



## THESIS / THÈSE

### MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

#### Le facteur de transcription HIF-1 dans la réponse du kératinocyte épidermique aux stress

Deprez, Guillaume

*Award date:*  
2009

*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**

**LE FACTEUR DE TRANSCRIPTION HIF-1 DANS LA REPONSE DU  
KERATINOCYTE EPIDERMIQUE AUX STRESS**

**Mémoire présenté pour l'obtention  
du grade académique de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire**

Guillaume DEPPEZ

Janvier 2009

**Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix**  
**FACULTE DES SCIENCES**  
Secrétariat du Département de Biologie  
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR  
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20  
E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

## **Le facteur de transcription HIF-1 dans la réponse du kératinocyte épidermique aux stress**

DEPREZ Guillaume

### Résumé

Le facteur de transcription HIF-1 est l'élément régulateur central de la réponse cellulaire à l'hypoxie. Il s'agit d'une protéine hétérodimérique composée d'une sous-unité  $\alpha$  et d'une sous-unité  $\beta$  exprimée de façon constitutive. Récemment, le rôle de ce facteur de transcription a été décrit au niveau de l'épiderme dans la réponse systémique de l'organisme à l'hypoxie. Par ailleurs, des résultats récents montrent l'activation du facteur HIF-1 en conditions non-hypoxiques dans les kératinocytes à la suite d'une perturbation de leur homéostasie. Notre travail s'intéresse au facteur de transcription HIF-1 dans la réponse des kératinocytes à différents stress cellulaires que sont l'hypoxie, le stress oxydatif et la déplétion en cholestérol. L'objectif de ce travail est de caractériser si ce facteur de transcription représente un acteur clé dans la réponse des kératinocytes aux stress. Notre travail montre que les kératinocytes répondent à l'hypoxie en activant le facteur de transcription HIF-1. Un traitement par l' $H_2O_2$ , suivi ou non d'une incubation en hypoxie, ne permet pas de stabiliser HIF-1 $\alpha$  dans les kératinocytes. Ces observations suggèrent l'implication d'une signalisation sensible aux conditions rédox des cellules dans la régulation de la stabilisation de la sous-unité  $\alpha$  du facteur de transcription HIF-1 en hypoxie. L'extraction du cholestérol membranaire par un traitement avec la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine (M $\beta$ CD), un polysaccharide cyclique, perturbe les « lipid rafts » et la signalisation sous-jacente, mais n'induit pas la stabilisation de HIF-1 $\alpha$  dans les kératinocytes. Cependant, notre étude montre une stabilisation de HIF-1 $\alpha$  dans les kératinocytes qui ont été traités avec la M $\beta$ CD et incubés en hypoxie. L'utilisation de la molécule PD169316 suggère l'implication de la MAPK p38 dans la signalisation régulant le niveau d'expression de HIF-1 $\alpha$  induit par l'hypoxie dans les cellules déplétées en cholestérol. Cependant, l'inhibiteur n'a aucun effet sur la stabilisation de la sous-unité  $\alpha$  dans les kératinocytes en conditions d'hypoxie seules. La MAPK p38 pourrait dès lors être impliquée dans la signalisation hypoxique menant à la stabilisation de HIF-1 $\alpha$  lorsque son activation est préalable à l'hypoxie dans les kératinocytes. Cette hypothèse nécessitera d'être approfondie dans la suite du travail. Le facteur de transcription HIF-1 est donc inductible dans les kératinocytes mais ne représente cependant pas un acteur clé dans la réponse de ceux-ci face aux stress oxydatif ou à une disruption des « lipid rafts » membranaires.

Mémoire de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Janvier 2009

**Promoteur:** Y. Poumay

**Co-promoteur :** C. Michiels

## ***Remerciements,***

Au terme de ces dix mois passés au sein du département cellules et tissus, je tiens tout d'abord à remercier mon promoteur, le Professeur Yves Poumay, pour son accueil, sa disponibilité et pour l'intérêt qu'il a toujours manifesté vis-à-vis de mon travail de recherche. Je remercie également mon co-promoteur, le Professeur Carine Michiels, pour m'avoir éclairé, guidé et surtout encouragé tout au long de ce travail. Je voudrai également leur dire un tout grand merci pour leur patience et leurs corrections judicieuses lors de la construction de ce mémoire.

Je voudrai également dire un tout grand merci à Ganka pour son aide et ses conseils très utiles qu'elle m'a apportés tout au long de ce travail.

Je remercie Conny, Sylvianne, Séverine, Aurélie et Emilie pour leur joie de vivre et leur patience face aux nombreuses questions que j'ai pu leur poser. Un tout grand merci à Frédérique pour ses remarques pertinentes et ses conseils.

Merci à Françoise Herphelin, Valérie De Glas et Daniel Van Vlaender pour leurs conseils et leur aide au laboratoire. Je remercie également Madame Annie Degen, Madame Michèle Leclercq-Smekens et Patrick Glesner pour leur sympathie. Merci aussi à tous les membres du LabCeTi que je n'ai pas cité mais que je n'oublie pas pour autant.

Je remercie aussi les membres de l'URBC, particulièrement toute l'équipe HIF pour leur accueil chaleureux et leur disponibilité.

C'est l'occasion de remercier tous les autres mémorants de 2<sup>ème</sup> Maîtrise pour les glorieux moments passés ensemble. Un tout grand merci à Pépit, Céline et Sophie pour leur soutien et leur patience.

Je tiens aussi à remercier toute ma famille et surtout mes parents pour m'avoir permis la réalisation de mes projets et de m'avoir encouragé tout au long de ce travail.

Merci les kératinocytes !!!

Enfin, je remercie les personnes qui liront cet ouvrage. Merci de l'intérêt que vous lui portez.

## *Table des abréviations*

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNc	ADN complémentaire
AMP	Adénosine MonoPhosphate
AMPK	AMP Kinase
ARD-1	ADP-Ribosylation factor Domain protein-1
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	ARN messenger
ARNT	Aryl/hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator
ATP	Adenosine TriPhosphate
bHLH	basic Helix-Loop-Helix
BNIP3	Bcl2/adenovirus E1B 19kDA Interacting Protein 3
BSA	Bovin Serum Albumin
CO <sub>2</sub>	Dioxyde de carbone
Ct	Cycle threshold
DFO	Désferrioxamine
DMSO	DiMéthylSulfOxyde
dNTP	désoxyNucleotide TriPhosphate
EDTA	Ethylène Diamine Tétra Acétique
E2-EPF	E2-Endemic Pemphigus Foliaceus
eEF-2	eukaryotic Elongation Factor-2
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
eIF	eukaryotic Initiation Factor
EPO	Erythropoïétine
E.P.S.K	Epithélium Pavimenteux Stratifié Kératinisé
ERK1/2	Extracellular Regulated Kinase 1/2 (p44/p42 MAPK)
FIH-1	Factor Inhibiting HIF-1
GPI	GlycosylPhosphatidylInositol
GPx	Glutathion Peroxydase
GSK-3 $\beta$	Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$
HB-EGF	Heparin-Binding EGF like Growth Factor

HBS	HIF-1 Binding Site
Hdm-2	Human double minute-2
HIF-1	Hypoxia-Inductible Factor-1
HIF-1 $\alpha$	Hypoxia-Inductible Factor-1 alpha
HIF-1 $\beta$	Hypoxia-Inductible Factor-1 beta
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peroxyde d'hydrogène
HSP27	Heat Shock Protein-27
HSP90	Heat Shock Protein-90
HRE	Hypoxia Response Element
HRP	Horse Radish Peroxidase
IRES	Internal Ribosome Entry Site
JNK	Jun N-terminal Kinase
kDA	kiloDalton
LDHA	Lactate DésHydrogénase-A
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
M $\beta$ CD	Méthyl- $\beta$ -cyclodextrine
MKP-1	MAP Kinase Phosphatase 1
MNK	MAPK-interacting Kinase
mTOR	mammalian Target Of Rapamycin
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
NF $\kappa$ B	Nuclear Factor- $\kappa$ B
NLS	Nuclear Localisation Sequence
NO	Nitric Oxide
NOS	Nitric Oxide Synthase
O <sub>2</sub>	Oxygène
ODD	Oxygen-dependent Degradation Domain
PABP	Poly-Adenylated Binding Protein
PAS	Per-ARNT-Sim
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PERK	PKR-like ER Kinase
PFA	ParaFormAldéhyde
PHD	Prolyl Hydroxylase
PI3K	PhosphatidylInositol-3 Kinase

PIB	Phosphatase Inhibitor Buffer
PIC	Protease Inhibitor Cocktail
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine Kinase C
PP2B	Protein Phosphatase 2B
p70S6K	70-kDA ribosomal protein S6 Kinase
PVDF	PolyVinylidène DiFluoride
pVHL	Protéine von Hippel Lindau
REDD-1	REgulated Development and DNA-damage response-1
ROS	Reactive Oxygen Species
SDS	Sodium Dodécyl Sulphate
Shh	Sonic hedgehog
SLOS	Smith-Lemli-Opitz syndrome
SOD	SuperOxyde Dismutase
SSAT-2	Spermidine/Spermine-N-AcéthylTransférase-2
SUMO-1	Small Ubiquitin-like Modifier-1
TAD	TransActivation Domain
TEMED	N'N'N'-Tétra-Méthyl-EthylèneDiamine
TNF- $\alpha$	Tumor Necrosis Factor- $\alpha$
TSC1/2	Tuberous Sclerosis 1/2
UCP	Ubiquitin Carrier Protein
UPR	Unfolded Protein Response
UVB	Ultra-Violet B
VDU-2	VHL-interacting De-Ubiquitylating enzyme-2

# Table des matières

## INTRODUCTION

<b>1. La peau</b> .....	<b>1</b>
1.1. Généralités .....	1
1.2. Structure et organisation de la peau .....	1
1.2.1. L'hypoderme .....	1
1.2.2. Le derme .....	1
1.2.3. La jonction dermo-épidermique .....	2
1.2.4. L'épiderme .....	2
1.3. La différenciation épidermique .....	4
1.3.1. Le kératinocyte et les kératines .....	4
1.3.2. La prolifération et la différenciation des kératinocytes .....	4
1.3.3. Le psoriasis .....	5
1.4. La cicatrisation cutanée .....	6
<b>2. Le stress épidermique</b> .....	<b>6</b>
2.1. La déplétion en cholestérol membranaire .....	7
2.1.1. Généralités .....	7
2.1.2. Le cholestérol membranaire et les « lipid rafts » .....	8
2.1.3. L'extraction du cholestérol membranaire par la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine .....	9
2.1.4. Effets de la déplétion du cholestérol membranaire dans les kératinocytes .....	9
2.2. Le stress oxydatif .....	10
2.2.1. Généralités .....	10
2.2.2. La production des ROS .....	10
2.2.3. Les systèmes antioxydants de protection .....	11
2.2.4. Effets du peroxyde d'hydrogène dans les kératinocytes .....	12
2.3. L'hypoxie et le facteur de transcription HIF-1 .....	13
2.3.1. L'hypoxie .....	13
2.3.2. Le facteur de transcription HIF-1 .....	14
2.3.2.1. Découverte .....	14
2.3.2.2. Structure de HIF-1 .....	14
2.3.2.3. Régulation de l'activité et activation de HIF-1 .....	15
2.3.2.4. Les gènes cibles induits par le facteur de transcription HIF-1 .....	19
<b>3. La peau et le facteur de transcription HIF-1</b> .....	<b>19</b>
<b>4. Objectifs</b> .....	<b>21</b>

## MATERIEL ET METHODES

<b>1. Culture des kératinocytes humains épidermiques</b> .....	<b>22</b>
1.1. Matériel .....	22
1.2. Méthodes .....	22
1.2.1. Culture primaire .....	22
1.2.2. Culture secondaire .....	23
1.2.3. Congélation des kératinocytes .....	23
1.2.4. Culture tertiaire .....	23
<b>2. Traitement des kératinocytes</b> .....	<b>24</b>
2.1. Incubation sous hypoxie .....	24
2.1.1. Matériel .....	24

2.1.2.	Méthode.....	- 24 -
2.2.	Extraction du cholestérol membranaire par la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine .....	- 25 -
2.2.1.	Matériel .....	- 25 -
2.2.2.	Méthode.....	- 25 -
2.3.	Traitement des kératinocytes par le peroxyde d'hydrogène (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	- 25 -
2.3.1.	Matériel .....	- 25 -
2.3.2.	Méthode.....	- 25 -
2.4.	Traitement des kératinocytes par la desféroxamine (DFO).....	- 25 -
2.4.1.	Matériel .....	- 25 -
2.4.2.	Méthode.....	- 26 -
2.5.	Traitement des kératinocytes par l'interleukine-1 $\alpha$ (IL-1 $\alpha$ ).....	- 26 -
2.5.1.	Matériel .....	- 26 -
2.5.2.	Méthode.....	- 26 -
2.6.	Traitement des kératinocytes par des inhibiteurs de kinases.....	- 26 -
2.6.1.	Matériel .....	- 26 -
2.6.2.	Méthode.....	- 26 -
<b>3.</b>	<b>Test de viabilité cellulaire : mesure de la libération de la LDH.....</b>	<b>- 27 -</b>
3.1.	Principe.....	- 27 -
3.2.	Matériel .....	- 27 -
3.3.	Méthode.....	- 27 -
<b>4.</b>	<b>Analyse des protéines par Western blot.....</b>	<b>- 28 -</b>
4.1.	Principe.....	- 28 -
4.2.	Matériel .....	- 28 -
4.3.	Méthodes .....	- 28 -
4.3.1.	Extraction des protéines .....	- 28 -
4.3.2.	Dosage de la concentration en protéines par la méthode de Bradford .....	- 29 -
4.3.3.	Préparation des échantillons.....	- 29 -
4.3.4.	Electrophorèse .....	- 29 -
4.3.5.	Transfert .....	- 29 -
4.3.6.	Saturation et incubation avec les anticorps .....	- 30 -
4.3.7.	Révélation.....	- 30 -
<b>5.</b>	<b>Analyse de l'expression génique par PCR en temps réel.....</b>	<b>- 30 -</b>
5.1.	Principe.....	- 30 -
5.2.	Matériel .....	- 31 -
5.3.	Méthodes .....	- 31 -
5.3.1.	Extraction de l'ARN total .....	- 31 -
5.3.2.	Rétro-transcription .....	- 32 -
5.3.3.	PCR en temps réel .....	- 32 -
<b>6.</b>	<b>Marquage en immunofluorescence.....</b>	<b>- 33 -</b>
6.1.	Principe.....	- 33 -
6.2.	Matériel .....	- 33 -
6.3.	Méthode.....	- 33 -

## RESULTATS

<b>1.</b>	<b>L'effet de l'hypoxie sur la viabilité des kératinocytes.....</b>	<b>- 35 -</b>
<b>2.</b>	<b>Effet de l'hypoxie sur l'activité de HIF-1.....</b>	<b>- 36 -</b>
2.1.	Analyse de l'induction de HIF-1 $\alpha$ .....	- 36 -
2.2.	Analyse de l'expression de deux gènes cibles de HIF-1 .....	- 37 -
2.3.	Analyse des voies de signalisation induites par l'hypoxie .....	- 37 -

<b>3. L'effet de l'hypoxie sur la physiologie des kératinocytes .....</b>	<b>38 -</b>
3.1. Analyse de l'expression d'HB-EGF .....	38 -
3.2. Analyse de l'expression des marqueurs de différenciation .....	39 -
<b>4. Effet du stress oxydatif sur l'abondance de HIF-1<math>\alpha</math> .....</b>	<b>39 -</b>
<b>5. Effet de la déplétion en cholestérol sur l'abondance de HIF-1<math>\alpha</math> .....</b>	<b>40 -</b>
<b>6. Effet du stress oxydatif ou d'une déplétion en cholestérol combiné à l'hypoxie sur l'activité de HIF-1.....</b>	<b>42 -</b>
6.1. Analyse de l'induction de HIF-1 $\alpha$ .....	42 -
6.2. Analyse des voies de signalisation induites au cours des différents traitements combinés à l'hypoxie .....	43 -
6.3. Analyse de l'expression de deux gènes cibles de HIF-1 .....	44 -
<b>7. Effet du stress oxydatif ou d'une déplétion en cholestérol combiné à l'hypoxie sur la physiologie du kératinocyte .....</b>	<b>45 -</b>
7.1. Analyse de l'expression d'HB-EGF .....	45 -
7.2. Analyse de l'expression des marqueurs de différenciation .....	46 -
<b>8. Etude du rôle de la MAPK p38 sur l'abondance de HIF-1<math>\alpha</math> suite à un stress oxydatif ou une déplétion en cholestérol combiné à l'hypoxie .....</b>	<b>46 -</b>
8.1. Etude des effets de l'inhibition de la MAPK p38 sur l'abondance de HIF-1 $\alpha$ lors des différents traitements étudiés .....	46 -
8.2. Recherche des effets de l'inhibition de la MAPK p38 sur l'abondance de HIF-1 $\alpha$ en présence d'IL-1 $\alpha$ en hypoxie.....	49 -

## DISCUSSION ET PERSPECTIVES

<b>1. Effets de l'hypoxie .....</b>	<b>50 -</b>
<b>2. Effets d'un stress oxydatif combiné ou non à l'hypoxie .....</b>	<b>53 -</b>
<b>3. Effets d'une déplétion en cholestérol combinée ou non à l'hypoxie .....</b>	<b>55 -</b>
<b>4. Conclusion.....</b>	<b>58 -</b>

## BIBLIOGRAPHIE

# INTRODUCTION

# 1. La peau

## 1.1. Généralités

La peau est l'un des organes les plus importants du corps humain en regard de sa surface et de sa masse. Son poids totalise environ 15% du poids total du corps humain adulte, sa surface représente jusqu'à 2 m<sup>2</sup> et son épaisseur varie de 1,5 à 4 mm selon la région anatomique.

La peau a pour fonction principale d'établir une barrière de protection contre les atteintes de l'environnement tout en permettant certains échanges entre le milieu intérieur et le milieu extérieur. De plus, grâce à un système vasculaire complexe, la peau intervient dans la thermorégulation, la régulation de la pression artérielle, la synthèse de l'érythropoïétine et la défense immunitaire de l'organisme. L'innervation cutanée, assurée par un réseau composé de fibres myélinisées, de terminaisons nerveuses libres et de corpuscules tactiles, permet la perception des variations et des agressions extérieures comme le toucher, les vibrations, la pression, la température et la douleur. Enfin, elle est le siège de nombreux processus métaboliques qui sont modulés par les conditions physiologiques de l'organisme ainsi que par les conditions de l'environnement.

## 1.2. Structure et organisation de la peau

La peau humaine normale est constituée de l'intérieur vers l'extérieur, de trois compartiments distincts : l'hypoderme, le derme et l'épiderme séparé du derme par la jonction dermo-épidermique (figure 1.1A).

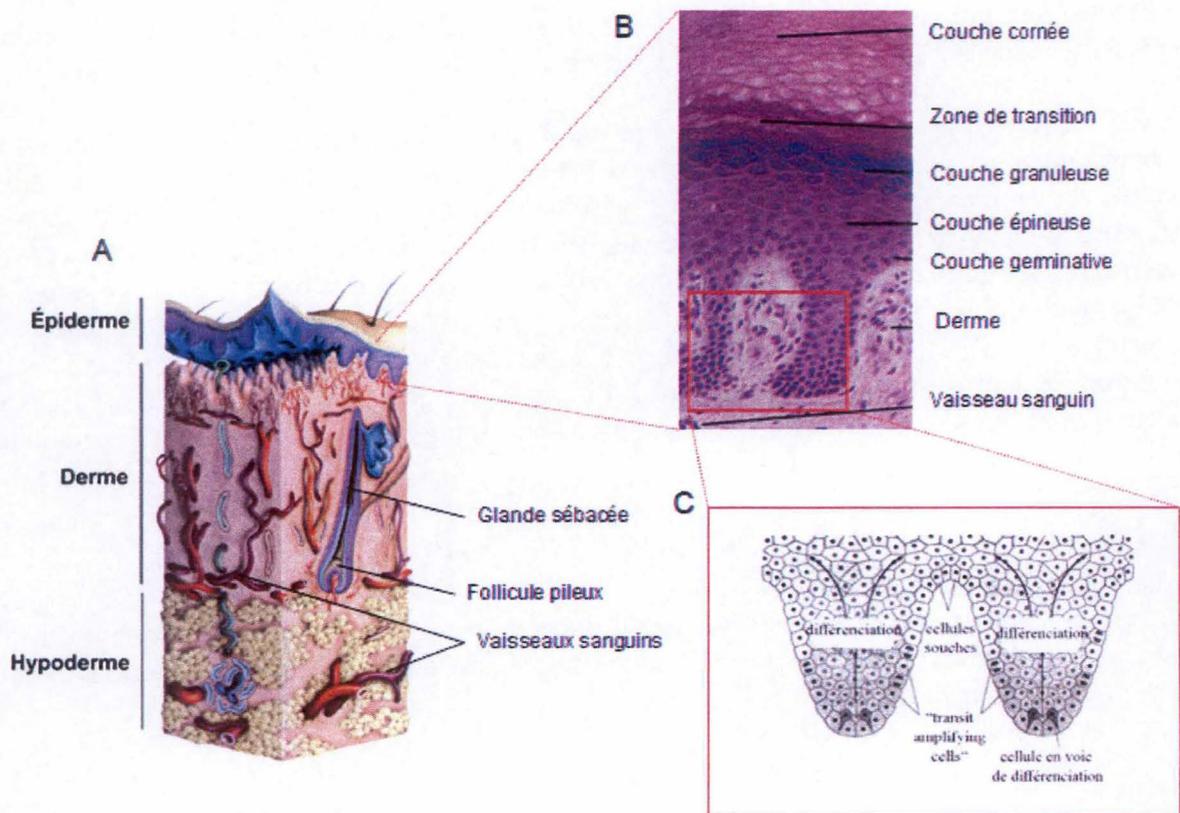
### 1.2.1. L'hypoderme

L'hypoderme ou tissu sous-cutané, est un tissu adipeux séparant le derme et les plans aponévrotiques et musculaires sous-jacents. Il est constitué de travées conjonctives qui cloisonnent les lobes adipeux. Les cellules adipeuses qui le constituent sont des cellules mésenchymateuses différenciées, riches en triglycérides et en acides gras, qui interviennent dans le stockage énergétique sous forme de graisse. En outre, l'hypoderme possède également un rôle de protection mécanique et thermique.

### 1.2.2. Le derme

Le derme, d'épaisseur très variable selon les régions du corps, est un tissu conjonctif fibro-élastique composé de cellules et de fibres baignant dans une substance amorphe appelée substance fondamentale. L'ensemble « fibres et substance fondamentale » est regroupé sous le nom de matrice extracellulaire. Histologiquement, le derme est divisé en deux zones : la zone papillaire superficielle et la zone réticulaire profonde.

- Le derme papillaire représente un tissu conjonctif lâche qui s'insinue entre les crêtes de l'épiderme, formant ainsi les papilles dermiques. Il est composé d'un réseau de faisceaux de collagène relativement fins et orientés perpendiculairement à la membrane basale épidermique. Ces faisceaux baignent dans une substance interfibrillaire abondante constituée de protéoglycanes, de glycosaminoglycanes et de



**Figure 1.1** : Structure et organisation de la peau. (A) La peau est formée par l'épiderme, le derme et l'hypoderme. (B) Représentation de l'épiderme et des couches qui le constituent : la couche cornée, la couche granuleuse, la couche épineuse et la couche basale (ou germinative). Ce schéma représente un épithélium kératinisé de type B. (C) Organisation de la couche basale avec les cellules qui la constituent : les cellules souches, les cellules amplificatrices transitoires et les cellules post-mitotiques en cours de différenciation. ([www.cours.cegep-st-jerome.qc.ca](http://www.cours.cegep-st-jerome.qc.ca) / [www.archimede.bibl.ulaval.ca](http://www.archimede.bibl.ulaval.ca)).

fibres élastiques. Cette partie du derme est riche en vaisseaux sanguins et en cellules, principalement des fibroblastes.

- Le derme réticulaire profond qui se différencie du derme papillaire par un tissu conjonctif dense constitué de faisceaux de fibres de collagène entremêlées à des fibres élastiques, de plus en plus épais vers la profondeur du derme. Le derme réticulaire contient peu de substance fondamentale et peu de cellules conjonctives.

Le derme contient également les annexes épithéliales cutanées telles que les follicules pileux, les glandes sudoripares et sébacées, ainsi qu'un réseau vasculaire, lymphatique et nerveux contribuant au maintien de l'intégrité de l'organisme tout entier (figure 1.1A).

### 1.2.3. La jonction dermo-épidermique

La jonction dermo-épidermique appelée aussi membrane (ou lame) basale épidermique est une structure complexe séparant l'épiderme du derme, élaborée à la fois par les kératinocytes basaux et les fibroblastes dermiques. Elle peut être divisée en quatre zones allant de l'épiderme vers le derme :

- la membrane plasmique des kératinocytes basaux avec leur structure d'attache : les hémidesmosomes. Ces derniers sont formés d'une plaque intracellulaire et de composants transmembranaires qui constituent un lien permettant l'attachement des kératinocytes basaux de l'épiderme au derme adjacent.
- la lamina lucida traversée par des filaments d'ancrage riches en laminine. Ces filaments, plus nombreux au niveau des hémidesmosomes, forment un complexe d'adhérence continu avec ces derniers en se liant à la surface des kératinocytes.
- la lamina densa, majoritairement constituée de collagène de type IV, forme la zone d'ancrage des filaments issus de l'épiderme et de la zone fibrillaire.
- la zone fibrillaire qui contient des fibrilles d'ancrage reliant la lamina densa de la membrane basale à des plaques d'ancrage dans le derme papillaire et formées de collagène VII.

La jonction dermo-épidermique assure des fonctions fondamentales : elle possède un rôle de support mécanique pour l'adhérence de l'épiderme au derme et un rôle de barrière sélective permettant le contrôle des échanges moléculaires et cellulaires entre les deux compartiments. Elle est également, à travers les glycoprotéines qui la constituent, en particulier les laminines, le support de l'adhérence et de la migration des kératinocytes lors de la restauration de l'intégrité épidermique, étape fondamentale de la cicatrisation cutanée.

### 1.2.4. L'épiderme

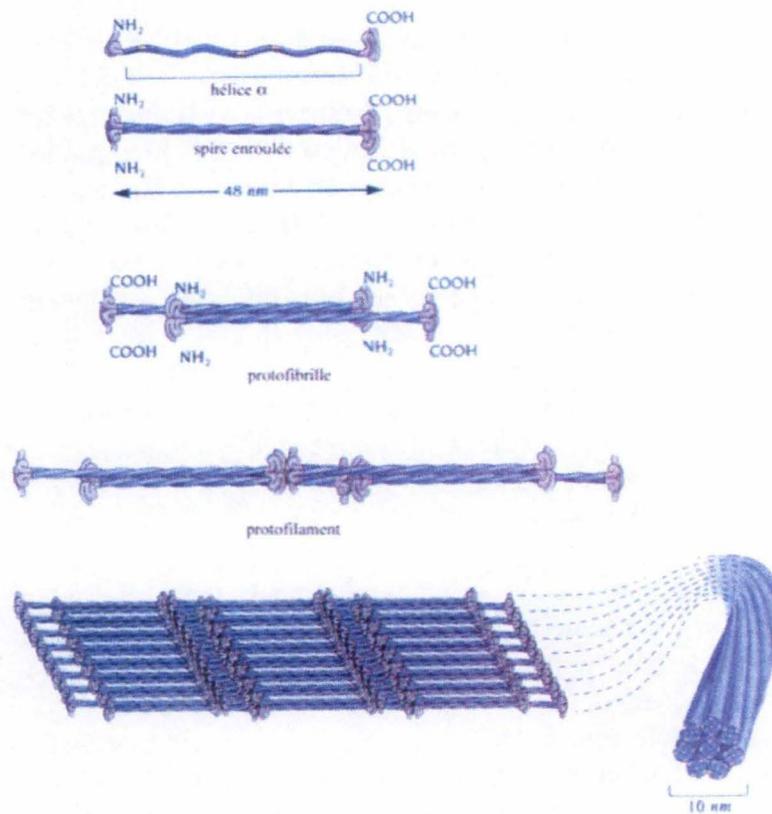
L'épiderme est la couche épithéliale de surface en contact avec l'environnement extérieur. Différents types cellulaires s'organisent au sein de l'épiderme. On retrouve les mélanocytes, lieu de synthèse et de maturation de la mélanine, qui sont responsables de la pigmentation de la peau et qui garantissent la photoprotection du tissu épidermique. Les cellules de Langerhans font aussi partie de la population cellulaire épidermique en formant un réseau de cellules "sentinelles" chargées de présenter aux lymphocytes les antigènes exogènes déposés sur la peau, induisant ainsi une réponse immunitaire de type cellulaire. On retrouve également les cellules de Merckel qui jouent un rôle de mécanorécepteurs en s'associant à des terminaisons nerveuses. Enfin, il y a les kératinocytes qui constituent le type cellulaire majoritaire de l'épiderme formant environ 90% de la population cellulaire épidermique.

## Introduction

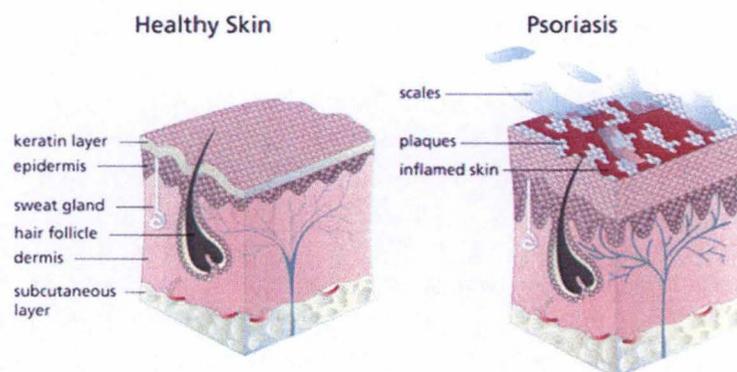
Ceux-ci sont disposés jointivement en strates superposées, et leur différenciation aboutit à la formation d'une couche de cellules mortes remplies de kératine : la couche cornée. L'épiderme est donc un épithélium pavimenteux stratifié kératinisé (E.P.S.K). Il existe deux types d'E.P.S.K différents en fonction de l'épaisseur et de la morphologie de la couche cornée. La majorité de la surface corporelle est constituée d'un E.P.S.K de type B caractérisé par une couche cornée mince qui varie entre 75 et 150  $\mu\text{m}$  alors que dans les régions de forte friction telles que la paume des mains ou la plante des pieds, on trouve un E.P.S.K de type A. Ce dernier est caractérisé par une couche cornée plus importante, pouvant atteindre 600  $\mu\text{m}$ , permettant une meilleure résistance.

L'épiderme s'organise en quatre couches morphologiquement différentes (figure 1.1B), générées par la différenciation complexe et progressive que subissent les kératinocytes au cours de leur migration depuis la base de l'épiderme jusqu'à la surface du tissu épidermique (en environ 30 jours chez l'homme) :

- **La couche basale** (*stratum basale*) repose sur la jonction épidermo-dermique ; elle est formée d'une assise de cellules cubiques ou cylindriques présentant des radicelles au niveau de leur pôle basal, augmentant l'ancrage de l'épiderme au derme. La couche basale constitue l'assise germinative de l'épiderme (figure 1.1C). Les cellules souches de la couche basale assurent le renouvellement constant de l'épiderme grâce à leur pouvoir prolifératif illimité. Ces cellules basales, par leurs mitoses asymétriques, assurent à la fois leur renouvellement et la formation d'autres cellules basales, les cellules amplificatrices transitoires, caractérisées par un potentiel de multiplication rapide mais limité. Ces dernières prolifèrent pour former des cellules filles post-mitotiques qui vont alors s'orienter vers la surface de l'épiderme, quitter la couche basale et entamer leur processus de différenciation épidermique.
- **La couche épineuse ou couche malpighienne** (*stratum spinosum*) surmonte la couche basale et forme environ trois à cinq assises de cellules polyédriques. Ces dernières possèdent les mêmes organites que les cellules de la couche basale. En outre, elles présentent des tonofilaments de kératine assemblés en faisceaux qui traversent le cytosol et s'insèrent dans des desmosomes. Cette structure, qui forme de petites épines sur la surface cellulaire, relie étroitement les cellules et confère à la peau une résistance et une souplesse. Les kératinocytes épineux sont le siège d'une synthèse active de protéines.
- **La couche granuleuse** (*stratum granulosum*) constitue la dernière couche nucléée de l'épiderme et est composée d'une à trois assises de cellules aplaties d'aspect pavimenteux. Les kératinocytes de cette couche acquièrent des granules de kératohyaline qui contiennent une substance (la profilaggrine) qui renforce les liaisons entre les filaments de kératine. Les cellules granuleuses sont également caractérisées par la présence de vésicules remplies de glycolipides et phospholipides, les corps d'Odland ou corps lamellaires, qui ont pour fonction d'imperméabiliser l'espace intercellulaire. Lors de l'ascension vers la couche cornée, le noyau des kératinocytes entre en pycnose et les autres organites disparaissent progressivement.
- **La couche cornée** (*stratum corneum*) est composée de kératinocytes morts, anucléés appelés cornéocytes. Ceux-ci sont complètement aplatés et possèdent un cytosquelette robuste dû à l'organisation en réseau dense des filaments intermédiaires de kératine. Ce réseau, formant une barrière fonctionnelle entre l'organisme et son environnement,



**Figure 1.2 :** Représentation des différentes étapes menant à la formation des tonofilaments de kératines. Deux kératines s'enroulent et forment une unité de base hétérodimérique. Ensuite deux dimères s'alignent pour former une unité tétramérique. L'assemblage de tétramères forme alors de manière successive le protofilament, dont l'assemblage forme les protofibrilles, qui à leur tour forment le tonofilament ou le filament intermédiaire.  
 (www.archimede.bibl.ulaval.ca).



**Figure 1.3 :** Comparaison entre une peau saine et une peau psoriasique. Représentation des squames argentées, caractéristiques des plaques de psoriasis à la surface de la peau chez les patients atteints de psoriasis.  
 (www.web-libre.org/dossiers/psoriasis,3043.html).

est consolidé par la filaggrine issue des grains de kératohyaline. L'espace intercellulaire est quant à lui enrobé par le contenu des corps d'Odland, rendant la couche cornée imperméable. A la surface du tissu épidermique, les cornéocytes perdent leurs liaisons intercellulaires et se détachent progressivement donnant lieu au phénomène de desquamation.

L'épaisseur de l'épiderme est ainsi maintenue par une prolifération en profondeur au niveau de la couche basale et d'une desquamation des cellules en surface. Une régulation précise maintient l'équilibre entre prolifération, différenciation et mort cellulaire et garantit de cette façon l'homéostasie de l'épiderme.

### 1.3. La différenciation épidermique

#### 1.3.1. Le kératinocyte et les kératines

Le kératinocyte, qui rappelons-le représente le type cellulaire majoritaire de l'épiderme, se différencie pour former la barrière cutanée. Il produit des protéines fibreuses, les kératines. Ces kératines sont des protéines fibreuses organisées en filaments intermédiaires qui forment, avec les microfilaments d'actine et les microtubules, le cytosquelette des kératinocytes (figure 1.2). Ces protéines du cytosquelette possèdent un domaine central en hélice  $\alpha$  d'environ 310 acides aminés, encadré par un domaine amino-terminal et un domaine carboxy-terminal non hélicoïdaux de taille extrêmement variable. Il existe deux classes de kératines : les kératines acides et les kératines basiques. Une kératine acide et une kératine basique forment une unité de base hétérodimérique qui résulte de l'enroulement de la région en hélice  $\alpha$  des deux kératines. La cohésion entre les deux protéines est garantie par l'établissement de nombreux ponts disulfures. Deux dimères s'alignent ensuite pour former une unité tétramérique. L'assemblage de tétramères forme de manière successive le protofilament, dont l'assemblage forme les protofibrilles, qui à leur tour forment le filament intermédiaire d'une épaisseur de 10 nm (Fuchs et Marchuk, 1983). Selon le stade de différenciation des kératinocytes, les kératines épidermiques peuvent représenter de 30% à 85% des protéines cellulaires. En effet, lorsque les kératinocytes entament leur programme de différenciation et migrent vers la surface cutanée, les gènes qui contrôlent la synthèse des kératines s'expriment par paire et de manière successive. L'expression de gènes codant pour des kératines est donc spécifique d'un état de différenciation cellulaire. On retrouve principalement quatre kératines différentes : les kératines 10 (K10) et 14 (K14) pour le type acide et les kératines 1 (K1) et 5 (K5) pour le type basique. Selon la classification établie par Moll *et al.* (1982), les cellules de la couche basale en mitose expriment majoritairement K5 et K14 alors que les cellules des couches suprabasales en cours de différenciation, expriment préférentiellement la paire K1 et K10.

#### 1.3.2. La prolifération et la différenciation des kératinocytes

L'épiderme peut être subdivisé en deux zones distinctes. Une zone de prolifération, formée par la couche basale de l'épiderme et une zone de différenciation regroupant toutes les couches suprabasales. Comme explicité ci-dessus, les kératinocytes de la couche basale de l'épiderme sont fonctionnellement hétérogènes. Les cellules souches sont caractérisées par un potentiel de division lent, mais illimité, ce qui les rend responsables du renouvellement continu de l'épiderme au cours de la vie. Ces cellules souches donnent naissance aux cellules amplificatrices transitoires dotées d'une capacité mitotique rapide mais limitée. Le détachement de la lame basale des cellules post-mitotiques issues des cellules amplificatrices

transitoires, marque le début du processus de différenciation de ces cellules dans les couches suprabasales.

L'activité mitotique intensive ainsi que la différenciation précoce des kératinocytes au niveau de la couche basale est stimulée par des facteurs de croissance. Ceux-ci se lient à leurs récepteurs membranaires respectifs et initient des cascades de phosphorylation ou de déphosphorylation menant à l'expression de gènes caractéristiques de la prolifération, de la différenciation ou d'autres réponses cellulaires (Pittelkow *et al.*, 1993). Par exemple, la liaison du facteur de croissance épidermique (EGF) au récepteur de l'EGF (EGFR) favorise la prolifération ainsi que la migration des kératinocytes (Cheng *et al.*, 1993).

La différenciation des kératinocytes s'accompagne d'un ensemble de transformations morphologiques et biochimiques qui aboutit, comme nous l'avons dit précédemment, à la formation de cellules anucléées et aplaties, les cornéocytes, qui desquament à la surface de la peau. Au niveau de la couche épineuse, les kératinocytes expriment les kératines K1 et K10, mais plus les kératines K5 et K14 (Poumay *et al.*, 1998). Plusieurs modifications ont également lieu lors de la transition de la couche épineuse à la couche granuleuse. On observe tout d'abord une perte de l'intégrité de la membrane plasmique qui induit l'entrée massive d'ions calcium dans les cellules. Ces ions activent alors toute une série de processus catalytiques détruisant la plupart des organites cellulaires. L'augmentation de la concentration en  $Ca^{++}$  intracellulaire induit également l'expression abondante de l'involucrine, une protéine précurseur de l'enveloppe cornée, ainsi que l'activation de la transglutaminase I. C'est alors que commence la différenciation terminale des kératinocytes. L'involucrine est un des substrats de la transglutaminase I. Cette enzyme catalyse la formation de ponts iso-peptidiques entre l'involucrine et d'autres protéines précurseurs de l'enveloppe cornée telles que la loricrine. Le résultat de cette réticulation enzymatique est la formation d'une enveloppe cornée insoluble sous la membrane plasmique des cellules différenciées (Eckert, 2002). Cette enveloppe cornée de nature protéique procure la résistance mécanique de l'épiderme. Une autre protéine marqueur de différenciation joue aussi un rôle important dans la structure de l'épiderme : il s'agit de la filaggrine, stockée sous forme de précurseur dans les granules de kératohyaline. Cette protéine permet l'assemblage des filaments de kératine en macrofilaments en les unissant par des ponts disulfures, induisant ainsi une réorganisation du cytosquelette des kératinocytes (Eckert *et al.*, 2005). Enfin, c'est également à cette étape qu'interviennent les corps d'Odland au niveau de la couche granuleuse. Ces derniers fusionnent avec la membrane plasmique des kératinocytes et libèrent leur contenu dans l'espace intercellulaire, assurant ainsi l'imperméabilité cutanée.

### 1.3.3. Le psoriasis

Le psoriasis est une dermatose chronique très répandue. Il est caractérisé par une prolifération et une différenciation anormale des kératinocytes. En effet, il est causé par une division excessivement rapide des cellules épidermiques et par leur migration précoce de la couche basale à la couche cornée, causant des inflammations localisées. Dans le psoriasis, les kératinocytes immatures élaborent une kératine anormale qui forme des squames argentées, caractéristiques des plaques de psoriasis à la surface de la peau (figure 1.3). Ces plaques se retrouvent principalement chez l'homme au niveau des genoux, des coudes et du cuir chevelu. Les causes exactes du psoriasis ne sont pas encore bien connues. Cependant, des recherches récentes permettent de croire que cette dermatose serait causée par une déficience du système immunitaire. L'hérédité et la génétique sont aussi mises en cause mais le ou les gènes qui seraient responsables de la maladie n'ont pas encore été formellement identifiés. Une

## Introduction

composante liée aux facteurs environnementaux et psychologiques semble également intervenir. De façon intéressante, de nombreuses analogies ont été trouvées entre les événements moléculaires et cellulaires aboutissant à une plaque de psoriasis et ceux impliqués dans la cicatrisation cutanée : la plaque de psoriasis ressemble ainsi à une cicatrisation qui n'en finit pas.

### 1.4. La cicatrisation cutanée

Il est important de rappeler qu'une des fonctions principales de la peau est d'isoler et de protéger l'organisme contre les atteintes de l'environnement. Par conséquent, toute lésion tissulaire provoque ainsi une cascade de réponses qui conduit à la formation d'un tissu de réparation et à la cicatrisation cutanée.

La cicatrisation nécessite l'intégration de nombreux processus dynamiques impliquant à la fois la matrice extracellulaire du tissu lésé, des médiateurs solubles ainsi que des cellules sanguines et mésenchymateuses. Les processus de réparation tissulaire suivent une cinétique spécifique qui permet de distinguer trois phases (Clark, 1985):

- l'hémostase et la détersion du foyer de la lésion;
- la formation du tissu de granulation qui rétablit l'intégrité du derme et la ré-épithélialisation ;
- le remodelage tissulaire qui aboutit à la formation d'un tissu résistant, ressemblant à la peau d'origine.

Une blessure cutanée d'origine mécanique, chimique, thermique ou immunologique, ainsi que plusieurs facteurs de stress qui seront décrits dans les paragraphes suivants, peuvent être à l'origine du processus de cicatrisation cutané.

