



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Étude de l'expression de molécules d'adhésion dans les kératinocytes épidermiques en prolifération ou différenciation terminale

Baudoux, Barbara

Award date:
1995

Awarding institution:
Université 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.

0 1 DEC, 1995

**FACULTES UNIVERSITAIRES N.-D. DE LA PAIX
NAMUR
FACULTE DES SCIENCES**

**Etude de l'expression de molécules d'adhésion
dans les kératinocytes épidermiques en
prolifération ou différenciation terminale.**

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

BAUDOUX Barbara

Etude de l'expression de molécules d'adhésion dans les kératinocytes épidermiques en prolifération ou en différenciation terminale

BAUDOUX Barbara

Résumé

Par sa physiologie, le kératinocyte épidermique joue un rôle capital au sein de l'épiderme. La prolifération des kératinocytes basaux permet le renouvellement du tissu, puis leur différenciation suprabasale assure la formation de la couche cornée imperméable et résistante. Lors de leur migration depuis la couche basale vers les couches suprabasales, les kératinocytes modifient leur adhésion à la matrice extracellulaire et leur adhésion intercellulaire. Ces adhésions sont prises en charge par les intégrines et les cadhérines. Notre travail a étudié l'expression de ces molécules d'adhésion dans des kératinocytes cultivés en absence de sérum dans des conditions où prolifération et différenciation cellulaires sont caractérisées. L'expression globale des intégrines diminue avec la différenciation, tandis que l'expression de la E-cadhérine n'est que peu augmentée dans ces conditions. Le rôle joué par l'epidermal growth factor dans la modulation de l'expression des molécules d'adhésion a été également étudié. Ce facteur maintient l'expression des intégrines dans les cellules en différenciation. L'expression de la E-cadhérine est par contre régulée négativement par ce facteur, aussi bien à sous-confluence qu'à confluence. Notre travail confirme que la différenciation épidermique s'accompagne d'une régulation des molécules d'adhésion. Il montre aussi que des facteurs de croissance qui interfèrent avec l'induction de la différenciation perturbent également cette régulation de l'adhésion cellulaire et donc l'homéostasie épidermique

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Décembre 1995

Promoteur : R. Leloup

Co-promoteur : Y. Poumay

REMERCIEMENTS

Au terme de ces quelques mois passés dans le département d'Histologie-Embryologie, j'aimerais vivement remercier Monsieur le Professeur R. Leloup pour m'avoir accueillie et permis de réaliser mon mémoire dans son unité ainsi que le Professeur Yves Poumay, co-promoteur de ce mémoire, qui m'a guidée et encouragée tout au long de mon travail en me prodiguant aide et conseils avec une grande disponibilité.

J'exprime également ma profonde gratitude à :

Madame F. de Bosch-Kemper-Herphelin pour son aide précieuse et l'intérêt permanent qu'elle m'a témoigné au cours de cette année.

Madame M. Leclercq-Smekens et Monsieur R. Deom pour leur collaboration amicale.

Monsieur M. Lombet pour sa grande disponibilité et pour la qualité exceptionnelle de ses iconographies.

Mademoiselle I. Roland pour son aide et ses conseils judicieux.

Madame A. Degen et Madame F. Zune pour leur assistance amicale.

Madame N. Fievet-Henri et Madame M-F Six. pour leur gentillesse et pour la réalisation des coupes de microscopie électronique.

Messieurs Y. Houbion, J-M Pirson et C. Didembourg pour leur aide technique.

Monsieur D. Van Acker pour la réalisation du travail photographique.

Je souhaite également exprimer toute ma reconnaissance aux autres membres du département pour leur sympathie ainsi qu'au Docteur B. Bienfait pour nous avoir fourni les biopsies cutanées.

Merci enfin à mes parents et à Thierry qui m'ont continuellement soutenue et encouragé tout au long de ce travail.