## 2. Le stress épidermique

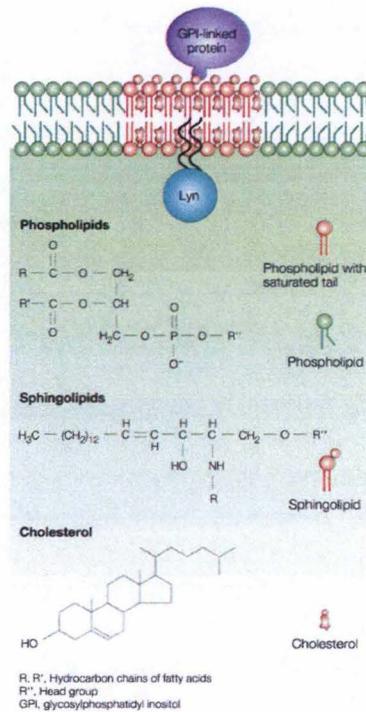
Les organismes vivent dans des environnements auxquels ils se sont adaptés. Chaque variation de leur environnement constitue un stress répercuté à tous les niveaux de l'organisme et jusqu'à la cellule. Ces stress peuvent être de nature variée : augmentation de température, diminution de l'oxygénation, perturbation des lipides membranaires, pression mécanique, exposition à des molécules chimiques, à des radiations, à des agents pathogènes... Pour vivre, un organisme doit donc être adapté à son environnement mais aussi être capable de se protéger des effets nocifs induits par les variations de son environnement. Au niveau cellulaire, les mécanismes de protection mis en place pour surmonter ces stress sont caractérisés par un bouleversement de l'expression génique : malgré une synthèse protéique générale nettement diminuée, la synthèse de plusieurs protéines, telles que des cytokines, des facteurs de croissance, des facteurs de transcription ou tout autre acteur protéique assurant l'intégrité de l'organisme, est fortement activée ou augmentée. Les principes généraux sont également applicables à l'épiderme et aux kératinocytes qui le constituent.

## 2.1. La déplétion en cholestérol membranaire

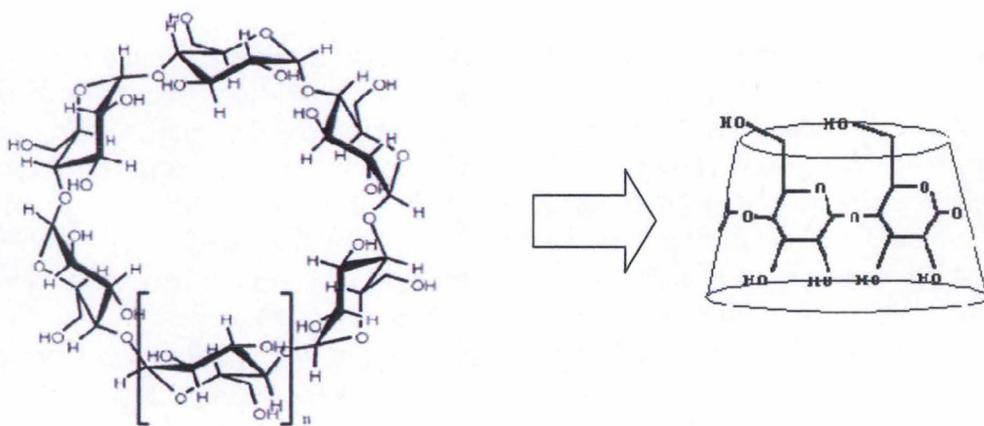
### 2.1.1. Généralités

Le cholestérol est un lipide de la famille des stéroïdes. Il possède une fonction hydroxyle et noyau tétracyclique à 27 atomes de carbone. Cette molécule est amphiphile, principalement hydrophobe à l'exception du groupement -OH qui est hydrophile. Ce stérol est apporté à l'organisme par consommation de produits d'origine animale mais il peut également être synthétisé par les cellules hépatiques à la suite d'une cascade de voies de synthèse complexes. Le cholestérol est généralement acheminé jusqu'aux tissus sous forme d'ester de cholestérol via la circulation sanguine. Ce transport s'effectue grâce à des complexes de protéines et de lipides hydrosolubles ; les lipoprotéines. Par contre, étant donné que l'épiderme est un tissu non vascularisé, les cellules épidermiques synthétisent elles-mêmes le cholestérol dont elles ont besoin. Le cholestérol sert de précurseur pour la synthèse d'autres stéroïdes tels que les hormones sexuelles ou la vitamine D. De plus, il représente un des composants essentiels de la membrane plasmique des cellules animales, ayant un rôle structural, mais également de multiples implications fonctionnelles. En effet, le cholestérol intervient dans beaucoup de processus cellulaires comme la transduction du signal, l'adhérence cellulaire, l'apoptose et l'activation de réponses immunitaires (Simons et Toomre, 2000). Afin que ces processus physiologiques se déroulent de manière optimale, il est très important de maintenir l'homéostasie du cholestérol. L'absorption cellulaire à partir des lipoprotéines ainsi que la biosynthèse du cholestérol au niveau cellulaire sont strictement régulés. Cependant, une concentration trop élevée en cholestérol libre peut avoir des effets toxiques et provoquer des maladies comme l'athérosclérose ou la maladie d'Alzheimer (Simons *et al.*, 2002). La mutation de certains gènes encodant les enzymes impliquées dans la synthèse du cholestérol peut être une autre cause de maladies. Certaines d'entre-elles ont notamment un impact au niveau de l'épiderme ; c'est le cas du syndrome de Smith-Lemli-Opitz et de la desmostérolose (Roux *et al.*, 2000 ; Waterham, 2001).

- Le syndrome de Smith-Lemli-Opitz (SLOS) est une maladie génétique due à une mutation du gène codant pour l'enzyme 7-déhydrocholestérol réductase de la voie de synthèse du cholestérol. Ce syndrome est caractérisé par des quantités plasmatiques et tissulaires faibles en cholestérol et anormalement élevés en certains intermédiaires stérols. Les patients ont des anomalies morphogénétiques et congénitales ainsi qu'un problème mental et de croissance. Les anomalies liées aux problèmes de développement sont en partie dues à la protéine Shh (Sonic hedgehog) qui doit, en temps normal, fixer une molécule de cholestérol pour être activée (Roux *et al.*, 2000). Les patients atteints du SLOS présentent également une sensibilité cutanée anormale aux ultraviolets A. Enfin, une étude a mis en évidence une désorganisation des « lipid rafts » dans les cellules épidermiques de ces patients (Valencia *et al.*, 2006).
- La desmostérolose est une maladie génétique rare due à une mutation du gène codant pour l'enzyme 3 $\beta$ -hydroxysterol  $\Delta$ 24-réductase (DHCR24) de la voie de synthèse du cholestérol. Cette maladie est caractérisée par une augmentation du précurseur desmostérol (Waterham *et al.*, 2001). Etant donné la faible incidence de cette maladie, la littérature donne que très peu d'information concernant les anomalies physiologiques dues à cette maladie. Néanmoins, une étude utilisant des souris knock-out pour le gène DHCR24 a montré une hyperprolifération de kératinocytes immatures au niveau de l'épiderme de ces souris. Cette hyperprolifération est similaire à celle observée dans le psoriasis (Schafer *et al.*, 2006).



**Figure 1.4 :** Représentation de la composition d'un « lipid raft » représenté par la portion rouge au centre de la membrane schématisée. Les trois composés essentiels de ces microdomaines sont également illustrés (phospholipide, sphingolipide et le cholestérol).  
([www.nature.com](http://www.nature.com)).



**Figure 1.5 :** Structure de la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine. Les liens  $\alpha$ -1-4 des sept molécules de glucose composant la molécule induisent la formation d'une cavité qui permet d'extraire une molécule de cholestérol.  
([www.pharmj.com/.../education/parenteral2.html](http://www.pharmj.com/.../education/parenteral2.html)).

### 2.1.2. Le cholestérol membranaire et les « lipid rafts »

Les protéines et les lipides sont les composants chimiques principaux des membranes cellulaires. Les propriétés physico-chimiques des molécules de lipides vont en déterminer plusieurs caractéristiques dont leur organisation générale en bicouche et la perméabilité. La composition lipidique de chacun des feuillet de la bicouche lipidique est différente et varie en fonction de la nature de la membrane considérée. Il existe plusieurs espèces de lipides dans les membranes. Ils peuvent être regroupés en trois familles principales chez les mammifères : les glycéro-phospholipides, les sphingolipides et le cholestérol.

Le cholestérol entre dans la composition de la membrane plasmique des cellules animales, dans des pourcentages divers (15 à 50 % des lipides totaux) selon les cellules et les tissus. Inséré entre les molécules de glycéro-phospholipides, le cholestérol joue un rôle important dans la fluidité membranaire, notamment lors de changements de température. A des températures modérées, le cholestérol diminue la fluidité membranaire en diminuant les mouvements des glycéro-phospholipides. En effet, il limite le désordre du fait de sa rigidité, supérieure à celle des queues hydrocarbonées des acides gras, et de sa mobilité réduite au sein de la membrane. Par contre, à des températures plus basses, ce stéroïde interfère avec les queues hydrocarbonées des acides gras, empêchant l'entassement des glycéro-phospholipides et augmentant ainsi la fluidité de la membrane plasmique.

L'étude du cholestérol membranaire a mené à la découverte du concept de « lipid rafts » ou de radeaux lipidiques. Il s'agit de microdomaines lipidiques du feuillet externe de la membrane plasmique ayant une composition différente du reste de celle-ci (Schroeder *et al.*, 1994) (figure 1.4). On retrouve en effet de nombreuses protéines à ancre GPI (glycosylphosphatidylinositol) ainsi que des protéines possédant des groupements acyls, myristates et palmitates. Une plus grande proportion de cholestérol et de sphingolipides enrichit également ces « lipid rafts ». Ceux-ci possèdent des chaînes hydrocarbonées saturées contrairement aux lipides retrouvés dans le reste de la membrane. Ces radeaux lipidiques régulent de nombreux processus cellulaires, tels que la prolifération, l'apoptose et la mobilité cellulaire (Gniadecki et Bang, 2003). Il est effectivement connu que ces microdomaines possèdent une affinité particulière pour plusieurs protéines de signalisation (Simons et Toomre, 2000). De plus, la localisation de ces protéines au sein des « lipid rafts » influence leur activité. En effet, certains récepteurs membranaires à activité tyrosine kinase, tels que le récepteur à l'EGF, se trouvent préférentiellement associés à ces structures lipidiques et peuvent être modulés par certains lipides, dont le cholestérol. Ces microdomaines sont également enrichis en cavéoline, flotilline, protéine kinase C (PKC) et en protéines G (Pike, 2005). Les « lipid rafts » sont dès lors considérés comme des plateformes de signalisation.

Puisque le cholestérol est considéré comme l'agent dynamique de l'intégrité de la membrane plasmique et principalement des « lipid rafts », l'extraction de celui-ci va engendrer une perturbation de la structure de ces radeaux et donc générer un stress entraînant une réponse de la cellule dans le but de maintenir son intégrité. Il est possible de détruire ces structures lipidiques en mettant les cellules en présence de substances qui retirent ou complexent le cholestérol membranaire.

### 2.1.3. L'extraction du cholestérol membranaire par la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine

La méthyl- $\beta$ -cyclodextrine (M $\beta$ CD) est un polysaccharide cyclique composé d'une chaîne de sept molécules de glucose reliées entre elles par des liens glycosidiques  $\alpha$ -1,4 et portant un nombre variable de groupements méthyl. Le cycle des sept sucres forme une cavité centrale dans laquelle peut se loger une molécule de cholestérol (figure 1.5). La M $\beta$ CD permet donc d'extraire le cholestérol des membranes, ce qui déstabilise la structure des radeaux lipidiques. Chez les kératinocytes, une diminution du cholestérol membranaire est constatée après un traitement avec la M $\beta$ CD à 7,5 mM pendant une heure (Jans *et al.*, 2004).

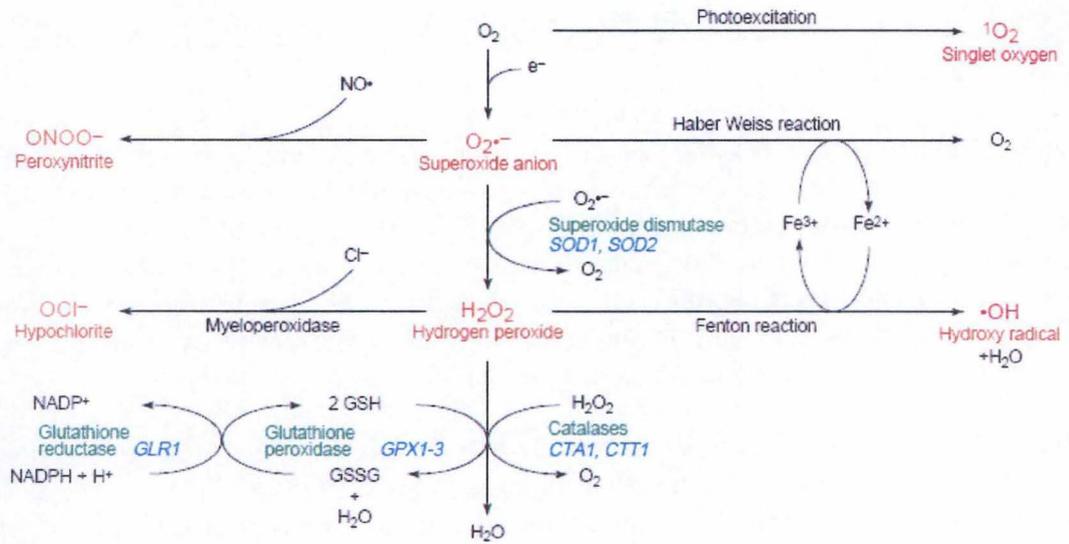
Les rôles physiologiques du cholestérol au niveau de la membrane plasmique peuvent être étudiés en suivant les conséquences d'un traitement des cultures cellulaires avec la M $\beta$ CD. Remarquons par ailleurs qu'il existe également d'autres composés pour extraire le cholestérol des membranes cellulaires tels que la filipine ou la saponine. Cependant, contrairement à la M $\beta$ CD qui a la capacité de se déplacer dans l'environnement aqueux présent autour des membranes, ces derniers se fixent directement au niveau de celles-ci (Pike, 2005).

### 2.1.4. Effets de la déplétion du cholestérol membranaire dans les kératinocytes

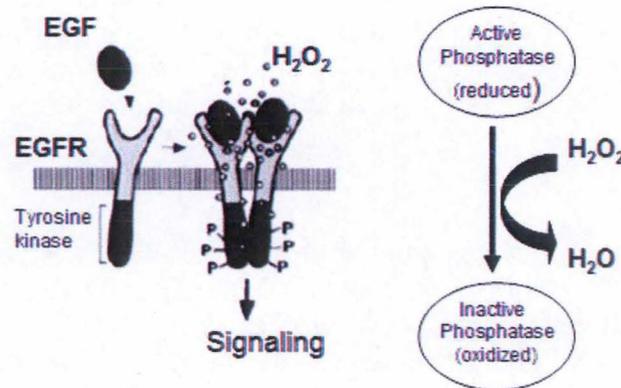
L'extraction du cholestérol par la M $\beta$ CD peut induire l'expression de certains marqueurs de différenciation. Cet effet est différent selon l'état de différenciation des kératinocytes. L'expression génique des marqueurs de différenciation tels que l'involucrine, K10 et K14 n'est pas modifiée dans les cultures de kératinocytes non différenciées ou en cours de différenciation, traitées à la M $\beta$ CD. Par contre, les cultures déplétées en cholestérol induisent la synthèse d'involucrine et répriment l'expression des kératines 10 et 14, lorsqu'elles sont à un stade précoce de différenciation. De plus, on observe simultanément l'activation de la MAP kinase p38 et de la protéine de stress HSP27 (heat shock protein 27) dans ces cellules (Jans *et al.*, 2004). Les résultats de cette étude suggèrent que le cholestérol joue un rôle important dans la régulation de l'expression génique des marqueurs de différenciation épidermique.

La M $\beta$ CD active également le récepteur au facteur de croissance épidermique (EGFR) qui joue un rôle important dans la voie de signalisation de survie cellulaire. Une étude a démontré que l'activation de EGFR par la M $\beta$ CD est un phénomène indépendant de son ligand ; le récepteur s'autophosphoryle d'abord et dimérise ensuite. Une fois le récepteur activé, il peut agir ensuite sur la prolifération cellulaire en activant les MAP kinases ERK1/2 (Lambert *et al.*, 2006).

Une étude récente, réalisée au sein du laboratoire, montre qu'une déplétion du cholestérol des membranes des kératinocytes active la MAPK p38 et induit l'expression rapide et importante du facteur de croissance HB-EGF (heparin-binding EGF like growth factor) (Mathay *et al.*, 2008). Remarquons par ailleurs que cette caractéristique est semblable à celle observée dans les cellules de patients atteints de psoriasis. Ces résultats suggèrent que HB-EGF est un facteur de réponse précoce au stress qui permet probablement la réparation rapide de l'épiderme et donc le maintien de son homéostasie.



**Figure 1.6 :** Représentation des réactions qui conduisent à la production des espèces réactives de l'oxygène. L'oxygène moléculaire est réduit par des étapes monovalentes aboutissant à la production de l'ion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ), du radical hydroxyle ( $\bullet OH$ ), ainsi que du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). Ces radicaux libres dérivés de l'oxygène peuvent voir leurs effets inhibés par les enzymes anti-oxydantes telles que la superoxyde dismutase, la glutathion peroxydase et la catalase. (Temple *et al.*, 2005).



**Figure 1.7 :** Illustration du modèle proposé pour la production d' $H_2O_2$  extracellulaire suite à l'activation de EGFR par la liaison de son ligand. L'interaction entre le ligand et son récepteur génère du peroxyde d'hydrogène qui diffuse à travers la membrane plasmique et inactive les phosphatases associées au récepteur, modulant de cette façon la cascade de signalisation dépendante de l'activation de EGFR. (De Yulia *et al.*, 2005).

Malgré l'activation du récepteur de l'EGF et de la voie de ERK1/2, la M $\beta$ CD pourrait induire l'apoptose. Une étude a suggéré l'implication des « lipid rafts » dans l'activation d'Akt qui est un facteur de signalisation connu pour être impliqué dans la voie de survie cellulaire par les facteurs de croissance et les cytokines. Lorsque Akt est phosphorylé et donc actif, il peut inactiver les molécules pro-apoptotiques telles que Bad et la caspase-9, et stimuler, via le facteur de transcription NF $\kappa$ B (Nuclear Factor- $\kappa$ B), la transcription de gènes anti-apoptotiques. Cette étude démontre qu'une désorganisation de ces « rafts », par un traitement à la M $\beta$ CD, inactive le facteur Akt. L'inactivation de ce facteur peut donc rendre les molécules pro-apoptotiques actives et mener à la voie de l'apoptose. De plus, la M $\beta$ CD induirait également l'apoptose par la voie mitochondriale en activant notamment la caspase-3 suite à un changement du potentiel membranaire mitochondrial. Il semble donc que l'intégrité des « lipid rafts » soit indispensable pour la survie des kératinocytes (Bang *et al.*, 2005).

## 2.2. Le stress oxydatif

### 2.2.1. Généralités

Notre peau peut être soumise à une grande variété d'agressions physiques, infectieuses, chimiques ou métaboliques. La plupart de ces agressions débouchent sur un stress oxydant, dû à l'exagération d'un phénomène physiologique, normalement très contrôlé, la production de radicaux libres dérivés de l'oxygène, souvent appelé espèces réactives de l'oxygène (ROS, reactive oxygen species). Les ROS sont fortement impliqués dans le cancer, le vieillissement, les maladies neurodégénératives, pulmonaires, cardiovasculaires et les inflammations chroniques. En effet, ces ROS sont capables d'engendrer des dommages qui touchent aussi bien les acides nucléiques que les protéines ou les lipides, altérant ainsi le bon fonctionnement des cellules. La peau est particulièrement vulnérable aux attaques des radicaux libres et cela est désormais connu du grand public par le biais des cosmétiques ou de l'action des rayons ultraviolets (UV). Cependant, même si ces dérivés de l'oxygène peuvent être générés par des facteurs environnementaux, ils peuvent être également produits au cours du fonctionnement normal des cellules et notamment au cours de la respiration cellulaire au niveau des mitochondries (Halliwell et Gutteridge, 1990).

### 2.2.2. La production des ROS

Il y a 3,5 milliards d'années, la transformation de l'énergie solaire en énergie chimique stockable grâce à un flux d'électrons a favorisé l'apparition de la vie sur terre. Dans les cellules eucaryotes aérobies, cette transformation d'énergie s'appelle la phosphorylation oxydative. L'oxydation d'une molécule correspond à la perte d'un électron et nécessite une deuxième molécule capable d'accepter cet électron ; c'est-à-dire de subir la réduction. Lorsque la molécule qui subit la réduction est l'oxygène, plusieurs dérivés peuvent être produits : l'ion superoxyde ( $O_2^{\cdot -}$ ), l'ion peroxyde ( $O_2^{2-}$ ), le radical hydroxyle ( $OH^{\cdot}$ ), ainsi que des dérivés organiques tels que le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) (figure 1.6).

La réactivité de ces radicaux libres dérivés de l'oxygène est très variable selon la nature du radical. Ainsi, parmi les radicaux formés chez les êtres vivants, l'anion superoxyde n'est pas très réactif mais constitue un précurseur d'autres espèces plus réactives comme le radical hydroxyle. Le radical superoxyde est une espèce est très instable car il se dismute spontanément en  $H_2O_2$  et en  $O_2$ . L'anion superoxyde peut également réagir avec le peroxyde d'hydrogène pour former le radical hydroxyle. Le peroxyde d'hydrogène peut, quant à lui, être produit directement par l'action d'une oxydase sur l'oxygène moléculaire.

Les êtres vivants trouvent leur énergie dans la respiration cellulaire dont la dernière étape réduit par quatre électrons la molécule d'oxygène sans libérer d'espèces radicalaires. Toutefois, au contact entre l'oxygène et certaines protéines de la chaîne respiratoire, une libération d'anions superoxydes se produit lors du transport des électrons. Même si cette production de radicaux superoxydes reste relativement faible et ne concerne qu'un faible pourcentage de l'oxygène utilisé par la respiration, elle peut s'amplifier lorsque la respiration devient plus intense suite à un effort physique ou à une hyperoxie. De plus, certaines cellules inflammatoires et immunes peuvent produire des cytokines comme le TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor-  $\alpha$ ), qui sont capables d'induire la production de radicaux libres par la mitochondrie de cellules cibles (Hancock *et al.*, 2001). L'inflammation est par ailleurs une source importante d'espèces réactives de l'oxygène, produites directement par les cellules phagocytaires. Ces cellules possèdent une enzyme membranaire, la NADPH (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) oxydase, qui est capable d'utiliser l'oxygène moléculaire pour produire de grandes quantités d'anions superoxydes. La NADPH oxydase est une enzyme normalement dormante qui est activée uniquement lorsque les cellules phagocytaires sont stimulées. Ce mécanisme est capital dans la lutte anti-infectieuse car il permet la destruction des bactéries et des corps étrangers au cours de la phagocytose (Forman *et al.*, 2002). Plusieurs autres systèmes enzymatiques comme la hème oxygénase, le cytochrome P450 ou la xanthine oxydase produisent également des radicaux libres au cours de réactions biochimiques. Certains métaux de transition (par exemple le fer, le cuivre ou le chrome), non complexés, peuvent conduire à la formation de radicaux hydroxyles à partir de peroxyde d'hydrogène, par une réaction appelée réaction de Fenton (Forman *et al.*, 2002). Les rayonnements sont également des sources de radicaux libres oxygénés, soit par radiolyse lorsqu'il s'agit des rayons ionisants X ou gamma, soit en activant des molécules photosensibilisantes lorsqu'il s'agit des rayons ultraviolets qui vont, par ce mécanisme, produire des anions superoxydes (Cerutti, 1985). Plusieurs études ont par ailleurs démontré que les kératinocytes exposés aux ultraviolets B produisent du peroxyde d'hydrogène intracellulaire par un mécanisme encore inconnu (Peus *et al.*, 1998 ; Peus *et al.*, 1999).

### 2.2.3. Les systèmes antioxydants de protection

Dans le cas d'une production physiologique de radicaux libres, l'organisme dispose de systèmes efficaces de protection qui lui permettent de lutter contre ces espèces radicalaires. Ces systèmes de défense font intervenir des mécanismes de nature enzymatique (figure 1.6) représenté par (Hancock *et al.*, 2001):

- La superoxyde dismutase (SOD), capable d'éliminer l'anion superoxyde en produisant un composé moins réactif, le peroxyde d'hydrogène. Il existe trois formes majeures de superoxydes dismutases qui diffèrent entre elles par leur localisation et leur ion métallique situé au cœur de l'enzyme, qui catalyse le mécanisme réactionnel. On distingue la superoxyde dismutase à manganèse au niveau des mitochondries, celle à cuivre et celle à zinc dans le cytosol. La troisième, bactérienne, contient du fer.
- La glutathion peroxydase à sélénium (GPx), capable de réduire le peroxyde d'hydrogène par une réaction produisant deux molécules d'eau. Cette enzyme localisée dans le cytosol de la plupart des cellules ainsi que dans l'espace intermembranaire des mitochondries et dans le noyau.

## Introduction

- La catalase à cofacteur fer, capable à partir de deux molécules de peroxyde d'hydrogène de produire deux molécules d'eau et une molécule d'oxygène. La catalase est une enzyme localisée au sein de peroxysomes de la plupart des cellules.

Ce système de défense comporte également un dispositif d'antioxydants exogènes apporté par l'alimentation. La vitamine E, les caroténoïdes ou encore la vitamine C agissent en piégeant les radicaux libres et en captant l'électron célibataire, afin de transformer ces molécules réactives en d'autres molécules ou ions plus stables.

Le stress oxydant est le résultat d'un déséquilibre entre la production d'espèces réactives de l'oxygène et de leur dégradation par les mécanismes de défense. Par conséquent, le stress oxydant peut provenir d'une production exagérée de radicaux libres, comme on l'a expliqué ci-dessus, mais peut également survenir quand ces mécanismes de défense sont diminués.

### 2.2.4. Effets du peroxyde d'hydrogène dans les kératinocytes

Comme mentionné ci-dessus, les rayons ultraviolets sont capables d'induire une production de peroxyde d'hydrogène au sein des kératinocytes (Peus *et al.*, 1998). Des études ont montré que l' $H_2O_2$  induit par les UVB stimule la phosphorylation du récepteur épidermique à l'EGF (EGFR), qui active à son tour des voies de signalisation en aval, telles que la voie des ERK1/2 et la voie de la MAP kinase p38. Ces études montrent que les deux voies sont activées de manière indépendante et distincte dans le temps. La voie des ERK1/2 est activée en premier, suivie par l'activation de la MAPK p38 (Peus *et al.*, 1998 ; Peus *et al.*, 1999). Des études plus récentes confirment l'activation du récepteur à l'EGF par les radiations UVB et montrent en outre l'activation d'une autre voie de signalisation, celle de la phosphatidylinositol 3-kinase/Akt (PI3K/Akt), menant à l'activation de nombreux facteurs de transcription dont le facteur HIF-1 (Li *et al.*, 2006).

Les MAP kinases JNK et p38 sont également activées par les rayons ultraviolets chez les kératinocytes ; elles induisent l'apoptose et interviennent dans le vieillissement cellulaire par des mécanismes dépendants de la production des espèces réactives de l'oxygène (Peus *et al.*, 1998).

Les connaissances actuelles montrent que les radicaux libres dérivés de l'oxygène jouent aussi un rôle physiologique comme médiateur secondaire dans les voies de transduction du signal. En effet, plusieurs protéines impliquées dans la signalisation ou la régulation sont très sensibles au statut rédox de la cellule (Hancock *et al.*, 2001). C'est le cas de certains récepteurs membranaires et de nombreux facteurs de transcription dont HIF-1 (voir ci-dessous) (Kietzmann, 2005). Récemment, une étude a montré que la liaison du facteur de croissance EGF à son récepteur engendre la production de peroxyde d'hydrogène (De Yulia *et al.*, 2005). On ne connaît pas cependant les mécanismes par lequel l' $H_2O_2$  est produit, mais on pense néanmoins que la dimérisation du récepteur EGFR et le peroxyde d'hydrogène peuvent agir ensemble pour initier les voies de transduction du signal médiées par ce récepteur. De Yulia *et al.*, (2005) ont proposé un modèle selon lequel le peroxyde d'hydrogène, produit au niveau extracellulaire, peut diffuser à travers la membrane plasmique et inactiver les phosphatases associées au récepteur, modulant ainsi la cascade de transduction dépendante de l'activation d'EGFR (figure 1.7).

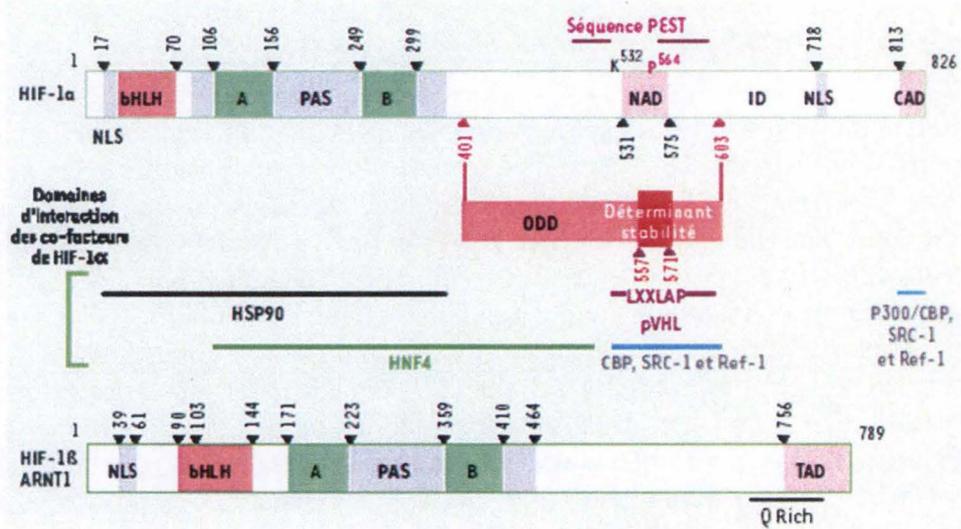
D'autres études se sont penchées sur l'activation du facteur de transcription HIF-1 dans la réponse des kératinocytes suite à une exposition au UVB. Celles-ci nous apprennent que les

UVB, par l'intermédiaire des radicaux libres dérivés de l'oxygène, induisent une variation de l'expression de la sous-unité  $\alpha$  du facteur HIF-1 par l'activation de la MAPK p38. Cette expression se déroule en deux phases successives ; une première phase où l'on trouve une faible expression de la sous-unité  $\alpha$  suivie d'une seconde où l'expression augmente fortement. Selon ces études, cette variation dans l'expression de la sous-unité  $\alpha$  est liée à la production consécutive des radicaux libres dérivés de l'oxygène dans un premier temps dans le cytoplasme et ensuite au niveau de la chaîne respiratoire (Rezvani *et al.*, 2007 ; Wunderlich *et al.*, 2007). Le rôle de ce facteur dans la régulation de l'homéostasie cellulaire et plus particulièrement au niveau de l'épiderme va être décrit dans le chapitre suivant.

### 2.3. L'hypoxie et le facteur de transcription HIF-1

#### 2.3.1. L'hypoxie

L'homme, comme la plupart des espèces animales, présente une dépendance totale vis-à-vis de l'oxygène. Son importance est capitale pour le bon fonctionnement des cellules et de l'organisme. L'oxygène est en effet l'accepteur final des électrons au niveau de la chaîne respiratoire dont l'activité consiste à générer l'ATP. Il est également utilisé dans les réactions d'oxydoréduction au niveau du métabolisme cellulaire. Sans un apport adéquat en oxygène, l'organisme est donc condamné à mourir rapidement. Durant l'embryogenèse, les organismes supérieurs développent des systèmes respiratoire et circulatoire complexes afin d'assurer la disponibilité en oxygène à toutes les cellules de l'organisme. Toute diminution de l'apport d'oxygène aux tissus, qui est désignée par le terme « hypoxie », entraîne une réponse physiologique générale de l'organisme induisant des mécanismes permettant de réguler rapidement la respiration pulmonaire et la perfusion tissulaire. Des structures spécialisées comme les corps carotidiens, localisés au niveau de la crosse aortique, sont sensibles à la teneur en oxygène du sang artériel tandis que les corps neuroépithéliaux, localisés au niveau des bifurcations des voies respiratoires, détectent le taux d'oxygène de l'air inspiré (Michiels, 2004). Une diminution de la pression partielle en oxygène atmosphérique induit également une synthèse importante de l'érythropoïétine (EPO) qui stimule la prolifération des globules rouges et par conséquent, le potentiel de transport de l'oxygène dans le sang. Ces mécanismes permettent alors à la circulation sanguine d'approvisionner de manière optimale les cellules en oxygène. La diminution de la concentration en oxygène dans l'environnement cellulaire et par conséquent dans les cellules, va également entraîner une réponse cellulaire spécifique. Dans les conditions d'hypoxie, la production d'ATP diminue car le métabolisme respiratoire mitochondrial ne peut plus se dérouler efficacement. Les cellules stimulent alors les voies métaboliques productrices d'énergie et répriment celles qui sont consommatrices d'énergie. De plus, lorsque l'ATP devient limitant, les cellules sont capables de redistribuer leur énergie entre les processus consommateurs d'ATP selon leur degré d'importance. Par exemple, les pompes ioniques ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$  et  $\text{Ca}^{2+}$  ATPases), dont le fonctionnement est indispensable pour maintenir l'intégrité cellulaire, reçoivent prioritairement l'énergie tandis que les synthèses protéiques et nucléotidiques sont les premières inhibées. Afin de satisfaire leurs besoins énergétiques, les cellules se tournent également vers la glycolyse, un processus anaérobie (Michiels, 2004). Si l'hypoxie se prolonge, des réponses à long terme se mettent en place grâce à l'activité du facteur de transcription HIF-1 qui régule l'expression de nombreux gènes codant pour les acteurs clés de ces réponses.



**Figure 1.8 :** Structure des sous-unités HIF-1 $\alpha$  et ARNT constituant le facteur de transcription HIF-1. Les différents domaines et motifs fonctionnels des deux sous-unités sont représentés ; les domaines bHLH et PAS, les deux motifs NLS, le domaine ODD, les deux domaines de transactivation (TAD-N et TAD-C), le motif ID et les deux séquences PEST. Les domaines d'interaction de HIF-1 $\alpha$  avec des co-facteurs sont également représentés. (Gothié et Pouyssegur, 2002).

## 2.3.2. Le facteur de transcription HIF-1

### 2.3.2.1. Découverte

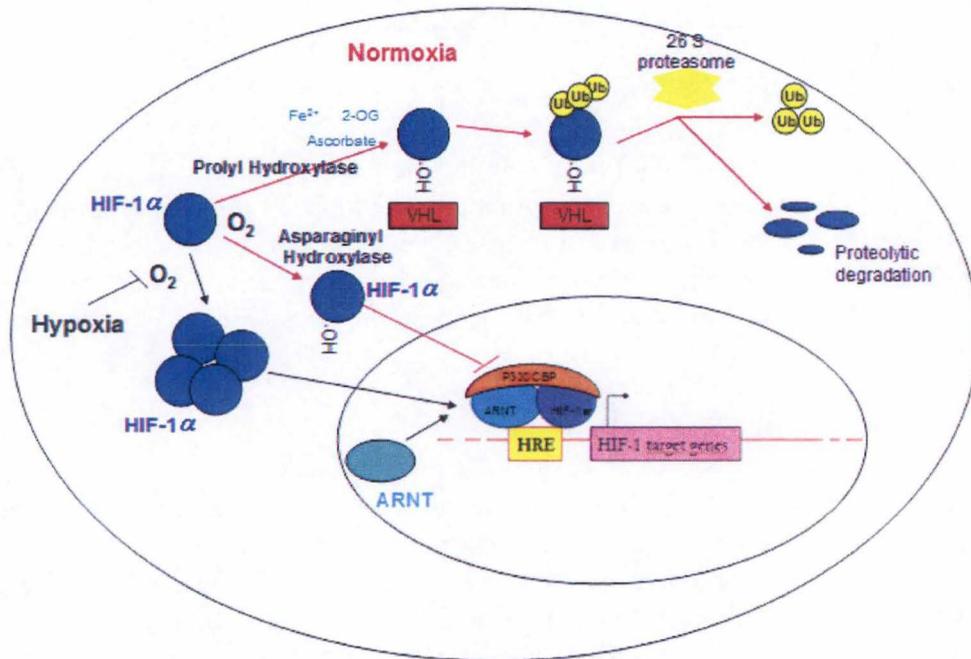
Le facteur de transcription HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor-1) fut initialement identifié en 1992 comme une protéine nucléaire spécifiquement induite par l'hypoxie (Semenza et Wang, 1992). C'est l'étude de la région promotrice du gène de l'érythropoïétine (EPO) liant le facteur HIF-1 lors d'une hypoxie prolongée, qui a permis de mettre en évidence une séquence *enhancer* en position 3' non codante du gène. Cette région sensible à l'oxygène fut nommée HRE (hypoxia response element).

### 2.3.2.2. Structure de HIF-1

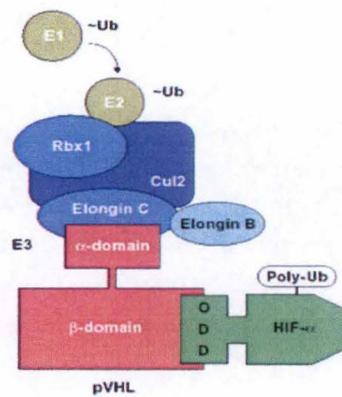
Le facteur de transcription HIF-1 est un complexe hétérodimérique composé de deux sous-unités : HIF-1 $\alpha$  et HIF-1 $\beta$ /ARNT (Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator) (figure 1.8). Ces sous-unités ont un poids moléculaire respectif de 120 kDa et 94 kDa pour une longueur de 826 et 789 acides aminés chez l'homme (Wang et Semenza, 1995). ARNT est une protéine constitutivement exprimée et localisée dans le noyau. Cette sous-unité n'est pas spécifique de la réponse adaptative à l'hypoxie contrairement à HIF-1 $\alpha$  qui est stabilisé lorsque la concentration en oxygène dans les tissus est faible. A ce jour, deux autres isoformes de HIF- $\alpha$  ont été décrites : HIF-2 $\alpha$  et HIF-3 $\alpha$ . HIF-1 $\alpha$  et HIF-2 $\alpha$  sont actuellement les mieux caractérisés. HIF-2 $\alpha$  semble agir de la même manière que HIF-1 $\alpha$ , par contre, sa localisation est plus restreinte et est spécifique de certains tissus (Wiesener *et al.*, 2003). D'autre part, HIF-3 $\alpha$  semble agir en tant qu'inhibiteur du facteur HIF-1 car il ne possède pas de domaine de transactivation. ARNT existe aussi sous trois isoformes (ARNT1, ARNT2 et ARNT3) issues d'un épissage alternatif (Wang *et al.*, 1995). L'existence d'isoformes de HIF- $\alpha$  ou des formes résultantes d'un épissage alternatif pouvant également fixer ARNT1 laisse supposer des phénomènes de compétition entre les différents éléments. Par ailleurs, la présence d'autres partenaires potentiels pour HIF-1 $\alpha$  (ARNT2 et ARNT3) laisse envisager d'autres hétérodimères fonctionnels pouvant interférer avec la voie centrale de la réponse cellulaire dépendante de HIF-1.

Les sous-unités : HIF-1 $\alpha$  et ARNT appartiennent à la même famille de protéines, contenant un domaine bHLH (basic Helix-Loop-Helix) (aa 17 à 71) et un domaine PAS (Per-ARNT-Sim) (aa 85 à 298) du côté N-terminal. Le motif HLH intervient dans la dimérisation des protéines tandis que la région basique qui le précède intervient dans la fixation et la spécificité de liaison de la protéine à l'ADN. Le domaine PAS constitue un second motif de dimérisation, mais il participe également à la liaison et à l'interaction avec d'autres protéines impliquées dans la régulation de HIF-1 (Wang *et al.*, 1995).

Plusieurs autres domaines ont été cartographiés sur la protéine HIF-1 $\alpha$ . Ainsi, HIF-1 $\alpha$  est doté de deux motifs NLS lui permettant de se localiser dans le noyau, et ce indépendamment de son partenaire ARNT. Au niveau des résidus 401 à 603, il existe un domaine particulier, le domaine ODD (Oxygen-dependent Degradation Domain) impliqué dans la régulation de la dégradation de la sous-unité HIF-1 $\alpha$ . Ensuite, cette sous-unité comporte deux domaines de transactivation : TAD-N ou NAD (TransActivation Domain N-terminal) et TAD-C ou CAD (TransActivation Domain C-terminal). Entre ces deux domaines, on retrouve un motif peu connu appelé ID (Inhibitory Domain). Enfin, deux séquences PEST (d'environ 20 aa) riches en proline, sérine, thréonine et acide glutamique ont été décrites pour HIF-1 $\alpha$  (Huang *et al.*, 1998).



**Figure 1.9 :** Représentation schématique de la régulation de la sous-unité  $\alpha$  du facteur de transcription HIF-1 en normoxie et en hypoxie. En normoxie, après son hydroxylation au niveau de son domaine ODD, HIF-1 $\alpha$  interagit avec pVHL ce qui conduira à sa poly-ubiquitination et à sa dégradation par le protéasome. En hypoxie, HIF-1 $\alpha$  n'est plus hydroxylé et peut alors transloquer dans le noyau et former le facteur de transcription complet et fonctionnel. (Deprez G. d'après Carroll et Ashcroft, 2005).



**Figure 1.10 :** Formation du complexe à activité E3 ubiquitine ligase. pVHL reconnaît les deux résidus proline hydroxylés au niveau du domaine ODD de HIF-1 $\alpha$  et s'associe ensuite avec les élongines B et C, la culline-2 et la ring-box 1. (www.nature.com).

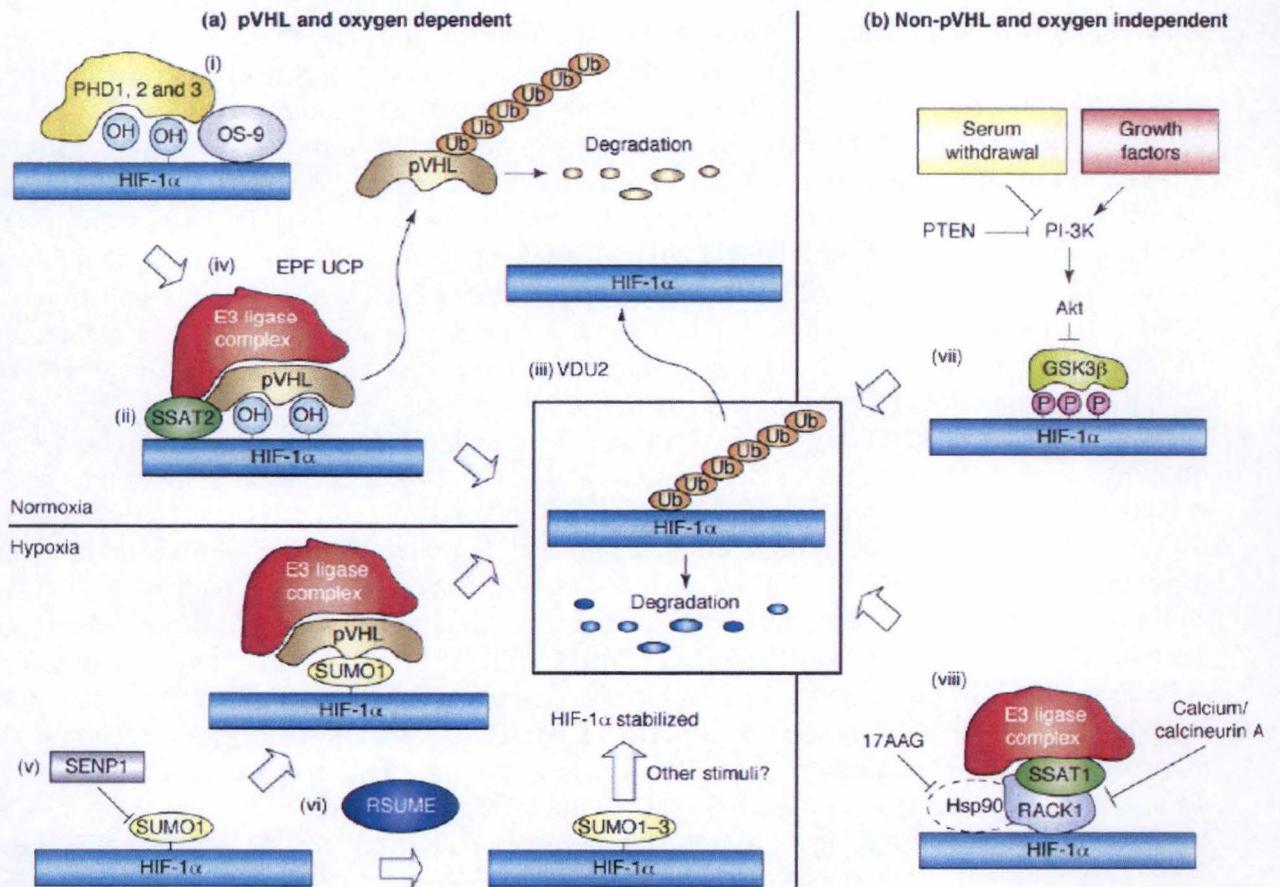
### 2.3.2.3. Régulation de l'activité et activation de HIF-1

➤ Régulation du niveau d'expression de HIF-1 $\alpha$  par dégradation (figure 1.11)

▪ **Voie de dégradation de HIF-1 $\alpha$  dépendante de pVHL**

Dans les conditions de normoxie, la sous-unité HIF-1 $\alpha$  est rapidement dégradée, et cela malgré qu'elle soit exprimée de façon constitutive (figure 1.9). En effet, en présence d'un taux d'oxygène suffisant (> 5% O<sub>2</sub>), HIF-1 $\alpha$  est hydroxylé par une prolyl hydroxylase (PHD) au niveau de deux résidus proline (Pro402 et Pro564) situés dans le domaine ODD. Les prolyl hydroxylases (PHDs) appartiennent à la superfamille des dioxygénases qui utilisent l'oxygène, l'ascorbate, le 2-oxoglutarate et des atomes de Fer comme substrats et co-substrats. Les PHDs transfèrent un atome d'oxygène sur les résidus proline de HIF-1 $\alpha$  alors que le second atome d'oxygène réagit avec le 2-oxoglutarate pour former du succinate et du dioxyde de carbone (Jaakkola *et al.*, 2001). L'hydroxylation de ces deux résidus proline constitue un motif d'interaction du complexe d'ubiquitination menant à la dégradation de la sous-unité HIF-1 $\alpha$  par le protéasome 26S (Huang *et al.*, 1998). Le facteur suppresseur de tumeur pVHL (protéine de von Hippel-Lindau), cible de mutations dans les cellules germinales donnant le syndrome de cancer héréditaire caractéristique de la maladie du même nom, est clairement impliqué dans ce mécanisme de dégradation. pVHL représente en fait la composante de la machinerie chargée de la reconnaissance de la sous-unité HIF-1 $\alpha$ . En effet, pVHL reconnaît la forme hydroxylée des deux résidus proline au niveau du domaine ODD et se fixe au domaine de transactivation TAD-N de HIF-1 $\alpha$ . pVHL s'associe ensuite avec les élongines B et C, la culline-2 et la ring-box 1, afin de former un complexe complet et fonctionnel présentant une activité E3 ubiquitine ligase (Semenza, 2001) (figure 1.10). Ce complexe peut alors polyubiquitiner HIF-1 $\alpha$  qui sera alors rapidement dégradé par le protéasome. L'acétylation de la lysine 532 par la N-acétyltransférase ARD-1 (ADP-ribosylation factor domain protein-1) favorise également l'interaction de pVHL avec la sous-unité HIF-1 $\alpha$  dans les conditions de normoxie. Il est important de spécifier qu'un autre facteur, Hdm2 (Human minute 2), faisant partie d'un complexe E3 ligase qui lie et dégrade le suppresseur de tumeur p53, peut également induire la dégradation de la sous-unité HIF-1 $\alpha$  par la voie du protéasome 26S. Cette dégradation se fait par une voie indépendamment de l'oxygène et nécessite la liaison de p53 à HIF-1 $\alpha$  (Ravi *et al.*, 2000). Dans les conditions d'hypoxie (< 5% O<sub>2</sub>), les prolyl hydroxylases sont inhibées par un manque d'oxygène. HIF-1 $\alpha$  n'est donc plus hydroxylé et n'interagit plus avec le complexe d'ubiquitination. La sous-unité  $\alpha$  est alors stabilisée et peut s'accumuler (figure 1.9).

Le facteur suppresseur de tumeur pVHL peut être lui-même sujet à une régulation par des mécanismes qui modulent sa stabilité ou son affinité pour la sous-unité HIF-1 $\alpha$  ou par les autres composants du complexe E3 ubiquitine ligase. Par exemple, un membre de la famille des enzymes E2, E2-EPF (E2-endemic pemphigus foliaceus) ubiquitin carrier protein (UCP), est capable d'ubiquitiner pVHL de manière spécifique et ainsi de mener à sa dégradation par le protéasome. De plus, il a été montré que la surexpression d'UCP est liée à une diminution de pVHL et à une augmentation du niveau d'expression de HIF-1 $\alpha$  dans de nombreuses lignées cellulaires ainsi que dans des tumeurs primaires et métastatiques (Jung *et al.*, 2006). Par conséquent, la dégradation de pVHL par le *carrier* E2-EPF pourrait expliquer en partie l'accumulation de HIF-1 $\alpha$  en normoxie. Par ailleurs, il existe également des régulateurs qui favorisent la dégradation de la sous-unité HIF-1 $\alpha$  en augmentant l'affinité de pVHL pour celle-ci. C'est le cas notamment de SSAT-2 (spermidine/spermine-N-acétyltransférase-2) qui se lie simultanément à la sous-unité HIF-1 $\alpha$ , au facteur pVHL et à l'élongine C, stabilisant



**Figure 1.11 :** Résumé de la régulation par dégradation du niveau d'expression de HIF-1 $\alpha$ . Les différentes voies de régulation sont soit dépendantes soit indépendantes de l'oxygène et du facteur pVHL. (Koh *et al.*, 2008).

ainsi leur interaction et favorisant la polyubiquitination de HIF-1 $\alpha$  et donc sa dégradation (Baek *et al.*, 2007).

### ▪ **Régulation par dé-ubiquitination**

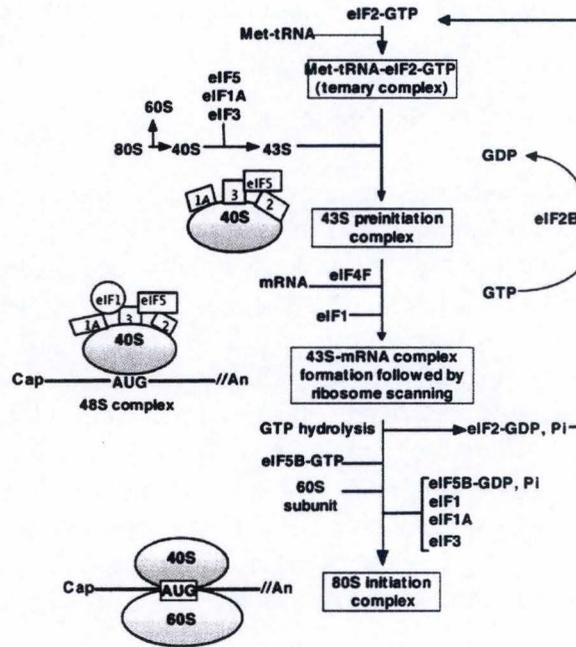
Il existe des protéases spécifiques qui ont la capacité de dé-ubiquitiner les protéines marquées par l'ubiquitination. Ces protéases, que l'on nomme DUBs (de-ubiquitylating enzymes), jouent un rôle important dans la régulation de la voie de dégradation ubiquitine-dépendante par le protéasome. VDU2 (pVHL-interacting de-ubiquitylating enzyme-2) est la seule enzyme identifiée à ce jour capable de dé-ubiquitiner HIF-1 $\alpha$  en condition de normoxie. En effet, VDU2 peut se lier à la sous-unité HIF-1 $\alpha$  et lui enlever la chaîne d'ubiquitines afin que celle-ci puisse échapper à la voie de dégradation. Cependant, VDU2 peut elle-même être ubiquitinée et dégradée en se liant au complexe pVHL-E3 ubiquitine ligase (Li *et al.*, 2002). Par conséquent, un certain équilibre entre l'ubiquitination et la dé-ubiquitination doit exister afin de maintenir un niveau d'expression de HIF-1 $\alpha$  en normoxie.

### ▪ **Régulation par sumoylation**

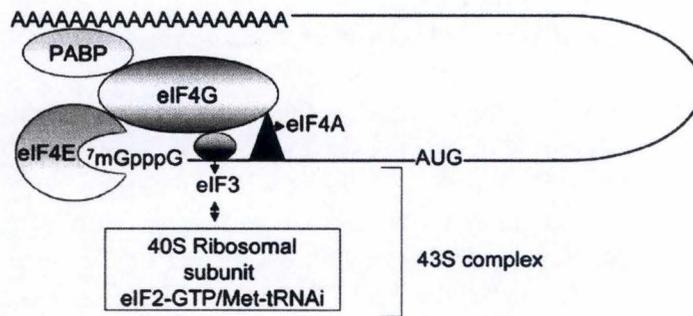
L'hypoxie peut induire l'expression de SUMO1 (Small Ubiquitin-like Modifier-1) et augmenter ainsi la sumoylation de HIF-1 $\alpha$ , un processus capable de stabiliser la protéine dans les conditions d'hypoxie (Shao *et al.*, 2004). Cependant, on a récemment démontré que la sumoylation de HIF-1 $\alpha$  peut également conduire à sa dégradation. En effet, en hypoxie, la sumoylation de la sous-unité HIF-1 $\alpha$  peut aussi favoriser la liaison du complexe pVHL-E3 ubiquitine ligase à celle-ci, et ce indépendamment de l'hydroxylation des résidus proline, menant à l'ubiquitination de HIF-1 $\alpha$  et à sa dégradation par le protéasome (Cheng *et al.*, 2007). La régulation de HIF-1 $\alpha$  par sumoylation reste néanmoins paradoxale et demande une étude plus approfondie afin d'en appréhender la portée exacte.

### ▪ **Voie de dégradation de HIF-1 $\alpha$ indépendante de pVHL**

La stabilité de HIF-1 $\alpha$  peut également être contrôlée par plusieurs mécanismes indépendants de la concentration en oxygène et de la voie de dégradation impliquant le facteur pVHL. Ces mécanismes semblent plus tributaires des conditions spécifiques de la cellule comme la présence d'ions calcium ou de facteurs de croissance. Par exemple, un de ces mécanismes implique la protéine chaperonne HSP90 (Heat-Shock Protein-90) et le récepteur de la protéine kinase C (PKC), RACK1. En normoxie, HSP90 doit se lier à la sous-unité HIF-1 $\alpha$  afin que celle-ci adopte une conformation activable par l'hypoxie, un rôle cohérent avec son rôle de protéine chaperonne. De plus, l'interaction HSP90-HIF-1 $\alpha$  semble liée aux conditions d'oxygénation ; HSP90 se dissocie de HIF-1 $\alpha$  en condition d'hypoxie lui permettant de transloquer dans le noyau (Minet *et al.*, 1999). En normoxie, RACK1 peut lui aussi lier la sous-unité HIF-1 $\alpha$  et entrer par conséquent en compétition avec la chaperonne HSP90. Lorsque HSP90 est inhibée ou peu présente, RACK1 lie HIF-1 $\alpha$ , homodimérise et recrute l'élongine C ainsi que les autres composants du complexe E3 ubiquitine ligase et induit alors l'ubiquitination et la dégradation de HIF-1 $\alpha$  de façon similaire à la voie impliquant le facteur pVHL. De plus, la voie de RACK1 peut être régulée par l'action de la calcineurine, une protéine sérine/thréonine phosphatase dépendante du calcium et de la calmoduline, également connue sous le nom de protéine phosphatase 2B (PP2B). En effet, en présence de calcium, la calcineurine favorise la stabilisation de HIF-1 $\alpha$  en dé-phosphorylant RACK1 afin d'en empêcher la dimérisation (Liu *et al.*, 2007).



**Figure 1.12 :** Représentation schématique de la formation des complexes d'initiation de la traduction chez les eucaryotes. (Lopez-Lastra *et al.*, 2005).



**Figure 1.13 :** Représentation schématique de la formation du complexe d'initiation de la traduction dépendante de la coiffe sur un ARNm. (Lopez-Lastra *et al.*, 2005).

➤ Régulation traductionnelle de HIF-1 $\alpha$

▪ **Régulation traductionnelle de HIF-1 $\alpha$  dans les conditions de normoxie**

Certaines cellules, sous l'effet de cytokines, de facteurs de croissance ou d'un stress particulier, présentent une expression augmentée de HIF-1 $\alpha$  malgré un environnement riche en oxygène. En effet, alors que l'hypoxie augmente l'expression de HIF-1 $\alpha$  dans tous les types cellulaires en diminuant notamment la vitesse de dégradation de la sous-unité  $\alpha$ , certains stimuli permettent d'accroître le niveau d'expression de HIF-1 $\alpha$  en augmentant la traduction de son ARNm.

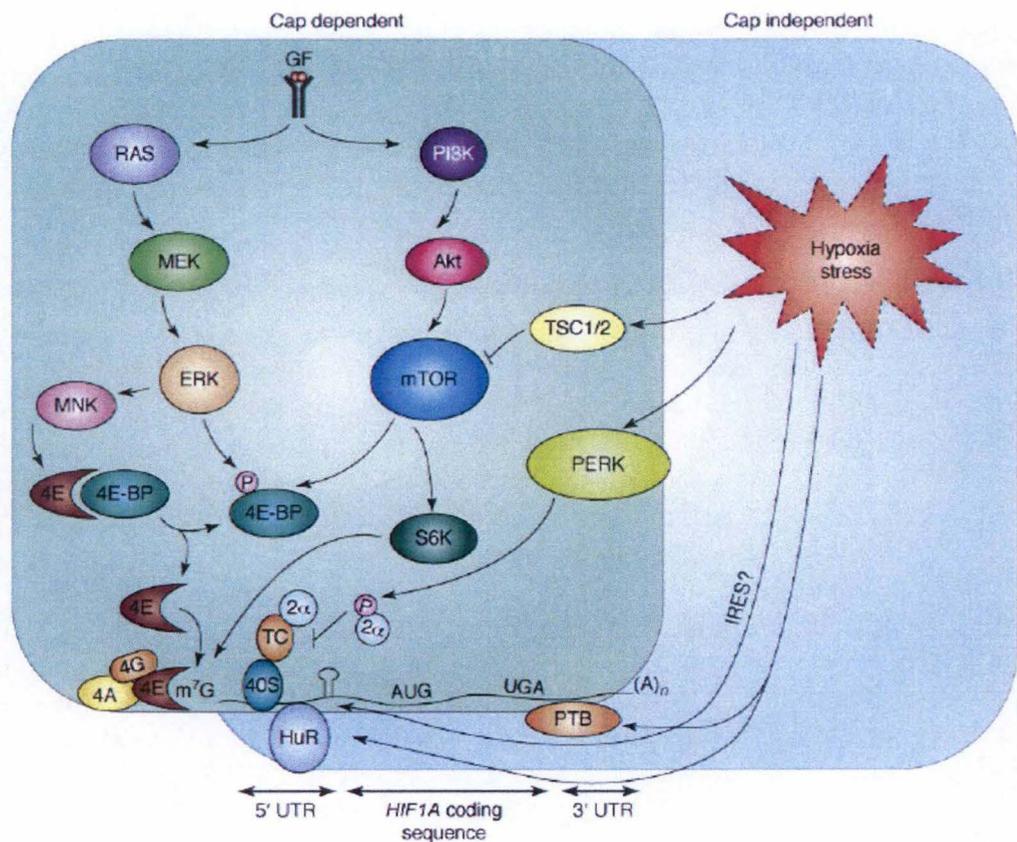
Dans les conditions de normoxie, les ARNm de HIF-1 $\alpha$  sont traduits de façon dépendante de la coiffe. La coiffe est formée d'une guanosine modifiée par l'ajout d'un groupement méthyle en position 7. L'interaction de cette coiffe avec les facteurs d'initiation eIFs (eucaryotic Initiation Factors) permet de recruter la sous-unité 40S du ribosome en 5'UTR des ARNm de HIF-1 $\alpha$  (figure 1.12-13). Cette étape fait intervenir de nombreux facteurs protéiques dont eIF4E, eIF4G et eIF4A qui forment le complexe eIF4F, une cible clé dans la régulation de l'initiation de la traduction (figure 1.12). eIF4G est une protéine qui recrute des partenaires tels que eIF4A, eIF3 et PABP (Poly-adenylated Binding Protein). Le facteur eIF3 recrute la sous-unité ribosomique 40S à l'extrémité 5' de l'ARNm. La protéine PABP se lie à la queue poly-A des messagers et relie l'extrémité 3' et 5' UTR. La disponibilité de eIF4E pour ses partenaires est le point essentiel dans la régulation de la traduction dépendante de la coiffe. Des petites protéines 4EBP (eIF4E Binding Protein) sont capables d'interagir avec eIF4E et d'inhiber la fixation de eIF4G sur eIF4E par compétition pour un même site. En effet, 4EBP et eIF4G possèdent le site consensus d'interaction sur eIF4E : 4EBP empêche la formation du complexe eIF4F et inhibe la synthèse protéique. L'association de eIF4E avec 4EBP dépend surtout de l'état de phosphorylation de 4EBP (Kahvejian *et al.*, 2005).

Certains facteurs de croissance activent la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR (mammalian target of rapamycin) ainsi que celle des MAP kinases (mitogen-activated protein kinases), comprenant Raf-MEK-ERK, pour stimuler la traduction de la sous-unité HIF-1 $\alpha$  en normoxie (figure 1.14). Les kinases mTOR et ERK (extracellular signal-regulated kinase) sont capables de phosphoryler une autre kinase appelée S6K (ou p70S6 kinase) qui elle-même peut activer la machinerie de traduction en phosphorylant la protéine ribosomale S6. Ces deux voies de signalisation peuvent également phosphoryler 4EBP et lever la répression de la synthèse protéique exercée par celui-ci. De plus, l'activation de la voie des MAP kinases peut aussi stimuler la traduction de HIF-1 $\alpha$  par phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction eIF4E via la protéine MNK (MAPK-interacting kinase) (Koh *et al.*, 2008).

Remarquons par ailleurs que la production accrue de la sous-unité  $\alpha$  en normoxie, suite à ces divers mécanismes, sature le système de dégradation dépendant des prolyl hydroxylases, ce qui permet son accumulation.

▪ **Régulation traductionnelle de HIF-1 $\alpha$  dans les conditions d'hypoxie**

Malgré une diminution globale de la traduction des protéines lors de l'hypoxie, afin de limiter la consommation d'énergie, un certain nombre de protéines cruciales pour la survie cellulaire, y compris HIF-1 $\alpha$ , continuent à être traduites.



**Figure 1.14 :** Représentation de la régulation traductionnelle de HIF-1 $\alpha$  en normoxie et en hypoxie. En normoxie, les ARNm de HIF-1 $\alpha$  sont traduits de façon dépendante de la coiffe. Certains facteurs de croissance peuvent stimuler la traduction de HIF-1 $\alpha$  en activant la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR ainsi que celle des MAP kinases. En hypoxie, la traduction des ARNm de HIF-1 $\alpha$  peut se dérouler par un mécanisme indépendant de la reconnaissance de la coiffe, impliquant en partie la présence d'une séquence IRES dans la région 5'UTR des ARNm de HIF-1 $\alpha$ . De plus, de façon générale, l'inhibition de la traduction des protéines lors de l'hypoxie est régulée par la réponse UPR et par la voie de mTOR impliquant REDD1 et le complexe TSC1/2. (Koh *et al.*, 2008).

L'inhibition de la traduction lors de l'hypoxie est régulée au moins par deux voies distinctes (figure 1.14). La première voie implique la réponse UPR (unfolded protein response) qui est rapidement stimulée dans les conditions d'hypoxie sévère (<1% O<sub>2</sub>). Cette réponse induit l'activation d'une kinase du réticulum endoplasmique PERK (PKR-like ER kinase) qui est alors capable de phosphoryler eIF2, un régulateur important de l'initiation de la traduction. Cette phosphorylation empêche l'assemblage des éléments de la machinerie de traduction. La deuxième voie est contrôlée par la kinase mTOR, et est activée lors d'une hypoxie prolongée. Dans ce cas, l'activité de mTOR est inhibée par REDD1 (regulated in development and DNA-damage responses-1) et le complexe TSC1/2 (tuberous sclerosis-1/2), ce qui entraîne la phosphorylation de 4EBP et par conséquent, l'inhibition de la synthèse protéique. De plus, l'hypoxie peut aussi inhiber l'étape d'élongation de la traduction, par une voie impliquant l'AMPK (AMP-activated-protein-kinase) et par une voie dépendante de mTOR. En effet, ces deux voies peuvent inhiber eEF2 (eucaryotic Elongation Factor-2), un régulateur crucial de l'étape d'élongation de la traduction (Koh *et al.*, 2008)..

La traduction des ARNm de HIF-1 $\alpha$  en hypoxie, tout comme certains autres messagers de gènes importants dans l'adaptation spécifique à l'hypoxie, peut se dérouler par un mécanisme indépendant de la reconnaissance de la coiffe, dont le principe a été décrit précédemment. Ce mécanisme implique en partie la présence d'une séquence IRES (internal ribosome entry site) dans la région 5'UTR des ARNm, qui surpasse la traduction dépendante de la coiffe en liant directement les facteurs d'initiation de la traduction tels que eIF4G et eIF3 aux sous-unités ribosomiales (Koh *et al.*, 2008).

### ➤ Régulation de l'activité transcriptionnelle de HIF-1

Une fois stabilisé, HIF-1 $\alpha$  est transporté dans le noyau. Cette étape est dépendante de son signal de localisation nucléaire, situé en position C-terminale. Il peut ensuite se dimériser dans ce compartiment avec la sous-unité ARNT, qui est, rappelons-le, exclusivement nucléaire. L'hétérodimère se fixe alors sur les éléments HRE de ces gènes cibles, contenant un HBS (HIF Binding Site). Ce HBS contient une séquence appelée E-box faisant partie de la séquence reconnue par tous les facteurs à motifs bHLH. Cependant, la formation du facteur de transcription complet suite à la stabilisation de la sous-unité  $\alpha$  n'est pas suffisante pour induire son activité. En effet, en plus d'être présent, ce facteur doit être transcriptionnellement actif. Plusieurs co-activateurs peuvent ainsi intervenir en se fixant au complexe et en augmentant la transactivation. Par exemple, p300/CBP doit se fixer au domaine TAD-C de HIF-1 $\alpha$  pour en activer la transactivation. Cette liaison est régulée par une enzyme qui utilise l'oxygène moléculaire comme substrat. Cette enzyme qui se nomme FIH1 (factor inhibiting HIF-1), est une asparaginyl hydroxylase qui hydroxyle, en présence d'oxygène, le résidu asparaginyl 803 de HIF-1 $\alpha$ , n'empêchant pas l'accumulation de la protéine, mais prévenant son interaction avec ses co-activateurs p300 et CBP (Lando *et al.*, 2002). Ce mécanisme empêche HIF-1 de fonctionner en normoxie, dans le cas où la synthèse protéique des sous-unités  $\alpha$  surpasserait un peu les capacités de dégradation de HIF-1 $\alpha$  par un des systèmes décrits ci-dessus. Par contre, en hypoxie, suite au manque de substrat, FIH1 est inactivée, ce qui permet l'activation de HIF-1.

Enfin, l'activation de la voie de MAP kinases, comprenant raf-MEK-ERK, peut également augmenter la fonction transactivatrice de HIF-1 en agissant directement sur l'état de phosphorylation du co-activateur p300 et de la sous-unité HIF-1 $\alpha$ . Des études en spectrométrie de masse ont identifié deux résidus sérine (ser-641 et ser-643) comme sites de phosphorylation des ERK1/2 au niveau de HIF-1 $\alpha$  (Mylonis *et al.*, 2006).

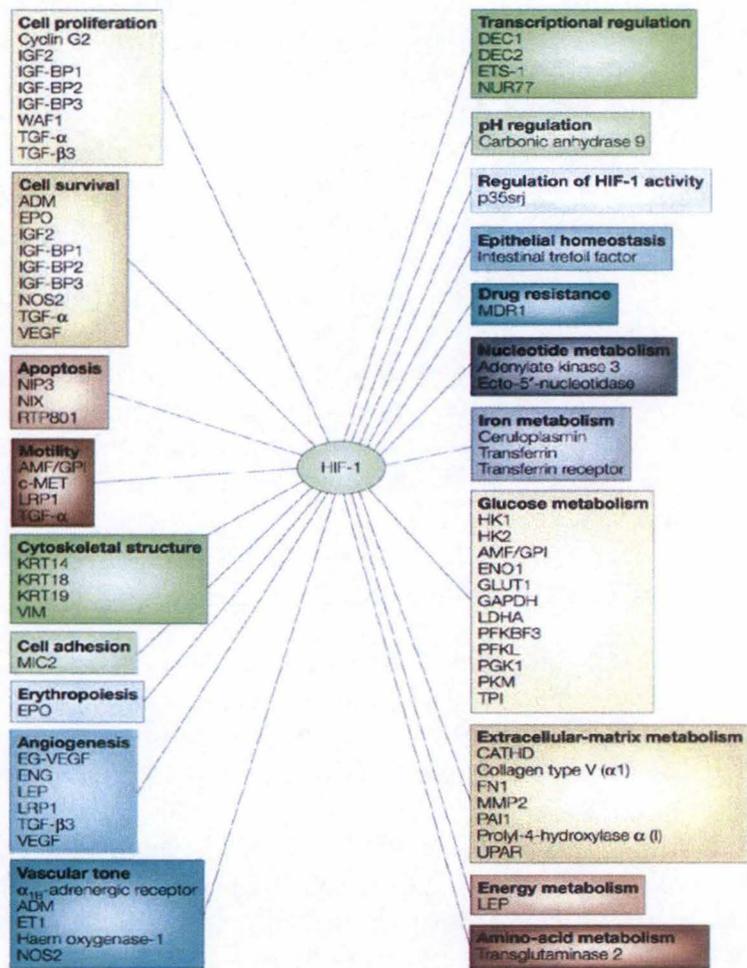


Figure 1.15 : Liste des gènes dont l'expression est régulée par le facteur de transcription HIF-1.

➤ Régulation de HIF-1 $\alpha$  par les espèces réactives de l'oxygène

Comme expliqué ci-dessus, la stabilité de la sous unité HIF-1 $\alpha$  dépend fortement du taux d'oxygène présent dans la cellule. La découverte de l'implication des hydroxylases, qui ciblent HIF-1 $\alpha$  vers la voie de dégradation par le protéasome, a permis une avancée majeure dans la compréhension des mécanismes senseurs d'oxygène dans la signalisation hypoxique. En outre, puisque la formation des espèces réactives de l'oxygène requiert la présence d'oxygène moléculaire, il a été suggéré que ceux-ci puissent intervenir dans la réponse cellulaire à l'hypoxie. Ces radicaux libres dérivés de l'oxygène pourraient effectivement constituer des messagers secondaires impliqués dans la signalisation régulant le niveau d'expression de HIF-1 $\alpha$ , et les enzymes les engendrant être d'autres senseurs cellulaires à l'oxygène. Dans la littérature, on retrouve deux modèles dans lesquels les radicaux libres joueraient un rôle crucial dans la régulation de l'activité de HIF-1. Le premier modèle propose le rôle d'une NAD(P)H oxydoréductase, encore non identifiée, qui convertirait l'oxygène en radicaux libres tels que l'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène. La diminution de ces espèces oxygénées réactives en hypoxie pourrait alors être le déclencheur de la signalisation menant à l'activation de HIF-1 (Michiels *et al.*, 2002 ; Kietzmann *et al.*, 2005). Le second modèle propose quant à lui un rôle de la mitochondrie, plus particulièrement de la chaîne de transport des électrons, dans la signalisation hypoxique. Effectivement, en hypoxie, la réduction de l'oxygène en eau est diminuée au profit de la formation d'espèces réactives de l'oxygène au niveau du complexe III de la chaîne de transport des électrons (Chandel *et al.*, 1997 ; Michiels *et al.*, 2002). Ces deux modèles sont donc diamétralement opposés. Néanmoins, plusieurs études ont donné des résultats en faveur de l'un ou l'autre de ces deux modèles, mais ceux-ci restent encore insuffisants pour trancher le débat.

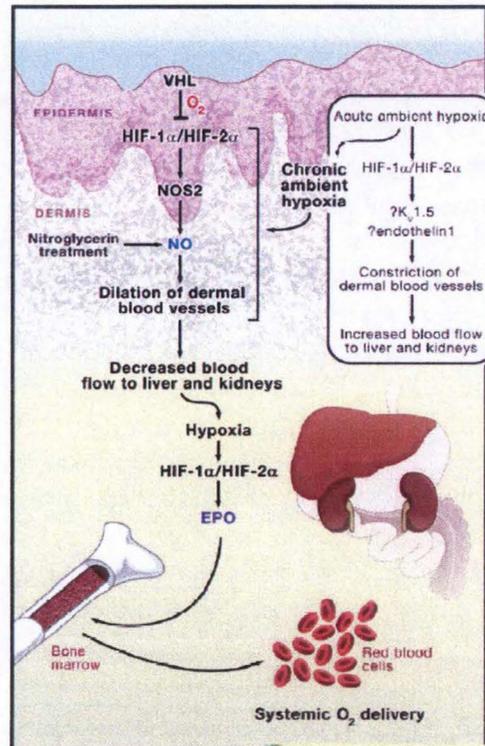
2.3.2.4. Les gènes cibles induits par le facteur de transcription HIF-1

Si le gène de l'érythropoïétine a été le premier gène cible de HIF-1 décrit, plusieurs autres ont depuis été identifiés. Ils possèdent tous au moins un HRE dans leur région promotrice et sont impliqués dans différentes fonctions (l'angiogenèse, l'érythropoïèse, les métabolismes du fer et du glucose, la migration cellulaire, etc), ayant comme conséquence l'adaptation des cellules et des tissus à l'hypoxie (figure 1.15). Le nombre de ces gènes s'accroît régulièrement et on estime qu'environ 1 à 2 % du génome pourrait être régulé par HIF-1.

### 3. La peau et le facteur de transcription HIF-1

A l'exception de la couche cornée, l'oxygène est consommé dans toutes les couches de l'épiderme et du derme. Cependant, contrairement au derme, l'épiderme n'est irrigué par aucun vaisseau sanguin. Les cellules qui le composent sont alors alimentées par diffusion de l'oxygène depuis le derme.

Au début des années 80, Stewart *et al.* (1982) ont avancé l'hypothèse selon laquelle la peau humaine normale pouvait être caractérisée par des régions hypoxiques dues à sa faible teneur en oxygène au niveau de l'épiderme (de 1,5 à 5 % O<sub>2</sub>). Plus tard, plusieurs études ont démontré la présence de ces zones hypoxiques au sein de l'épiderme grâce à la localisation des marqueurs spécifiques de l'hypoxie et de la sous-unité  $\alpha$  du facteur HIF-1 par les techniques d'immunocytochimie (Bedogni *et al.*, 2005). Ces études ont montré une faible



**Figure 1.16 :** Représentation de la réponse de l'épiderme à l'hypoxie. Dans les cellules épidermiques, HIF-1 $\alpha$  est exprimé en hypoxie et dimérise avec ARNT pour former le facteur de transcription HIF-1. Ce facteur de transcription stimule l'expression de la NOS qui produit de l'oxyde nitrique. Celui-ci diminue l'apport sanguin au niveau du foie et des reins, ce qui y active HIF-1 à ces endroits. Une fois activé, le facteur de transcription induit la synthèse de l'hormone érythropoïétine. (Boutin *et al.*, 2008)

## Introduction

expression de HIF-1 $\alpha$  au niveau de l'épiderme avec une expression plus importante au niveau des glandes sudoripares et sébacées ainsi qu'au niveau des follicules pileux. Par ailleurs, une expression plus importante de la sous-unité  $\alpha$  est détectée au niveau de l'épiderme de peaux psoriatiques, où une grande quantité d'oxygène est utilisée par les cellules en cours de prolifération (Rosenberger *et al.*, 2007).

De plus, une étude récente a mis en évidence le rôle de la peau dans la réponse systémique à l'hypoxie par l'intermédiaire du facteur HIF-1, qui se trouve présent au niveau de l'épiderme (Boutin *et al.*, 2008) (figure 1.16). L'induction de l'expression de HIF-1 $\alpha$  dans les cellules épidermiques provoque l'activation du facteur HIF-1 qui augmente l'expression de la NOS (nitric oxide synthase). La NOS augmente ensuite la production d'oxyde nitrique (NO), un puissant vasodilatateur. Le NO peut alors diffuser dans les capillaires dermiques et y induire une vasodilatation qui a pour conséquence une diminution du flux sanguin dans les vaisseaux menant au foie et aux reins. Cette diminution de l'apport sanguin induit un stress hypoxique au niveau de ces deux organes qui se traduit par l'activation de HIF-1. Une fois activé, le facteur de transcription induit la synthèse de l'hormone érythropoïétine (EPO). Cette hormone stimule la production et la prolifération des précurseurs des globules rouges. Ces précurseurs vont ensuite se différencier en érythrocytes, afin d'augmenter le nombre de globules rouges et, par conséquent, le potentiel de transport de l'oxygène dans le sang.

Lors d'une blessure cutanée, les tissus épidermiques et dermiques sont endommagés et l'oxygène ne peut plus diffuser aussi facilement dans les différentes couches de l'épiderme. Les abords épidermiques de la blessure deviennent alors fortement hypoxiques et on retrouve une surexpression de la sous-unité HIF-1 $\alpha$  au niveau des cellules bordant la lésion (Elson *et al.*, 2000). L'activation du facteur de transcription HIF-1 au niveau de ces cellules peut ensuite induire l'expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans la migration cellulaire comme la laminnie-5 afin d'entamer la phase de ré-épithélialisation lors de la cicatrisation (Hartwig *et al.*, 2007).

## **4. Objectif**

Récemment, le rôle du facteur de transcription HIF-1 a été décrit au niveau de l'épiderme dans la réponse systémique de l'organisme à l'hypoxie. Par ailleurs, des résultats récents montrent l'activation du facteur HIF-1 en conditions non-hypoxiques dans les kératinocytes à la suite d'une perturbation de leur homéostasie. Notre travail s'intéresse au facteur de transcription HIF-1 dans la réponse des kératinocytes à différents stress cellulaires que sont l'hypoxie, le stress oxydatif et la déplétion en cholestérol. Dans ce mémoire nous tenterons donc d'identifier si ce facteur de transcription représente un acteur clé dans la réponse des kératinocytes aux stress.

Nous essayerons de détecter dans un premier temps si les kératinocytes répondent à l'hypoxie en activant le facteur HIF-1. Ensuite, si ce facteur est activé dans les kératinocytes, nous analyserons les voies de signalisation impliquées dans son activation en hypoxie.

Etant donné que certains résultats décrits dans la littérature indique que la production de ROS dans les conditions d'hypoxie, mais aussi dans certaines conditions de stress chez les kératinocytes, joue un rôle dans la régulation de l'activité de HIF-1, nous investiguerons si des ROS exogènes peut influencer la régulation de HIF-1 dans les kératinocytes.

Des études ont montré qu'une extraction du cholestérol membranaire désorganise la structure des « lipid rafts » et induit par conséquent, une perturbation des voies de transduction en aval des protéines de signalisation associées à ces microdomaines (Simons et Toomre, 2000). L'extraction du cholestérol membranaire génère donc un stress pour les kératinocytes, impliquant une réponse adaptative ayant pour but de maintenir leur intégrité. Notre objectif sera donc d'identifier si le facteur de transcription HIF-1 fait partie de cette réponse adaptative.

Nous rechercherons également un éventuel effet synergique du stress oxydatif ou de la déplétion en cholestérol combiné à l'hypoxie sur l'activité de HIF-1. Nous analyserons aussi les protéines activées suite aux différents stress afin de déterminer les voies de signalisation qui pourraient être impliquées dans la réponse adaptative des kératinocytes.

Enfin, puisqu'une perturbation des mécanismes de prolifération et de différenciation conduit inévitablement à des dysfonctionnements, nous rechercherons également les effets des différents stress sur la physiologie des kératinocytes en étudiant l'expression de certains marqueurs de différenciation ainsi que l'expression du facteur de croissance HB-EGF.

# **MATERIEL ET METHODES**

# 1. Culture des kératinocytes humains épidermiques

## 1.1. Matériel

- Trypsine T17 (Tableau 1)
- Solution dFCS 2 % (solution bloquante) (Tableau 2)
- Milieu complet KGM-2 (keratinocyte growth medium) (Tableau 3)
- Trypsine T25 (Tableau 4)
- Milieu complet Epilife<sup>®</sup> + (Tableau 5)
- Milieu de congélation (Tableau 6)
- Milieu autocrine Epilife<sup>®</sup> - (Tableau 7)
- Boîtes de culture cellulaire (Cellstar<sup>®</sup>, Greiner Bio-one, Germany)
- Pincettes et scalpels stérilisés

## 1.2. Méthodes

### 1.2.1. Culture primaire

Les kératinocytes épidermiques humains sont obtenus à partir de prélèvements de peau humaine lors d'abdominoplasties réalisées par le docteur B. Bienfait à la clinique Saint-Luc de Bouge. Immédiatement après l'intervention, la couche superficielle du prélèvement est récupérée à l'aide d'un dermatome et conservée dans une solution physiologique jusqu'à son arrivée au laboratoire. Les kératinocytes isolés au laboratoire et issus d'échantillons de peau fournis par un patient, constituent le point de départ pour l'établissement d'une nouvelle souche : NAK pour Normal Abdominoplasty Keratinocyte. L'isolement des kératinocytes se réalise en conditions stériles sous hotte à flux laminaire vertical de classe 2 et en présence de matériel stérilisé. Les prélèvements de peau sont découpés en petits carrés de 1 centimètre de côté et la face dermique de ces petites sections est ensuite disposée sur une solution de trypsine T17 (tableau 1) avec 50 µg/ml de gentamycine. Une incubation à 4°C pendant une nuit en présence de cette solution est alors nécessaire afin de digérer la jonction épidermo-dermique. Le lendemain, l'épiderme est détaché du derme à l'aide de pincettes et est placé dans une solution bloquante contenant 2 % de sérum de veau fœtal dialysé (dFCS) (tableau 2) afin de neutraliser l'activité de la trypsine. L'étape suivante consiste à isoler les cellules en triturant les morceaux d'épiderme et en réalisant des passages successifs à l'aide d'une pipette pour séparer les cellules les unes des autres. Une filtration sur un tamis cellulaire (filtre de Nylon stérile) de 70 µm permet ensuite d'éliminer les cellules non dissociées ainsi que la couche cornée. La suspension cellulaire recueillie est centrifugée pendant 10 minutes à 1000 rpm à 4°C. Le surnageant est éliminé alors que le culot contenant les cellules est récupéré et resuspendu dans du milieu de culture KGM-2 (tableau 3). La concentration en calcium du milieu KGM-2 et l'ajout de 0,1 % de dFCS dans le milieu augmentent l'adhérence des kératinocytes au substrat. De plus, le milieu de culture comporte tous les facteurs de croissance et hormones nécessaires à une bonne prolifération des cellules épidermiques. Les cellules sontensemencées à raison de 46 000 cellules par cm<sup>2</sup> dans des boîtes de culture T175 et placées dans un incubateur à 37°C, avec une atmosphère humide contenant 5 % de CO<sub>2</sub>. Le milieu de culture est renouvelé 3 jours plus tard et ensuite tous les 2 jours.

Trypsine T17	
Composition	Concentration
Solution A	
Trypsine (Sigma,USA)	0.17 %

**Tableau 1** : Composition de la trypsine T17

Milieu complet KGM-2 (keratinocyte growth medium)	
Composition	Concentration
<b>KBM-2</b> (keratinocyte basal medium) (Lonza, Belgium)	
<b>+ Suppléments :</b> (Lonza, Belgium)	
- BPE (Bovine Pituitary Extract)	0,2 %
- Hydrocortisone	$5 \times 10^{-7}$ M
- EGF ( Epidermal Growth Factor)	0,2 ng/ml
- Insuline	5 µg/ml
- Transferrine	5 µg/ml
- Streptomycine	50 µg/ml
- Pénicilline	50 unités/ml
- Epinéphrine	

**Tableau 3** : Composition du milieu complet KGM-2

Milieu complet Epilife® +	
Composition	Concentration
<b>Epilife medium</b> (Invitrogen, Belgium)	
<b>+ Suppléments :</b> (Invitrogen, Belgium)	
- BPE	0,2 %
- Hydrocortisone	$5 \times 10^{-7}$ M
- EGF	0,2 ng/ml
- Insuline	5 µg/ml
- Transferrine	5 µg/ml
- Streptomycine	50 µg/ml
- Pénicilline	50 unités/ml

**Tableau 5** : Composition du milieu Epilife® +

Milieu autocrine Epilife® -	
Composition	Concentration
<b>Epilife medium</b> (Invitrogen, Belgium)	
<b>+ Suppléments :</b> (Invitrogen, Belgium)	
- L-histidine	$2,4 \times 10^{-4}$ M
- L-isoleucine	$7,5 \times 10^{-4}$ M
- L-méthionine	$9 \times 10^{-4}$ M
- L-phénylalanine	$9 \times 10^{-4}$ M
- L-tryptophane	$4,5 \times 10^{-4}$ M
- Hydrocortisone	$5 \times 10^{-7}$ M
- Streptomycine	50 µg/ml
- Pénicilline	50 unités/ml

**Tableau 7** : Composition du milieu autocrine Epilife® -

Solution dFCS (solution bloquante)	
Composition	Concentration
Solution A	
dFCS (PAA Laboratories GmbH, Austria)	2 %

**Tableau 2** : Composition de la solution bloquante

Trypsine T25	
Composition	Concentration
Solution A	
Trypsine (Sigma,USA)	0,025 %
EDTA (Ethylène Diamine Tétracétate) (Merck,Germany)	0,01 %

**Tableau 4** : Composition de la trypsine T25

Milieu de congélation	
Composition	Concentration
Milieu complet Epilife® + (Invitrogen, Belgium)	80 %
DMSO (Diméthylsulfoxyde) (Merck,Germany)	10 %
Sérum de veau foetal dialysé (dFCS) (PAA Laboratories GmbH, Austria)	10 %

**Tableau 6** : Composition du milieu de congélation

Solution A	
Composition	Concentration
Glucose (Merck, Germany)	10 mM
KCl (Merck, Germany)	3 mM
NaCl (Merck, Germany)	130 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Merck, Germany)	1 mM
Rouge phénol (Sigma,USA)	0,0033 mM
HEPES (Sigma,USA)	30 mM
Stérilisation par filtration sur Stérivex-GP 0,22µm (Millipore,USA)	pH 7,4

**Tableau 8** : Composition de la solution A

### 1.2.2. Culture secondaire

Dans le but d'obtenir une amplification importante du nombre de cellules, les kératinocytes de la culture primaire sont passés en culture secondaire. Cette étape se déroule avant que la culture primaire n'atteigne le stade de confluence, de manière à préserver le pouvoir prolifératif des cellules et d'éviter leur différenciation. Les cellules en phase de prolifération intense sont incubées tout d'abord 5 minutes avec une solution de trypsine T25 (tableau 4) afin de décrocher les éventuels mélanocytes et fibroblastes qui ont une capacité d'adhérence moins importante que les kératinocytes. Ensuite, on procède à une trypsinisation plus longue (10 à 15 minutes) pour détacher les kératinocytes. La solution T25 contient un chélateur de calcium EDTA facilitant ce détachement cellulaire. Par la suite, les kératinocytes sont récoltés dans la solution bloquante qui permet d'inhiber l'action de la trypsine avant d'être centrifugés pendant 5 minutes à 1000 rpm et à 4°C. Après centrifugation, les cellules sont comptées et ensemencées à une densité de 10 000 cellules par cm<sup>2</sup> dans du milieu Epilife<sup>®</sup> + (tableau 5), favorisant la prolifération cellulaire, notamment en raison de sa faible teneur en ions Ca<sup>++</sup> (0.06 mM). La culture secondaire est amenée à un état proche de la confluence de manière à obtenir le plus grand nombre de cellules tout en évitant la différenciation cellulaire.