TABLE DE MATIERES

INTRODUCTION

1. La peau

1.1. Généralités

1.2. L'épiderme

1.2.1. Le stratum basal ou couche basale

1.2.2. Le stratum spinosum ou couche épineuse

1.2.3. Le stratum granulosum ou couche granuleuse

1.2.4. Le stratum corneum ou couche cornée

1.3. La jonction épidermo-dermique (JED)

1.3.1. Ultrastructure de la JED

1.3.2. Composition biochimique de la JED

2. Le kératinocyte épidermique

2.1. Structures cellulaires propres au kératinocyte épidermique

2.2. Culture des kératinocytes

2.2.1. La culture selon Rheinwald et Green (1975)

2.2.2. La culture selon Royce et Ham

2.2.3. La culture en croissance autonome

2.3. Prolifération et différenciation des kératinocytes

2.3.1. Prolifération cellulaire

2.3.2. Contrôle de la prolifération cellulaire

2.3.3. Différenciation cellulaire

2.3.4. Contrôle de la différenciation

3. Adhésion cellulaire du kératinocyte épidermique

3.1. Adhésion à la matrice extracellulaire

3.1.1. Les intégrines

3.1.1.1. Structure et composition des intégrines

3.1.1.2. Interactions intégrine-ligand

3.1.1.3. Site de fixation : séquence RGD

3.1.1.4. Sous-famille d'intégrines (les intégrines épidermiques)

A) Sous-famille $\beta 1$

B) Sous-famille $\beta 4$

C) Sous-famille $\beta 5$

3.1.1.5. Intégrines et transduction du signal

3.1.2. Le contact focal

- 3.1.3. Les hémidesmosomes et leurs principaux composants
 - A) L'intégrine $\alpha 6\beta 4$ et son ligand la laminine 5
 - B) Autres composants de l'hémidesmosome
- 3.2. Adhésion intercellulaire
 - 3.2.1. Les cadhérines
 - 3.2.1.1. Généralités
 - 3.2.1.2. Les cadhérines épidermiques
 - 3.2.2. Les jonctions de type adherens
 - 3.2.3. Les desmosomes
 - 3.2.3.1. Structure et composition
 - A) Les composants du desmosome
 - B) Aspects dynamiques des interactions desmosomales
 - 3.2.4. Les intégrines $\alpha 2\beta 1$ et $\alpha 3\beta 1$ dans l'adhésion intercellulaire
- 4. Les facteurs de croissance et homéostasie épidermique
 - 4.1. L'EGF et les facteurs de croissance apparentés
 - 4.1.1. L'EGF
 - 4.1.2. Le TGF- α
 - 4.1.3. L'amphiréguline (AR) et le "Heparin-binding EGF-like growth factor" (HB-EGF)
 - 4.2. Le récepteur à l'EGF
 - 4.3. Le NDF/Hereguline et les autres membres de la famille du récepteur à l'EGF
- 5. Objectifs du travail

MATERIEL ET METHODES

- 1. La culture des kératinocytes épidermiques
 - 1.1. Etablissement de cultures primaires à partir des prélèvements cutanés
 - 1.2. Etablissement de cultures secondaires
- 2. Extraction d'ARN-poly (A) à partir de cultures cellulaires
- 3. Préparation de la sonde $\alpha 5$ (sous-clonage par RT-PCR)
- 4. Northern blot
- 5. Hybridation des Northern blots par sondes ^{32}P
 - 5.1. Préhybridation des membranes
 - 5.2. Marquage des sondes au ^{32}P et hybridation des Northern blots
- 6. Marquages immunocytochimiques des kératinocytes cultivés sur couvre-objet
- 7. Analyses par cytométrie de flux
- 8. Hybridation in situ
 - 8.1. Préparation des sondes ARN
 - 8.2. Préparation des cellules et hybridation

7. Analyse quantitative par cytométrie de flux des sous-unités d'intégrine $\alpha 2$ et $\beta 6$ présentes en surface des cellules dans des cultures sous-confluentes et confluentes

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

BIBLIOGRAPHIE

INTRODUCTION

1. LA PEAU

1.1 GENERALITES

La peau, vaste barrière physique à l'interface entre l'organisme et son environnement, joue certainement et avant tout un rôle de protection contre les agressions mécaniques, chimiques, thermiques et autres en provenance de cet environnement. Cependant, la peau est également le siège des échanges de l'organisme avec l'environnement et est pourvue à cet effet de diverses glandes et annexes cutanées et d'un réseau de neurorécepteurs et autres terminaisons nerveuses. Chez l'être humain particulièrement, la peau joue aussi un rôle socio-culturel dont l'importance est indéniable.

La peau d'un individu moyen adulte couvre plus de deux mètres carrés en surface et, en de très nombreux endroits, son épaisseur n'excède pas deux millimètres. De façon conventionnelle, on reconnaît deux tissus majeurs constituant la peau humaine. En position externe, l'épiderme présente une épaisseur comprise entre 75 et 150 μm , excepté au niveau de la paume des mains et de la plante des pieds où son épaisseur peut atteindre 400 à 600 μm . Sous l'épiderme se trouve le derme, un tissu conjonctif riche en fibres collagènes et élastiques qui comprend les réseaux vasculaires et nerveux et qui renferme de nombreuses glandes ainsi que les annexes kératinisées comme les poils et les ongles. Sous le derme, l'hypoderme est surtout composé de tissu adipeux.