### 1.2.3. Congélation des kératinocytes

La congélation des kératinocytes se fait lorsque les cultures secondaires ont atteint une phase de prolifération intense donnant un nombre important de kératinocytes non différenciés. Les cellules sont alors trypsinisées comme décrit ci-dessus, centrifugées, suspendues dans du milieu complet KGM-2 et comptées de manière à obtenir une densité de cellules double de celle attendue *in fine*. Une quantité équivalente de milieu de congélation (tableau 6) deux fois concentré composé de milieu de culture complet (60 %), de DMSO (20 %) et de dFCS (20 %) est ensuite ajoutée à la suspension cellulaire afin d'obtenir une concentration finale de 1 ou de 2 millions de cellules par ml. Cette suspension cellulaire est répartie dans des cryotubes de 1,5 ml (NUNC) qui sont lentement congelés à -80°C pendant une nuit, avant d'être transférés dans l'azote liquide à -180°C.

### 1.2.4. Culture tertiaire

La culture tertiaire se réalise à partir des cultures secondaires congelées. Le nombre de cryotubes nécessaire pour l'expérience est sorti avec précaution de l'azote liquide et leur contenu est dégelé rapidement dans un bain-marie à 37°C. Les kératinocytes sont ensuite comptés et ensemencés dans du milieu de culture complet KGM-2, plus favorable à l'adhérence des cellules. La mise en culture tertiaire se fait à une densité cellulaire de 7000 cellules par cm<sup>2</sup> dans du milieu KGM-2. Le lendemain, ce milieu est remplacé par du milieu Epilife<sup>®</sup> +, notamment afin d'éliminer les traces du DMSO. Par la suite, le milieu de culture est renouvelé tous les deux jours avec ce milieu Epilife<sup>®</sup> +, qui est plus favorable à la croissance des cellules. Lorsque 60 % de la superficie de la boîte de culture sont recouverts par les cellules, le milieu complet Epilife<sup>®</sup> + est remplacé par du milieu autocrine Epilife<sup>®</sup> - (tableau 7) contenant des acides aminés mais plus aucun facteur peptidique exogène. Les kératinocytes sont alors capables de stimuler eux-mêmes leur prolifération. Ce milieu est également renouvelé tous les deux jours. Les cultures autocrines atteignent alors successivement les stades de sous-confluence, confluence et post-confluence.

- La **sous-confluence** est atteinte lorsque les kératinocytes recouvrent environ 70 % de la surface de la boîte de culture. A ce stade, la culture se caractérise par une prolifération importante, marquée par de nombreuses mitoses. Les cellules présentent plutôt une forme ovale et les jonctions intercellulaires sont très réfringentes.
- La **confluence** se caractérise par un tapis cellulaire recouvrant l'entièreté de la surface de la boîte de culture. Les cellules se tassent les unes contre les autres et adoptent une forme plutôt polyédrique où les jonctions intercellulaires sont moins réfringentes. Les mitoses deviennent plus rares indiquant l'arrêt de la phase de prolifération intensive des kératinocytes.
- La **post-confluence** est atteinte quatre jours après la confluence. Ce stade se caractérise par un début de stratification ainsi que par l'arrondissement et le détachement de certaines cellules.

Dans ce travail, les différents traitements ont été réalisés sur des cultures confluentes.

## 2. Traitement des kératinocytes

### 2.1. Incubation sous hypoxie

#### 2.1.1. Matériel

- Milieu CO<sub>2</sub> indépendant (Gibco, UK)  
+ Suppléments :
  - L-glutamine 5 mM
  - Pénicilline G 50 unités/ml
  - Streptomycine 50 µg/ml
- Milieu autocrine Epilife<sup>®</sup> - (Tableau 7)

#### 2.1.2. Méthode

Lorsque les cellules doivent être incubées en condition d'hypoxie, le milieu de culture traditionnel Epilife<sup>®</sup> -, est soit renouvelé, soit remplacé par du milieu CO<sub>2</sub> indépendant. Le bouchon des boîtes ou des plaques de culture sont alors ouverts et celles-ci sont placées dans un incubateur préalablement nettoyé à l'alcool. L'air y est ensuite chassé par un flux d'azote pur sous pression pendant 2 à 3 minutes afin d'obtenir une atmosphère qui ne contienne plus que 1 % d'oxygène et 99 % d'azote. L'incubateur est ensuite placé dans une chambre à 37°C pour un temps plus ou moins important (de 1 à 16 heures selon l'expérience). Les cellules contrôles, dites normoxiques, sont incubées dans le même milieu que les cellules en hypoxie mais sous une atmosphère normale.

## 2.2. *Extraction du cholestérol membranaire par la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine*

### 2.2.1. Matériel

- Solution de méthyl- $\beta$ -cyclodextrine (M $\beta$ CD)
  - M $\beta$ CD 7.5 mM (Sigma, Belgium)
  - Milieu autocrine Epilife<sup>®</sup> - (Tableau 7)
  - stérilisation par filtration sur Millex-GP 0,22 $\mu$ m (Millipore)
- Solution A (Tableau 8)

### 2.2.2. Méthode

Les cellules sont amenées jusqu'au stade de la confluence et sont traitées avec une solution de méthyl- $\beta$ -cyclodextrine (M $\beta$ CD) à une concentration de 7.5 mM. La M $\beta$ CD se présente sous forme d'une poudre et la quantité adéquate est pesée et dissoute dans du milieu Epilife<sup>®</sup>. Ensuite, la solution est filtrée afin de rendre la solution stérile. Le milieu de culture est remplacé par le milieu de culture autocrine contenant la M $\beta$ CD. Les cellules sont alors incubées pendant 1 heure avec cette solution à 37°C. Après le traitement, les cultures sont rincées deux fois avec la solution A stérile (tableau 8).

## 2.3. *Traitement des kératinocytes par le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)*

### 2.3.1. Matériel

- Solution de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)
  - H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100, 250 ou 500  $\mu$ M (Sigma, Belgium)
  - Milieu autocrine Epilife<sup>®</sup> - (Tableau 7)
- Solution A (Tableau 8)

### 2.3.2. Méthode

Les kératinocytes sont traités à confluence avec une solution de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à une concentration de 100, 250 ou de 500  $\mu$ M dans du milieu Epilife<sup>®</sup> - pendant une incubation de 30 minutes à 37°C avant d'être rincées trois fois avec la solution A stérile (tableau 8).

## 2.4. *Traitement des kératinocytes par la desféroxamine (DFO)*

### 2.4.1. Matériel

- Solution de desféroxamine (DFO)
  - DFO 130  $\mu$ M (Sigma, Belgium)
  - Milieu autocrine Epilife<sup>®</sup> - (Tableau 7)

Produit	Enzyme inhibée	Source	Concentration
PD169316	p38 $\alpha$ , $\beta$	Calbiochem	15 $\mu$ M
SP600125	JNK	Tocris	20 $\mu$ M
PD98059	ERK 1/2	Calbiochem	40 $\mu$ M
H89	PKA	Biomol	20 $\mu$ M
Wortmannin	Pi3K	Sigma	500 $\mu$ M

**Tableau 9 :** Caractéristiques et concentrations des inhibiteurs utilisés au cours du travail

#### 2.4.2. Méthode

Le facteur de transcription HIF-1 peut être stabilisé chimiquement en condition non hypoxique. Le DFO est un chélateur d'ions  $Fe^{2+}$  dont dépendent les hydroxylases en partie responsables de la dégradation de la sous-unité HIF-1 $\alpha$  dans les conditions d'hypoxie. Par sa propriété chélatrice, le DFO est utilisé dans nos expériences comme contrôle positif à une concentration de 130  $\mu$ M. Les cultures sont incubées à 37°C en présence de la molécule pendant une période de 8 heures.

### 2.5. *Traitement des kératinocytes par l'interleukine-1 $\alpha$ (IL-1 $\alpha$ )*

#### 2.5.1. Matériel

- Solution d'interleukine-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ )
  - IL-1  $\alpha$  10ng/ml (Sigma, Belgium)
  - Milieu autocrine Epilife<sup>®</sup> - (Tableau 7)

#### 2.5.2. Méthode

Les kératinocytes sont traités à confluence avec une solution d'interleukine-1 $\alpha$  à une concentration de 10 ng/ml dans du milieu Epilife<sup>®</sup> - pendant une incubation de 15 minutes à 37°C avant d'être rincées trois fois avec la solution A stérile (tableau 8).

### 2.6. *Traitement des kératinocytes par des inhibiteurs de kinases*

#### 2.6.1. Matériel

- Inhibiteurs (Tableau 9)
- DMSO 0.7 %

#### 2.6.2. Méthode

Afin de mettre en évidence si une protéine kinase particulière est impliquée dans la voie de signalisation investiguée, des inhibiteurs spécifiques de cette kinase sont utilisés. En pratique, lorsque l'on met les cellules en hypoxie/normoxie ou lorsqu'on effectue un traitement à la M $\beta$ CD, à l' $H_2O_2$ , à l'IL-1 $\alpha$  ou au DFO, les cultures sont incubées avec l'inhibiteur 1 heure avant le début du traitement. Ensuite, l'inhibiteur reste présent dans le milieu de culture jusqu'à la fin du traitement. En fonction des dilutions de l'inhibiteur, une quantité identique de DMSO est ajoutée aux cellules contrôles.

### 3. Test de viabilité cellulaire : mesure de la libération de la LDH

#### 3.1. Principe

La cytotoxicité éventuelle exercée par les différents traitements sur les cultures de kératinocytes confluents est évaluée à l'aide d'un test LDH (lactate déshydrogénase). Le principe de base de ce test est une mesure de l'activité de l'enzyme LDH cytosolique qui est libérée dans le milieu cellulaire par rupture membranaire des cellules endommagées par un stress quelconque. Cette mesure permet ainsi de quantifier le taux de mort cellulaire après une incubation.

#### 3.2. Matériel

- Cytotoxicity Detection Kit (LDH) (Roche, Germany)
- PBS (Tableau 30)
- PBS+10 % Triton X-100
- Spectrophotomètre ( VERSAmax<sup>®</sup>, Molecular Devices, UK)

#### 3.3. Méthode

Après une incubation en hypoxie, le milieu contenu dans les plaques de culture 24 puits, est décanté et transféré dans des Eppendorfs qui sont alors centrifugés à 2000 rpm pendant 5 minutes. Les surnageants sont récupérés et les culots sont resuspendus dans 250 µl de PBS+10 % Triton X-100. Les cellules dont le milieu a été retiré sont lysées par l'ajout de 250 µl de PBS+10 % Triton X-100 (par puits) pendant 10 minutes. Les lysats sont ensuite récupérés dans des Eppendorfs. On place ensuite séparément dans les puits d'une plaque 96 puits : 100 µl du culot resuspendu, 100 µl de surnageant, 5 µl de lysat dilué dans 95 µl de PBS+10 % Triton X-100, 100 µl de milieu seul représentant le blanc pour les échantillons « surnageant » et enfin 100 µl de PBS+10 % Triton X-100 représentant le blanc pour les échantillons « culot » et « lysat ». Un mélange est ensuite constitué à partir d'une bouteille 1 et 2 fournies avec le kit de détection de cytotoxicité (Roche, Germany). 100 µl de ce mélange est distribué dans chaque puits. La plaque est conservée à l'abri de la lumière à température ambiante et 15 minutes après l'incubation on mesure l'absorbance. Ensuite, à partir des valeurs d'absorbance, le pourcentage de cytotoxicité est calculé à partir de la formule :

$$\% \text{ Cytotoxicité} = \frac{(\text{val culot} - \text{val blanc}) + ((\text{val surnageant} - \text{val blanc}) \times 4)}{(\text{val culot} - \text{val blanc}) + ((\text{val surnageant} - \text{val blanc}) \times 4) + ((\text{val lysat} - \text{val blanc}) \times 20)}$$

<b>Phosphatase Inhibitor Buffer (PIB) 25x</b>	
Composition	Concentration
NaVO <sub>3</sub> (Sigma, USA)	25 mM
PNPP (Para-Nitrophényl Phosphate) (Sigma, USA)	250 mM
α-glycérophosphate (Sigma, USA)	250 mM
NaF (Merck, Germany)	125 mM

**Tableau 10** : composition du PIB 25x

<b>Tampon de lyse 2x</b>	
Composition	concentration
TRIS pH 7.5 (Merck, Germany)	40 mM
KCl (Merck, Germany)	150 mM
EDTA (Merck, Germany)	1 mM
Triton X-100 (Merck, Germany)	1 %
PIC (Protease Inhibitor Cocktail) - Complete (Roche, Germany)	10 %
PIB (Phosphatase Inhibitor Buffer)	10 %

**Tableau 12** : Composition du tampon de lyse 2x

<b>Gel buffer</b>	
Composition	pour 200 ml
TRIS (ICN, Biomedicals, USA)	36,3 g
SDS (sodium dodecyl sulfate) (ICN, Biomedicals, USA)	0,8 g
pH 8.9	

**Tableau 14** : Composition du gel buffer

<b>Gel séparateur</b>	
Composition	pour 1 gel
Gel mix	35 ml
APS (persulfate d'ammonium) 25% (Pharmacia Biotech AB, Sweden)	175 µl
TEMED (Pharmacia Biotech AB, Sweden)	10,5 µl

**Tableau 16** : Composition du gel séparateur

<b>Spacer gel</b>	
Composition	pour 1 gel
Spacer gel mix	10 ml
APS (persulfate d'ammonium) 25% (Pharmacia Biotech AB, Sweden)	50 µl
TEMED (Pharmacia Biotech AB, Sweden)	3 µl

**Tableau 18** : Composition du spacer gel mix

<b>Protease Inhibitor Cocktail (PIC) 25x</b>	
Composition	
Une tablette de Complete® (Roche, Germany)	
H <sub>2</sub> O	

**Tableau 11** : Composition du PIC 25x

<b>Bleu de charge 5x</b>	
Composition	Concentration
Tris HCl pH 6.8	1 M
SDS (sodium dodecyl sulfate) (ICN, Biomedicals, USA)	20 %
β-mercaptoéthanol (Flukachemie AG, Switzerland)	4 %
Glycérol (Merck, Germany)	20 %
Bleu de bromophénol (Janssens Chemica, Belgium)	1 %

**Tableau 13** : composition du bleu de charge 5x

<b>Gel mix 10 %</b>	
Composition	pour 35 ml
Gel buffer	8,4 ml
Acryl/Bis (30/0,8) (BIO-Rad, USA)	11,6 ml
H <sub>2</sub> O	15 ml

**Tableau 15** : Composition du gel mix 10 %

<b>Spacer gel buffer</b>	
Composition	pour 100 ml
TRIS (ICN, Biomedicals, USA)	5,1 g
SDS (sodium dodecyl sulfate) (ICN, Biomedicals, USA)	0,4 g
pH 6.8	

**Tableau 17** : Composition du spacer gel buffer

<b>Spacer gel mix</b>	
Composition	pour 10 ml
Spacer gel mix	2,5 ml
Acryl/Bis (30/0,8) (BIO-Rad, USA)	1,7 ml
H <sub>2</sub> O	5,8

**Tableau 19** : Composition du spacer gel

<b>Running buffer 10x</b>	
Composition	pour 1 litre
TRIS (ICN, Biomedicals, USA)	63,2 g
SDS (sodium dodecyl sulfate) (ICN, Biomedicals, USA)	10 g
Glycine (ICN, Biomedicals, USA)	40 g

**Tableau 20** : Composition du tampon d'électrophorèse 10x

## 4. Analyse des protéines par Western blot

### 4.1. Principe

Le « Western blot » est une technique permettant de déterminer de manière semi-quantitative l'abondance d'une protéine d'intérêt dans un extrait cellulaire. Cette technique permet également d'étudier les variations d'abondance d'une protéine entre différentes conditions expérimentales. Suite à une lyse cellulaire et à un dosage de la concentration en protéines, les protéines sont séparées en fonction de leur poids moléculaire par une électrophorèse en gel de polyacrylamide. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane et détectées par un système de marquage impliquant un anticorps primaire reconnaissant la protéine d'intérêt et un anticorps secondaire reconnaissant l'anticorps primaire et couplé à un système de révélation permettant d'imprimer un film photographique.

### 4.2. Matériel

- Tampon de lyse 2x (Tableau 12)
- Réactif de Bradford 5x (Bio-Rad, USA)
- Spectrophotomètre (Ultrospec 2100 Pro, Amersham Biosciences, UK)
- BSA (Bovine Serum Albumine) (2 $\mu$ g/ml)
- Bleu de charge 5x (Tableau 13)
- Gel séparateur (Running gel) (Tableaux 14-16)
- Gel concentrateur (Stacking gel) (Tableaux 17-19)
- Tampon d'électrophorèse (Tableau 20)
- Appareil de transfert: Hoeffer Semiphor (Amersham, USA)
- Papier Whatman (Merck, Germany)
- Membrane Hybond-P de PVDF (Amersham, UK)
- Méthanol 100 % (Merck, Germany)
- Tampon de transfert (Tableau 21)
- Tampon de rinçage: TBS-Tween 0,1 % (TBS-T) (Tableau 22)
- Anticorps primaires et secondaires (Tableaux 23 et 24)
- Agent bloquant 2 % (Amersham, UK)
- Substrat de révélation : ECL Advance Western Blotting Detection (Amersham, UK)
- Film photographique (Amersham, UK)
- Solutions de révélation et de fixation (Ilford, 2000RT Imaging, US)

### 4.3. Méthodes

#### 4.3.1. Extraction des protéines

Les boîtes de culture dont le milieu a été préalablement enlevé sont déposées sur glace. Les cellules sont lysées en présence de 200  $\mu$ l de tampon de lyse 1x (tableau 12), et le lysat est rassemblé à l'aide d'un petit racloir et transféré dans un Eppendorf sur glace. Celui-ci est ensuite centrifugé à 13 000 rpm à 4°C pendant 5 minutes. Le surnageant est alors récupéré et aliquoté dans de nouveaux Eppendorfs. Les échantillons sont conservés à -70°C.

<b>Tampon de transfert</b>	
Composition	pour 5 litres
TRIS (ICN, Biomedicals, USA)	24 g
Glycine (ICN, Biomedicals, USA)	115 g
Méthanol	1 litre
H <sub>2</sub> O	Mise à volume

**Tableau 21** : Composition du tampon de transfert

<b>TBS-Tween 0,1 %</b>	
Composition	pour 1 litre
NaCl (Merck, Germany)	2,42 g
Tris (Merck, Germany)	8 g
Tween (Sigma, USA)	1 ml

**Tableau 22** : Composition du TBS-Tween 0,1 %

<b>Anticorps primaires</b>	<b>Dilution</b>	<b>Provenance</b>	<b>Source et isotype</b>	<b>Spécificité</b>
p38 total	1/ 1000	Cell signaling	IgG polyclonal de lapin	p38 phosphorylé et non phosphorylé
Phospho-p38	1/1000	Cell signaling	IgG polyclonal de lapin	p38 phosphorylé
Akt total	1/1000	Cell signaling	IgG polyclonal de lapin	Akt1/Akt2/Akt3 non phosphorylé
Phospho-Akt	1/1000	Cell signaling	IgG monoclonal de lapin	Akt phosphorylé
ERK1/2 total	1/1000	Cell signaling	IgG polyclonal de lapin	ERK1/ERK2 phosphorylé
Phospho ERK1/2	1/1000	Cell signaling	IgG monoclonal de souris	ERK1/ERK2 non phosphorylé
EGF-R total	1/1000	Cell signaling	IgG polyclonal de lapin	EGF-R non phosphorylé
Phospho-EGF-R	1/500	Biosource	IgG monoclonal de lapin	EGF-R phosphorylé
SAPK/JNK total	1/1000	Cell signaling	IgG polyclonal de lapin	SAPK/JNK non phosphorylé
Phospho-SAPK/JNK	1/2000	Cell signaling	IgG monoclonal de souris	p46/p54 SAPK/JNK phosphorylé
HB-EGF	1/2000	Cell signaling	IgG polyclonal de chèvre	proHB-EGF et HB-EGF
HIF-1 $\alpha$	1/2000	BD Transduction	IgG monoclonal de souris	HIF-1 $\alpha$
$\alpha$ -tubuline	1/100 000	Sigma	IgG monoclonal de souris	$\alpha$ -tubuline
$\beta$ -actine	1/100 000	Sigma	IgG monoclonal de souris	$\beta$ -actine

**Tableau 23** : Liste et caractéristiques des anticorps primaires utilisés pour l'immunodétection de protéines par Western blot

#### 4.3.2. Dosage de la concentration en protéines par la méthode de Bradford

Cette méthode permet d'estimer la quantité de protéines présente dans un échantillon. Un volume déterminé d'échantillon à tester est prélevé et ajouté à 1 ml de réactif de Bradford dilué 5x dans de l'eau distillée et filtré. Ensuite, 5 minutes après l'ajout de l'extrait, la densité optique (DO) est mesurée au spectrophotomètre à 595 nm, mis préalablement à zéro avec de l'eau. La DO mesurée est proportionnelle à la concentration en protéines, et doit être normalisée à l'aide de différents contrôles. Le blanc échantillon correspond au tampon de lyse avec lequel les cellules ont été lysées, l'étalon est constitué de BSA (Bovine Serum Albumine) de concentration connue (2µg/ml), enfin le blanc étalon est constitué d'eau. La concentration en protéines est calculée à partir des DO mesurées en duplicat en utilisant la formule suivante :

$$\mu\text{g de protéine}/\mu\text{l} = \frac{((\text{moyenne test} - \text{moyenne blanc test})/(\text{moyenne étalon} - \text{moyenne blanc étalon})) \times 5}{\text{volume des échantillons}}$$

#### 4.3.3. Préparation des échantillons

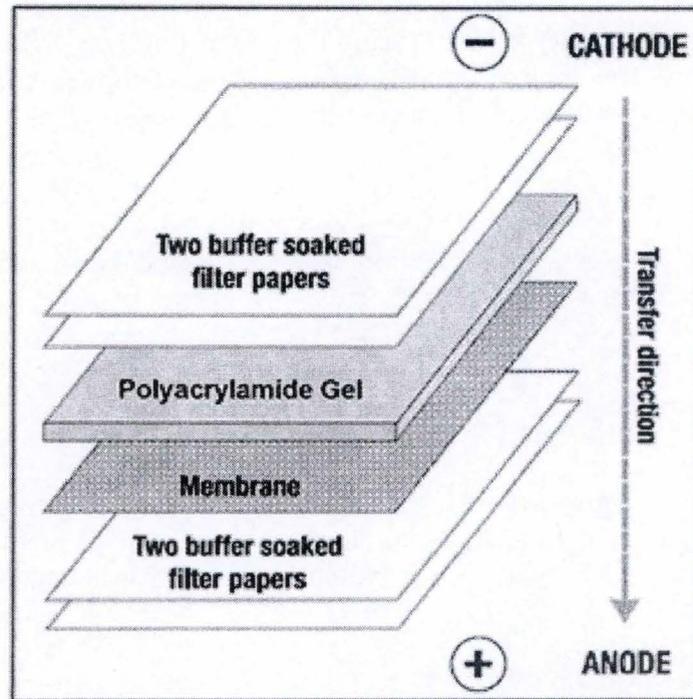
Une quantité équivalente de protéines est prélevée pour chaque échantillon et portée à un volume de 40 µl avec de l'eau distillée. Le bleu de charge concentré 5x (tableau 13) est ajouté pour obtenir une dilution finale de 1x et les protéines sont dénaturées pendant 5 minutes à 100°C.

#### 4.3.4. Electrophorèse

Le gel séparateur (tableaux 14-16) est coulé entre deux plaques de verre séparées par des spacers. De l'isobutanol saturé en eau est ensuite déposé à la surface du gel afin de l'aplanir et de permettre sa polymérisation tout en empêchant sa déshydratation. Après 1 heure de polymérisation, l'isobutanol est délicatement enlevé et la surface du gel polymérisé est rincée trois fois avec de l'eau distillée avant d'être séchée à l'aide d'un morceau de papier Watman. Le gel concentrateur (tableau 17-19) est ensuite coulé et un peigne est placé dans celui-ci afin de former les puits de chargement. Après 45 minutes de polymérisation, le peigne est retiré et les deux plaques de verre contenant les gels polymérisés sont placées dans une cuve adéquate. Le tampon d'électrophorèse (tableau 20) est ajouté de part et d'autre des gels et les échantillons sont déposés dans chaque puits. Afin de s'assurer de la localisation de notre protéine d'intérêt, un étalon de poids moléculaire ou « ladder » est également chargé dans un des puits. Les échantillons une fois chargés vont migrer 30 minutes à travers le gel concentrateur à 35 mA et 3 heures à travers le gel séparateur à 45 mA.

#### 4.3.5. Transfert

Une membrane de polyvinylidenedifluoride (PVDF) ainsi que quatre papiers Whatman sont découpés à la taille du gel séparateur. La membrane est réhydratée pendant 1 minute dans du méthanol 100 % puis équilibrée dans du tampon de transfert (tableau 21) durant 5 minutes. Une fois l'électrophorèse terminée, le gel est démoulé et assemblé à la membrane en sandwich entre les papiers Whatman (figure 2.1) dans une cuve de transfert. Les bulles d'air



**Figure 2.1 :** Représentation du montage en « sandwich » du gel d'électrophorèse et de la membrane de transfert

entre chaque couche du sandwich sont éliminées et les différents composants sont humectés avec une petite quantité de tampon de transfert afin de maintenir le système suffisamment humide. Le transfert s'effectue soit pendant toute la nuit à 30 mA, soit pendant 2 heures à 150 mA.

#### 4.3.6. Saturation et incubation avec les anticorps

Après le transfert, la membrane est placée avec les protéines transférées, orientées vers le dessus, dans un cylindre avec une solution de saturation (ou bloquante) TBS-Tween 0,1 % (tableau 22) + agent bloquant 2 % pendant 1 heure à température ambiante ou toute la nuit à 4°C. Cette étape permet de bloquer les sites de liaison non spécifiques des anticorps par saturation de la membrane avec des protéines contenues dans la solution bloquante. Ensuite, la membrane est incubée avec l'anticorps primaire spécifique de la protéine d'intérêt, dilué dans la solution de saturation TBS-Tween 0,1 % + agent bloquant 2 % pendant 2 heures à température ambiante ou une nuit à 4°C. Après cette incubation, la membrane est lavée 3 fois 15 minutes dans du TBS-Tween 0,1 % avant d'être incubée en présence de l'anticorps secondaire couplé à la HRP (Horse Radish Peroxidase) pendant 45 minutes. L'anticorps secondaire est également dilué dans la solution de saturation. Les dilutions des anticorps primaires et secondaires et les temps d'incubation en présence de ces anticorps sont fonction de la protéine à détecter (tableaux 23 et 24). Après l'incubation avec l'anticorps secondaire, la membrane est à nouveau lavée 3 fois 20 minutes dans du TBS-Tween 0,1 % avant l'étape de révélation.

#### 4.3.7. Révélation

La révélation de la protéine d'intérêt se fait par une réaction de chémoluminescence. Le substrat (solution de révélation ECL) de l'enzyme HRP est versé sur la membrane pendant 5 minutes. Ensuite, un film autoradiographique est placé sur la membrane durant un temps d'exposition adéquat (variable suivant la protéine) et le film est ensuite développé.

## **5. Analyse de l'expression génique par PCR en temps réel**

### *5.1. Principe*

La PCR (polymérase chain reaction) en temps réel est une technique basée sur la PCR classique et qui correspond à l'amplification d'un fragment d'ADN spécifique délimité par des amorces. Après rétro-transcription, cette technique permet de mesurer des variations d'abondance de transcrits entre une condition contrôle et plusieurs conditions tests. La première étape consiste en l'extraction de l'ARN total des cellules. Les extraits d'ARN totaux sont ensuite rétro-transcrits de manière à générer de l'ADNc (ADN complémentaire) pour chaque ARNm (ARN messenger). C'est cet ADNc qui va être amplifié par PCR. La quantité d'amplicons est alors mesurée en fin de chaque cycle d'amplification à l'aide d'une molécule fluorescente, le SYBR Green, qui a la capacité de s'intercaler dans l'ADN double brin. La fluorescence émise à 520 nm est alors proportionnelle à la quantité d'ADN de départ. La PCR en temps réel repose aussi sur la notion de cycle seuil ou Ct (cycle threshold). Celui-ci peut être défini comme le cycle de PCR au cours duquel la fluorescence émise se distingue du bruit

Anticorps primaires	Dilution	Provenance	Source et isotype	Spécificité
Ac secondaire anti-IgG de lapin HRP	1/300 000	Cell signaling	IgG de chèvre	IgG de lapin
Ac secondaire anti-IgG de souris HRP	1/300 000	Cell signaling	IgG de cheval	IgG de souris
Ac secondaire anti-IgG de chèvre HRP	1/300 000	DakoCytomation	IgG de lapin	IgG de chèvre

**Tableau 24** : Liste et caractéristiques des anticorps secondaires utilisés pour l'immunodétection de protéines par Western Blot

Kit d'extraction RNeasy (Qiagen, Belgium)
Composition
Colonne RNeasy Mini Spin
Colonne QIAshredder Spin
Tubes collecteurs
Tampon RLT (+ $\beta$ -mercaptoéthanol)
Tampon RW1
Tampon RPE (+ Ethanol)
H <sub>2</sub> O RNase-Free

**Tableau 25** : Composition du kit d'extraction RNeasy

Kit "reverse transcription" (Invitrogen, Belgium)	
Composition	Concentration
First Strand Buffer (Tris-HCl 250 mM, KCl 375 mM, MgCl <sub>2</sub> 15mM)	5x
DTT	0,1 M
Oligo-dT	500 $\mu$ g/ml
dNTP	10 mM
SuperScript II transcriptase	200 unités

**Tableau 26** : Composition du Kit "reverse transcription"

Mix "reverse transcription"	
Composition	pour 20 $\mu$ l
ARNm	1 $\mu$ g
First Strand Buffer (Tris-HCl 250 mM, KCl 375 mM, MgCl <sub>2</sub> 15mM)	1x (4 $\mu$ l)
DTT	0,01 mM (2 $\mu$ l)
Oligo-dT	50 $\mu$ g/ml (1 $\mu$ l)
dNTP	10 mM (1 $\mu$ l)
SuperScript II transcriptase	20 unités (1 $\mu$ l)
H <sub>2</sub> O RNase-Free	(x $\mu$ l)

**Tableau 27** : Composition du Mix "reverse transcription"

Mix PCR	
Composition	pour 1 puits
SYBR Green Power 2x	10 $\mu$ l (1/2 volume total)
Amorces sense	2,5 $\mu$ l (1/8 volume total)
Amorces antisens (voir tableau 31)	2,5 $\mu$ l (1/8 volume total)
ADNc (dilué)	5 $\mu$ l
Vol final = 20 $\mu$ l	

**Tableau 28** : Composition du mix PCR

de fond. Ce Ct se trouve dans la phase exponentielle de la réaction d'amplification, ce qui permet de calculer la quantité d'ADNc au départ, sans influence de la limitation en amorces. Le cycle seuil est inversement proportionnel à la quantité de matériel au départ et donc, il sera d'autant plus faible que la quantité d'ADN au départ est élevée. Cette valeur est normalisée à celle d'un gène dont la quantité ne varie pas selon les conditions expérimentales dans le type cellulaire d'intérêt.

## 5.2. *Matériel*

- Kit d'extraction RNeasy (Qiagen, Belgium) (*Tableau 25*)
- Ethanol 70 % (Merck, Germany)
- Kit Super Script H Reverse transcriptase (Invitrogen, Belgium) (*Tableau 26*)
- Mix "reserve transcription" (*Tableau 27*)
- Mélange PCR (*Tableau 28*)
- Amorces (*tableau 29*)
- Système de détection (Real time PCR 7300 System Software) (Applied Biosystem, Holland)
- Plaques MicroAmp (Applied Biosystem, Holland)
- Eppendorfs traités à l'eau DEPC
- Spectrophotomètre (GeneQuant, Pharmacia Biotech, Sweden)

## 5.3. *Méthodes*

### 5.3.1. Extraction de l'ARN total

(Toutes les manipulations avec l'ARN se font en conditions RNase free).

Les boîtes de culture dont le milieu a été préalablement enlevé sont déposées sur glace. Les cellules sont lysées en présence de 350 µl de tampon RLT (tampon de lyse) (*tableau 25*). Les cellules lysées sont ensuite collectées à l'aide d'un racloir et transférées dans des colonnes QIAshredder Spin (Qiagen, Belgium) (*tableau 25*). Ces colonnes sont déposées sur des tubes collecteurs et sont centrifugées pendant 2 minutes à 13 000 rpm. Les colonnes QIAshredder permettent de dérouler et d'étaler l'ARN contenu dans le lysat cellulaire. Après centrifugation, le lysat cellulaire est récupéré dans les tubes collecteurs et un volume de 350 µl d'éthanol 70 % est ajouté dans chaque tube afin de précipiter l'ARN. Les 700 µl d'échantillon (lysate+éthanol) sont alors transférés dans de nouvelles colonnes RNeasy Mini Spin (Qiagen, Belgium) (*tableau 25*) placées dans de nouveaux tubes collecteurs. Ces colonnes sont centrifugées à 10 000 rpm pendant 30 secondes. Les colonnes RNeasy contiennent une membrane en silice permettant d'isoler l'ARN. Le contenu des tubes collecteurs est éliminé et de nouveaux tubes sont remplacés sous les colonnes RNeasy. L'étape suivante consiste à rincer les colonnes RNeasy contenant l'ARN à l'aide de deux tampons (tampons RW1 et RPE) (*tableau 25*). En pratique, 500 µl de chaque tampons sont déposés dans les colonnes RNeasy avant d'être centrifugés pendant 30 secondes à 10 000 rpm. Après les étapes de rinçage, 60 µl d'eau RNase-free sont déposés sur chaque colonne RNeasy. Celles-ci sont à nouveau centrifugées 1 minute à 10 000 rpm pour éluer l'ARN dans des Eppendorfs RNase-free traités à l'eau DEPC. Enfin, une certaine quantité d'ARN est prélevée de chaque échantillon et est diluée dans un certain volume d'eau RNase free, afin d'en estimer la concentration. Le dosage s'effectue par mesure de l'absorbance des différentes dilutions à 260 nm au spectrophotomètre.

Amorces	Séquence	Concentration finale	Provenance
36B4 sense 36B4 antisense	ATCAACGGGTACAAACGAGTC CAGATGGATCAGCCAAGAAGG	300 nM	Applied Biosystems
LDHA sense LDHA antisense	TGGCAGAGAGTATAATGAAGAATCTTAGG GAAGACATCATCCTTTATTCCGATA	300 nM	Applied Biosystems
BNIP3 sense BNIP3 antisense	TTTGCTGGCCATCGGATT ACCAAGTCAGACTCCAGTTCT	300 nM	Applied Biosystems
HB-EGF sense HB-EGF antisense	TGGCCCTCCACTCCTCATC GGGTCACAGAACCATCCTA	300 nM	Applied Biosystems
Involucrine sense Involucrine antisense	TGAAACAGCCAACCTCCAC TTCCTCTTGCTTTGATGGG	300 nM	Applied Biosystems
hLAMA3 sense hLAMA3 antisense	CGGTGGTGTGTTGGCCATG ACCACCAAGCAGGAAGACA	300 nM	Applied Biosystems

**Tableau 29** : Séquence des amorces utilisées lors de l'amplification de l'ADNc

### 5.3.2. Rétro-transcription

La rétro-transcription ou la transcription inverse est réalisée à l'aide du Kit Super Script H Reverse transcriptase (Invitrogen, Belgium). Les oligo-dT reconnaissent la queue poly-A des ARNm et font office d'amorces pour la transcriptase inverse. Cette enzyme va alors synthétiser les brins d'ADN complémentaires à l'ARNm. Premièrement, un volume contenant 1 µg d'ARN est prélevé dans chaque microtube et ajusté à 11 µl avec de l'eau RNase free. L'ajout d'amorces oligo-dT ainsi que de dNTP permet d'obtenir un volume de 13 µl par tube (tableau 27). Ce volume est incubé pendant 5 minutes à 65°C afin de dénaturer l'ARN et de permettre l'hybridation des amorces poly-T à la queue poly-A des ARNm. Les microtubes sont ensuite placés sur glace et chacun reçoit 6 µl d'un mix contenant le First Strand Buffer et le DTT (tableau 27). Ensuite, on incube le tout à 42°C pendant 2 minutes avant d'ajouter 1 µl d'enzyme SuperScript II transcriptase à chaque microtube. On incube de nouveau à 42°C pendant 50 minutes afin que la réaction de transcription inverse se réalise. La SuperScript II transcriptase est ensuite inactivée par une incubation de 15 minutes à 70°C. Une fois la réaction terminée, les échantillons d'ADNc sont conservés à -20°C.

### 5.3.3. PCR en temps réel

Afin de mesurer la variation d'ARNm par la technique de PCR en temps réel, il faut réaliser un « mix PCR » pour chaque gène étudié (tableau 28). Ce mix doit au final contenir par puits 10µl de SYBR Green, 2.5 µl d'amorce sens (tableau 29) et 2.5 µl d'amorce antisens (tableau 29). 15 µl du mélange réactionnel ainsi que 5 µl de ADNc dilué dans 120 µl d'eau distillée sont placés dans les puits de la plaque MicroAmp (Applied Biosystem, Holland). Pour les blancs, les 5 µl d'ADNc sont remplacés par de l'eau. La plaque est ensuite couverte d'un film plastique autocollant, centrifugée à 1000 rpm pendant 3 minutes, puis placée dans le système de détection (Real time PCR 7300 System Software) pour réaliser l'amplification PCR. Afin de désappairer les brins de l'ADN, la réaction débute à 95°C durant une période de 10 minutes. Ensuite, cette température est maintenue pendant 15 secondes, puis diminue à 60°C durant 1 minute pour l'étape d'hybridation/élongation, ce qui correspond à un cycle. La réaction se termine après 40 cycles.

Après l'amplification PCR, le niveau d'induction est calculé par rapport à une condition contrôle. Tout d'abord, la valeur Ct (cycle threshold) d'un gène donné pour une condition donnée est normalisée par rapport à la valeur Ct de 36B4 (le gène de référence de RPLPo (Human ribosomal large protein) pour nos expériences). Le résultat de cette normalisation donne donc une valeur de  $\Delta Ct$  pour chaque condition pour un gène donné. Ces valeurs sont ensuite soustraites par le  $\Delta Ct$  de la condition par rapport à laquelle on souhaite normaliser les valeurs (dans notre cas, il s'agit de la normoxie). Les valeurs obtenues sont alors appelées  $\Delta\Delta Ct$ . En effectuant l'opération  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , on obtient le niveau d'induction du gène pour chaque condition par rapport à la condition de référence.

Solution	Composition
PBS	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 9 g de NaCl (Merck, Germany)</li> <li>- 20 ml de tampon phosphate 0.5 M</li> <li>- Mise à volume avec H<sub>2</sub>O distillée pour un volume final de 1 L</li> </ul>
PBS/PFA	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 100 ml de PBS</li> <li>- 4 g de paraphormaldéhyde (Merck, Germany)</li> </ul>
PBS/BSA 2%	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 100 ml de PBS</li> <li>- 2 g de BSA (Bovine Serum Albumine) (Sigma, Belgium)</li> </ul>
PBS /Triton X-100 1 %	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 100 ml de PBS</li> <li>- 1 g de Triton X-100 (Sigma, Belgium)</li> </ul>
Solution de TOPRO 3	<ul style="list-style-type: none"> <li>- TOPRO 3 (Molecular Probes) dilué 80 x dans une solution de RNase (ICN Biomedicals) à 2 mg/ml dans du PBS</li> </ul>

**Tableau 30** : Solutions utilisées pour le marquage en immunofluorescence

Anticorps	Dilution	Provenance	Source et isotype	Spécificité
HIF-1 $\alpha$ (anticorps primaire)	1/100	BD Transduction	IgG monoclonal de souris	HIF-1 $\alpha$
Anti-souris Alexa 488 (anticorps secondaire)	1/500	Invitrogen	IgG polyclonal de chèvre	IgG de souris

**Tableau 31** : Liste des anticorps utilisés en immunofluorescence

## 6. Marquage en immunofluorescence

### 6.1. Principe

Le marquage en immunofluorescence est une technique qui permet de visualiser et de localiser une protéine d'intérêt au sein de la cellule. Cette technique qualitative nécessite une fixation et une perméabilisation des cellules ou des coupes d'épidermes, de manière à en rendre chacun des constituants accessibles. Le principe de cette technique repose sur l'utilisation d'un anticorps spécifique dirigé contre la protéine d'intérêt. Cet anticorps est ensuite détecté au moyen d'un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome qui émet de la fluorescence après excitation à une longueur d'onde déterminée. Les noyaux des cellules sont également détectés grâce au TO-PRO 3, un agent intercalant de l'ADN. La détection des éléments marqués se fait par microscopie confocale.

### 6.2. Matériel

- Lamelles couvre-objet de 18 mm de diamètre (Vel, Germany)
- Lames porte-objet de 2.6 x 7.6 cm (Vel, Germany)
- PBS (Tableau 30)
- PBS/PFA 4% (Merck, Germany) (Tableau 30)
- PBS/Glycine 0.1 M (Tableau 30)
- PBS/BSA 2 % (Tableau 30)
- PBS Triton X-100 1 % (Tableau 30)
- Solution TO-PRO 3 (Molecular Probes, USA) (Tableau 30)
- Anticorps primaires et secondaires (Tableau 31)
- Mowiol (Sigma, Germany)
- Microscope confocal ( Leica, Germany)

### 6.3. Méthode

Les protocoles de culture et de traitements des kératinocytes suivent les indications données précédemment, si ce n'est que les kratinocytes sontensemencés sur des lamelles couvre-objet dans des plaques de 6 ou de 12 puits. Après le traitement, les cellules sont fixées pendant 15 minutes avec le PBS/paraformaldéhyde 4 % (PBS/PFA 4 %) (tableau 30). Cette étape est suivie de 3 rinçages dans du PBS contenant 0,1 M de glycine pour neutraliser les aldéhydes libres. Les protéines d'intérêt étant cytoplasmiques, une étape de perméabilisation de 5 minutes est nécessaire avec une solution de PBS + Triton X-100 1 % (tableau 30), un détergent neutre. Les cellules fixées et perméabilisées sont ensuite rinçées 3 fois dans une solution de PBS/BSA 2 % (tableau 30). Les rinçages au PBS sont importants afin d'éliminer les traces de PBS/PFA 4 % et de Triton X-100, tandis que la BSA permet de saturer les sites de liaison non spécifique des anticorps. Suite aux rinçages, 30 µl d'anticorps primaire (tableau 31) dilué dans du PBS/BSA 2 %, sont déposés sur un parafilm placé en chambre humide. La lamelle couvre-objet est sortie du puits et la face portant les cellules est mise au contact de la goutte d'anticorps pendant 2 heures à température ambiante. Après l'incubation avec l'anticorps, les lamelles sont replacées dans les puits de la plaque de culture et 3 rinçages avec le PBS/BSA 2 % ont lieu afin d'éliminer l'excès d'anticorps non fixé. L'incubation avec

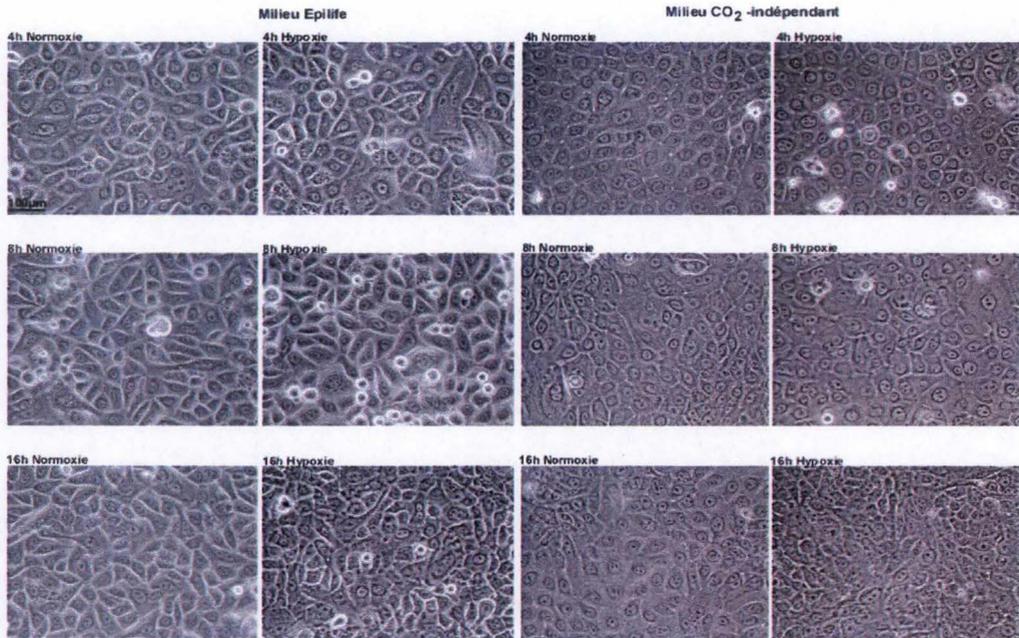
## *Matériel et Méthodes*

l'anticorps secondaire (tableau 31) se déroule comme pour l'anticorps primaire, excepté qu'elle dure seulement une heure à température ambiante et dans l'obscurité afin préserver le fluorochrome couplé à l'anticorps. Après l'incubation, les lamelles couvre-objet sont à nouveau transférées dans la plaque de culture multipuits pour y être rincées 3 fois dans le PBS. L'étape suivante consiste à marquer les noyaux en incubant 30 minutes les cellules avec le TO-PRO 3 dilué 80x dans une solution de RNase (tableau 31). L'incubation avec le TOPRO 3 est semblable à celle avec l'anticorps secondaire, c'est-à-dire sur parafilm en chambre humide dans l'obscurité. Finalement, les lamelles couvre-objet sont rincées 3 fois dans le PBS avant d'être montées sur lame porte-objet avec du Mowiol préchauffé à 54°C. Le Mowiol est un milieu de montage préservant la fluorescence. Les lames porte-objets sont ensuite conservées à 4°C avant d'être observées au microscope confocal.

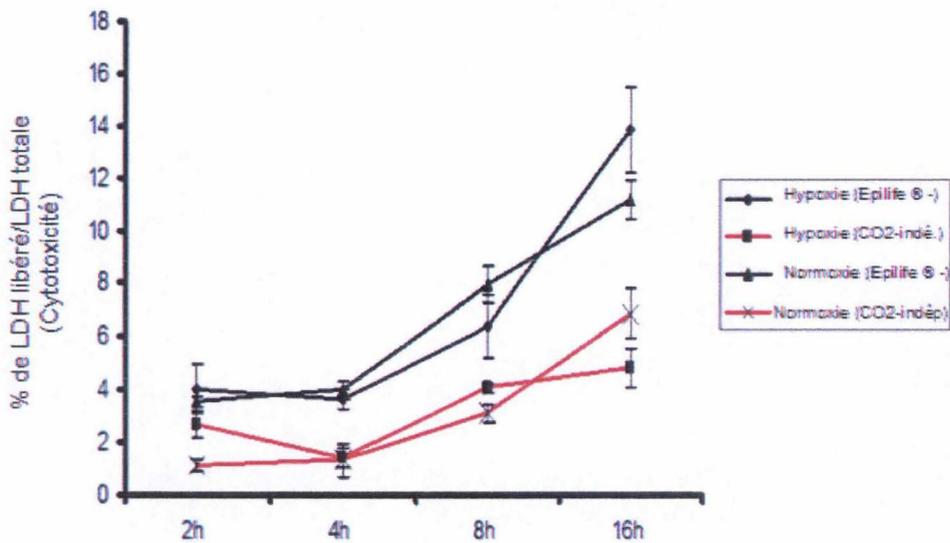
# **RESULTATS**

# **RESULTATS**

A.



B.



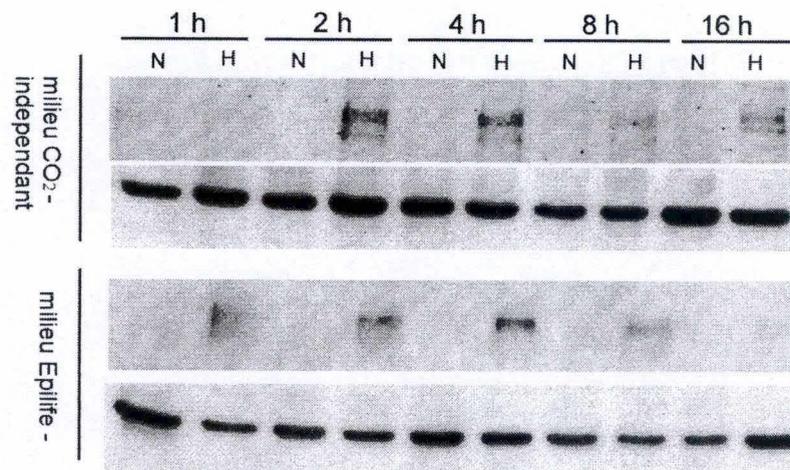
**Figure 3.1 : Effet de l'hypoxie sur la morphologie et la viabilité des kératinocytes.** Les cultures de kératinocytes ont été incubées en conditions d'hypoxie ou de normoxie. Les incubations ont été réalisées en présence soit du milieu Epilife<sup>®</sup> - soit du milieu CO<sub>2</sub>-indépendant durant 2, 4, 8 et 16 heures. (A) Observation en microscopie à contraste de phase de la morphologie cellulaire après 4, 8 et 16 heures d'incubation. (B) Mesure de la libération de la LDH après 2, 4, 8, et 16 heures d'incubation en hypoxie et en normoxie. Les résultats présentés sont des moyennes de 3 valeurs ( $\pm$  1 déviation standard).

## 1. L'effet de l'hypoxie sur la viabilité des kératinocytes

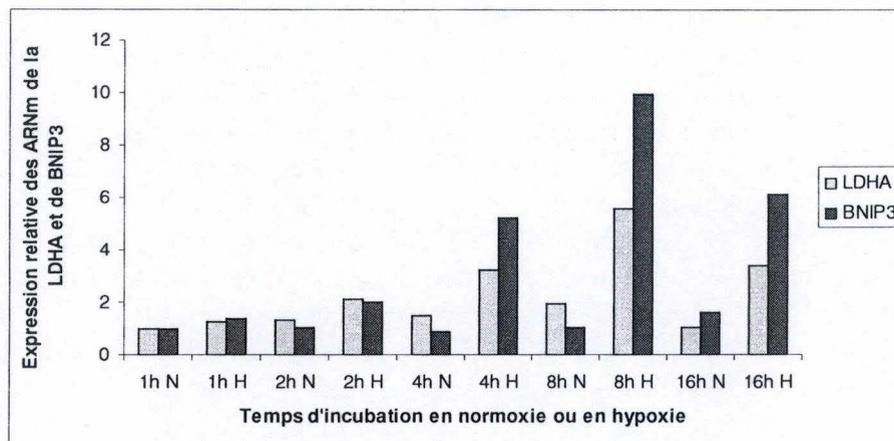
L'incubation des cultures cellulaires dans les conditions d'hypoxie (1 % O<sub>2</sub> et 99 % N<sub>2</sub>) nécessite normalement la présence d'un milieu spécifique, dit « CO<sub>2</sub>-indépendant », afin de maintenir le pH physiologique en absence de CO<sub>2</sub>. Ce milieu convient très bien à la plupart des cellules. Les kératinocytes sont cependant cultivés dans des conditions particulières, notamment en présence d'une basse concentration en calcium. Nous avons donc voulu étudier si une incubation des kératinocytes en conditions d'hypoxie et de normoxie en présence du milieu autocrine Epilife<sup>®</sup> - spécifique à ces cellules pourrait être réalisée. C'est pourquoi, nous avons en guise de mise au point, comparé la morphologie et la viabilité des kératinocytes dans les conditions d'hypoxie et de normoxie dans le milieu Epilife<sup>®</sup> - ainsi que dans le milieu CO<sub>2</sub>-indépendant.

Tout d'abord, l'analyse par microscopie à contraste de phase montre un effet du milieu sur la morphologie des kératinocytes alors que l'hypoxie ne semble pas l'influencer (figure 3.1A). En présence du milieu Epilife<sup>®</sup> -, les jonctions intercellulaires des kératinocytes apparaissent beaucoup plus réfringentes comparées à celles des cellules incubées en présence du milieu CO<sub>2</sub>-indépendant. De plus, les cellules perdent leur forme polyédrique et apparaissent plus étalées dans le milieu CO<sub>2</sub>-indépendant et cela, particulièrement après 16 heures d'incubation. La concentration en calcium dans les deux milieux peut expliquer les différences morphologiques observées. Le milieu autocrine Epilife<sup>®</sup> - possède une faible concentration en calcium ( $\pm 0,06$  mM) comparé au milieu CO<sub>2</sub>-indépendant qui contient une concentration beaucoup plus élevée ( $\pm 1,5$  à 2 mM). Une augmentation de la concentration en calcium dans les cultures de kératinocytes induit une redistribution rapide des E- et des P-cadhérines ainsi que de la vinculine et de la desmoplakine au niveau des jonctions intercellulaires (Wheelock et Jensen, 1992). Ces protéines représentent les constituants majeurs des jonctions adhérentes de la plupart des cellules épithéliales, et sont toutes dépendantes de la concentration en ions Ca<sup>++</sup>. Dès lors, une faible concentration en ions Ca<sup>++</sup> diminue l'adhérence entre les cellules, ce qui rend leurs jonctions intercellulaires plus réfringentes, comme on l'observe en présence du milieu Epilife<sup>®</sup> -. Par contre, une concentration plus importante augmente l'adhérence entre les cellules. De plus, le calcium favorise également l'interaction des intégrines avec la matrice extracellulaire permettant aux cellules de s'étaler, comme on l'observe en présence du milieu CO<sub>2</sub>-indépendant. l'hypoxie, par contre, ne semble pas influencer ces paramètres.

Parallèlement à l'observation de la morphologie des kératinocytes au microscope à contraste de phase, en présence des deux milieux et après les différents temps d'incubation en hypoxie et en normoxie, nous avons mesuré la cytotoxicité. La cytotoxicité éventuelle exercée par l'hypoxie sur les cultures de kératinocytes confluents en présence du milieu Epilife<sup>®</sup> - ou du milieu CO<sub>2</sub>-indépendant est évaluée à l'aide d'un test LDH (lactate déshydrogénase). Le principe de base de ce test est une mesure de l'activité de l'enzyme LDH qui est libérée dans le milieu cellulaire par les cellules endommagées par un stress quelconque. Cette mesure permet ainsi de quantifier le taux de mort cellulaire après une incubation dans une condition donnée. Les résultats de cette expérience indiquent peu de variations entre les conditions d'hypoxie et de normoxie dans chacun des milieux au cours des différents temps d'incubation (figure 3.1B). Le taux de toxicité pour les cellules incubées dans le milieu CO<sub>2</sub>-indépendant reste plus faible par rapport à celui pour les cellules incubées dans le milieu Epilife<sup>®</sup> -.



**Figure 3.2 : Effet de l'hypoxie sur l'activité de HIF-1 : Analyse de l'induction de HIF-1 $\alpha$ .** Les cultures de kératinocytes ont été incubées en conditions d'hypoxie (H) ou de normoxie (N) en présence soit du milieu Epilife<sup>®</sup> - soit du milieu CO<sub>2</sub>-indépendant durant 2, 4, 8 et 16 heures. Des lysats protéiques totaux sont ensuite récupérés et analysés par Western blot en révélant la protéine HIF-1 $\alpha$  à l'aide d'un anticorps spécifique. L'homogénéité du chargement a été vérifiée par la détection de l' $\alpha$ -tubuline.



**Figure 3.3 : Effet de l'hypoxie sur l'activité de HIF-1 : Analyse de l'expression de deux gènes cibles de HIF-1.** Les cultures de kératinocytes ont été incubées en conditions d'hypoxie ou de normoxie durant 2, 4, 8 et 16 heures. L'ARN messager a été extrait et rétro-transcrit en ADNc puis soumis à une PCR en temps réel à l'aide d'amorces spécifiques de BNIP3 ou de LDHA. Les valeurs de CT ont été normalisées par rapport au gène de référence 36B4. Les résultats sont exprimés par rapport à la condition normoxie 1 heure. Cette expérience a été réalisée deux fois de manière indépendante et les résultats présentés sont des moyennes.

Cependant, le niveau de toxicité reste acceptable dans les deux milieux, et l'hypoxie n'a pas d'effet marqué sur la viabilité cellulaire dans ces milieux.

## 2. Effet de l'hypoxie sur l'activité de HIF-1

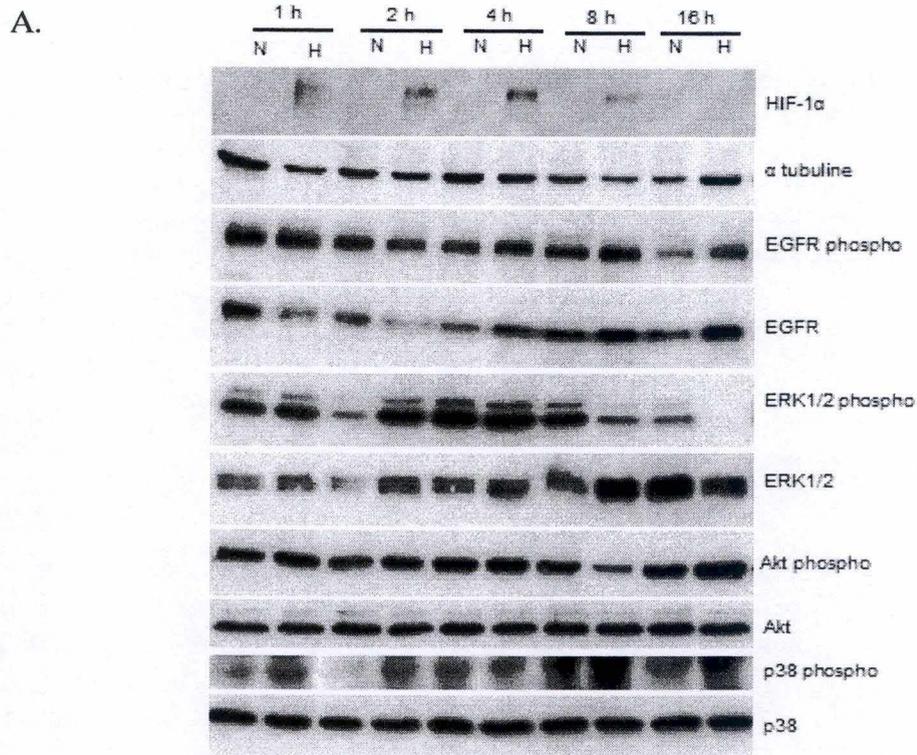
Dans ce chapitre, nous nous sommes tout d'abord intéressé à l'effet de l'hypoxie sur la stabilisation de la sous-unité  $\alpha$  dans les kératinocytes par une analyse en Western blot. Ensuite, nous avons mesuré l'activité transcriptionnelle de HIF-1 en évaluant la quantité de transcrits de certains de ses gènes cibles afin de vérifier si les kératinocytes répondent à l'hypoxie par l'activité de ce facteur. Enfin, nous avons analysé par Western blot plusieurs acteurs potentiels des voies de signalisation régulant l'activité du facteur HIF-1 afin de caractériser cette réponse dans les kératinocytes.

### 2.1. Analyse de l'induction de HIF-1 $\alpha$

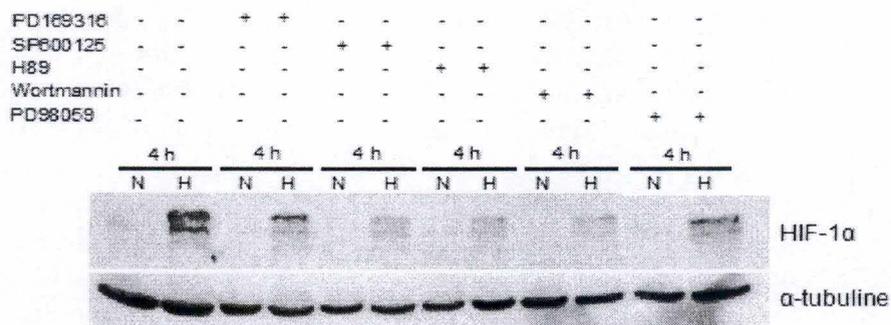
Afin de déterminer si l'hypoxie induit la stabilisation de HIF-1 $\alpha$  dans les kératinocytes, nous avons effectué une analyse par Western blot de l'abondance de la protéine HIF-1 $\alpha$  à partir de lysats cellulaires totaux obtenus immédiatement après différents temps d'incubation en conditions d'hypoxie. Un contrôle négatif en normoxie a également été effectué pour chaque condition. Remarquons par ailleurs que l'incubation des cellules en hypoxie ou en normoxie s'est réalisée parallèlement en présence soit du milieu Epilife<sup>®</sup>-, soit du milieu CO<sub>2</sub>-indépendant, afin de définir les conditions optimales d'incubation pour induire la stabilisation de HIF-1 $\alpha$  dans les kératinocytes.

Les résultats du Western blot (figure 3.2) ne montrent aucune bande située aux environs de 120 kDa, correspondant au poids moléculaire de HIF-1 $\alpha$ , pour les lysats de cellules incubées dans les conditions de normoxie. Par contre, la protéine HIF-1 $\alpha$  est détectable dans la plupart des lysats de cellules incubées dans les conditions d'hypoxie et cela pour les deux cinétiques réalisées en présence de milieu Epilife<sup>®</sup>- ou de milieu CO<sub>2</sub>-indépendant. Cependant, nous pouvons observer quelques différences entre ces deux cinétiques. En effet, HIF-1 $\alpha$  est décelable dès 1 heure d'incubation en hypoxie dans le lysat de cellules incubées en présence du milieu Epilife<sup>®</sup>-, alors qu'il ne l'est pas pour le lysat de cellules incubées en présence du milieu CO<sub>2</sub>-indépendant. Inversement après 16 heures d'incubation en hypoxie, HIF-1 $\alpha$  est décelable dans le lysat de cellules incubées en présence du milieu CO<sub>2</sub>-indépendant mais ne l'est pas dans le lysat de cellules incubées en présence du milieu Epilife<sup>®</sup>-. Nous pouvons également constater que l'abondance de HIF-1 $\alpha$  s'avère la plus importante après 2 et 4 heures d'incubation en hypoxie dans les deux milieux de culture.

Remarquons par ailleurs qu'étant donné que HIF-1 $\alpha$  est clairement stabilisé dans les conditions d'hypoxie en présence de l'un ou l'autre de ces deux milieux testés et qu'il n'y a pas d'effet marqué sur la viabilité cellulaire en hypoxie dans les deux milieux (voir point 1.1), nous avons décidé d'utiliser le milieu Epilife<sup>®</sup>-, le plus approprié pour la culture des kératinocytes, pour toutes les expériences suivantes.



**B.**



**Figure 3.4 : Effet de l'hypoxie sur l'activité de HIF-1 : Analyse des voies de signalisation induites par l'hypoxie régulant l'activité de HIF-1.** (A) Les kératinocytes ont été incubés en conditions d'hypoxie ou de normoxie durant 1, 2, 4, 8 et 16 heures. (B) Les kératinocytes ont été traités durant 30 minutes avec l'inhibiteur de la MAPK p38 (PD169316 à 15  $\mu$ M), l'inhibiteur de JNK (SP600125 à 20  $\mu$ M), l'inhibiteur de PKA (H89 à 20  $\mu$ M), l'inhibiteur de PI3K (Wortmannin à 500  $\mu$ M) et l'inhibiteur des ERK1/2 (PD98059 à 40  $\mu$ M). Ensuite, les cellules sont incubées dans les conditions d'hypoxie ou de normoxie, toujours en présence des inhibiteurs, pour une durée de 4 heures. (A et B) Des lysats protéiques totaux sont ensuite récupérés et analysés par Western blot. La détection des différentes protéines a été réalisée grâce à des anticorps spécifiques. L'homogénéité du chargement a été vérifiée par la détection de la tubuline  $\alpha$  ou des formes totales des protéines d'intérêt.

## 2.2. Analyse de l'expression de deux gènes cibles de HIF-1

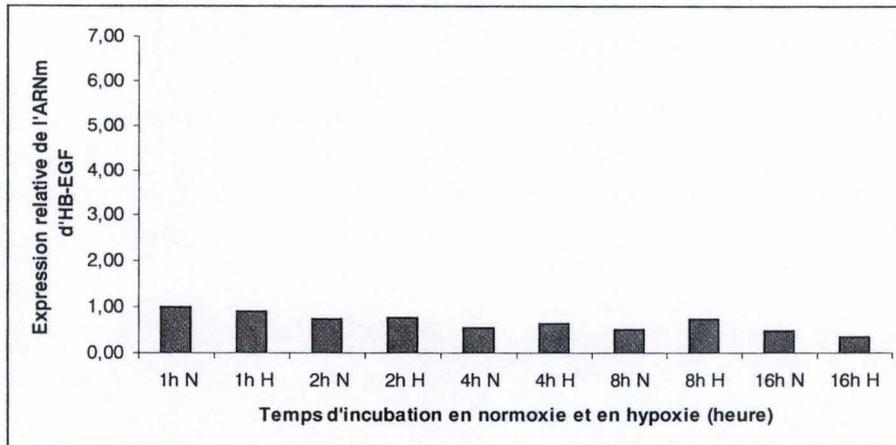
Afin de vérifier si la stabilisation de HIF-1 $\alpha$  conduit bien à une activation du facteur de transcription HIF-1, nous avons étudié l'effet de l'hypoxie sur l'expression de messagers d'une enzyme glycolytique, la LDHA (lactate déshydrogénase-A), et d'une protéine pro-apoptotique BNIP3 (Bcl-2/E1B 19kDa interacting protein), connues toutes les deux pour être des gènes cibles de HIF-1. Cette expérience s'est réalisée à partir d'ADNc, obtenus après rétro-transcription de l'ARN total extrait immédiatement après les différents temps d'incubation en conditions d'hypoxie. Un contrôle négatif en normoxie a également été effectué pour chaque temps d'incubation.

Les résultats sont représentés à la figure 3.3. L'expression des messagers de la LDHA et de BNIP3 varie très peu en fonction du temps d'incubation en normoxie. Par contre, en hypoxie, on observe une augmentation progressive de leur expression en fonction du temps d'incubation. Cette augmentation est cependant moins marquée pour les transcrits de la LDHA comparé à ceux de BNIP3. Après 16 heures d'incubation dans les conditions d'hypoxie, l'expression de ces messagers diminue. Cette diminution est parallèle à la diminution de l'abondance de HIF-1 $\alpha$  observée après 16 heures d'incubation dans les conditions d'hypoxie (figure 3.2).

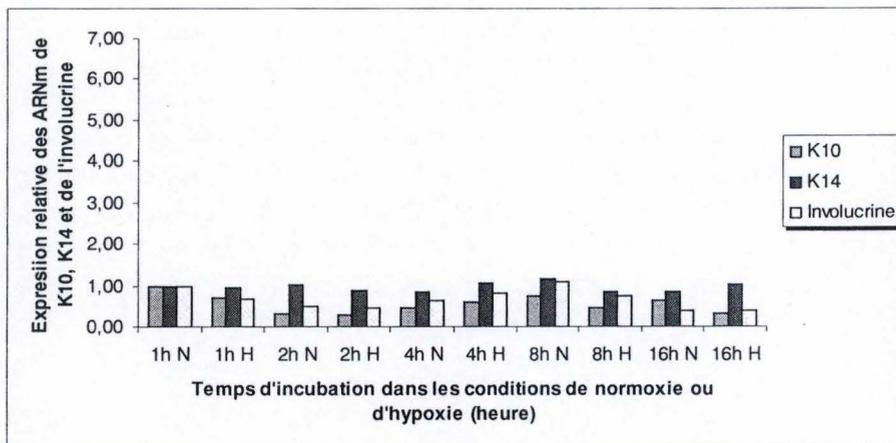
## 2.3. Analyse des voies de signalisation induites par l'hypoxie régulant l'activité de HIF-1

Afin d'émettre certaines hypothèses concernant la signalisation impliquée dans l'activation du facteur HIF-1 dans les kératinocytes, nous avons tout d'abord décidé d'analyser par Western blot l'abondance des formes actives (c'est-à-dire des formes phosphorylées) de plusieurs kinases, dont Akt et certaines MAP kinases comme la MAPK p38 et les ERK1/2, après différents temps d'incubation dans les conditions d'hypoxie. Ces kinases sont connues pour influencer l'activité de HIF-1 (voir Introduction). La forme active du récepteur de l'EGF, connu pour jouer un rôle dans la réponse aux stress chez les kératinocytes (Peus *et al.*, 1999), a également été analysée dans les mêmes conditions. Un contrôle négatif en normoxie a été effectué pour chaque temps d'incubation testé. Enfin, remarquons que cette analyse par Western blot est réalisée à partir des mêmes extraits cellulaires utilisés pour la détection de HIF-1 $\alpha$  dans l'expérience précédente.

Les résultats présentés à la figure 3.4A n'indiquent aucune modification de l'abondance de la forme phosphorylée d'Akt et du récepteur à l'EGF dans les conditions d'hypoxie par rapport aux conditions contrôles en normoxie. Il faut noter que ces protéines ont un taux de phosphorylation de base (en normoxie) élevé. Les ERK1/2 sont également activées dans les conditions contrôles. Par ailleurs, nous pouvons constater qu'un temps d'incubation court en conditions d'hypoxie (de 1 à 4 heures) n'affecte pas l'activation des ERK1/2, contrairement à des temps plus long, où une diminution de l'état de phosphorylation de ces kinases est observée par rapport au temps correspondant en normoxie. Après 16 heures d'incubation en hypoxie, l'activation des ERK1/2 n'est plus du tout détectable. L'abondance de la forme phosphorylée de la MAPK p38 est plus importante après 1, 2 et 16 heures d'incubation en hypoxie par rapport au temps correspondant en normoxie. Enfin, nous n'observons pas de modification de l'abondance des formes totales de ces kinases et de la forme totale du récepteur de l'EGF pour les différentes conditions.



**Figure 3.5 : L'effet de l'hypoxie sur la physiologie du kératinocyte : Analyse de l'expression de d'HB-EGF.** Les kératinocyte ont été incubés en conditions d'hypoxie ou de normoxie durant 1, 2, 4, 8 et 16 heures. L'ARN messager a été extrait et rétro-transcrit en ADNc puis soumis à une PCR en temps réel à l'aide d'amorces spécifiques d'HB-EGF. Les valeurs de CT ont été normalisées par rapport au gène de référence 36B4. Les résultats sont exprimés par rapport à la condition normoxie 1 heure. Cette expérience a été réalisée deux fois de manière indépendante et les résultats présentés sont des moyennes de 2 valeurs.



**Figure 3.6 : L'effet de l'hypoxie sur la physiologie du kératinocyte : Analyse de l'expression des marqueurs de différenciation K10, K14 et de l'involucrine.** Les kératinocytes ont été incubés en conditions d'hypoxie ou de normoxie durant 1, 2, 4, 8 et 16 heures. L'ARN messager a été extrait et rétro-transcrit en ADNc puis soumis à une PCR en temps réel à l'aide d'amorces spécifiques des gènes d'intérêt. Les valeurs de CT ont été normalisées par rapport au gène de référence 36B4. Les résultats sont exprimés par rapport à la condition normoxie 1 heure. Cette expérience a été réalisée deux fois de manière indépendante et les résultats sont des moyennes de 2 valeurs.

Deuxièmement, afin d'essayer de déterminer si une de ces voies de signalisation intervient dans la régulation du niveau d'expression de HIF-1 $\alpha$  en hypoxie, nous avons effectué une analyse par Western blot de l'abondance de HIF-1 $\alpha$  à partir de lysats de cellules incubées en conditions d'hypoxie pendant une période de 4 heures en présence d'inhibiteurs spécifiques : le PD98059 pour inhiber les ERK1/2, le PD169316 pour inhiber la MAPK p38, le SP600125 pour inhiber la JNK, la wortmannin pour inhiber la PI3K et le H89 pour inhiber la PKA. Une condition contrôle sans traitement a également été réalisée ainsi que des contrôles négatifs en normoxie pour chaque inhibiteur testé.

Les résultats présentés à la figure 3.4B, ne montrent aucun effet des inhibiteurs de ERK1/2 et de la MAPK p38 sur la stabilisation de HIF-1 $\alpha$  dans les conditions d'hypoxie après 4 heures d'incubation. Par contre, l'inhibition de la MAP kinase JNK, de la PI3K ou de la PKA, diminue nettement l'abondance de HIF-1 $\alpha$  en conditions d'hypoxie. Ces résultats suggèrent donc l'implication de ces kinases dans la régulation de la stabilisation de la sous-unité  $\alpha$  en hypoxie.

### 3. L'effet de l'hypoxie sur la physiologie des kératinocytes

Nous venons de démontrer que les kératinocytes répondent à l'hypoxie par l'activité du facteur de transcription HIF-1. Nous avons alors décidé d'investiguer l'influence que pouvait avoir l'hypoxie sur la physiologie des kératinocytes. Deux points ont été étudiés dans cette partie du travail.

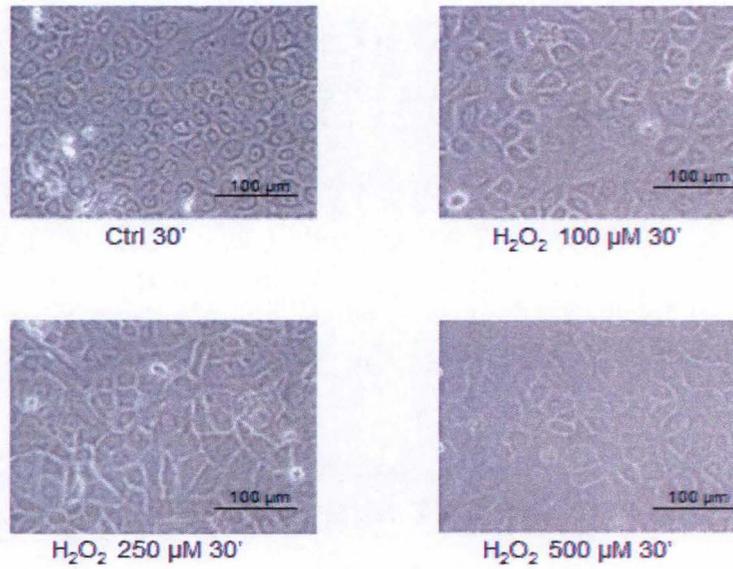
Premièrement, nous avons voulu voir l'effet de l'hypoxie sur l'expression du facteur HB-EGF, connu pour agir de manière autocrine au niveau des kératinocytes en activant le récepteur de l'EGF et en favorisant entre autre la migration cellulaire. Plusieurs études ont d'ailleurs démontré son implication dans l'étape de ré-épithélialisation du processus de cicatrisation cutanée (Block *et al.*, 2004). Notre intérêt pour ce facteur découle du fait qu'une étude de notre laboratoire a récemment suggéré un rôle d'HB-EGF dans la réponse cellulaire précoce au stress dans les kératinocytes (Mathay *et al.*, 2008) : HB-EGF permettrait la réparation rapide de l'épiderme et par conséquent le maintien de son homéostasie.

Deuxièmement, une étude antérieure également réalisée au sein de notre laboratoire a mis en évidence une modification du niveau d'expression de certains marqueurs de différenciation au cours d'une situation de stress dans les cultures de kératinocytes (Jans *et al.*, 2004). Cette étude montre qu'une déplétion du cholestérol membranaire, dans les kératinocytes, induit la synthèse de l'involucrine et réprime l'expression des kératines 10 et 14, favorisant ainsi la différenciation des kératinocytes. Nous avons donc voulu également rechercher les effets de l'hypoxie sur l'expression de ces marqueurs cellulaires de différenciation.

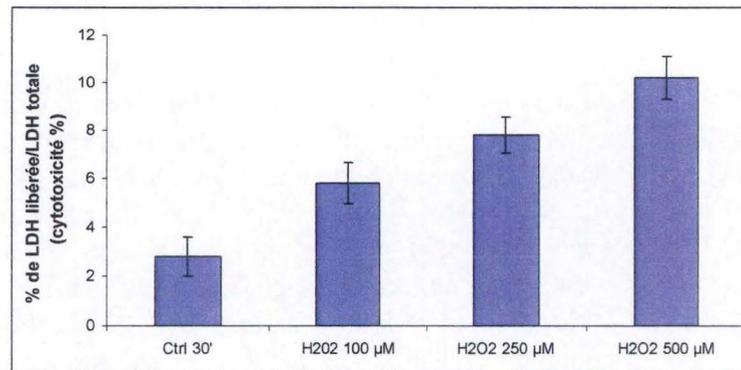
#### 3.1. Analyse de l'expression d'HB-EGF

L'expression d'HB-EGF dans les kératinocytes incubés en conditions d'hypoxie ou de normoxie a été suivie par la PCR en temps réel, et ceci après différents temps. Cette expérience a été effectuée à partir d'ADNc, obtenus après rétro-transcription de l'ARN total extrait immédiatement après les différents temps d'incubation.

A.



B.



**Figure 3.7 : Effet du stress oxydatif sur la morphologie et la viabilité des kératinocytes. (A et B)** Les kératinocytes ont été incubés en présence de peroxyde d'hydrogène pendant 30 minutes. Trois concentrations différentes ont été testées : 100 μM, 250 μM et 500 μM. Une condition contrôle où les cellules n'ont subi aucun traitement a également été réalisée. **(A)** La morphologie cellulaire, suite aux différents traitements, a été observée à l'aide d'un microscope à contraste de phase. **(B)** La libération de la LDH a été mesurée après chaque traitement. Les résultats présentés sont des moyennes de 3 valeurs ( $\pm 1$  déviation standard).

Les résultats présentés à la figure 3.5 ne montrent aucun effet de l'hypoxie sur l'expression des transcrits d'HB-EGF. Le niveau d'expression des messagers de ce facteur tend à diminuer lorsque les temps d'incubation se prolongent à la fois en normoxie et en hypoxie. L'hypoxie seule ne semble donc pas induire de réponse par l'intermédiaire de ce facteur de croissance.

### 3.2. Analyse de l'expression des marqueurs de différenciation

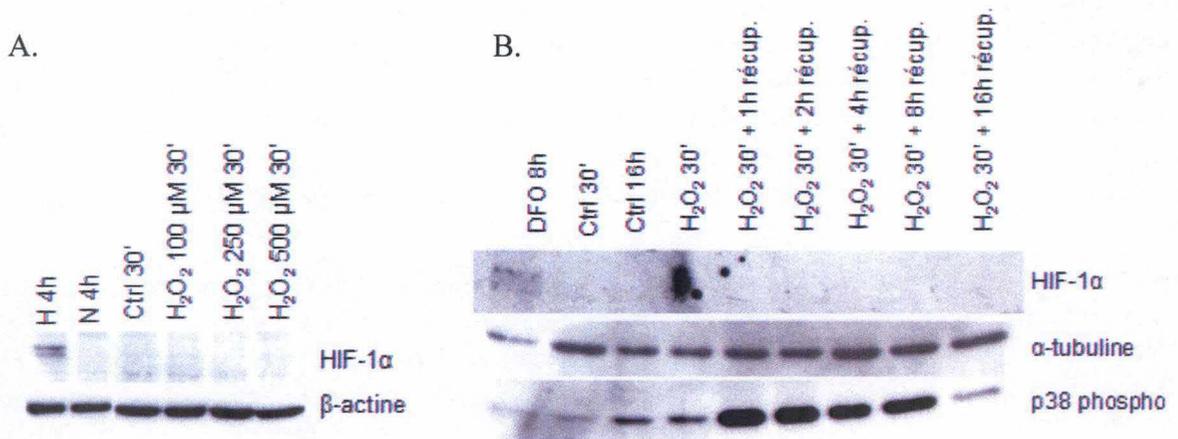
L'effet de l'hypoxie sur l'expression des trois marqueurs de différenciation (kératines 10, 14 et involucrine) a été étudié en quantifiant l'expression des ARNm de ces gènes par PCR en temps réel. Cette expérience a de nouveau été réalisée à partir d'ADNc, obtenus après rétro-transcription de l'ARN total extrait immédiatement après différents temps d'incubation dans les conditions d'hypoxie. Un contrôle négatif en normoxie a également été réalisé pour chaque temps d'incubation.

Les résultats, présentés à la figure 3.6, indiquent que le niveau d'expression des transcrits des kératines 10, 14 et de l'involucrine, n'est pas influencé par l'hypoxie. L'hypoxie n'influence donc pas l'état de différenciation des kératinocytes.

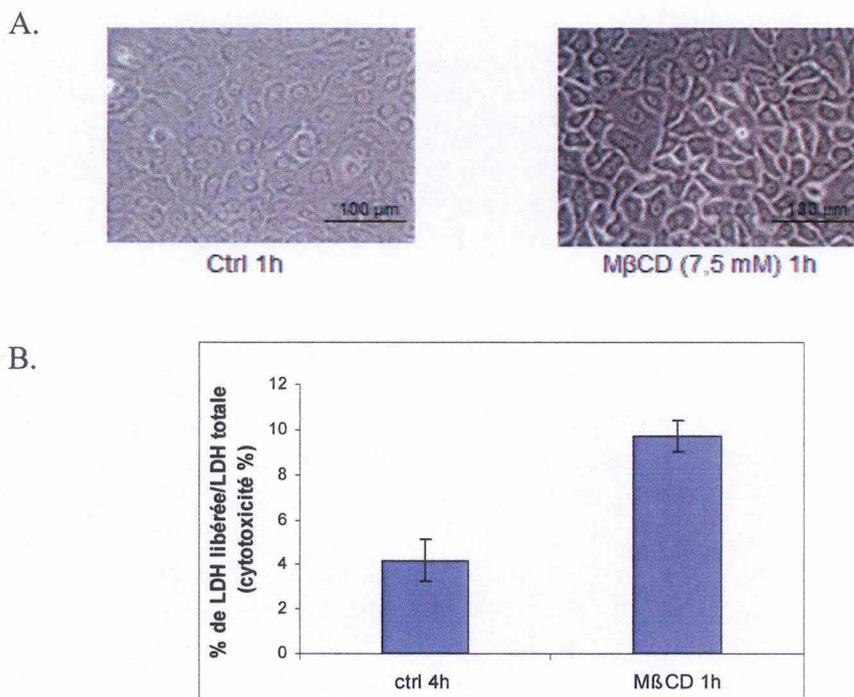
## 4. Effet du stress oxydatif sur l'abondance de HIF-1 $\alpha$

Plusieurs résultats décrits dans la littérature indiquent que la production de ROS dans les conditions d'hypoxie, mais aussi dans certaines conditions de stress chez les kératinocytes telles qu'une irradiation aux UVB, joue un rôle dans la régulation de l'activité de HIF-1 (Rezvani *et al.*, 2007 ; Wunderlich *et al.*, 2007). D'autre part, les tissus épidermiques endommagés par une blessure sont hypoxiques et activent HIF-1, et les ROS jouent un rôle dans la cicatrisation (Sen *et al.*, 2003). Nous avons donc investigué si des ROS exogènes pouvaient influencer la régulation de HIF-1 dans les kératinocytes. Nous avons, dans cette partie du travail, étudié l'effet d'un stress oxydatif sur la stabilisation de HIF-1 $\alpha$  en traitant les kératinocytes par du peroxyde d'hydrogène. En vue d'optimiser le traitement permettant d'induire un stress oxydatif, nous avons utilisé différentes concentrations d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100  $\mu$ M, 250  $\mu$ M et 500  $\mu$ M), pendant 30 minutes.

Tout d'abord, nous avons étudié l'effet des différentes concentrations en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur la morphologie et la viabilité des kératinocytes. L'observation en microscopie à contraste de phase des cellules incubées en présence d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nous a permis de distinguer quelques changements morphologiques des kératinocytes en comparaison avec les cellules incubées en absence d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (figure 3.7A). Dans les conditions contrôles, les kératinocytes, de forme polyédrique, sont aplatis et leurs jonctions intercellulaires semblent être bien étroites. Par contre, le traitement avec le peroxyde d'hydrogène induit des petites modifications morphologiques. En effet, les cellules ont plutôt tendance à prendre une forme ovale et le pourtour des cellules devient plus réfringent. Cependant, aucune concentration en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ne semble induire d'effet toxique. Une mesure de la cytotoxicité a ensuite été réalisée en mesurant la libération de la LDH comme précédemment (figure 3.7 B). Les résultats indiquent une toxicité de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> d'autant plus grande que la concentration en peroxyde d'hydrogène est élevée. Cependant, la mortalité cellulaire reste relativement faible puisqu'un traitement de 30 minutes avec 500  $\mu$ M engendre une toxicité de seulement 10 %.