1.2 L'EPIDERME

L'épiderme est un épithélium pavimenteux stratifié kératinisé. Il est constitué de plusieurs types cellulaires dont le kératinocyte qui représente la grande majorité des cellules épidermiques. Le rôle du kératinocyte est crucial pour la régénération de l'épiderme, mais aussi pour établir son rôle de protection contre les agressions externes. En effet, la prolifération des kératinocytes permet le renouvellement constant de l'épiderme et leur différenciation (processus également nommé kératinisation) élabore une couche imperméable et résistante en surface du tissu. Prolifération et différenciation des kératinocytes sont des mécanismes complexes régulés par de nombreux facteurs et entre lesquels doit régner un équilibre précis. Par ailleurs, trois

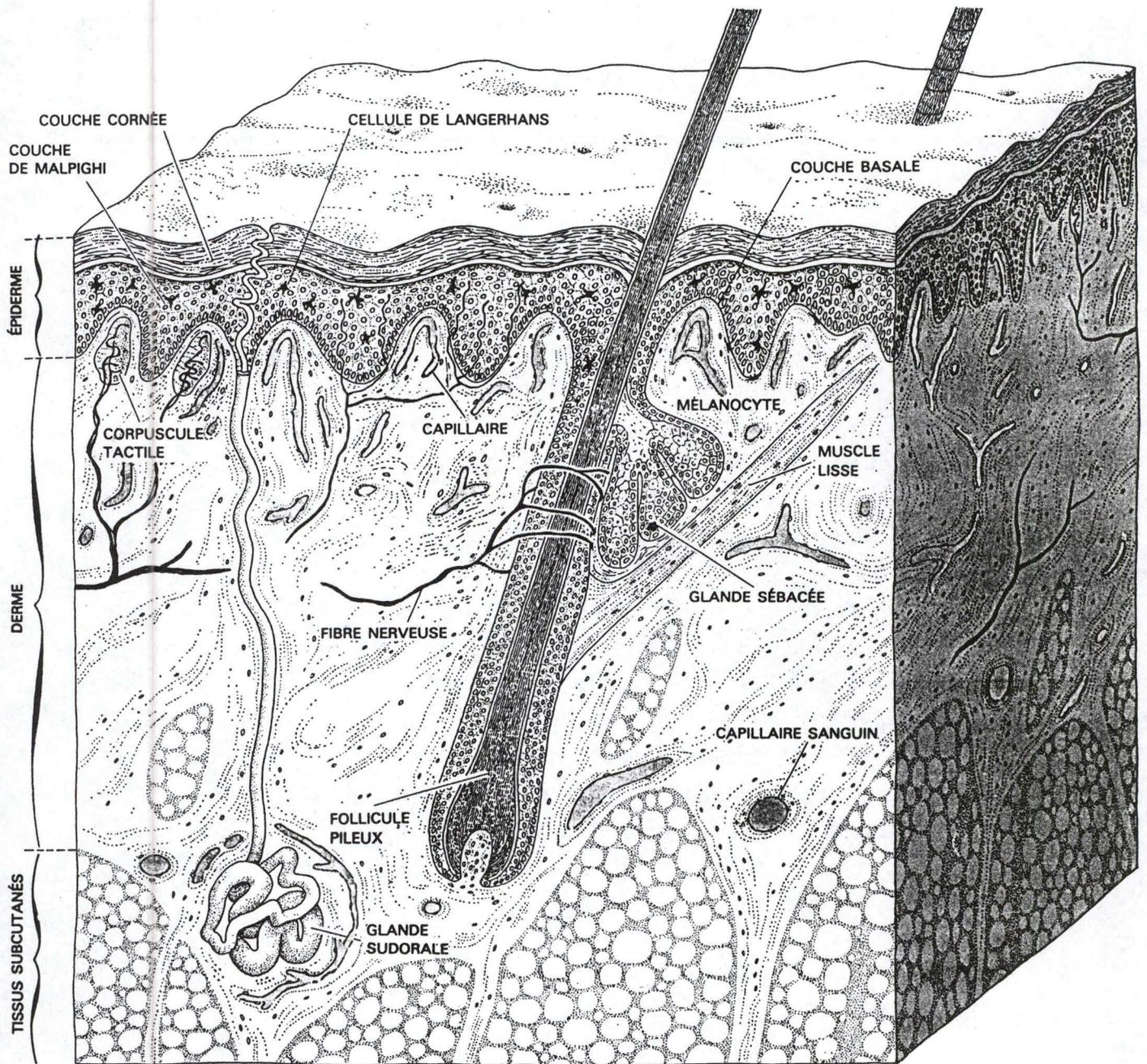


Figure 1 : Structure générale de la peau par Thivolet (1986)

autres types cellulaires nettement moins abondants se trouvent au sein de l'épiderme : les mélanocytes, les cellules de Langerhans et les cellules de Merkel.