**Figure 3.8 : Effet d'un stress oxydatif sur l'abondance de HIF-1 $\alpha$ .** (A) Les kératinocytes ont été incubés en présence de peroxyde d'hydrogène pendant 30 minutes à trois concentrations différentes : 100  $\mu$ M, 250  $\mu$ M et 500  $\mu$ M. Des conditions contrôles où les cellules ont été incubées sans H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou ont été incubées pendant 4 heures en hypoxie et en normoxie, ont également été réalisées. (B) Les kératinocytes ont été traités avec le peroxyde d'hydrogène pendant 30 minutes à une concentration de 100  $\mu$ M. Les cellules ont ensuite subi une période de récupération d'1, 2, 4, 8 ou 16 heures. Une condition contrôle où les cellules ont été incubées pendant 8 heures avec le DFO (130  $\mu$ M) ainsi que deux autres conditions sans aucun traitement ont également été réalisées. (A et B) Les extraits totaux sont ensuite récoltés et le Western blot est réalisé. La détection des différentes protéines a été réalisée grâce à des anticorps spécifiques. L'homogénéité du chargement a été vérifiée par la détection de la tubuline  $\alpha$  ou de la  $\beta$ -actine.



**Figure 3.9 : Effet d'une déplétion en cholestérol sur la morphologie et la viabilité des kératinocytes.** (A et B) Les kératinocytes ont été traités avec la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine à une concentration de 7,5 mM, pendant 1 heure. Une condition contrôle où les cellules n'ont subi aucun traitement a également été réalisée. (A) La morphologie cellulaire a été observée à l'aide d'un microscope à contraste de phase. (B) La libération de la LDH a été mesurée pour la condition contrôle et la condition où les cellules ont été traitées à la M $\beta$ CD. Les résultats présentés sont des moyennes de 3 valeurs ( $\pm$  1 déviation standard).

## Résultats

Ensuite, afin de déterminer si un stress oxydatif est capable d'induire la stabilisation de HIF-1 $\alpha$  dans les kératinocytes, nous avons effectué une analyse par Western Blot de l'abondance de la protéine HIF-1 $\alpha$  à partir de lysats cellulaires totaux obtenus immédiatement après 30 minutes de traitement avec l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, et cela pour les trois concentrations testées. Un contrôle positif, où les cellules ont été incubées pendant 4 heures dans les conditions d'hypoxie, a également été réalisé.

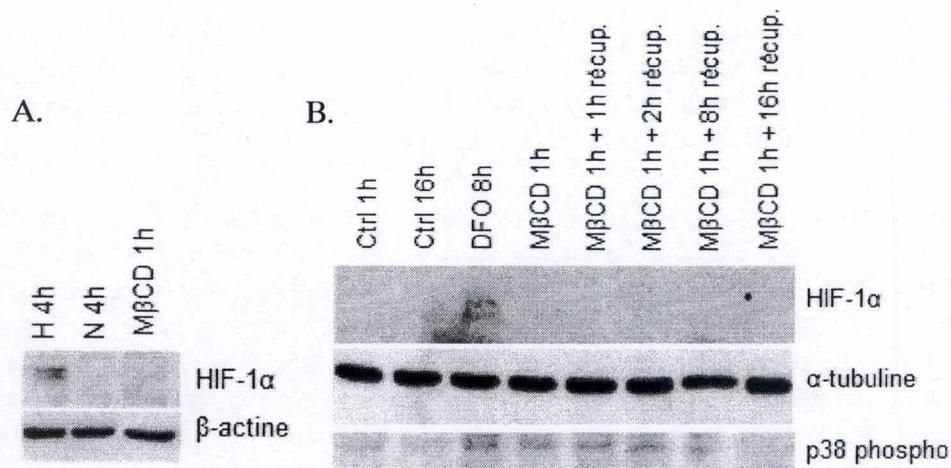
Les résultats, présentés à la figure 3.8A, montrent une bande située aux environs de 120 kDa, correspondant à HIF-1 $\alpha$ , pour les cellules incubées en hypoxie. Cependant, on n'observe aucune stabilisation de la sous unité  $\alpha$  lorsque les cellules ont été incubées en présence de peroxyde d'hydrogène, quelle que soit la concentration.

Cependant, les voies de signalisation en aval d'un stress peuvent parfois demander un certain temps avant d'être activées. Cela implique alors une réponse plus tardive des cellules face à la situation de stress. Au vu des résultats précédents, et en considérant que le facteur HIF-1 peut être activé après un certain temps suivant le stress, nous avons décidé de réaliser une incubation en présence d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pendant 30 minutes, suivie d'une période de « récupération ». Cette période de récupération, qui commence dès la fin du traitement, consiste à ré-incuber les cellules dans le milieu de culture classique pendant un certain laps de temps. Une analyse par Western blot de l'abondance de la protéine HIF-1 $\alpha$  a de nouveau été réalisée à partir de lysats cellulaires totaux obtenus, cette fois-ci, immédiatement après 1, 2, 4, 8 et 16 heures de récupération à la suite d'un traitement avec l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100  $\mu$ M). Un contrôle positif, où les cellules ont été incubées pendant 8 heures avec le DFO (130  $\mu$ M), connu pour induire la stabilisation de HIF-1 $\alpha$ , ainsi que plusieurs contrôles négatifs sans aucun traitement ont également été réalisés. Enfin, dans le but de vérifier si les cellules répondaient bien au stress oxydatif, nous avons également analysé la forme phosphorylée de la MAPK p38 à partir des mêmes extraits cellulaires.

Les résultats du Western blot (figure 3.8 B) montrent un signal correspondant à HIF-1 $\alpha$  pour les cellules incubées en présence de DFO. Par contre, aucune bande n'est observée à 120 kDa, correspondant à la protéine HIF-1 $\alpha$ , dans les extraits de cellules qui ont été incubées en présence de peroxyde d'hydrogène puis pendant une période de récupération allant de 1 à 16 heures. Les cellules ont effectivement perçu le stress oxydatif puisque nous observons une activation de p38 immédiatement après le stress, suivie d'une forte activation après 1 heure de récupération. Cet état d'activation est maintenu pendant les 2 premières heures de récupération et diminue ensuite après 4 et 8 heures. Après 16 heures de récupération, nous observons un état de phosphorylation semblable à la condition contrôle, indiquant que les cellules sont revenues dans un état semblable à leur état initial.

## 5. Effet de la déplétion en cholestérol sur l'abondance de HIF-1 $\alpha$

Une extraction du cholestérol membranaire désorganise la structure des « lipid rafts » et induit par conséquent, une perturbation des voies de transduction en aval des protéines de signalisation associées à ces microdomaines (Simons et Toomre, 2000). Une étude réalisée au sein du laboratoire a également montré qu'une déplétion du cholestérol membranaire perturbe le programme de différenciation des kératinocytes (Jans *et al.*, 2004). L'extraction du cholestérol membranaire génère donc un stress pour les kératinocytes, impliquant une réponse



**Figure 3.10 : L'effet d'une déplétion en cholestérol sur l'abondance de HIF-1α.** (A) Les kératinocytes ont été traités à la méthyl-β-cyclodextrine à une concentration de 7,5 mM, pendant 1 heure. Des conditions contrôles où les cellules n'ont subi aucun traitement ou ont été incubées pendant 4 heures en hypoxie et en normoxie, ont également été réalisées. (B) Les kératinocytes ont été traités à la MβCD pendant 1 heure avant de subir une période de récupération d'1, 2, 8 ou 16 heures. Une condition contrôle où les cellules ont été incubées pendant 8 heures avec le DFO (130 μM) ainsi que deux autres sans aucun traitement, ont également été réalisées. (A et B) Les extraits totaux sont ensuite récoltés et le Western Blot est réalisé. La détection des différentes protéines a été réalisée grâce à des anticorps spécifiques. L'homogénéité du chargement a été vérifiée par la détection de la tubuline α ou de la β-actine.

## Résultats

adaptative ayant pour but de maintenir leur intégrité. Dans cette étude, nous avons investigué si le facteur de transcription HIF-1 faisait partie de cette réponse adaptative.

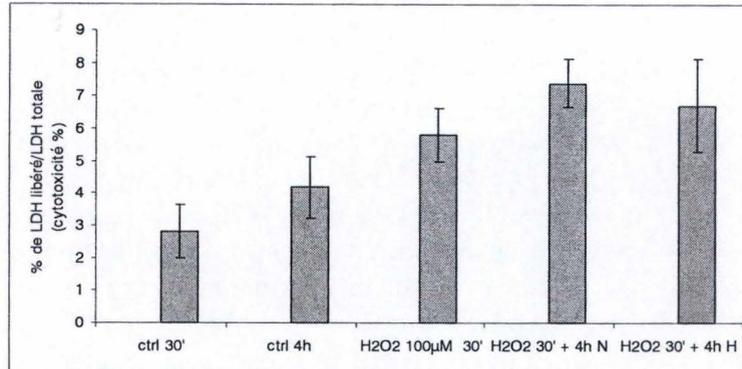
Nous avons donc étudié l'effet d'une déplétion en cholestérol sur la stabilisation de HIF-1 $\alpha$  en traitant les kératinocytes avec la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine (7,5 mM) pendant 1 heure afin d'extraire le cholestérol membranaire.

Tout d'abord, nous avons étudié l'effet du traitement par la M $\beta$ CD sur la morphologie des kératinocytes en microscopie à contraste de phase (Figure 3.9A). Le traitement par la M $\beta$ CD entraîne des changements morphologiques considérables. Les espaces intercellulaires apparaissent moins étroits et la réfringence des kératinocytes augmente de façon importante par rapport aux cellules non traitées. Il semble également que quelques kératinocytes se détachent du support de culture. Ces changements suggèrent que l'extraction du cholestérol membranaire par la M $\beta$ CD pourrait diminuer l'adhérence cellulaire et causer des modifications au niveau du cytosquelette. Nous avons ensuite réalisé une mesure de la cytotoxicité exercée par le traitement avec la M $\beta$ CD sur les kératinocytes, en quantifiant la libération de la LDH (figure 3.8B). Les résultats indiquent une toxicité relativement faible pour la condition où les cellules sont traitées avec la M $\beta$ CD (environ 10 %). De plus, il a été démontré dans notre laboratoire que la concentration utilisée ne change pas significativement la viabilité cellulaire après 1 heure de traitement et donc que les effets produits par la déplétion en cholestérol ne sont probablement pas dus à la cytotoxicité de cette cyclodextrine (Mathay, 2004).

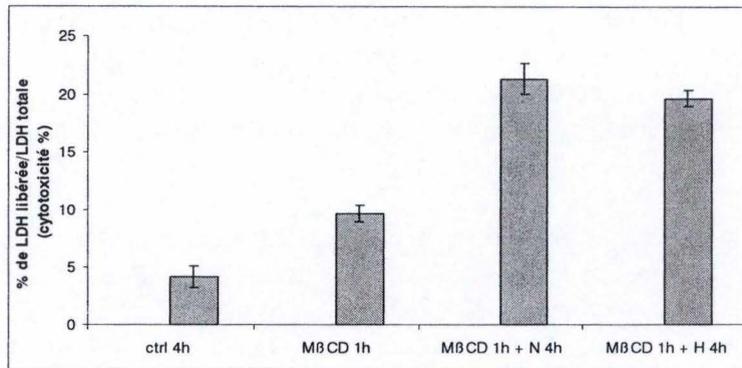
Ensuite, afin de déterminer si une déplétion du cholestérol membranaire est capable d'induire la stabilisation de HIF-1 $\alpha$  dans les kératinocytes, nous avons effectué une analyse par Western blot de l'abondance de la protéine HIF-1 $\alpha$ . Nous avons suivi les mêmes conditions expérimentales que celles utilisées précédemment pour les traitements en présence d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, c'est-à-dire d'une part, une analyse à partir de lysats cellulaires totaux obtenus immédiatement après 1 heure de traitement avec la M $\beta$ CD et d'autre part, une analyse à partir de lysats cellulaires totaux obtenus immédiatement après 1, 2, 8 et 16 heures de récupération à la suite d'1 heure de traitement avec la M $\beta$ CD. Nous avons également analysé la forme phosphorylée de la MAPK p38 dans nos extraits cellulaires. Pareillement, plusieurs contrôles positifs et négatifs ont été effectués.

Les résultats présentés aux figures 3.10A et B ne montrent aucune bande correspondant à la protéine HIF-1 $\alpha$  dans les extraits de cellules traitées à la M $\beta$ CD avec ou sans période de récupération. Les cellules répondent pourtant au stress car, comme nous l'avons observé pour le traitement avec l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, nous remarquons une activation de p38 immédiatement après le traitement avec la M $\beta$ CD. Cependant, cette activation qui est relativement faible est maintenue jusqu'à 8 heures de récupération. Après 16 heures, nous observons un état de phosphorylation semblable à la condition contrôle comme observé pour le traitement avec l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

A.



B.



**Figure 3.11 : Effet du stress oxydatif ou d'une déplétion en cholestérol combiné à l'hypoxie sur la viabilité des kératinocytes. (A) Mesure de la libération de la LDH sur les cultures de kératinocyte après un traitement avec l' $H_2O_2$  à une concentration de  $100 \mu M$  pendant 30 minutes suivi ou non d'une incubation en conditions d'hypoxie et de normoxie. (B) Mesure de la libération de la LDH sur les cultures de kératinocyte après un traitement à la  $M\beta CD$  à une concentration de  $7,5 \text{ mM}$  pendant 60 minutes suivi ou non d'une incubation en conditions d'hypoxie et de normoxie. Les résultats présentés sont des moyennes de 3 valeurs ( $\pm 1$  déviation standard).**

## 6. Effet du stress oxydatif ou d'une déplétion en cholestérol combiné à l'hypoxie sur l'activité de HIF-1

Les résultats obtenus précédemment dans ce travail ne nous ont pas permis de mettre en évidence un quelconque effet soit du stress oxydatif ou soit d'une déplétion en cholestérol sur l'activité du facteur de transcription HIF-1. Cependant, les kératinocytes répondent d'une part au stress oxydatif et au traitement avec la M $\beta$ CD puisqu'une phosphorylation de p38 est détectée, et d'autre part à l'hypoxie puisque l'activité de HIF-1 est augmentée. Dans la suite de ce travail, nous avons recherché un éventuel effet synergique de chacun de ces deux stress combiné à l'hypoxie sur l'activité de HIF-1.

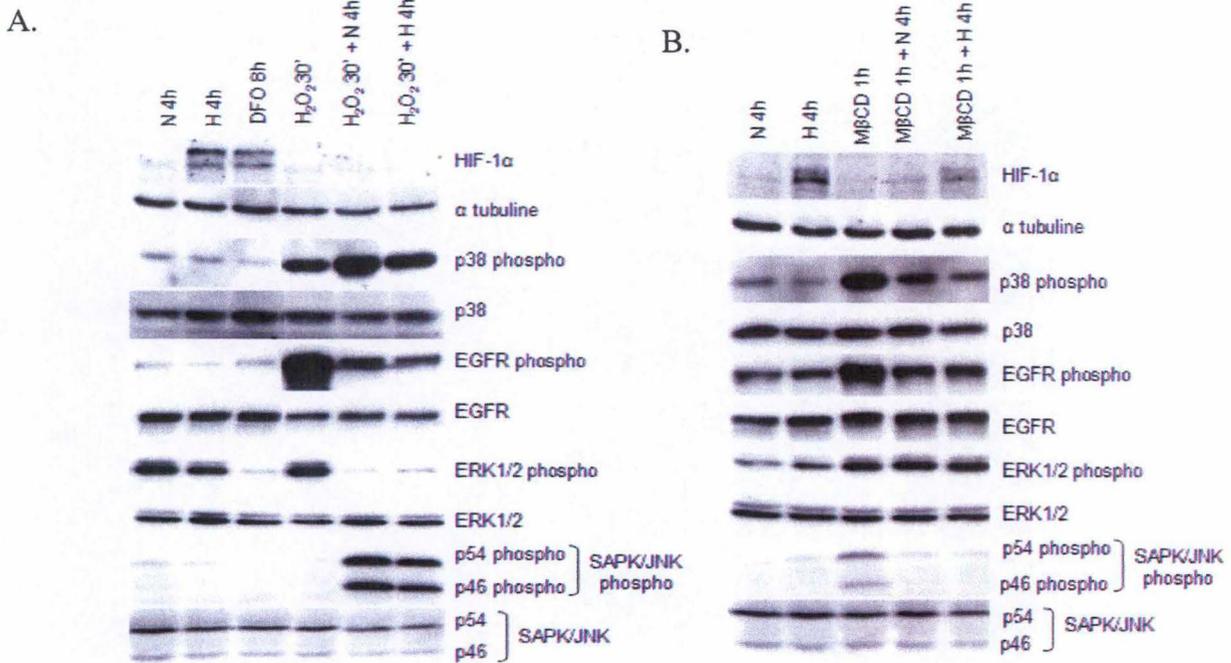
Dans cette partie, nous nous sommes tout d'abord intéressé à l'effet de chacun de ces deux stress combiné à l'hypoxie sur la stabilisation de HIF-1 $\alpha$  dans les kératinocytes. Ensuite, nous avons analysé quelles sont les protéines activées suite aux différents traitements afin de déterminer les voies de signalisation qui pourraient être impliquées dans la réponse des cellules. Enfin, nous avons étudié l'expression de messagers induits par le facteur de transcription HIF-1 dans ces conditions expérimentales, comme nous l'avons fait précédemment pour l'hypoxie seule.

### 6.1. Analyse de l'induction de HIF-1 $\alpha$

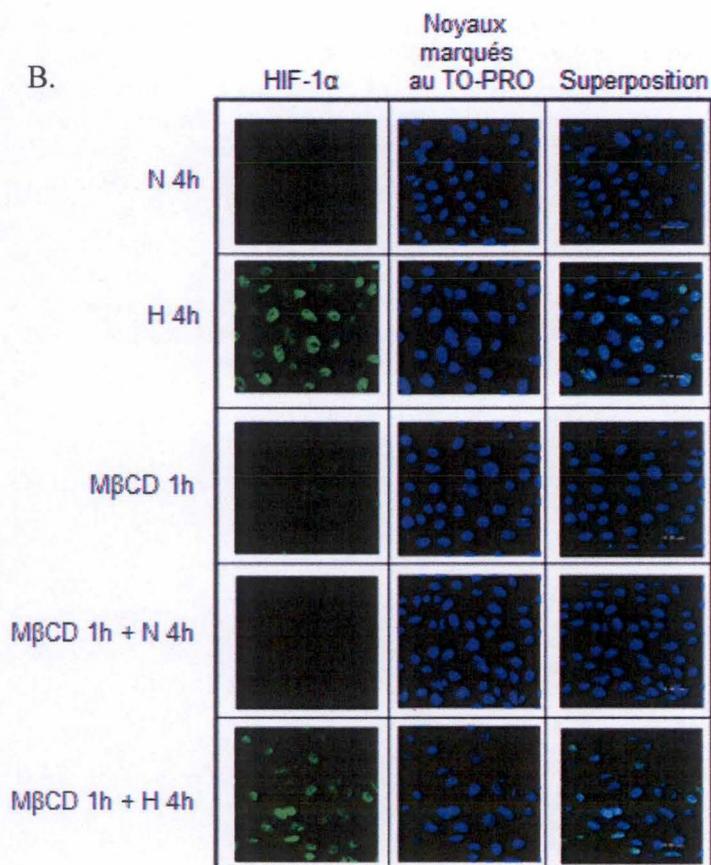
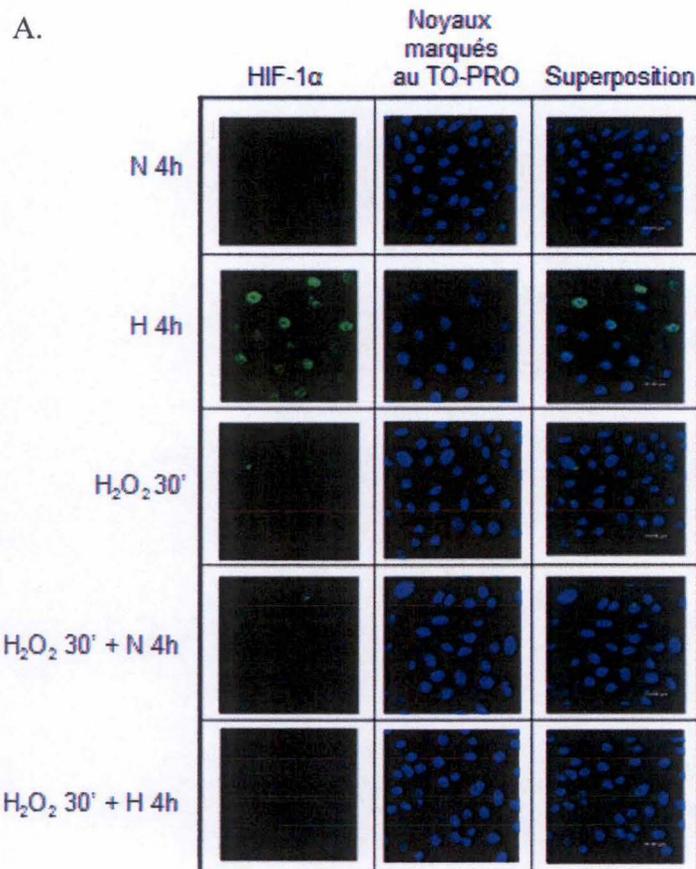
Afin de déterminer l'influence d'un stress oxydatif ou d'une déplétion en cholestérol sur la stabilisation de HIF-1 $\alpha$  induite par l'hypoxie, nous avons effectué une analyse par Western blot de l'abondance de la protéine HIF-1 $\alpha$  dans les différentes conditions de stress. Pour cette expérience, les kératinocytes ont été traités avec le peroxyde d'hydrogène (100  $\mu$ M) pendant 30 minutes ou avec la M $\beta$ CD (7,3 mM) pendant 1 heure avant d'être incubés dans les conditions d'hypoxie ou de normoxie pour une période de 4 heures. Plusieurs conditions contrôles ont également été réalisées ; un contrôle en normoxie et en hypoxie de 4 heures, ainsi qu'un contrôle positif où les cellules ont été traitées avec le DFO (130  $\mu$ M) pendant 8 heures. Enfin, des contrôles où les cellules ont été traitées uniquement avec l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pendant 30 minutes ou avec la M $\beta$ CD pendant une heure ont également été effectués.

Signalons que nous avons réalisé un test de cytotoxicité préalable afin d'évaluer l'effet de ces traitements sur la viabilité des kératinocytes. Un traitement des cultures de kératinocytes avec l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> combiné à l'hypoxie n'a pas d'effet cytotoxique supérieur à un traitement seul avec le peroxyde d'hydrogène (figure 3.11A). Par contre, une cytotoxicité plus importante est observée après les 4 heures de récupération qui suivent le traitement avec la M $\beta$ CD (figure 3.11B). Cette augmentation ne semble cependant pas être un effet spécifique de l'hypoxie puisque l'on observe un résultat similaire pour les cultures qui ont été incubées en normoxie.

Les figures 3.12A et B confirment que HIF-1 $\alpha$  n'est pas détectable en normoxie alors que son abondance est importante en hypoxie. Les résultats indiquent également que HIF-1 $\alpha$  est stabilisé dans les cellules incubées en présence de DFO. Par contre, un traitement au peroxyde d'hydrogène ou avec la M $\beta$ CD n'induit pas la stabilisation de la sous-unité  $\alpha$  dans les kératinocytes. Ces résultats sont cohérents par rapport à ceux obtenus dans les expériences précédentes. De manière intéressante, on observe que HIF-1 $\alpha$  n'est cependant pas présent dans les cellules qui ont été traitées avec l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et incubées en hypoxie (figure 3.12A). Une production importante de ROS dans les kératinocytes, suite au traitement avec le peroxyde



**Figure 3.12 : Effet du stress oxydatif ou d'une déplétion en cholestérol combiné à l'hypoxie sur l'activité de HIF-1 : Analyse de l'induction d'HIF-1 $\alpha$  et analyse des voies de signalisation induites par les deux types de stress combinés à l'hypoxie (A-B)** Les cultures de kératinocytes ont été traitées avec le peroxyde d'hydrogène (100  $\mu$ M) pendant 30 minutes ou avec la M $\beta$ CD (7,5 mM) pendant 1 heure avant d'être incubées en conditions d'hypoxie ou de normoxie pour une période de 4 heures. Deux conditions contrôles ont été réalisées en normoxie et en hypoxie de 4 heures ainsi qu'une condition contrôle où les cellules ont été traitées avec le DFO (130  $\mu$ M) pendant 8 heures, ont été réalisées. D'autres conditions contrôles ont également été effectués où les cellules ont été traitées uniquement avec l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou avec la M $\beta$ CD. Les extraits totaux sont ensuite récoltés et le Western blot est réalisé. La détection des différentes protéines a été réalisée grâce à des anticorps spécifiques. L'homogénéité du chargement a été vérifiée par la détection de la tubuline  $\alpha$  ou des formes totales des protéines d'intérêt.



**Figure 3.13 : Effet du stress oxydatif ou d'une déplétion en cholestérol combiné à l'hypoxie sur l'activité de HIF-1 : Analyse de l'induction d'HIF-1 $\alpha$ .** (A et B) Les cultures de kératinocytes ont été traitées avec le peroxyde d'hydrogène (100  $\mu$ M) pendant 30 minutes ou avec la M $\beta$ CD (7,5 mM) pendant 1 heure avant d'être incubées en conditions d'hypoxie ou de normoxie pour une période de 4 heures. Deux conditions contrôles en normoxie et en hypoxie de 4 heures a été réalisées. D'autres conditions contrôles ont également été effectués où les cellules ont été traitées uniquement avec l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou avec la M $\beta$ CD. A la suite des différents traitements, les cellules sont fixées à la PFA 4 % et perméabilisées au PBS Triton X-100 1 %. La protéine HIF-1 $\alpha$  est alors détectée par un anticorps spécifique et les noyaux sont marqués au TO-PRO. Toutes les observations ont été réalisées en maintenant le PMT constant.

d'hydrogène empêcherait la stabilisation de HIF-1 $\alpha$  dans les conditions d'hypoxie. La sous-unité est par contre stabilisée dans les kératinocytes qui ont été traités par la M $\beta$ CD et incubés dans les conditions d'hypoxie (figure 3.12B). Cette stabilisation reste faible par rapport à celle observée pour la condition contrôle en hypoxie. Une déplétion du cholestérol membranaire, à la suite d'un traitement par la M $\beta$ CD, influence donc aussi la stabilisation de HIF-1 $\alpha$  dans les conditions d'hypoxie. Enfin, remarquons également qu'un traitement avec la M $\beta$ CD, suivi d'une incubation dans les conditions de normoxie, ne permet pas de stabiliser HIF-1 $\alpha$ , ce qui avait déjà été observé dans les expériences précédentes.

Afin de confirmer les résultats concernant l'influence des différents traitements sur l'abondance protéique de HIF-1 $\alpha$ , la protéine HIF-1 $\alpha$  a été visualisée par un marquage en immunofluorescence. Les kératinocytes ont été fixés et perméabilisés à la suite des différentes incubations. La protéine HIF-1 $\alpha$  a ensuite été détectée à l'aide d'un anticorps spécifique.

Les résultats sont présentés aux figures 3.13A et B. Dans la condition contrôle en hypoxie, on observe un marquage intense indiquant une abondance importante de HIF-1 $\alpha$ . Ce marquage est exclusivement nucléaire. Nous n'observons pas de marquage dans les cellules qui ont subi un traitement avec l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> suivi d'une incubation en hypoxie de 4 heures. Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus dans l'expérience précédente. Par ailleurs, HIF-1 $\alpha$  est présent dans les noyaux des kératinocytes qui ont été traités par la M $\beta$ CD et incubés ensuite dans les conditions d'hypoxie. L'abondance de la protéine HIF-1 $\alpha$  ne semble pas modifiée par rapport à la condition contrôle en hypoxie. La sous-unité  $\alpha$  n'est pas détectable dans les autres conditions, comme attendu.

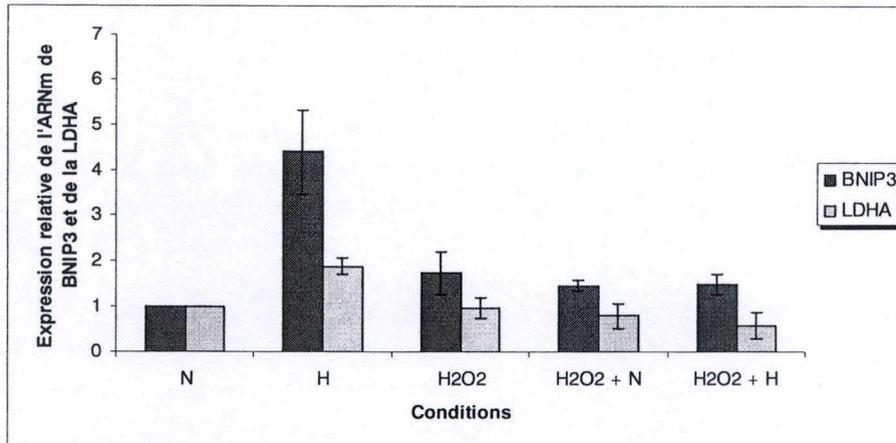
### *6.2. Analyse des voies de signalisation induites au cours des différents traitements combinés à l'hypoxie*

Au vu des résultats précédents montrant un effet du stress oxydatif ou d'une déplétion en cholestérol sur la stabilisation de HIF-1 $\alpha$  en conditions d'hypoxie dans les kératinocytes, nous avons voulu rechercher par quelles voies de signalisation ces effets se mettent en place.

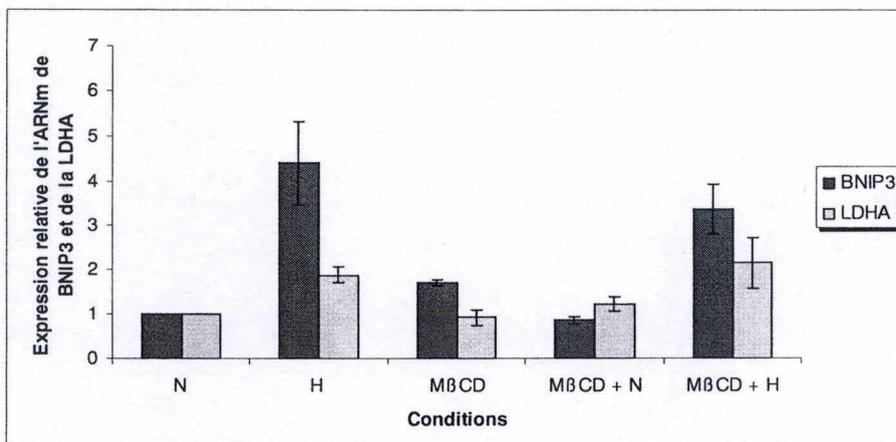
Nous avons donc étudié l'état d'activation de plusieurs kinases dont la MAP kinase p38, SAPK/JNK et les ERK1/2, par une analyse en Western blot de l'abondance de leurs formes phosphorylées. Nous nous sommes également intéressé à l'activation du récepteur de l'EGF (EGFR). Cette expérience a été réalisée à partir des mêmes extraits cellulaires que ceux utilisés pour la détection de HIF-1 $\alpha$  dans les expériences précédentes.

La figure 3.12A présente les résultats obtenus à la suite d'un traitement des kératinocytes avec le peroxyde d'hydrogène, suivi ou non d'une période d'incubation en conditions d'hypoxie ou de normoxie. Nous pouvons observer premièrement une activation de la MAPK p38 dans les cellules traitées avec l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Cette réponse s'amplifie pendant la période de récupération qui suit le traitement. Cependant, l'activation de p38 est plus importante dans les cellules incubées en normoxie par rapport à celles incubées en hypoxie. L'hypoxie pourrait donc influencer l'état de phosphorylation de la MAPK p38 dans les kératinocytes stressés par le peroxyde d'hydrogène. L'état de phosphorylation de p38 reste faible dans les conditions contrôles en normoxie et en hypoxie. Les résultats montrent également une forte abondance de la forme phosphorylée de EGFR après un traitement avec le peroxyde d'hydrogène. Ce résultat témoigne sans doute d'une internalisation du récepteur en présence d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Cette phosphorylation diminue pendant la période de récupération, lorsque les cellules sont

A.



B.



**Figure 3.14 : Effet du stress oxydatif ou d'une déplétion en cholestérol combiné à l'hypoxie sur l'activité de HIF-1 : Analyse de l'expression de deux gènes cibles de HIF-1. (A et B)** Les cultures de kératinocytes ont été traitées avec le peroxyde d'hydrogène (100  $\mu$ M) pendant 30 minutes ou avec la M $\beta$ CD (7,5 mM) pendant 1 heure avant d'être incubées en conditions d'hypoxie ou de normoxie pour une période de 4 heures. Une condition contrôle en normoxie et en hypoxie de 4 heures ainsi qu'une condition contrôle où les cellules ont été uniquement traitées avec l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pendant 30 minutes ou avec la M $\beta$ CD pendant 1 heure, ont également été réalisées. L'ARN messager a ensuite été extrait et rétro-transcrit en ADNc puis soumis à une PCR en temps réel à l'aide d'amorces spécifiques de BNIP3 et de la LDHA. Les valeurs de CT ont été normalisées par rapport au gène de référence 36B4. Les résultats sont exprimés par rapport à la condition normoxie 1 heure. Chacune des expériences ont été réalisées trois fois et les résultats présentés sont des moyennes de 3 valeurs ( $\pm$  1 déviation standard).

incubées en normoxie ou en hypoxie. Nous n'observons cependant pas de différences entre les deux conditions. Dans les conditions contrôles en normoxie et en hypoxie, l'activité du récepteur est faible. Les ERK1/2 sont également activées en présence d' $H_2O_2$  et dans les conditions contrôles. Cependant, leur activité est très faible après le traitement par le peroxyde d'hydrogène dans les cellules incubées dans les conditions de normoxie et d'hypoxie. Par conséquent, ces résultats suggèrent plutôt un effet du traitement par l' $H_2O_2$  sur l'activité des ERK1/2 plutôt qu'un effet de l'hypoxie. Enfin, la SAPK/JNK n'est activée que dans les cellules après un traitement avec l' $H_2O_2$  et ce, de manière similaire dans les conditions de normoxie et d'hypoxie.

La figure 3.12B présente quant à elle les résultats obtenus à la suite d'un traitement des kératinocytes avec la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine, suivi ou non d'une période d'incubation en conditions d'hypoxie ou de normoxie. La MAPK p38 est activée dans les cellules à la suite d'un traitement par la M $\beta$ CD. Cependant, contrairement aux résultats observés lors des traitements avec l' $H_2O_2$ , cette activation s'atténue au cours de la période de récupération et ce de la même façon en normoxie ou en hypoxie. Cette kinase est peu active dans les conditions contrôles en normoxie et en hypoxie. Concernant l'activation de EGFR, nous retrouvons des résultats semblables à ceux observés lors des traitements réalisés par le peroxyde d'hydrogène. Son activité est importante dans les cellules après un traitement avec la M $\beta$ CD, mais devient par contre plus faible lorsque les cellules sont incubées en normoxie ou en hypoxie après le traitement. De plus, aucun effet de l'hypoxie sur l'activité du récepteur n'est observé dans les cellules déplétées en cholestérol. Dans les conditions contrôles en normoxie et en hypoxie, l'activité du récepteur n'est pas négligeable. Néanmoins, cette activité reste faible par rapport aux conditions obtenues avec la M $\beta$ CD. Les ERK1/2 sont activées dans toutes conditions où un traitement avec la M $\beta$ CD a été réalisé, et l'hypoxie n'influence pas leur activité. La quantité de la forme phosphorylée de ces kinases est faible dans les conditions contrôles. La SAPK/JNK est activée dans les cellules après un traitement par la M $\beta$ CD, mais est rapidement déphosphorylée pendant la période de récupération, de façon similaire en normoxie et en hypoxie.

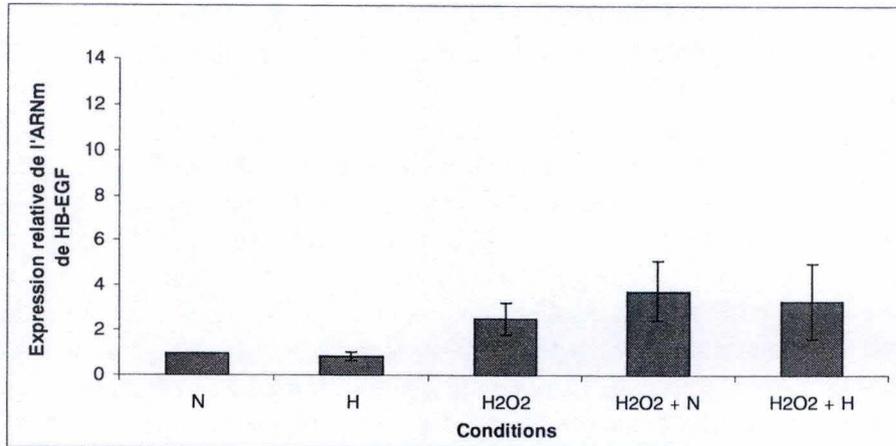
### 6.3. Analyse de l'expression de deux gènes cibles de HIF-1

Les résultats obtenus précédemment mettent en évidence l'effet de l'hypoxie sur l'expression des messagers de la LDHA et de BNIP3 dans les kératinocytes. Ils montrent également les effets de l'hypoxie sur certaines voies de signalisation induites par le stress oxydatif ou une déplétion en cholestérol. Nous nous sommes alors intéressé à l'effet que pouvait avoir un stress oxydatif ou une déplétion en cholestérol combiné à l'effet de l'hypoxie sur l'expression de ces messagers comme mesure indirecte de l'activité proprement dite du facteur HIF-1.

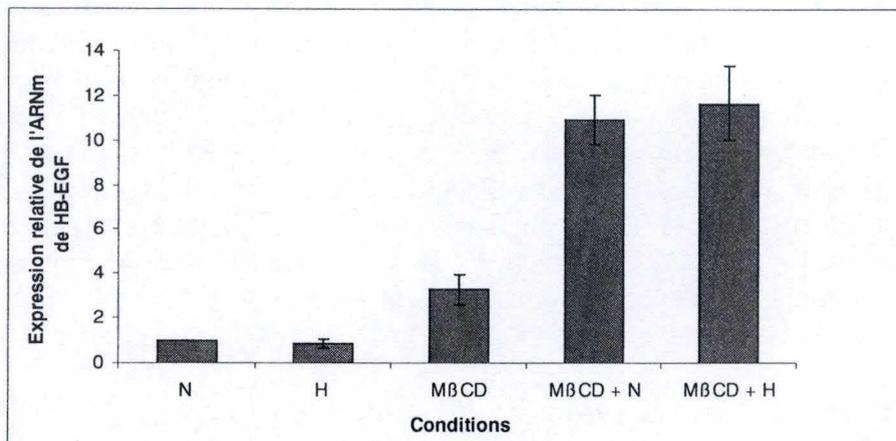
Les cellules ont été traitées par le peroxyde d'hydrogène (100  $\mu$ M) pendant 30 minutes ou par la M $\beta$ CD (7,5 mM) pendant une heure avant d'être incubées en hypoxie et en normoxie pendant 4 heures. Une condition contrôle en hypoxie et en normoxie de 4 heures ainsi qu'une condition contrôle où les cellules ont été traitées uniquement par l' $H_2O_2$  pendant 30 minutes ou par la M $\beta$ CD pendant 1 heure, ont également été réalisées. Nous avons ensuite analysé l'expression des transcrits des deux gènes d'intérêt par la technique de PCR en temps réel, qui est réalisée à partir d'ADNc obtenus après rétro-transcription de l'ARN total extrait immédiatement après les différents traitements.

Les résultats présentés graphiquement aux figures 3.14A et B montrent une augmentation de l'expression des messagers de la LDHA et de BNIP3 dans la condition contrôle après 4 heures

A.



B.



**Figure 3.15 : Effet du stress oxydatif ou d'une déplétion en cholestérol combiné à l'hypoxie sur la physiologie du kératinocyte : Analyse de l'expression d'HB-EGF.** (A et B) Les cultures de kératinocytes ont été traitées avec le peroxyde d'hydrogène (100  $\mu$ M) pendant 30 minutes ou avec la M $\beta$ CD (7,5 mM) pendant 1 heure avant d'être incubées en conditions d'hypoxie ou de normoxie pour une période de 4 heures. Une condition contrôle en normoxie et en hypoxie de 4 heures ainsi qu'une condition contrôle où les cellules ont été uniquement traitées avec l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pendant 30 minutes ou avec la M $\beta$ CD pendant 1 heure, ont également été réalisées. L'ARN messager a ensuite été extrait et rétro-transcrit en ADNc puis soumis à une PCR en temps réel à l'aide d'amorces spécifiques d'HB-EGF. Les valeurs de CT ont été normalisées par rapport au gène de référence 36B4. Les résultats sont exprimés par rapport à la condition normoxie 1 heure. Chacune des expériences ont été réalisées trois fois et les résultats présentés sont des moyennes de 3 valeurs ( $\pm$  1 déviation standard).

d'hypoxie. Comme les résultats présentés à la figure 3.3, cette augmentation est moins marquée pour les transcrits de la LDHA comparé à ceux de BNIP3. Un traitement par l' $H_2O_2$  ou par la M $\beta$ CD induit une faible augmentation de l'expression des ARNm de BNIP3, mais ne stimule pas l'expression d'ARNm de la LDHA. L'expression des messagers des deux gènes cibles de HIF-1 est moindre par rapport au contrôle en hypoxie lorsque les cellules ont subi un traitement avec l' $H_2O_2$  avant l'incubation en hypoxie (figure 3.14A). Ce résultat est similaire à celui observé pour la stabilisation de HIF-1 $\alpha$ . Une augmentation de l'expression des ARNm de BNIP3 et de la LDHA est observée après un traitement avec la M $\beta$ CD suivi d'une incubation en hypoxie (figure 3.14B). Lorsque l'on compare cette augmentation à la condition contrôle en hypoxie, celle-ci est plus faible pour les transcrits de BNIP3 mais pas pour ceux de la LDHA. Nous avons par ailleurs observé un résultat similaire lorsque nous analysons l'abondance de HIF-1 $\alpha$  par Western blot pour les mêmes conditions.

## 7. Effet du stress oxydatif ou d'une déplétion en cholestérol combiné à l'hypoxie sur la physiologie du kératinocyte

Les résultats obtenus précédemment dans ce travail indiquent que le niveau d'expression du facteur HB-EGF ainsi que celui des kératines 10, 14 et de l'involucrine, n'est pas influencé par l'effet de l'hypoxie dans les kératinocytes. Cependant, des études récentes, réalisées au sein de notre laboratoire, montrent qu'une déplétion en cholestérol membranaire stimule l'expression du facteur de croissance HB-EGF et régule la différenciation des kératinocytes (Jans *et al.*, 2004 ; Mathay *et al.*, 2008).

Nous avons donc décidé d'étudier l'effet d'une déplétion en cholestérol combiné à l'effet de l'hypoxie sur l'expression d'HB-EGF et des marqueurs cellulaires de différenciation (K10, K14 et l'involucrine) dans le but de déceler un éventuel effet synergique des deux stress. De plus, puisque l'on s'intéresse également, dans cette étude, à l'effet du stress oxydatif combiné à l'effet de l'hypoxie, nous avons réalisé la même étude pour ces conditions expérimentales.

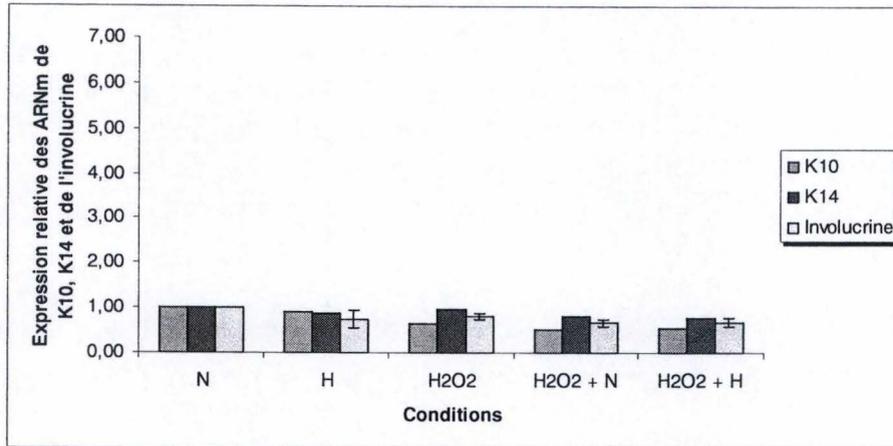
### 7.1. Analyse de l'expression d'HB-EGF

L'effet d'un stress oxydatif ou d'une déplétion en cholestérol membranaire combiné à l'effet de l'hypoxie sur l'expression d'HB-EGF dans les kératinocytes a été étudié par la technique de PCR en temps réel.

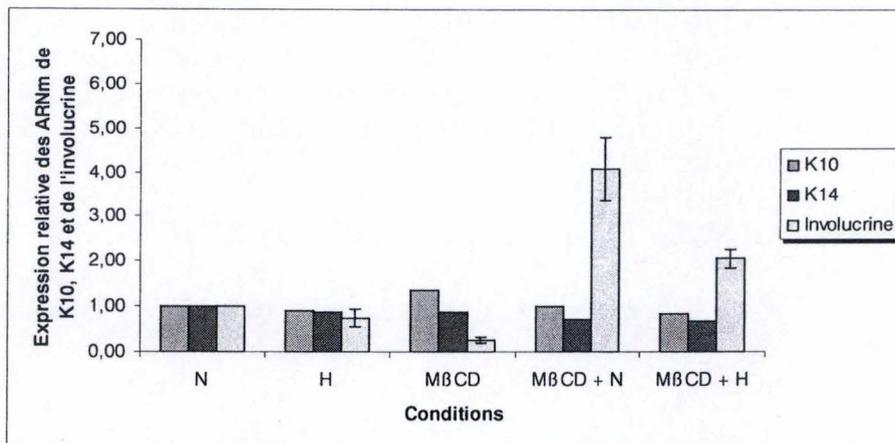
Pour cette expérience, les kératinocytes ont été traités avec le peroxyde d'hydrogène (100  $\mu$ M) pendant 30 minutes ou avec la M $\beta$ CD (7,5 mM) pendant 1 heure avant d'être incubés dans les conditions d'hypoxie ou de normoxie pour une période de 4 heures. Une condition contrôle en normoxie et en hypoxie de 4 heures ainsi qu'une condition contrôle où les cellules ont été uniquement traitées par l' $H_2O_2$  pendant 30 minutes ou par la M $\beta$ CD pendant 1 heure, ont également été réalisées. Les ARN ont été extraits des cellules immédiatement après les différents traitements et rétro-transcrit en ADNc qui ont été soumis à la PCR en temps réel.

Les résultats sont présentés aux figures 3.15 A et B. Le niveau d'expression du messageur d'HB-EGF augmente dans les cellules traitées au peroxyde d'hydrogène de près de 2 fois par rapport à la condition contrôle en normoxie. Dans les cellules traitées avec la M $\beta$ CD on observe une augmentation de près de 3 fois par rapport à la condition contrôle en normoxie. Après la période de récupération qui suit le traitement avec l' $H_2O_2$ , on observe une

A.



B.



**Figure 3.16 : Effet du stress oxydatif ou d'une déplétion en cholestérol combiné à l'hypoxie sur la physiologie du kératinocyte : Analyse de l'expression des marqueurs de différenciation K10, K14 et de l'involucrine.** (A et B) Les cultures de kératinocytes ont été traitées avec le peroxyde d'hydrogène (100  $\mu$ M) pendant 30 minutes ou avec la M $\beta$ CD (7,5 mM) pendant 1 heure avant d'être incubées en conditions d'hypoxie ou de normoxie pour une période de 4 heures. Une condition contrôle en normoxie et en hypoxie de 4 heures ainsi qu'une condition contrôle où les cellules ont été uniquement traitées avec l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pendant 30 minutes ou avec la M $\beta$ CD pendant 1 heure, ont également été réalisées. L'ARN messager a ensuite été extrait et rétro-transcrit en ADNc puis soumis à une PCR en temps réel à l'aide d'amorces spécifiques de ces gènes d'intérêt. Les valeurs de CT ont été normalisées par rapport au gène de référence 36B4. Les résultats sont exprimés par rapport à la condition normoxie 1 heure. Les expériences pour K10 et K14 ont été réalisées deux fois de manière indépendante et les résultats présentés sont des moyennes. L'expérience pour l'involucrine a été réalisée trois fois et les résultats présentés sont des moyennes de 3 valeurs ( $\pm$  1 déviation standard).

augmentation du niveau d'expression du messager de près de 4 fois par rapport à la condition contrôle et ce de manière similaire en normoxie ou en hypoxie (figure 3.15A). Cette augmentation est plus faible comparée à celle observée à la suite d'un traitement par la M $\beta$ CD dans les mêmes conditions, où l'on observe une induction de près de 12 fois par rapport à la condition contrôle (figure 3.15B). Les résultats observés pour les différentes conditions où un traitement par la M $\beta$ CD a été réalisé, sont en accord avec ceux obtenus par Mathay *et al.* (2008). L'hypoxie n'influence donc pas l'effet d'un traitement oxydatif ou d'une déplétion en cholestérol sur l'expression d'HB-EGF dans les kératinocytes.

## 7.2. Analyse de l'expression des marqueurs de différenciation

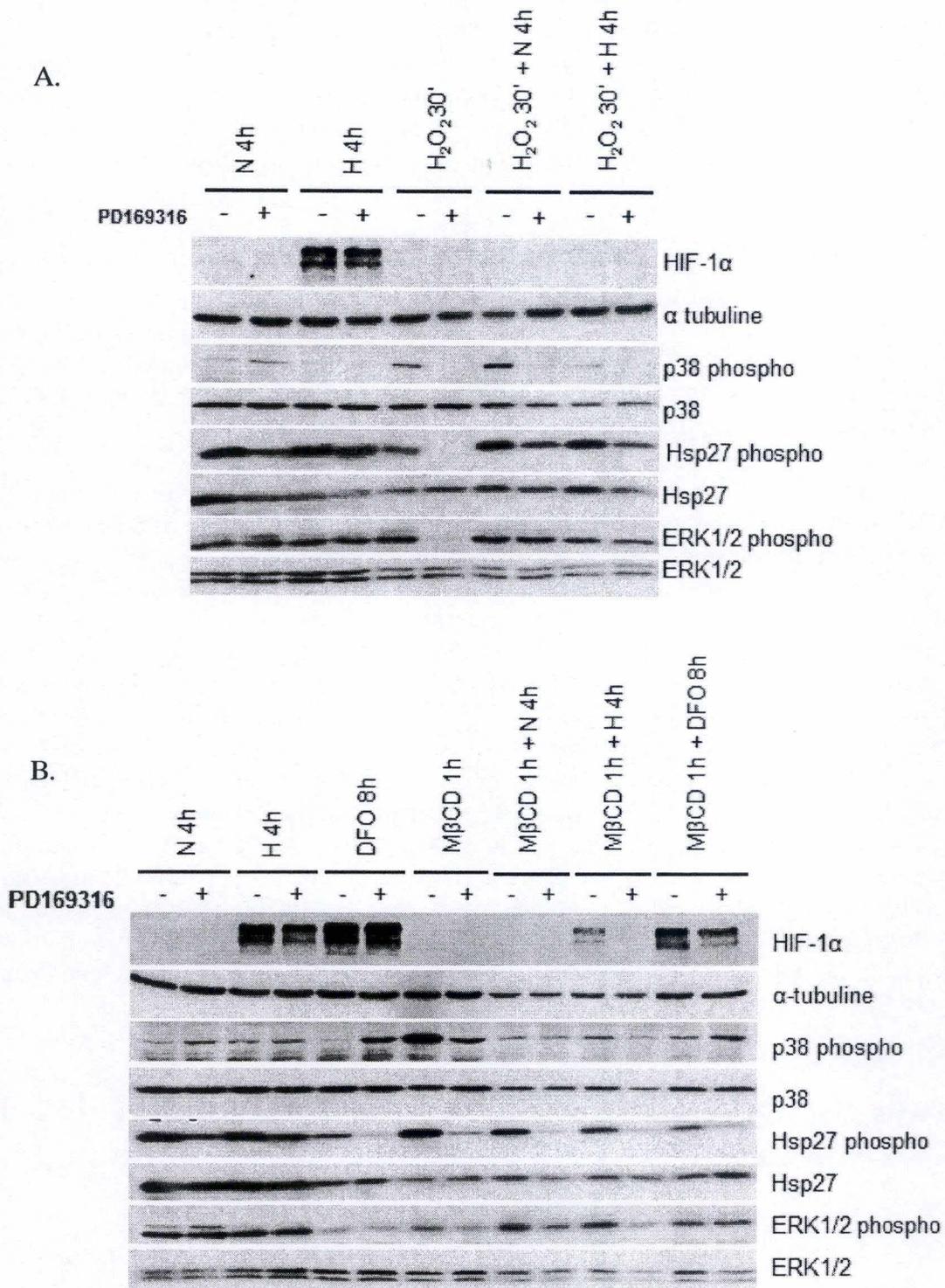
L'effet d'un traitement par le peroxyde d'hydrogène ou d'un traitement avec la M $\beta$ CD combiné à l'effet de l'hypoxie sur l'expression de K10, K14 et de l'involucrine a également fait l'objet d'une étude par PCR en temps réel. Cette expérience a été réalisée pour les mêmes conditions expérimentales que l'expérience précédente.

Les résultats représentés graphiquement à la figure 3.16A indiquent qu'un traitement par le peroxyde d'hydrogène n'influence pas l'expression des marqueurs de différenciation. Le niveau d'expression des transcrits de K10, K14 et de l'involucrine ne varie pas dans les cellules qui ont été incubées pendant 4 heures en conditions de normoxie ou d'hypoxie à la suite d'un traitement avec l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. L'expression des messagers de K10, K14 et de l'involucrine n'est donc pas influencée par l'effet d'un traitement à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> réalisé seul ou combiné à l'effet de l'hypoxie. Les résultats de la figure 3.16B montrent qu'une déplétion en cholestérol par la M $\beta$ CD n'influence pas l'expression des marqueurs de différenciation K10 et K14 mais semble diminuer l'expression de l'ARNm de l'involucrine. L'expression des ARNm de K10 et K14 ne change pas non plus pendant la période de récupération ni en normoxie, ni en hypoxie. Par contre, une nette augmentation de l'expression du messager de l'involucrine dans les cellules traitées par la M $\beta$ CD et ensuite incubées en conditions de normoxie pendant 4 heures est observée. Une période de récupération semble donc nécessaire pour que les cellules perçoivent et répondent au stress à la M $\beta$ CD. Un résultat similaire est observé en hypoxie. Cependant, cette augmentation est plus faible que dans les conditions de normoxie. Par conséquent, l'hypoxie semblerait diminuer l'effet de la déplétion en cholestérol sur l'expression de l'involucrine dans les kératinocytes.

## **8. Etude du rôle de la MAPK p38 sur l'abondance de HIF-1 $\alpha$ suite à un stress oxydatif ou une déplétion en cholestérol combiné à l'hypoxie**

### *8.1. Etude des effets de l'inhibition de la MAPK p38 sur l'abondance de HIF-1 $\alpha$ lors des différents traitements étudiés*

Des expériences investiguant l'expression et l'activation de la MAPK p38 dans les différentes conditions de stress ont déjà été réalisées dans ce travail. Dans ce chapitre, nous avons voulu approfondir nos recherches quant à l'implication de cette kinase dans les voies de



**Figure 3.17 : Etude des effets de l'inhibition de la MAPK p38 sur l'abondance de HIF-1α lors des différents stress étudiés. (A et B)** Les cultures de kératinocytes ont été traitées avec le peroxyde d'hydrogène (100 μM) pendant 30 minutes ou avec la MβCD (7,5 mM) pendant 1 heure, avant d'être incubées en conditions d'hypoxie ou de normoxie pour une période de 4 heures. Une condition contrôle en normoxie et en hypoxie de 4 heures ainsi qu'une condition contrôle où les cellules ont été uniquement traitées avec l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pendant 30 minutes ou avec la MβCD pendant 1 heure, ont également été réalisées. **(B)** Des conditions contrôles où les cellules ont été traitées avec la DFO (130 μM) pendant 8 heures, précédé ou non d'un traitement par la MβCD ont aussi été effectuées. **(A et B)** Chaque traitement a été réalisé en présence ou non de l'inhibiteur de la MAPK p38 (PD169316 à 15 μM). Des lysats protéiques totaux ont ensuite été récupérés et analysés par Western blot. La détection des différentes protéines a été réalisée grâce à des anticorps spécifiques. L'homogénéité du chargement a été vérifiée par la détection de la tubuline α ou des formes totales des protéines d'intérêt.

## Résultats

signalisation régulant le niveau d'expression de HIF-1 $\alpha$  dans les conditions d'hypoxie à la suite d'un stress oxydatif ou d'une déplétion en cholestérol dans les kératinocytes.

Nous avons donc réalisé une analyse par Western blot de l'abondance de la protéine HIF-1 $\alpha$  à partir de lysats cellulaires totaux obtenus immédiatement après avoir soumis les kératinocytes aux différents traitements (décrits ci-dessous) en présence d'un inhibiteur spécifique de la MAP kinase p38 (PD169316). Cette molécule bloque l'activité kinase de la MAPK p38 en l'empêchant de lier l'ATP et ainsi de phosphoryler ses substrats (Pargellis *et al.*, 2002).

Nous avons traité les cultures de kératinocytes avec le peroxyde d'hydrogène à une concentration de 100  $\mu$ M pendant 30 minutes ou avec la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine à 7,5 mM pendant 1 heure, et nous les avons incubées pour une période de 4 heures en hypoxie ou en normoxie. Une condition en hypoxie et en normoxie de 4 heures ainsi qu'une condition où les cellules ont été uniquement traitées par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pendant 30 minutes ou par la M $\beta$ CD pendant 1 heure, ont aussi été réalisées. Des conditions contrôles pour lesquelles les cellules ont subi un traitement par la desferoxamine (DFO) à une concentration de 130  $\mu$ M pendant 8 heures, précédé ou non d'un traitement avec la M $\beta$ CD d'1 heure, ont également été effectuées. Ces différents traitements ont été réalisés en présence de l'inhibiteur de la MAPK p38. Une condition contrôle, sans la présence de l'inhibiteur, a été effectuée pour chaque traitement.

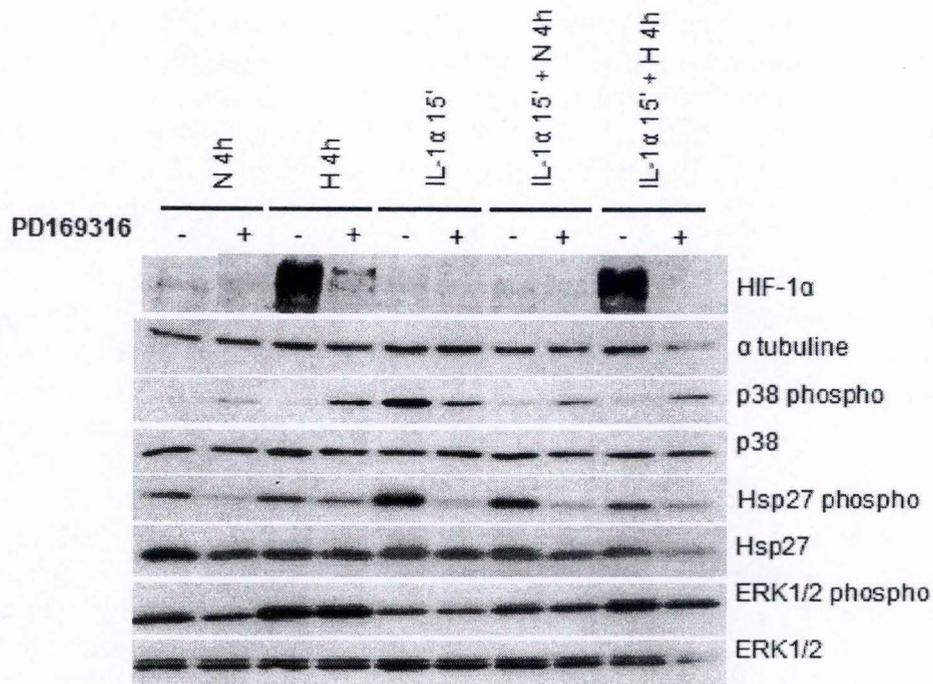
Les résultats sont présentés aux figures 3.17A et B. HIF-1 $\alpha$  est détectable en hypoxie et dans les conditions contrôles où les cellules ont été traitées par la DFO en présence ou non de l'inhibiteur. La stabilisation de la protéine HIF-1 $\alpha$  en hypoxie ne dépend donc pas de l'activité de la MAPK p38. Dans les cellules qui ont été traitées, en présence ou non de l'inhibiteur, par le peroxyde d'hydrogène et incubées ensuite en hypoxie, la sous-unité  $\alpha$  n'est pas stabilisée. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus précédemment dans ce travail et montrent que la MAPK p38 n'intervient pas dans la régulation de l'abondance de HIF-1 $\alpha$  en hypoxie à la suite d'un stress oxydatif. Comme attendu HIF-1 $\alpha$  est stabilisé dans les cellules qui ont été traitées par la M $\beta$ CD et incubées en hypoxie en absence de l'inhibiteur. De plus, une diminution de l'abondance de HIF-1 $\alpha$  est observée pour cette condition par rapport à la condition contrôle en hypoxie, comme nous l'avons déjà constaté auparavant dans nos résultats. Par contre, dans les cellules qui ont été traitées en présence de l'inhibiteur, la sous-unité  $\alpha$  n'est plus stabilisée. De plus, nous observons une diminution de l'abondance de la protéine HIF-1 $\alpha$  dans les cellules qui ont été traitées par la M $\beta$ CD et par la DFO en présence de l'inhibiteur. Ces résultats suggèrent donc l'implication de la MAPK p38 dans la régulation de l'abondance de HIF-1 $\alpha$  dans les conditions d'hypoxie à la suite d'une déplétion en cholestérol membranaire.

Ensuite, afin de vérifier l'efficacité du traitement avec l'inhibiteur, nous avons réalisé une analyse par Western blot de l'abondance de la forme phosphorylée de la MAPK p38 pour les différentes conditions. Cependant, étant donné que l'inhibiteur empêche la kinase de phosphoryler ses substrats mais ne l'empêche pas de s'auto-phosphoryler, et au vu de la relation décrite dans la littérature entre l'activation de la MAPK p38 et la phosphorylation d'Hsp27 (Jonak *et al.*, 2004), nous avons également décidé d'analyser l'abondance de la forme phosphorylée d'Hsp27. Nous avons également étudié la phosphorylation des ERK1/2 à la suite des différents traitements afin de déterminer leur implication dans la réponse cellulaire face aux différents stress étudiés en présence de l'inhibiteur de la MAPK p38. Toutes ces analyses ont été réalisées à partir des mêmes lysats de cellules que ceux utilisés pour la détection de HIF-1 $\alpha$  dans l'expérience précédente et sont représentées aux figures 3.17A et B.

## Résultats

La MAPK p38 est activée dans les kératinocytes qui ont subi un traitement par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, suivi ou non d'une incubation en conditions de normoxie ou d'hypoxie. Cependant, son activité est fortement diminuée lorsque ces traitements sont effectués en présence de son inhibiteur. D'autre part, une diminution de l'abondance de la forme phosphorylée d'Hsp27 est observée dans les cellules qui ont subi un traitement en présence de l'inhibiteur. Remarquons cependant que cette diminution de l'activité d'Hsp27 lors de l'inhibition de la MAPK p38 n'est pas totale. Cette diminution partielle de la phosphorylation d'Hsp27 nous suggère qu'il n'existe qu'un contrôle partiel de l'activité d'Hsp27 par la MAP kinase p38. Or, cette diminution est particulièrement importante dans les cellules qui ont subi uniquement un stress avec l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Par ailleurs, un effet similaire est observé au niveau de l'activité des ERK1/2 dans ces cellules. Ces résultats démontrent donc l'importance de la MAPK p38 dans la réponse cellulaire à un stress oxydatif. Enfin, l'activité des ERK1/2 ne semble pas être influencée par l'effet de l'inhibiteur de p38 à la suite des autres traitements étudiés. Ces résultats prouvent donc la spécificité de l'inhibiteur de la MAPK p38 dans les kératinocytes dans nos conditions expérimentales.

La MAPK p38 est également activée dans les kératinocytes qui ont subi un traitement par la M $\beta$ CD. Son activité est par ailleurs plus faible après récupération en condition de normoxie ou d'hypoxie ou à la suite d'un traitement par la DFO. Nous observons à nouveau une faible activité de la kinase dans les conditions contrôles en normoxie et en hypoxie. Cependant, contrairement à ce que l'on a pu observer lors des traitements avec l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, une phosphorylation de la MAPK p38 est observée ici dans la plupart des conditions expérimentales en présence de son inhibiteur. Ces résultats nous incitent à penser qu'il y a d'une part une auto-phosphorylation de la MAPK p38 dans les kératinocytes et que d'autre part, la simple présence de l'inhibiteur peut induire un stress pour la cellule. On assisterait alors, en réponse à ce stress, à l'activation de voies de signalisation qui mènent à la phosphorylation de la MAPK p38. Nous pouvons imaginer que nous assistons ici à une sorte de compétition entre l'effet inhibiteur de la molécule PD169316 sur l'activité de la MAPK p38 et l'activation de la voie des MAP kinases due au stress qu'induit la présence de cette molécule. Une diminution de l'abondance de la forme phosphorylée d'Hsp27 est également observée dans les cellules qui ont subi un traitement en présence de l'inhibiteur. Cette diminution de l'activité d'HSP27 est partielle dans les conditions contrôles en normoxie et en hypoxie, comme c'est également le cas après un traitement par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Par contre, l'activité d'HSP27 est presque nulle dans la condition DFO et dans les conditions après un traitement par la M $\beta$ CD. Il existe donc une autre voie qui intervient sur la phosphorylation d'Hsp27. Celle-ci pourrait agir sur les intermédiaires connus qui sont les MAPKAPK-2 ou-3, ou via d'autres effecteurs qui ne seraient pas connus, ou pas encore associés à cette voie. Enfin, l'activité des ERK1/2 n'est pas influencée par le traitement avec l'inhibiteur de la MAPK p38 dans les conditions contrôles en normoxie et en hypoxie et dans la condition contrôle DFO. Ces résultats montrent l'efficacité de l'inhibiteur de la MAPK p38. Cependant, pour les autres conditions où un traitement par la M $\beta$ CD a été réalisé, nous observons une diminution de la phosphorylation des ERK1/2 en présence de l'inhibiteur. Ces résultats nous incitent donc à penser qu'il pourrait y avoir un rétro-contrôle de l'activité des ERK1/2 dans les cellules traitées à la M $\beta$ CD, via le récepteur de l'EGF par exemple, à la suite d'un traitement avec l'inhibiteur de la MAPK p38. La M $\beta$ CD est connue pour activer la MAPK p38 et les ERK1/2 simultanément au récepteur de l'EGF dans les kératinocytes (Jans *et al.*, 2004 ; Lambert *et al.*, 2006). Nous pouvons donc suggérer que l'inhibition de la MAPK p38 pourrait agir négativement sur le récepteur, entraînant une diminution de la phosphorylation des ERK1/2.



**Figure 3.18 : Recherche des effets de l'inhibition de la MAPK p38 sur l'abondance de HIF-1 $\alpha$  en présence d'IL-1 $\alpha$  en hypoxie.** Les cultures de kératinocytes ont été traitées avec l'interleukine-1 $\alpha$  à une concentration de 10 ng/ml pendant 15 minutes, avant d'être incubées en conditions d'hypoxie ou de normoxie pour une période de 4 heures. Une condition contrôle en normoxie et en hypoxie de 4 heures ainsi qu'une condition contrôle où les cellules ont été uniquement traitées avec l'interleukine-1 $\alpha$  pendant 15 minutes, ont également été réalisées. Chaque traitement a été réalisé en présence ou non de l'inhibiteur de la MAPK p38 (PD169316 à 15  $\mu$ M). Des lysats protéiques totaux ont ensuite été récupérés et analysés par Western blot. La détection des différentes protéines a été réalisée grâce à des anticorps spécifiques. L'homogénéité du chargement a été vérifiée par la détection de la tubuline  $\alpha$  ou des formes totales des protéines d'intérêt.

## 8.2. Recherche des effets de l'inhibition de la MAPK p38 sur l'abondance de HIF-1 $\alpha$ en présence d'IL-1 $\alpha$ en hypoxie

Les résultats de l'expérience précédente suggèrent l'implication de la MAPK p38 dans la régulation de l'abondance de HIF-1 $\alpha$  dans les conditions d'hypoxie à la suite d'une déplétion en cholestérol membranaire. Or, puisque nous avons démontré précédemment qu'il n'y a pas d'effet d'une déplétion en cholestérol sur l'activité de HIF-1 et que la MAPK p38 ne semble pas impliquée dans la régulation de l'abondance de la protéine HIF-1 $\alpha$  en hypoxie, nous nous sommes intéressé plutôt à l'état d'activation de p38 dans les kératinocytes. Il semblerait que la signalisation hypoxique régulant l'abondance de HIF-1 $\alpha$  dans les kératinocytes puisse dépendre de la MAPK p38 lorsque celle-ci est activée au préalable dans les cellules. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons remplacé le traitement par la M $\beta$ CD par un traitement utilisant l'interleukine-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ), capable elle aussi d'activer la MAPK p38 dans les cellules. Une analyse par Western blot de l'abondance de la protéine HIF-1 $\alpha$  a ensuite été réalisée.

Les kératinocytes ont donc été traités par l'IL-1 $\alpha$  à 10 ng/ml pendant 15 minutes et ensuite incubés ou non en condition d'hypoxie ou de normoxie pour une période de 4 heures. Une condition en hypoxie et en normoxie de 4 heures a aussi été réalisée. Ces différents traitements ont été réalisés en présence de l'inhibiteur de la MAPK p38. Une condition contrôle, sans la présence de l'inhibiteur, a été effectuée pour chaque traitement.

Les résultats présentés à la figure 3.18 montrent une stabilisation de HIF-1 $\alpha$  en hypoxie en présence ou non de l'inhibiteur de la MAPK p38. Cependant, contrairement aux résultats présentés à la figure 3.17, l'abondance de la sous-unité  $\alpha$  est plus faible dans les cellules qui ont subi un traitement avec l'inhibiteur. Ce résultat surprenant peut être dû tout simplement à une erreur de manipulation de notre part. Cependant, nous pouvons à nouveau remettre en jeu l'effet de l'inhibiteur qui induirait un stress pour les cellules. De plus, étant donné que la MAPK p38 est activée dans cette condition, nous pouvons imaginer que ce stress module certaines voies de signalisation aux dépens de la signalisation hypoxie régulant le niveau d'HIF-1 $\alpha$  dans les cellules. HIF-1 $\alpha$  est stabilisé dans les cellules qui ont été traitées par l'IL-1 $\alpha$  et incubées en hypoxie en absence de l'inhibiteur. Cependant, nous n'observons pas une diminution de l'abondance de HIF-1 $\alpha$  pour cette condition par rapport à la condition contrôle en hypoxie, comme nous l'avons observé pour le traitement avec la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine dans les résultats précédents. Par contre, HIF-1 $\alpha$  n'est pas stabilisé dans les cellules qui ont été traitées avec l'IL-1 $\alpha$  et incubées en hypoxie en présence de l'inhibiteur. Ces résultats suggèrent donc à nouveau l'implication de la MAPK p38 dans la régulation de l'abondance de HIF-1 $\alpha$  dans les conditions d'hypoxie lorsqu'elle est activée dans les kératinocytes.

L'efficacité du traitement avec l'inhibiteur a également été vérifiée pour les différentes conditions par une analyse de l'abondance des formes phosphorylées de la MAPK p38, d'Hsp27 et des ERK1/2, à partir des mêmes lysats de cellules utilisés pour la détection de HIF-1 $\alpha$ . Les résultats à la figure 3.18 nous montrent cependant les mêmes effets observés et discutés lors des expériences précédentes. Ceux-ci indiquent à nouveau l'efficacité du traitement avec l'inhibiteur de la MAPK p38.

## **DISCUSSION ET PERSPECTIVES**

Ce travail s'intéresse à la réponse des kératinocytes à différents stress cellulaires que sont l'hypoxie, le stress oxydatif et la déplétion en cholestérol. Notre objectif est de caractériser cette réponse en déterminant si le facteur de transcription HIF-1 représente un acteur clé dans cette réponse aux stress.

## 1. Effets de l'hypoxie

Les kératinocytes peuvent se trouver en situation d'hypoxie dans les conditions normales comme pathologiques au sein de l'épiderme (Elson *et al.*, 2000 ; Bedogni *et al.*, 2005). Dans les deux cas, toute diminution de la concentration en oxygène dans l'environnement cellulaire entraîne une réponse spécifique des cellules en partie grâce à l'activité du facteur de transcription HIF-1. Celui-ci engendre alors dans les cellules des réponses adaptatives destinées à faire face à ces conditions contraignantes.

L'activité du facteur de transcription HIF-1 est régulée par différents mécanismes impliquant en partie la stabilité de sa sous-unité  $\alpha$ . En effet, HIF-1 $\alpha$  est extrêmement labile dans les conditions de normoxie, contrairement aux conditions d'hypoxie où l'inhibition de sa dégradation par le protéasome permet son accumulation dans les cellules. Les résultats des expériences décrites dans ce travail indiquent que HIF-1 $\alpha$  est stabilisé en condition d'hypoxie dans les kératinocytes. De plus, nous avons observé une augmentation puis une diminution de l'abondance de la protéine HIF-1 $\alpha$  au cours des différents temps d'incubation en conditions d'hypoxie. En effet, celle-ci augmente après 4 heures d'incubation et diminue ensuite après 8 heures. Après 16 heures d'incubation, la protéine HIF-1 $\alpha$  n'est plus détectée dans les cellules. La durée de l'incubation en conditions d'hypoxie influence donc la stabilisation et/ou la dégradation de la protéine HIF-1 $\alpha$  dans les kératinocytes. Ces observations ont déjà été faites dans d'autres études sur d'autres types cellulaires. Mottet *et al.* (2003) ont mis en évidence l'implication de la voie PI3K/Akt dans la régulation de la stabilisation de HIF-1 $\alpha$  en hypoxie dans la lignée cellulaire HepG2. D'après leurs résultats, une hypoxie à court terme stimule la voie PI3K/Akt dans ces cellules, ce qui induit à la stabilisation de HIF-1 $\alpha$ . Par contre, une hypoxie à long terme inactive cette voie et entraîne la dégradation de la sous-unité  $\alpha$  par le protéasome. Des données plus récentes complètent cette étude, dans le même type cellulaire, en proposant un rôle de la thréonine protéine kinase GSK3 $\beta$  dans la régulation de la stabilisation de HIF-1 $\alpha$  par la voie PI3K/Akt. Lorsque Akt est inactivé, la GSK3 $\beta$  est activée et phosphoryle HIF-1 $\alpha$ , ce qui entraîne son ubiquitination puis sa dégradation et cela, indépendamment de l'action des prolyl hydroxylases ou du facteur pVHL. Par contre, lorsque Akt est activé, il inhibe la GSK3 $\beta$  en la phosphorylant, ce qui entraîne la stabilisation et l'accumulation de HIF-1 $\alpha$  (Flugel *et al.*, 2007). Il serait donc intéressant d'analyser par Western blot l'activité d'Akt et de la GSK3 $\beta$  dans nos conditions expérimentales afin de confirmer ces résultats dans les kératinocytes.

Une fois stabilisée par l'hypoxie, la sous-unité HIF-1 $\alpha$  est transportée dans le noyau où elle dimérise avec la sous-unité ARNT pour former le facteur de transcription HIF-1 complet. Celui-ci peut ensuite se fixer sur les séquences conservées HRE dans les promoteurs de ces gènes cibles afin d'induire leur expression et permettre aux cellules et aux tissus de s'adapter à l'hypoxie (Semenza *et al.*, 1999). L'étude de l'expression de messagers de la LDHA et de BNIP3 nous a permis de vérifier que la stabilisation de HIF-1 $\alpha$  observée dans les kératinocytes conduisait bien à une activation du facteur de transcription HIF-1. En effet, une augmentation progressive de l'expression de ces deux messagers a été observée en fonction

du temps d'incubation. Il faut noter qu'après 16 heures d'incubation dans les conditions d'hypoxie, l'expression des messagers de BNIP3 et de la LDHA diminue. Cette diminution est parallèle à la diminution de l'abondance de HIF-1 $\alpha$  observée après 16 heures d'incubation dans les conditions d'hypoxie.

Dans la littérature, plusieurs voies de signalisation sont désormais connues et décrites comme étant capables de réguler l'activité du facteur HIF-1 en condition d'hypoxie. De nombreux résultats d'expériences démontrent l'implication de certaines voies de signalisation dans la régulation de l'activité transcriptionnelle du facteur HIF-1, ainsi que dans la régulation du niveau d'expression de HIF-1 $\alpha$ . En effet, plusieurs kinases sont capables de phosphoryler directement HIF-1 $\alpha$  en hypoxie. Cependant, les mécanismes précis menant à cette régulation ne sont pas encore totalement élucidés et semblent dépendre du type cellulaire.

Après avoir mis en évidence l'activité de HIF-1 dans les kératinocytes, nous avons donc décidé d'investiguer la signalisation impliquée dans l'activation du facteur HIF-1 dans ce type cellulaire. Nous avons suivi l'activation de plusieurs kinases en évaluant l'abondance de leur forme phosphorylée, et déterminé leur implication dans la phosphorylation de HIF-1 $\alpha$  en conditions d'hypoxie en utilisant des inhibiteurs spécifiques. Nous nous sommes également intéressés à l'activité du récepteur de l'EGF connu pour être activé par différents stress dans les kératinocytes (Peus *et al.*, 1999). De plus, EGFR se trouve en amont de certaines kinases connues pour être impliquées dans la régulation de l'activité de HIF-1.

Notre étude indique que le récepteur de l'EGF n'est pas activé au cours de la réponse des kératinocytes à l'hypoxie. Nos résultats ne montrent en effet aucun changement de l'état de phosphorylation d'EGFR au cours des différents temps d'incubations en conditions d'hypoxie. Cependant, certains résultats décrits dans la littérature montrent un lien entre l'activation d'EGFR et l'activité du facteur de transcription HIF-1 en normoxie dans les kératinocytes. Li *et al.* (2006) ont démontré que les radiations UVB stimulent dans les kératinocytes la phosphorylation du récepteur de l'EGF, qui active à son tour la voie de la PI3K/Akt ainsi que d'autres voies de signalisation en aval, menant à l'activation de nombreux facteurs de transcription dont le facteur HIF-1. De plus, Peng *et al.* (2006) ont montré une augmentation du niveau d'expression de HIF-1 $\alpha$  en conditions de normoxie par la voie du récepteur de l'EGF et de la PI3K/Akt dans des cellules cancéreuses de poumon résistantes à l'apoptose. Par ailleurs, certains facteurs de croissance, dont l'EGF, stimulent la traduction de la sous-unité HIF-1 $\alpha$  en normoxie par la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR ou celle des MAP kinases (Zhong *et al.*, 2000 ; Ruvinsky *et al.*, 2005). Le récepteur de l'EGF serait donc impliqué dans la régulation de l'activité du facteur de transcription HIF-1 dans les kératinocytes uniquement en conditions de normoxie. Il faut noter que certains résultats d'expériences décrits dans la littérature montrent une stabilisation de HIF-1 $\alpha$  dans les conditions de normoxie par le facteur de croissance épidermique (EGF) (Zhong *et al.*, 2000). Il serait donc intéressant de vérifier ces données en traitant les kératinocytes avec ce facteur de croissance et d'étudier en parallèle l'activité d'EGFR.

Plusieurs résultats décrits dans la littérature indiquent que la voie PI3K/Akt est étroitement liée à la régulation du niveau d'expression de HIF-1 $\alpha$  en induisant soit sa traduction, soit sa stabilisation en réponse à des facteurs de croissance ou à des facteurs de stress comme nous l'avons discuté ci-dessus (Mottet *et al.*, 2003). Cependant, la modulation ainsi que le rôle de la voie PI3K/Akt dans la régulation de la sous-unité HIF-1 $\alpha$  restent controversés et semblent dépendre du contexte cellulaire. Dans ce travail, nous avons montré que l'hypoxie n'influence pas l'état de phosphorylation d'Akt. Cependant, nos résultats montrent que la stabilisation de

HIF-1 $\alpha$  est affectée dans les kératinocytes qui ont été incubés en conditions d'hypoxie avec la Wortmannine, un inhibiteur de la voie PI3K. En conclusion, puisque Akt est activé dans toutes nos conditions expérimentales, et que son inhibition prévient la stabilisation de HIF-1 $\alpha$  en hypoxie, il est probable que la PI3K soit impliquée dans la régulation de l'activité de HIF-1. La voie PI3K/Akt est sûrement aussi impliquée dans d'autres processus cellulaires que l'adaptation à l'hypoxie dans les kératinocytes.

Les MAPK ERK1/2 sont capables de phosphoryler directement HIF-1 $\alpha$  en hypoxie (Minet *et al.*, 2001) et par conséquent, de réguler l'activité du facteur de transcription HIF-1 (Mylonis *et al.*, 2006). Cependant, les ERK1/2 ne sont pas activées dans tous les types cellulaires, alors que le facteur de transcription HIF-1 est activé en conditions d'hypoxie dans toutes les cellules (Minet *et al.*, 2001). L'activation des ERK1/2 ne semble dès lors pas totalement indispensable à l'activité du facteur HIF-1. Nos résultats indiquent que les ERK1/2 sont activées dans les cellules qui ont été incubées en conditions d'hypoxie ou de normoxie pendant 1, 2 et 4 heures. Cependant, l'hypoxie ne semble pas affecter l'état de phosphorylation de ces kinases durant de ces quatre temps d'incubation. Nous pouvons dès lors suggérer que l'activation des ERK1/2 soit impliquée à la fois dans la réponse à l'hypoxie et à la fois dans d'autres processus cellulaires dans ces conditions, tels que la stimulation de la prolifération des kératinocytes. Cependant, une diminution progressive de l'état de phosphorylation de ces kinases est observée après une incubation en hypoxie ou en normoxie de 8 et 16 heures. Dans ces conditions, nous pouvons observer un effet de l'hypoxie sur l'état de phosphorylation des ERK1/2, particulièrement après 16 heures d'incubation. L'activité des ERK1/2 semble donc dépendre de la durée de l'incubation en conditions d'hypoxie. Une régulation de la phosphorylation des ERK1/2 par un mécanisme impliquant la phosphatase MKP-1 (MAP kinase phosphatase 1) pourrait expliquer la diminution de l'activité de ces MAP kinases dans les kératinocytes. La MKP-1 a été identifiée comme étant un gène cible de HIF-1, mais son rôle dans la réponse des cellules à l'hypoxie est peu connu (Laderoute *et al.*, 1999). Liu *et al.* (2003) ont montré que l'hypoxie induisait l'expression de la MKP-1 dans les hépatocytes HepG2. Ils ont également démontré que cette expression était dépendante du temps d'incubation en conditions d'hypoxie. D'autre part, une étude a récemment démontré l'implication de cette phosphatase dans la régulation de l'activité transcriptionnelle de HIF-1 par l'inactivation de la voie des ERK1/2 dans des cellules cancéreuses de l'épithélium gastrique (Qiao *et al.*, 2005). La MKP-1 serait donc activée dans les kératinocytes lors d'une hypoxie importante ou de longue durée. Un rétro-contrôle de l'activité de HIF-1 par l'hypoxie via la MKP-1 peut donc être suggéré dans les kératinocytes. Par ailleurs, nous pouvons observer un lien entre l'activation des ERK1/2 et la stabilisation de HIF-1 $\alpha$  en hypoxie dans les kératinocytes. En effet, les ERK1/2 sont phosphorylées lorsque HIF-1 $\alpha$  est stabilisé dans les kératinocytes après un temps d'incubation court en hypoxie. De plus, la diminution de l'état de phosphorylation des ERK1/2, pour des temps d'incubation plus longs, est parallèle à la diminution de l'abondance de la protéine HIF-1 $\alpha$  décrite précédemment. Cependant, l'inhibition de l'activité des ERK1/2 par l'inhibiteur PD98059 ne semble pas affecter la stabilisation de HIF-1 $\alpha$  dans nos conditions expérimentales. On sait aujourd'hui que des phosphorylations par la voie des ERK1/2 sur deux résidus sérine (ser-641 et ser-643) de la sous-unité  $\alpha$  sont nécessaires à l'activité transcriptionnelle de HIF-1 mais pas à sa stabilisation en hypoxie (Minet *et al.*, 2001 ; Mylonis *et al.*, 2006). Dans cette étude, nous pouvons donc suggérer que l'activation des ERK1/2 pourrait participer directement à la régulation de l'activité transcriptionnelle de HIF-1, mais pas à la stabilisation de la sous-unité  $\alpha$  dans les kératinocytes.

Certaines études démontrent également l'implication de la MAPK p38 dans la régulation de l'activité du facteur de transcription HIF-1. Emerling *et al.* (2005) ont montré que l'activation de la MAPK p38, dans des fibroblastes embryonnaires de souris, induit une diminution de l'hydroxylation des résidus proline et asparagine au niveau de la sous-unité HIF-1 $\alpha$  en hypoxie, contribuant à l'activation du facteur HIF-1. Une autre étude, réalisée sur une lignée de cellules pancréatiques cancéreuses, a montré que la phosphorylation de HIF-1 $\alpha$  par la MAPK 38 empêche celle-ci d'interagir avec le facteur de von Hippel Lindau, menant à la stabilisation de HIF-1 $\alpha$  dans ces cellules (Kwon *et al.*, 2005). Nos résultats montrent une activation de la MAPK p38 après différents temps en condition d'hypoxie. Cependant, l'inhibition de la MAPK p38 dans les kératinocytes par le PD169316 n'affecte pas la stabilisation de HIF-1 $\alpha$ .