L'épiderme est subdivisé en plusieurs couches cellulaires (basale, épineuse, granuleuse et cornée) caractérisées par la position, la forme, la polarité, la morphologie ainsi que l'état de différenciation des kératinocytes qui les composent majoritairement (Holbrook, 1994).

1.2.1. Le stratum basal ou couche basale

Le stratum basal correspond à la première assise de cellules épithéliales, constituées essentiellement de kératinocytes cylindriques ancrés par des hémidesmosomes sur la lame basale. Il est caractérisé par une activité mitotique intense responsable du renouvellement continu des kératinocytes : comme les cellules basales se divisent, certaines de leurs cellules soeurs sont déplacées vers les couches supérieures où elles se différencient pour aboutir enfin dans le stratum corneum.

Il existe une hétérogénéité fonctionnelle et biochimique au sein des cellules basales : certaines sont de véritables cellules souches au potentiel de division illimité, d'autres sont des cellules amplificatrices de transition ou des cellules postmitotiques s'apprêtant à migrer vers les couches suprabasales.

Il se trouve des différences dans la composition protéique et les marqueurs de surface parmi les différentes cellules basales mais il existe pourtant une remarquable homogénéité dans leur ultrastructure. Notamment, les filaments intermédiaires de kératine sont organisés en faisceaux moins denses par rapport aux autres couches de l'épiderme. Des contacts intercellulaires par des desmosomes existent à ce niveau mais ils sont moins nombreux que dans les couches supérieures. Des communications physiologiques se rencontrent entre les cellules basales et entre les cellules basales et les cellules suprabasales, grâce à des jonctions gap.

1.2.2. Le stratum spinosum ou couche épineuse

Le stratum spinosum commence dès la première couche de cellules suprabasales et est constitué de cellules surtout polygonales ou légèrement aplaties. Elles sont étroitement liées les unes aux autres par des desmosomes situés sur de nombreuses digitations interconnectées, ce qui leur donne un aspect épineux.

Les cellules épineuses contiennent de larges et denses faisceaux de kératine. Suite à la différenciation (voir § 2.3.3), des polypeptides de kératine nouvellement synthétisés sont ajoutés aux kératines déjà présentes lorsque les cellules migrent depuis la couche basale vers la couche épineuse. De nouveaux organites, les granules lamellaires ou corps d'Odland apparaissent dans le cytoplasme des cellules épineuses les plus superficielles. Ces organites sont des structures bordées par une membrane, de 300-500 nm de diamètre et qui contiennent une série de bicouches lipidiques semblables à des disques.

1.2.3. Le stratum granulosum ou couche granuleuse

Cette couche cellulaire située juste au-dessus du stratum spinosum est formée de 3 à 5 assises de cellules aplaties possédant un noyau central et dont le cytoplasme comporte de nombreux grains de kérato-hyaline, de forme irrégulière et denses aux électrons.

Les cellules granuleuses synthétisent aussi et lient entre elles un certain nombre de protéines structurales qui constitueront l'enveloppe de la cellule cornée dans le stratum corneum (voir § 2.3.3). Au niveau de la couche granuleuse, les corps d'Odland précédemment décrits viennent fusionner avec la membrane plasmique et déverser leur contenu dans l'espace intercellulaire.

La couche granuleuse est la dernière couche vivante de l'épiderme. Bien que l'on puisse penser que la kératinisation consiste en un déclin progressif dans l'activité de la cellule et que la différenciation l'entraîne vers l'apoptose, il existe de nombreuses preuves morphologiques et biochimiques qui démontrent que les cellules granuleuses synthétisent de nouvelles protéines structurales. Au même moment, ces cellules doivent être préparées pour la destruction des organites cytoplasmiques et du noyau, un processus qui se déroule lors de la transition rapide et brutale de la couche granuleuse à la première couche cellulaire cornée. Les mécanismes responsables de ces dégradations, les contrôles qui empêchent une destruction cellulaire totale et la destinée des restes cytoplasmiques et nucléaires ne sont encore que très peu compris .

1.2.4. Le stratum corneum ou couche cornée

La couche cornée comporte des éléments cellulaires aplatis, anucléés et kératinisés, nommés cellules cornées. Leur cytoplasme n'est pratiquement plus constitué que de protéines complexées représentant environ 85% du contenu cellulaire. Au stade ultime, la cellule présente une membrane renforcée par une couche de 7-15 nm d'épaisseur et constituée de protéines fortement réticulées qui forment l'enveloppe cornée. A la surface du stratum corneum, les cellules desquament continuellement. Le nombre de couches cellulaires dans le stratum corneum varie très fort entre les centaines de couches cellulaires présentes dans la peau épaisse des paumes et de la plante des pieds et l'épiderme fin du reste du corps.

Les cellules cornées sont les plus grandes cellules parmi l'ensemble des kératinocytes. Une seule cellule du stratum corneum mesure de 30-40 µm de diamètre (contre 6-8 µm pour les cellules basales). Les kératinocytes du stratum corneum diffèrent dans leur structure (épaisseur, organisation des filaments de kératine et de la matrice interfilamenteuse contenant de la filaggrine, mécanismes d'attachement entre cellules, nature et quantité de matériel intercellulaire) en fonction de leur position relative vis-à-vis de la couche granuleuse et de la surface de la peau. Dans les couches les plus externes, les cellules présentent une structure moins renforcée (arêtes et villosités réduites) qui favorise leur desquamation.

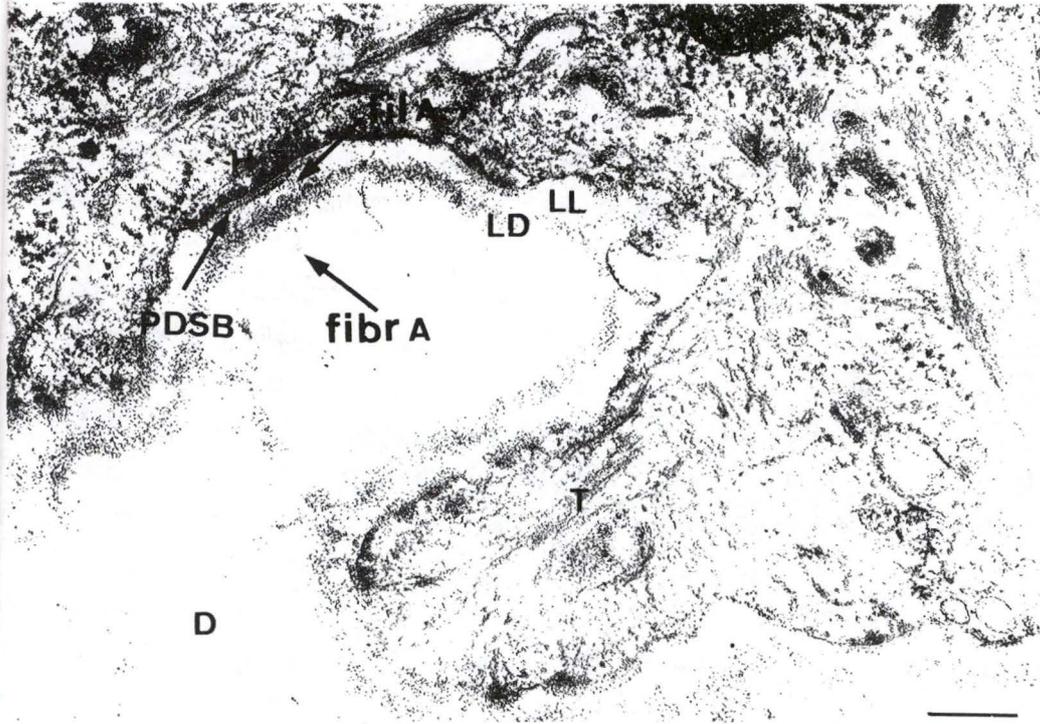


Figure 2 : Jonction épidermo-dermique (MET). On peut y voir le derme (D), la lamina densa (LD), la lamina lucida (LL), les hémidesmosomes (H), la plaque dense sub-basale (PDSB), les filaments d'ancrage (Fibr a), et les tonofilaments de kératine (T).
Barre : 0,2 μm .

1.3 LA JONCTION EPIDERMO-DERMIQUE (JED)

1.3.1. Ultrastructure de la JED

La jonction épidermo-dermique est la membrane basale particulière qui se localise à l'interface entre le tissu épidermique et le tissu conjonctif sous-jacent et qui permet l'ancrage des cellules épidermiques. Elle est constituée d'éléments cellulaires et extracellulaires et se divise en 4 régions : la membrane plasmique de la cellule basale, la lamina lucida, la lamina densa et la sub-lamina densa ou couche réticulaire.

L'attachement de la cellule basale au tissu sous-jacent est réalisé à travers la jonction épidermo-dermique par des hémidesmosomes que nous détaillerons au § 3.1.3.

La lamina lucida est une zone continue, claire aux électrons et située entre la membrane plasmique et la lamina densa. Dans la plupart des régions, la lamina lucida est amorphe.