Dans cette étude, nous avons également mis en évidence l'implication de la JNK et de la PKA dans la stabilisation de la sous-unité HIF-1 $\alpha$  en conditions d'hypoxie grâce à l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de ces kinases. En effet, l'inhibition de l'activité de la JNK par la molécule SP600125 ou de la PKA par la molécule H89 affecte l'abondance de la protéine HIF-1 $\alpha$  dans nos conditions expérimentales. Cependant, le rôle de la JNK dans la régulation de l'activité du facteur HIF-1 reste controversé et semble à nouveau dépendre du type cellulaire (Richard *et al.*, 1999). Une étude récente, réalisée au sein de notre laboratoire, indique que la phosphorylation de HIF-1 $\alpha$  est également affectée en présence de l'inhibiteur H89 dans des cellules endothéliales soumises à une hypoxie intermittente mais pas à une hypoxie chronique (Toffoli *et al.*, 2007). La phosphorylation de HIF-1 $\alpha$  par la PKA pourrait donc être une réponse spécifique à une hypoxie chronique dans les kératinocytes. D'autres résultats décrits dans la littérature indiquent une activation de la PKA en conditions d'hypoxie dans certains types cellulaires (Prabu *et al.*, 2005). Cette activation peut être due à une augmentation en hypoxie de la concentration intracellulaire en AMPc dans ces cellules (Kvietikova *et al.*, 1995). Nous pouvons donc suggérer l'implication de la PKA dans la signalisation menant à la stabilisation de la sous-unité  $\alpha$  dans les kératinocytes, dans nos conditions expérimentales.

## 2. Effets d'un stress oxydatif combiné ou non à l'hypoxie

La littérature fournit de nombreuses pistes quant à l'implication des ROS dans la signalisation régulant le niveau d'expression de HIF-1 $\alpha$ . Cependant, les mécanismes par lesquels les ROS régulent l'activité de HIF-1 ne sont pas encore totalement élucidés. Dans les conditions d'hypoxie, un statut rédox particulier dans les cellules est nécessaire à l'activation du facteur HIF-1 (Huang *et al.*, 1996). Un débat assez controversé persiste néanmoins quant à la production de ROS en hypoxie dans les cellules. Plusieurs résultats d'expériences différentes indiquent une diminution de la production de ROS en hypoxie dans les cellules, alors que d'autres montrent plutôt une élévation (Chandel *et al.*, 1997). Deux modèles dans lesquels les ROS seraient impliqués dans la régulation de l'activité de HIF-1 sont proposés dans la littérature. Le premier propose le rôle d'une NAD(P)H oxydoréductase dans le cytoplasme des cellules, qui convertirait l'oxygène en radicaux libres menant à la dégradation de HIF-1 $\alpha$  en normoxie. La diminution de la production de ces ROS en hypoxie serait alors le déclencheur de la signalisation menant à l'activation de HIF-1. D'après le second modèle, une augmentation de la production de ROS par la mitochondrie en hypoxie mènerait à la stabilisation de HIF-1 $\alpha$  (Chandel *et al.*, 1997). Les ROS jouent également un rôle important dans la régulation du facteur HIF-1 dans les conditions non-hypoxiques. Plusieurs expériences

décrites dans la littérature montrent une augmentation de l'expression de HIF-1 $\alpha$  en normoxie en réponse à la thrombine, au lipopolysaccharide, à l'angiotensine II, à des cytokines ou encore à des facteurs de croissance. Par ailleurs, la plupart de ces facteurs stimulent également la production de ROS dans certains types cellulaires, notamment dans les processus de cicatrisation et d'inflammation. En outre, certaines études montrent que l'inhibition de la production de ROS diminue le niveau d'expression de HIF-1 $\alpha$  induit préalablement dans les cellules par certains de ces facteurs (Richard *et al.*, 2000 ; Gorlach *et al.*, 2001 ; Sen *et al.*, 2003 ; Blouin *et al.*, 2004).

Rezvani *et al.* (2007) ont mis en évidence un lien entre le niveau d'expression de HIF-1 $\alpha$  et la production de ROS en normoxie dans les kératinocytes à la suite d'une exposition aux UVB. Les résultats de leur étude indiquent une variation de l'expression de HIF-1 $\alpha$  en deux phases successives en fonction du temps après l'irradiation par les UVB. HIF-1 $\alpha$  est exprimée et stabilisée dans les kératinocytes directement après l'exposition aux ultraviolets. Ensuite, une diminution très rapide du niveau d'expression de la sous-unité  $\alpha$  est observée, suivie d'une augmentation progressive pendant plusieurs heures après l'irradiation. Parallèlement à l'expression de HIF-1 $\alpha$ , cette étude montre une production rapide et importante de ROS dans le cytoplasme des kératinocytes directement après l'exposition aux UVB, suivie d'une production moins importante au niveau de la mitochondrie quelques heures après l'irradiation. Ces résultats suggèrent donc que la production de ROS en réponse à l'irradiation par les UVB pourrait être liée à la dégradation et à l'accumulation de HIF-1 $\alpha$  dans les kératinocytes irradiés. Ils suggèrent également l'implication des deux mécanismes décrits dans les deux modèles présentés ci-dessus. En effet, une production rapide de ROS par une NAD(P)H oxydase cytoplasmique après l'irradiation serait responsable de la dégradation de HIF-1 $\alpha$ , alors que la production plus tardive de ROS par les mitochondries serait à l'origine de l'accumulation de HIF-1 $\alpha$ .

Dans notre étude, les ROS exogènes n'influencent pas la régulation de HIF-1 dans les kératinocytes, en tout cas dans les limites de concentrations et de temps d'incubation envisagés. Cependant, Chandel *et al.* (2000) ont démontré la stabilisation de HIF-1 $\alpha$  en condition de normoxie dans les hépatocytes Hep3B à la suite d'un traitement par le peroxyde d'hydrogène. Il est important de noter que leurs expériences se sont réalisées dans des conditions expérimentales quelque peu différentes des nôtres. En effet, nous avons stressé les kératinocytes en présence d'une concentration en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> plus élevée que celle utilisée dans leurs expériences. Il faut cependant noter que les kératinocytes répondent bien au stress oxydatif dans nos conditions expérimentales, puisque les MAP Kinases p38, ERK1/2 et JNK1/2 sont activées à la suite d'un traitement par le peroxyde d'hydrogène. L'activation de ces kinases par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a également été démontrée dans la littérature (Peus *et al.*, 1999). Il serait donc intéressant de tester des concentrations plus faibles et d'autres temps d'incubation afin de mettre en évidence un éventuel effet de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur la stabilisation de HIF-1 $\alpha$  dans les kératinocytes.

Huang *et al.* (1996) ont montré qu'un pré-traitement par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> empêchait la stabilisation de HIF-1 $\alpha$  en hypoxie dans les hépatocytes Hep3B, un résultat similaire à ce que l'on a observé dans les kératinocytes dans nos conditions expérimentales. En effet, si un stress oxydatif par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> n'influence pas la stabilisation de HIF-1 $\alpha$  dans les kératinocytes en condition de normoxie, nous avons montré clairement que ce peroxyde a un effet lorsqu'il est combiné à un stress hypoxique.

En combinant les résultats des différentes études décrites ci-dessus avec nos propres données, nous pouvons comparer un apport en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exogène à la production de ROS en normoxie, d'après le modèle impliquant une NAD(P)H oxydoréductase cytoplasmique menant à la dégradation de HIF-1 $\alpha$ . De plus, nos observations suggèrent l'implication d'une signalisation sensible aux conditions rédox des cellules dans la régulation de la stabilisation de la sous-unité  $\alpha$  du facteur de transcription HIF-1 en hypoxie. Nous pourrions suggérer qu'un équilibre délicat existe : une légère augmentation de la production de ROS en hypoxie semble être nécessaire à la stabilisation de HIF-1 $\alpha$ , mais si celle-ci devient exagérée, les ROS exerceraient alors un effet négatif.

Il serait intéressant de confirmer nos résultats en utilisant des molécules anti-oxydantes telles que la NAC (N-acétyl-L-cystéine). De plus, différents moyens d'induction de stress oxydatif autres que l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pourraient être utilisés afin de voir si la signalisation menant à la dégradation de HIF-1 $\alpha$  nécessite un intermédiaire spécifique comme l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou toute autre espèce réactive dérivée de l'oxygène.

### 3. Effets d'une déplétion en cholestérol combinée ou non à l'hypoxie

Le cholestérol est un composant essentiel des membranes plasmiques animales. Il joue un rôle physiologique important au sein des membranes en régulant sa fluidité et sa perméabilité. Dans les kératinocytes, ce lipide est nécessaire à l'élaboration de l'enveloppe cornée et à l'étanchéité de la barrière lipidique épidermique. La concentration en cholestérol est particulièrement élevée dans les microdomaines lipidiques que l'on nomme « lipid rafts ». Ces structures mobiles possèdent une affinité particulière pour plusieurs protéines de signalisation dont certains récepteurs à tyrosine kinase tels que le récepteur de l'EGF présent en outre dans les kératinocytes (Simons et Toomre, 2000). De plus, l'activité de ces protéines peut être influencée par ces radeaux lipidiques. Ces microdomaines, considérés aujourd'hui comme de vraies plateformes de signalisation, sont donc capables de réguler de nombreux processus cellulaires (Gniadecki et Bang, 2003). De plus, plusieurs études démontrent l'implication de ces microdomaines dans la régulation de voies de signalisation en réponse à des stress. En effet, ces microdomaines peuvent subir un réarrangement afin d'activer ou d'inactiver certaines voies de transduction du signal permettant aux cellules d'induire une réponse rapide en situation de stress (Pike, 2005). Par exemple, une extraction du cholestérol membranaire, par la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine (M $\beta$ CD), désorganise la structure de ces radeaux lipidiques et induit par conséquent une perturbation des voies de transduction du signal en aval de ces structures. Plus récemment, il a été montré que l'hypoxie pouvait également induire un réarrangement des microdomaines lipidiques au sein de la membrane plasmique dans des cellules épithéliales d'alvéoles pulmonaires (Botto *et al.*, 2008).

Une étude récente réalisée au sein de notre laboratoire montre qu'une désorganisation des « lipid rafts » dans les kératinocytes par la M $\beta$ CD induit la relocalisation d'EGFR sous forme d'amas en dehors des radeaux lipidiques. Cette réorganisation diminue la mobilité des récepteurs au sein de la membrane plasmique et induit leur activation de façon indépendante du ligand. En aval d'EGFR, la MAP kinase ERK2 est alors activée, ce qui stimule la prolifération cellulaire (Lambert *et al.*, 2006). Li *et al.* (2006) ont mis en évidence l'activation du facteur de transcription HIF-1 par la voie EGFR/PI3K dans les kératinocytes à la suite d'une exposition aux UVB. Il est intéressant de noter que l'activation d'EGFR dans cette

étude n'est pas la conséquence d'une perturbation des « lipid rafts » membranaires, mais bien de la production d' $H_2O_2$  induite par les UVB stimulant la phosphorylation du récepteur. Etant donné qu'un lien entre l'activité d'EGFR et l'activation d'HIF-1 a été décrit dans la littérature en conditions de stress, et qu'une déplétion en cholestérol dans les cultures de kératinocytes induit l'activation d'EGFR, nous nous sommes intéressés à l'effet d'une déplétion en cholestérol sur l'activité de HIF-1 dans les kératinocytes. D'autre part, étant donné que certaines protéines de signalisation impliquées dans la régulation de l'activité de HIF-1 pourraient être associées aux « lipid rafts », nous avons voulu savoir si une perturbation de ces voies de signalisation par un traitement avec la M $\beta$ CD pouvait induire une réponse cellulaire spécifique par l'activité de HIF-1, comme pourrait le faire l'hypoxie en réorganisant ces microdomaines lipidiques. Cependant, nos résultats ne mettent pas en évidence la stabilisation de HIF-1 $\alpha$  dans les kératinocytes à la suite d'un traitement par la M $\beta$ CD. Par ailleurs, nous pouvons observer une activation de la MAPK p38, des ERK1/2 et de EGFR dans nos conditions expérimentales, montrant que les kératinocytes ont bien répondu à ce stress, comme cela est décrit dans la littérature (Jans *et al.*, 2004 ; Lambert *et al.*, 2006).

Dans nos expériences, nous avons montré une stabilisation de HIF-1 $\alpha$  dans les kératinocytes qui ont été traités avec la M $\beta$ CD et incubés en hypoxie. De plus, une déplétion en cholestérol semble avoir un effet sur la stabilisation de HIF-1 $\alpha$  induite par l'hypoxie. En effet, une légère diminution de l'abondance de la protéine HIF-1 $\alpha$  est observée en conditions d'hypoxie à la suite d'un traitement par la M $\beta$ CD. On observe également une diminution de l'expression de messagers de la LDHA et de BNIP3 dans les mêmes conditions expérimentales. Cependant, l'analyse de certaines voies de signalisation impliquées dans la réponse cellulaire à une déplétion en cholestérol ne montre aucun effet synergique de ces deux stress dans les kératinocytes.

L'utilisation du PD169316 suggère l'implication de la MAPK p38 dans la signalisation régulant le niveau d'expression de HIF-1 $\alpha$  induit par l'hypoxie dans les cellules déplétées en cholestérol. En effet, en présence de cet inhibiteur, l'abondance de HIF-1 $\alpha$  après une pré-incubation avec la M $\beta$ CD suivie d'une incubation de 4 heures en hypoxie, est moindre que en son absence. Cependant, l'inhibiteur n'a aucun effet sur la stabilisation de la sous-unité  $\alpha$  dans les kératinocytes en conditions d'hypoxie seule. Par ailleurs, nous savons et nous avons observé que p38 est activée dans les cellules à la suite d'une déplétion en cholestérol (Jans *et al.*, 2004 ; Mathay *et al.*, 2008). Nous avons dès lors émis l'hypothèse que la MAPK p38 pourrait être impliquée dans la signalisation hypoxique menant à la stabilisation de HIF-1 $\alpha$  lorsqu'elle est activée dans les kératinocytes après une déplétion en cholestérol. Par ailleurs, elle ne le serait pas lorsqu'elle n'est pas activée, c'est-à-dire en hypoxie seule. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons décidé de traiter les cultures de kératinocytes par l'interleukine-1 $\alpha$ , connue entre autres pour activer p38 dans les cellules. Nos résultats utilisant l'inhibiteur de la MAPK p38 confirment son implication dans la régulation du niveau d'expression de HIF-1 $\alpha$  induit par l'hypoxie après une incubation en présence d'IL-1 $\alpha$ , c'est-à-dire lorsque la p38 est préalablement activée.

Plusieurs résultats décrits dans la littérature montrent l'implication de cette kinase dans la régulation de l'activité du facteur de transcription HIF-1 dans certains types cellulaires (Emerling *et al.*, 2005 ; Kwon *et al.*, 2005). Cependant, p38 ne serait pas impliquée dans la régulation de l'activité de HIF-1 en conditions d'hypoxie dans les kératinocytes. Nous pouvons donc suggérer que la signalisation hypoxique peut « switcher » vers la MAPK p38 lorsque celle-ci est active au sein des cellules.

Pour affiner cette analyse, nous pourrions utiliser un siRNA spécifique dirigé contre la MAPK p38 dans les mêmes conditions expérimentales de stress (en présence de la M $\beta$ CD ou de l'interleukine-1 $\alpha$ ) afin d'identifier plus précisément son rôle dans la régulation du facteur de transcription HIF-1 dans les kératinocytes. Nous pourrions également étudier ce qui se passe, en terme de phosphorylation, au niveau des kinases en aval de p38, comme par exemple les MAPKAPK 2 et 3. De plus, il serait intéressant de reproduire les mêmes expériences avec d'autres traitements tels que par le TNF  $\alpha$ , connu également pour activer p38 dans les cellules. Enfin, nous pourrions confirmer nos résultats dans un autre type cellulaire.

Certains stress au niveau de l'épiderme induisent l'expression du facteur HB-EGF : c'est notamment le cas d'une exposition aux UV, d'un choc osmotique et d'un stress oxydatif (Takenobu *et al.*, 2003). Plus récemment, une étude réalisée au sein du laboratoire a montré qu'une déplétion du cholestérol membranaire, dans les kératinocytes, induit l'expression rapide et importante du facteur de croissance HB-EGF (Mathay *et al.*, 2008). Les résultats des expériences décrites dans ce travail confirment le rôle d'HB-EGF comme étant un facteur de réponse précoce au stress puisqu'une augmentation de son expression est observée après un traitement avec la M $\beta$ CD. Il est important de souligner que nous avons également observé une induction de l'expression du facteur HB-EGF dans les kératinocytes à la suite d'un traitement au peroxyde d'hydrogène. Cependant, l'hypoxie n'influence pas l'expression d'HB-EGF induit par un traitement avec la M $\beta$ CD (ou par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) dans les kératinocytes.

Le processus de différenciation des kératinocytes correspond à l'expression de nombreux gènes spécifiques, activés puis réprimés de manière séquentielle et coordonnée, aboutissant à l'élaboration d'une couche cornée hautement protectrice. Tout au long de ce processus et en fonction du stade de différenciation atteint, les kératinocytes expriment ainsi plusieurs protéines structurales qui constituent les marqueurs de différenciation. Cependant, l'expression de ces marqueurs de différenciation semble être modulée par certains stress cellulaires. Une étude, réalisée au sein du laboratoire, a mis en évidence une modification du niveau d'expression de certains marqueurs au cours d'une situation de stress dans les cultures de kératinocytes au stade de la confluence (Jans *et al.*, 2004). Une déplétion en cholestérol dans les cultures confluentes de kératinocytes induit l'expression d'involucrine et réprime simultanément l'expression des kératines 10 et 14 (Jans *et al.*, 2004). Il est important de noter que ce n'est qu'au stade de la confluence que les kératinocytes répondent au traitement avec la M $\beta$ CD par une modification de l'expression de ces gènes. Le phénotype produit par une déplétion en cholestérol sur les marqueurs de différenciation analysés peut être comparé à l'étape de différenciation correspondant à la migration des kératinocytes de la couche épineuse vers la couche granuleuse dans les épidermes *in vivo*. Lors de cette transition, l'expression d'involucrine augmente fortement alors que la transcription des kératines est réprimée. Selon Mathay *et al.* (2008) et Jans *et al.* (2004), la perte de cholestérol pourrait favoriser la différenciation des kératinocytes épineux en cellules granuleuses.

Nos résultats confirment la capacité de la M $\beta$ CD à induire la différenciation des kératinocytes *in vitro*. Par ailleurs, ils indiquent que l'hypoxie diminue l'effet de la déplétion en cholestérol sur l'expression de l'involucrine dans les kératinocytes. Les résultats des expériences réalisées par Jans *et al.* (2004) indiquent une diminution de l'expression d'involucrine à la suite d'une déplétion en cholestérol en présence de l'inhibiteur de la MAPK p38 (PD169316). Ces résultats ont ainsi permis de mettre en évidence l'implication de p38 dans l'apparition précoce du phénotype différencié induit par la M $\beta$ CD dans les kératinocytes. Par ailleurs, puisque la MAPK p38 serait impliquée dans la signalisation hypoxique menant à la stabilisation de HIF-1 $\alpha$  dans les kératinocytes après une déplétion en cholestérol, nous pouvons imaginer que nous

assistons à une sorte de compétition entre à la fois l'effet de la déplétion en cholestérol et l'effet de l'hypoxie sur l'activité de la MAPK p38. Cette hypothèse pourrait expliquer d'une part la diminution de l'abondance de la protéine HIF-1 $\alpha$ , et d'autre part la diminution de l'expression d'involucrine observée en conditions d'hypoxie dans les kératinocytes à la suite d'un traitement avec la M $\beta$ CD. Par ailleurs, l'implication de la MAPK p38 a également été démontrée dans la régulation du niveau d'expression d'HB-EGF après une déplétion en cholestérol par la M $\beta$ CD (Mathay *et al.*, 2008). Nous devrions alors nous attendre à un effet sur l'expression de ce facteur de croissance similaire à celui observé pour l'involucrine. Cependant, nos résultats ne montrent aucun effet de l'hypoxie sur l'expression d'HB-EGF dans nos conditions expérimentales, comme nous l'avons mentionné ci-dessus. Au vu de ces résultats, il serait donc intéressant d'étudier, en condition d'hypoxie, l'expression d'autres gènes, qui est régulée par l'activité de la MAPK p38 dans les kératinocytes à la suite d'une déplétion en cholestérol ou dans une autre situation de stress.

## 4. Conclusion

Notre travail montre que les kératinocytes répondent à l'hypoxie en activant le facteur de transcription HIF-1. Cette réponse, adaptative, est cependant limitée dans le temps, probablement parce que si l'oxygénation des cellules *in vivo* n'est pas rétablie rapidement, les cellules sont destinées à mourir. Cette rétro-inhibition pourrait faire intervenir une inhibition de la voie d'Akt. L'étude de la signalisation impliquée dans l'activation de ce facteur en hypoxie laisse entrevoir la complexité des mécanismes de régulation. Notre étude nous apprend d'une part que les ROS joueraient un rôle important, dans une moindre mesure, dans la régulation de la stabilisation de la protéine HIF-1 $\alpha$  en hypoxie, et d'autre part, que la signalisation hypoxique serait modulable en fonction des conditions de la cellule. En effet, la combinaison d'un stress préalable influence la stabilisation subséquente de HIF-1 $\alpha$  en hypoxie. Deux observations intéressantes ont été faites à cet égard. D'une part, nous avons observé qu'un stress oxydatif préalable à l'hypoxie empêche la stabilisation de HIF-1 $\alpha$  et d'autre part, nous proposons un éventuel rôle de p38 dans la stabilisation de HIF-1 $\alpha$  suite à son activation préalable à l'hypoxie. Cette observation tout à fait originale nécessitera d'être approfondie dans la suite du travail.

# **BIBLIOGRAPHIE**

## Bibliographie

- Baek JH, Liu YV, McDonald KR, Wesley JB, Hubbi ME, Byun H, et al. (2007) Spermidine/spermine-N1-acetyltransferase 2 is an essential component of the ubiquitin ligase complex that regulates hypoxia-inducible factor 1alpha. *The Journal of biological chemistry* **282**:23572-23580.
- Bang B, Gniadecki R, Gajkowska B (2005) Disruption of lipid rafts causes apoptotic cell death in HaCaT keratinocytes. *Experimental dermatology* **14**:266-272.
- Bedogni B, Welford SM, Cassarino DS, Nickoloff BJ, Giaccia AJ, Powell MB (2005) The hypoxic microenvironment of the skin contributes to Akt-mediated melanocyte transformation. *Cancer cell* **8**:443-454.
- Block ER, Matela AR, SundarRaj N, Iszkula ER, Klarlund JK (2004) Wounding induces motility in sheets of corneal epithelial cells through loss of spatial constraints: role of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor signaling. *The Journal of biological chemistry* **279**:24307-24312.
- Blouin CC, Page EL, Soucy GM, Richard DE (2004) Hypoxic gene activation by lipopolysaccharide in macrophages: implication of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Blood* **103**:1124-1130.
- Boutin AT, Weidemann A, Fu Z, Mesropian L, Gradin K, Jamora C, et al. (2008) Epidermal sensing of oxygen is essential for systemic hypoxic response. *Cell* **133**:223-234.
- Cerutti PA (1985) Prooxidant states and tumor promotion. *Science (New York, NY)* **227**:375-381.
- Chandel NS, Budinger GR, Choe SH, Schumacker PT (1997) Cellular respiration during hypoxia. Role of cytochrome oxidase as the oxygen sensor in hepatocytes. *The Journal of biological chemistry* **272**:18808-18816.
- Chandel NS, McClintock DS, Feliciano CE, Wood TM, Melendez JA, Rodriguez AM, et al. (2000) Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1alpha during hypoxia: a mechanism of O2 sensing. *The Journal of biological chemistry* **275**:25130-25138.
- Cheng C, Tennenbaum T, Dempsey PJ, Coffey RJ, Yuspa SH, Dlugosz AA (1993) Epidermal growth factor receptor ligands regulate keratin 8 expression in keratinocytes, and transforming growth factor alpha mediates the induction of keratin 8 by the v-rasHa oncogene. *Cell Growth Differ* **4**:317-327.
- Clark RA (1993) Biology of dermal wound repair. *Dermatologic clinics* **11**:647-666.
- Decraene D, Agostinis P, Bouillon R, Degreef H, Garmyn M (2002) Insulin-like growth factor-1-mediated AKT activation postpones the onset of ultraviolet B-induced apoptosis, providing more time for cyclobutane thymine dimer removal in primary human keratinocytes. *The Journal of biological chemistry* **277**:32587-32595.
- DeYulia GJ, Jr., Carcamo JM, Borquez-Ojeda O, Shelton CC, Golde DW (2005) Hydrogen peroxide generated extracellularly by receptor-ligand interaction facilitates cell signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**:5044-5049.
- Eckert RL, Crish JF, Robinson NA (1997) The epidermal keratinocyte as a model for the study of gene regulation and cell differentiation. *Physiological reviews* **77**:397-424.
- Eckert RL, Efimova T, Dashti SR, Balasubramanian S, Deucher A, Crish JF, et al. (2002) Keratinocyte survival, differentiation, and death: many roads lead to mitogen-activated protein kinase. *The journal of investigative dermatology Symposium proceedings / the Society for Investigative Dermatology, Inc* **7**:36-40.
- Eckert RL, Sturniolo MT, Broome AM, Ruse M, Rorke EA (2005) Transglutaminases in epidermis. *Progress in experimental tumor research Fortschritte der experimentellen Tumorforschung* **38**:115-124.

## Bibliographie

- Emerling BM, Plataniias LC, Black E, Nebreda AR, Davis RJ, Chandel NS (2005) Mitochondrial reactive oxygen species activation of p38 mitogen-activated protein kinase is required for hypoxia signaling. *Molecular and cellular biology* **25**:4853-4862.
- Flugel D, Gorchach A, Michiels C, Kietzmann T (2007) Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates hypoxia-inducible factor 1alpha and mediates its destabilization in a VHL-independent manner. *Molecular and cellular biology* **27**:3253-3265.
- Forman HJ, Torres M (2002) Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling. *American journal of respiratory and critical care medicine* **166**:S4-8.
- Fuchs E, Marchuk D (1983) Type I and type II keratins have evolved from lower eukaryotes to form the epidermal intermediate filaments in mammalian skin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **80**:5857-5861.
- Gao N, Shen L, Zhang Z, Leonard SS, He H, Zhang XG, et al. (2004) Arsenite induces HIF-1alpha and VEGF through PI3K, Akt and reactive oxygen species in DU145 human prostate carcinoma cells. *Molecular and cellular biochemistry* **255**:33-45.
- Gniadecki R, Bang B (2003) Flotillas of lipid rafts in transit amplifying cell-like keratinocytes. *The Journal of investigative dermatology* **121**:522-528.
- Goldberg MA, Schneider TJ (1994) Similarities between the oxygen-sensing mechanisms regulating the expression of vascular endothelial growth factor and erythropoietin. *The Journal of biological chemistry* **269**:4355-4359.
- Gorchach A, Diebold I, Schini-Kerth VB, Berchner-Pfannschmidt U, Roth U, Brandes RP, et al. (2001) Thrombin activates the hypoxia-inducible factor-1 signaling pathway in vascular smooth muscle cells: Role of the p22(phox)-containing NADPH oxidase. *Circulation research* **89**:47-54.
- Gothié E, Pouyssegur J (2002) HIF-1: Régulateur central de l'hypoxie. *Medecines/sciences* **18**:70-8
- Halliwell B, Gutteridge JM (1990) The antioxidants of human extracellular fluids. *Archives of biochemistry and biophysics* **280**:1-8.
- Hancock JT, Desikan R, Neill SJ (2001) Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. *Biochemical Society transactions* **29**:345-350.
- Hartwig B, Borm B, Schneider H, Arin MJ, Kirfel G, Herzog V (2007) Laminin-5-deficient human keratinocytes: defective adhesion results in a saltatory and inefficient mode of migration. *Experimental cell research* **313**:1575-1587.
- Hotchin NA, Gandarillas A, Watt FM (1995) Regulation of cell surface beta 1 integrin levels during keratinocyte terminal differentiation. *The Journal of cell biology* **128**:1209-1219.
- Huang LE, Arany Z, Livingston DM, Bunn HF (1996) Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit. *The Journal of biological chemistry* **271**:32253-32259.
- Huang LE, Gu J, Schau M, Bunn HF (1998) Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O2-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**:7987-7992.
- Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, et al. (2001) HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O2 sensing. *Science (New York, NY)* **292**:464-468.
- Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, et al. (2001) Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation. *Science (New York, NY)* **292**:468-472.

## Bibliographie

- Jans R, Atanasova G, Jadot M, Poumay Y (2004) Cholesterol depletion upregulates involucrin expression in epidermal keratinocytes through activation of p38. *The Journal of investigative dermatology* **123**:564-573.
- Jiang BH, Jiang G, Zheng JZ, Lu Z, Hunter T, Vogt PK (2001) Phosphatidylinositol 3-kinase signaling controls levels of hypoxia-inducible factor 1. *Cell Growth Differ* **12**:363-369.
- Jonak C, Trautinger F (2004) [Heat shock proteins in dermatology]. *J Dtsch Dermatol Ges* **2**:360-366; quiz 367.
- Jung CR, Hwang KS, Yoo J, Cho WK, Kim JM, Kim WH, et al. (2006) E2-EPF UCP targets pVHL for degradation and associates with tumor growth and metastasis. *Nature medicine* **12**:809-816.
- Kahvejian A, Svitkin YV, Sukarieh R, M'Boutchou MN, Sonenberg N (2005) Mammalian poly(A)-binding protein is a eukaryotic translation initiation factor, which acts via multiple mechanisms. *Genes & development* **19**:104-113.
- Kietzmann T, Gorchach A (2005) Reactive oxygen species in the control of hypoxia-inducible factor-mediated gene expression. *Seminars in cell & developmental biology* **16**:474-486.
- Koh MY, Spivak-Kroizman TR, Powis G (2008) HIF-1 regulation: not so easy come, easy go. *Trends in biochemical sciences*.
- Kvietikova I, Wenger RH, Marti HH, Gassmann M (1995) The transcription factors ATF-1 and CREB-1 bind constitutively to the hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) DNA recognition site. *Nucleic acids research* **23**:4542-4550.
- Kwon SJ, Song JJ, Lee YJ (2005) Signal pathway of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  phosphorylation and its interaction with von Hippel-Lindau tumor suppressor protein during ischemia in MiaPaCa-2 pancreatic cancer cells. *Clin Cancer Res* **11**:7607-7613.
- Kyriakis JM, Avruch J (2001) Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiological reviews* **81**:807-869.
- Laderoute KR, Mendonca HL, Calaoagan JM, Knapp AM, Giaccia AJ, Stork PJ (1999) Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MKP-1) expression is induced by low oxygen conditions found in solid tumor microenvironments. A candidate MKP for the inactivation of hypoxia-inducible stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal protein kinase activity. *The Journal of biological chemistry* **274**:12890-12897.
- Lambert S, Vind-Kezunovic D, Karvinen S, Gniadecki R (2006) Ligand-independent activation of the EGFR by lipid raft disruption. *The Journal of investigative dermatology* **126**:954-962.
- Lando D, Peet DJ, Whelan DA, Gorman JJ, Whitelaw ML (2002) Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science (New York, NY)* **295**:858-861.
- Lee PJ, Jiang BH, Chin BY, Iyer NV, Alam J, Semenza GL, et al. (1997) Hypoxia-inducible factor-1 mediates transcriptional activation of the heme oxygenase-1 gene in response to hypoxia. *The Journal of biological chemistry* **272**:5375-5381.
- Li L, Qu Y, Mao M, Xiong Y, Mu D (2008) The involvement of phosphoinositid 3-kinase/Akt pathway in the activation of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in the developing rat brain after hypoxia-ischemia. *Brain research* **1197**:152-158.
- Li Y, Bi Z, Yan B, Wan Y (2006) UVB radiation induces expression of HIF-1 $\alpha$  and VEGF through the EGFR/PI3K/DEC1 pathway. *International journal of molecular medicine* **18**:713-719.
- Li Z, Wang D, Na X, Schoen SR, Messing EM, Wu G (2002) Identification of a deubiquitinating enzyme subfamily as substrates of the von Hippel-Lindau tumor suppressor. *Biochemical and biophysical research communications* **294**:700-709.

## Bibliographie

- Liu Y, Gorospe M, Yang C, Holbrook NJ (1995) Role of mitogen-activated protein kinase phosphatase during the cellular response to genotoxic stress. Inhibition of c-Jun N-terminal kinase activity and AP-1-dependent gene activation. *The Journal of biological chemistry* **270**:8377-8380.
- Liu YV, Baek JH, Zhang H, Diez R, Cole RN, Semenza GL (2007) RACK1 competes with HSP90 for binding to HIF-1 $\alpha$  and is required for O<sub>2</sub>-independent and HSP90 inhibitor-induced degradation of HIF-1 $\alpha$ . *Molecular cell* **25**:207-217.
- Locke D, Chen H, Liu Y, Liu C, Kahn ML (2002) Lipid rafts orchestrate signaling by the platelet receptor glycoprotein VI. *The Journal of biological chemistry* **277**:18801-18809.
- Lopez-Lastra M, Rivas A, Barria MI (2005) Protein synthesis in eukaryotes: the growing biological relevance of cap-independent translation initiation. *Biological research* **38**:121-146.
- Mathay C, Giltaire S, Minner F, Bera E, Herin M, Poumay Y (2008) Heparin-binding EGF-like growth factor is induced by disruption of lipid rafts and oxidative stress in keratinocytes and participates in the epidermal response to cutaneous wounds. *The Journal of investigative dermatology* **128**:717-727.
- Michiels C (2004) Physiological and pathological responses to hypoxia. *The American journal of pathology* **164**:1875-1882.
- Michiels C, Minet E, Mottet D, Raes M (2002) Regulation of gene expression by oxygen: NF- $\kappa$ B and HIF-1, two extremes. *Free radical biology & medicine* **33**:1231-1242.
- Minet E, Michel G, Mottet D, Raes M, Michiels C (2001) Transduction pathways involved in Hypoxia-Inducible Factor-1 phosphorylation and activation. *Free radical biology & medicine* **31**:847-855.
- Minet E, Mottet D, Michel G, Roland I, Raes M, Remacle J, et al. (1999) Hypoxia-induced activation of HIF-1: role of HIF-1 $\alpha$ -Hsp90 interaction. *FEBS letters* **460**:251-256.
- Mottet D, Dumont V, Deccache Y, Demazy C, Ninane N, Raes M, et al. (2003) Regulation of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  protein level during hypoxic conditions by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/glycogen synthase kinase 3 $\beta$  pathway in HepG2 cells. *The Journal of biological chemistry* **278**:31277-31285.
- Mylonis I, Chachami G, Samiotaki M, Panayotou G, Paraskeva E, Kalousi A, et al. (2006) Identification of MAPK phosphorylation sites and their role in the localization and activity of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ . *The Journal of biological chemistry* **281**:33095-33106.
- Pargellis C, Tong L, Churchill L, Cirillo PF, Gilmore T, Graham AG, et al. (2002) Inhibition of p38 MAP kinase by utilizing a novel allosteric binding site. *Nature structural biology* **9**:268-272.
- Peng XH, Karna P, Cao Z, Jiang BH, Zhou M, Yang L (2006) Cross-talk between epidermal growth factor receptor and hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  signal pathways increases resistance to apoptosis by up-regulating survivin gene expression. *The Journal of biological chemistry* **281**:25903-25914.
- Peus D, Hamacher L, Pittelkow MR (1997) EGF-receptor tyrosine kinase inhibition induces keratinocyte growth arrest and terminal differentiation. *The Journal of investigative dermatology* **109**:751-756.
- Peus D, Meves A, Vasa RA, Beyerle A, O'Brien T, Pittelkow MR (1999a) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is required for UVB-induced EGF receptor and downstream signaling pathway activation. *Free radical biology & medicine* **27**:1197-1202.
- Peus D, Vasa RA, Beyerle A, Meves A, Krautmacher C, Pittelkow MR (1999b) UVB activates ERK1/2 and p38 signaling pathways via reactive oxygen species in cultured keratinocytes. *The Journal of investigative dermatology* **112**:751-756.

## Bibliographie

- Pike LJ (2005) Growth factor receptors, lipid rafts and caveolae: an evolving story. *Biochimica et biophysica acta* **1746**:260-273.
- Pike LJ, Han X, Gross RW (2005) Epidermal growth factor receptors are localized to lipid rafts that contain a balance of inner and outer leaflet lipids: a shotgun lipidomics study. *The Journal of biological chemistry* **280**:26796-26804.
- Pittelkow MR, Cook PW, Shipley GD, Derynck R, Coffey RJ, Jr. (1993) Autonomous growth of human keratinocytes requires epidermal growth factor receptor occupancy. *Cell Growth Differ* **4**:513-521.
- Poumay Y, Leclercq-Smekens M (1998) In Vitro models of epidermal differentiation. *Folia medica* **40**:5-12.
- Prabu SK, Anandatheerthavarada HK, Raza H, Srinivasan S, Spear JF, Avadhani NG (2006) Protein kinase A-mediated phosphorylation modulates cytochrome c oxidase function and augments hypoxia and myocardial ischemia-related injury. *The Journal of biological chemistry* **281**:2061-2070.
- Qiao TD, Liu CJ, Shi YQ, Du YL, Han S, Fan DM (2005) [A study on the regulatory mechanisms of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in hypoxia inducible factor-1 trans-activation]. *Zhonghua yi xue za zhi* **85**:555-559.
- Rane MJ, Coxon PY, Powell DW, Webster R, Klein JB, Pierce W, et al. (2001) p38 Kinase-dependent MAPKAPK-2 activation functions as 3-phosphoinositide-dependent kinase-2 for Akt in human neutrophils. *The Journal of biological chemistry* **276**:3517-3523.
- Ravi R, Mookerjee B, Bhujwalla ZM, Sutter CH, Artemov D, Zeng Q, et al. (2000) Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Genes & development* **14**:34-44.
- Rezvani HR, Dedieu S, North S, Belloc F, Rossignol R, Letellier T, et al. (2007) Hypoxia-inducible factor-1alpha, a key factor in the keratinocyte response to UVB exposure. *The Journal of biological chemistry* **282**:16413-16422.
- Richard DE, Berra E, Gothie E, Roux D, Pouyssegur J (1999) p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. *The Journal of biological chemistry* **274**:32631-32637.
- Richard DE, Berra E, Pouyssegur J (2000) Nonhypoxic pathway mediates the induction of hypoxia-inducible factor 1alpha in vascular smooth muscle cells. *The Journal of biological chemistry* **275**:26765-26771.
- Rosenberger C, Solovan C, Rosenberger AD, Jinping L, Treudler R, Frei U, et al. (2007) Upregulation of hypoxia-inducible factors in normal and psoriatic skin. *The Journal of investigative dermatology* **127**:2445-2452.
- Roux C, Wolf C, Mulliez N, Gaoua W, Cormier V, Chevy F, et al. (2000) Role of cholesterol in embryonic development. *The American journal of clinical nutrition* **71**:1270S-1279S.
- Salceda S, Beck I, Srinivas V, Caro J (1997) Complex role of protein phosphorylation in gene activation by hypoxia. *Kidney international* **51**:556-559.
- Schafer T (2006) Epidemiology of psoriasis. Review and the German perspective. *Dermatology (Basel, Switzerland)* **212**:327-337.
- Schlessinger J (2004) Common and distinct elements in cellular signaling via EGF and FGF receptors. *Science (New York, NY)* **306**:1506-1507.
- Schroeder F, Colles SM, Kreishman GP, Heyliger CE, Wood WG (1994) Synaptic plasma membrane structure and polarity of long-sleep and short-sleep mice. *Archives of biochemistry and biophysics* **309**:369-376.
- Semenza G (2002) Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochemical pharmacology* **64**:993-998.

## Bibliographie

- Semenza GL (1999) Regulation of mammalian O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annual review of cell and developmental biology* **15**:551-578.
- Semenza GL (2001) HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing. *Current opinion in cell biology* **13**:167-171.
- Semenza GL (2008) O<sub>2</sub> sensing: only skin deep? *Cell* **133**:206-208.
- Semenza GL, Agani F, Booth G, Forsythe J, Iyer N, Jiang BH, et al. (1997) Structural and functional analysis of hypoxia-inducible factor 1. *Kidney international* **51**:553-555.
- Semenza GL, Wang GL (1992) A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Molecular and cellular biology* **12**:5447-5454.
- Sen P, Mukherjee S, Bhaumik G, Das P, Ganguly S, Choudhury N, et al. (2003) Enhancement of catalase activity by repetitive low-grade H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exposures protects fibroblasts from subsequent stress-induced apoptosis. *Mutation research* **529**:87-94.
- Shao R, Zhang FP, Tian F, Anders Friberg P, Wang X, Sjolund H, et al. (2004) Increase of SUMO-1 expression in response to hypoxia: direct interaction with HIF-1alpha in adult mouse brain and heart in vivo. *FEBS letters* **569**:293-300.
- Simons K, Ehehalt R (2002) Cholesterol, lipid rafts, and disease. *The Journal of clinical investigation* **110**:597-603.
- Simons K, Toomre D (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nature reviews* **1**:31-39.
- Sodhi A, Montaner S, Patel V, Zohar M, Bais C, Mesri EA, et al. (2000) The Kaposi's sarcoma-associated herpes virus G protein-coupled receptor up-regulates vascular endothelial growth factor expression and secretion through mitogen-activated protein kinase and p38 pathways acting on hypoxia-inducible factor 1alpha. *Cancer research* **60**:4873-4880.
- Stewart FA, Denekamp J, Randhawa VS (1982) Skin sensitization by misonidazole: a demonstration of uniform mild hypoxia. *British journal of cancer* **45**:869-877.
- Temple MD, Perrone GG, Dawes IW (2005) Complex cellular responses to reactive oxygen species. *Trends in cell biology* **15**:319-326.
- Toffoli S, Feron O, Raes M, Michiels C (2007) Intermittent hypoxia changes HIF-1alpha phosphorylation pattern in endothelial cells: unravelling of a new PKA-dependent regulation of HIF-1alpha. *Biochimica et biophysica acta* **1773**:1558-1571.
- Valencia A, Rajadurai A, Carle AB, Kochevar IE (2006) 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.
- Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL (1995) Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**:5510-5514.
- Wang GL, Semenza GL (1995) Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *The Journal of biological chemistry* **270**:1230-1237.
- Waterham HR, Koster J, Romeijn GJ, Hennekam RC, Vreken P, Andersson HC, et al. (2001) Mutations in the 3beta-hydroxysterol Delta24-reductase gene cause desmosterolosis, an autosomal recessive disorder of cholesterol biosynthesis. *American journal of human genetics* **69**:685-694.
- Werner S, Grose R (2003) Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiological reviews* **83**:835-870.
- Wheelock MJ, Jensen PJ (1992) Regulation of keratinocyte intercellular junction organization and epidermal morphogenesis by E-cadherin. *The Journal of cell biology* **117**:415-425.
- Wiesener MS, Jurgensen JS, Rosenberger C, Scholze CK, Horstrup JH, Warnecke C, et al. (2003) Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2alpha in distinct cell populations of different organs. *Faseb J* **17**:271-273.

## Bibliographie

- Wunderlich L, Paragh G, Wikonkal NM, Banhegyi G, Karpati S, Mandl J (2008) UVB induces a biphasic response of HIF-1alpha in cultured human keratinocytes. *Experimental dermatology* **17**:335-342.
- Zhong H, Chiles K, Feldser D, Laughner E, Hanrahan C, Georgescu MM, et al. (2000) Modulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. *Cancer research* **60**:1541-1545.