La lamina densa est une couche continue dense aux électrons, d'épaisseur assez uniforme (approximativement 70 nm) et qui court parallèlement à la membrane plasmique des kératinocytes basaux.

Enfin, la sub-lamina densa est une région située immédiatement sous la lamina densa. Elle est riche en éléments fibreux de plusieurs types différents dont les fibrilles d'ancrage. Les fibrilles d'ancrage possèdent une extrémité qui s'attache à la lamina densa, tandis que l'extrémité opposée s'étend jusque dans le derme. Certaines de ces fibrilles se terminent sous forme de plaques d'ancrage denses aux électrons et de forme irrégulière.

1.3.2. Composition biochimique de la jonction épidermo-dermique

La JED se compose principalement de collagène de type IV, de laminine, de l'héparan sulfate protéoglycane et de l'entactine/nidogène. La fibronectine, absente dans une peau normale, est déposée le long de la JED lors du processus de cicatrisation.

Le collagène de type IV est formé de trois chaînes polypeptidiques de 500 kDa, possédant trois régions distinctes : une extrémité N-terminale qui constitue la région 7S, le domaine central flexible triple hélicoïdal, et le domaine C-terminal globulaire. Les deux domaines terminaux sont responsables de l'assemblage du collagène IV en un réseau macromoléculaire, constitué par un motif de base comprenant 4 molécules. Le collagène de type IV intervient dans l'attachement cellulaire, liant aussi la laminine, l'héparan sulfate protéoglycane, l'entactine/nidogène et la fibronectine (Verrando, 1989).

La laminine est une glycoprotéine existant sous 7 formes différentes composées de 3 sous-unités α , β et γ . La laminine-1 est la forme classique rencontrée dans l'ensemble des

retrouve spécifiquement au niveau de la JED (Gil *et al.*, 1994). La laminine-5 est concentrée au niveau des filaments d'ancrage (Rousselle *et al.*, 1991) et est actuellement admise comme le ligand de l'intégrine $\alpha 6\beta 4$, mais elle fonctionne également comme ligand pour $\alpha 3\beta 1$, une autre intégrine épidermique (Mercurio, 1995). Hormis les intégrines, la laminine-1 peut se lier aux autres composants de la JED. Par conséquent, les laminines jouent un rôle important dans l'attachement cellulaire à la JED, mais aussi dans la formation de celle-ci.

L'héparan sulfate protéoglycane possède un poids moléculaire plus ou moins égal à 750 000 daltons. Il contient approximativement des quantités égales de protéine et d'héparan sulfate liés de façon covalente (Briggaman, 1982). Cette molécule peut se retrouver dans toute l'épaisseur de la JED.

L'entactine/nidogène est une glycoprotéine ubiquiste d'un poids moléculaire de 160 kDa. Décrite à l'origine comme entactine dans des tissus murins, elle possède son équivalent le nidogène dans la jonction épidermo-dermique de la peau humaine. L'entactine/nidogène forme aisément des complexes avec la laminine. Il n'aurait pas de propriété d'attachement cellulaire en lui-même mais interviendrait plutôt dans l'organisation structurale des membranes basales au titre de molécule de "pontage" (Verrando, 1989).

La fibronectine n'est pas à proprement parler un constituant propre à la JED, car elle se retrouve dans le sang, les matrices extracellulaires et le tissu conjonctif. Cette glycoprotéine de 440 kDa est constituée de 2 sous-unités de 220 kDa reliées par des ponts disulfures du côté C-terminal, conférant à la molécule une forme en V. La fibronectine intervient dans l'attachement cellulaire et dans la cohésion de la membrane basale (interactions moléculaires avec les protéoglycanes, les collagènes IV et V, la laminine,...). La fibronectine joue surtout un rôle essentiel lors du processus de réépithélialisation en favorisant la migration des cellules épidermiques impliquées dans la cicatrisation.

2. LE KERATINOCYTE EPIDERMIQUE

Le kératinocyte épidermique est une cellule qui présente une morphologie particulière, suit un programme précis de prolifération puis de différenciation terminale. Le kératinocyte épidermique est aussi un des premiers types cellulaires normaux à avoir été amplifié avec succès par les techniques de culture cellulaire.

2.1 STRUCTURES CELLULAIRES PROPRES AU KERATINOCYTE EPIDERMIQUE

La morphologie des kératinocytes est en relation avec leur position au sein de l'épiderme et avec la différenciation qui accompagne leur migration dans les couches épidermiques.

Les kératinocytes possèdent des filaments intermédiaires de kératine. Ceux-ci sont organisés en faisceaux qui se faufilent à travers le cytoplasme autour de l'enveloppe nucléaire et vers les desmosomes et hémidesmosomes. Les desmosomes comprennent des éléments intra- et extracellulaires, ainsi que transmembranaires qui permettent l'adhésion entre deux cellules et connectent leurs filaments de kératine. Les hémidesmosomes sont des structures médiant l'adhésion des kératinocytes de la couche basale à la matrice extracellulaire (JED). Ils sont constitués d'une plaque dense cytoplasmique où sont attachés les filaments intermédiaires de kératine. L'adhésion à la matrice extracellulaire est réalisée par des filaments et des fibrilles d'ancrage. Cet ancrage sur la JED est supprimé lorsque les cellules migrent vers les couches suprabasales et entament leur différenciation terminale. Comment est régulé l'équilibre entre adhésion, prolifération et différenciation du kératinocyte pour assurer l'homéostasie de l'épiderme? Voici la question essentielle qui concerne la physiologie de cette cellule. L'établissement des cultures de kératinocytes a fourni des modèles permettant d'étudier le contrôle de la croissance et de la différenciation cellulaire, et de rechercher les relations existant entre ce contrôle et l'adhésion cellulaire.

2.2 CULTURE DES KERATINOCYTES

Plusieurs méthodes ont été décrites pour cultiver les kératinocytes. Il existe entre elles des différences fondamentales.

2.2.1. La culture selon Rheinwald et Green (1975)

Cette méthode a été la première à permettre l'amplification des kératinocytes. Elle implique l'utilisation d'un "lit nourricier" de fibroblastes, l'utilisation de sérum de veau foetal et l'ajout de facteurs de croissance dont l'epidermal growth factor (EGF).

Dans la culture selon Rheinwald et Green, la formation des colonies dépend de la présence de cellules murines 3T3 irradiées. De plus, ces dernières suppriment fortement la croissance des fibroblastes cutanés qui contaminent éventuellement la préparation de kératinocytes. Les cellules 3T3 sécrètent des facteurs de croissance ainsi que des protéines de la matrice extracellulaire qui favorisent les kératinocytes à s'attacher et à proliférer (Leigh et Watt, 1994). Les cellules épidermiques prolifèrent en formant des colonies qui s'étendent de plus en plus et repoussent les cellules nourricières 3T3 en périphérie. Les cellules murines irradiées 3T3 sont plus efficaces pour soutenir la croissance des kératinocytes

épidermiques que des fibroblastes humains irradiés. En effet, dans ce cas les colonies formées par les kératinocytes poussent beaucoup plus lentement et présentent une stratification moindre (Rheinwald et Green, 1975). Cette méthode produit des cultures épidermiques stratifiées qui ont été utilisées avec succès en clinique pour le traitement des brûlés et des ulcères.

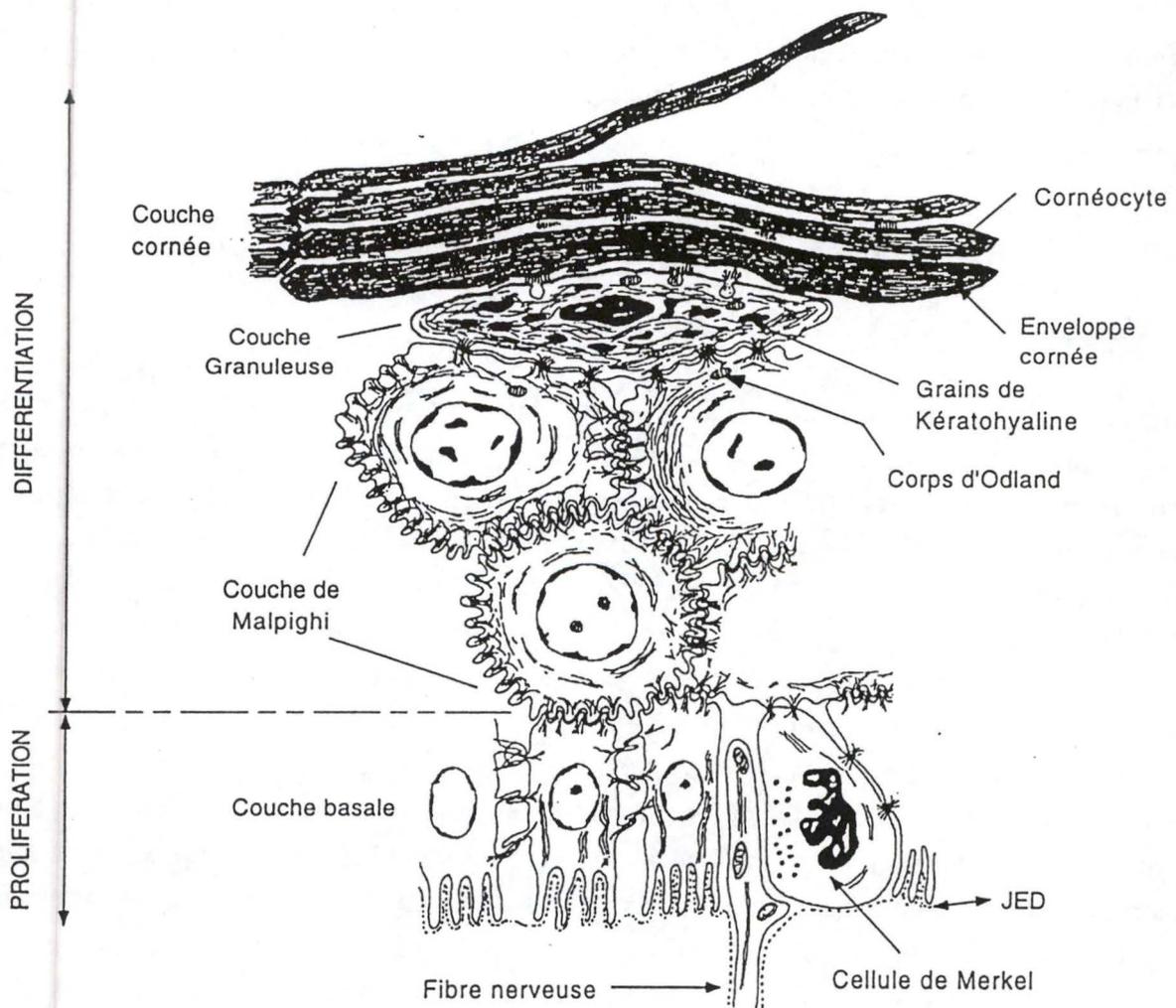
Au cours des années, la composition du milieu de culture selon Rheinwald et Green a été optimisée. Il consiste maintenant en un mélange dans les proportions 1 pour 3 du milieu F12 de Ham et du milieu de Eagle modifié par Dulbecco (DMEM) auxquels sont ajoutés du sérum de veau foetal, de l'adénine, de l'hydrocortisone, de l'insuline, de la toxine cholérique et de l'EGF.

2.2.2. La culture selon Boyce et Ham

Des essais pour rechercher les facteurs de croissance agissant sur les kératinocytes sont problématiques dans les cultures selon Rheinwald et Green. En effet, le sérum de veau foetal et la couche nourricière de cellules 3T3 contiennent et produisent des facteurs qui ne sont pas tous décrits ni même identifiés. Boyce et Ham (1983) ont donc tenté de développer un milieu sans sérum permettant la croissance des kératinocytes en absence d'une couche nourricière : le milieu MCDB153. Ce milieu est supplémenté avec de l'EGF, de l'insuline, de l'hydrocortisone, de l'éthanolamine et de la phosphoéthanolamine. Une faible quantité d'extrait pituitaire bovin (BPE) est aussi ajoutée pour permettre d'initier les cultures primaires (Boyce et Ham, 1983). Le MCDB 153 contient une plus faible concentration en ions calcium (à savoir 0.03 mM CaCl_2) que le milieu F12/DMEM utilisé dans les cultures selon Rheinwald et Green.

Boyce et Ham (1983) ont démontré que le taux de croissance des kératinocytes, dans leur système de culture, augmentait lorsque les concentrations en calcium extracellulaire se trouvent entre 0.03 et 0.3 mM et qu'il est même maximum à 0.1 mM. Cependant, lorsque la concentration est de 1.0 mM, le taux de croissance des cellules diminue et la différenciation terminale est induite.

Il faut être prudent dans le rôle attribué aux ions calcium. En effet, il est certes reconnu que l'augmentation du calcium favorise la stratification cellulaire mais son rôle dans la prolifération et en tant qu'inducteur de la différenciation terminale reste controversé. Ainsi, alors que plusieurs auteurs ont constaté que l'augmentation du calcium extracellulaire peut induire la différenciation des kératinocytes, Poumay et Pittelkow (1995) ont démontré que dans un système de culture basé sur le MCDB153, bien que l'augmentation du calcium favorise l'expression des kératines suprabasales K1 et K10, elle ne diminue pas le potentiel clonogénique des cellules. Il est probable que les conditions de culture et notamment la composition exacte des milieux de culture utilisés influencent fortement les effets potentiels du calcium et des facteurs de croissance sur la prolifération et la différenciation cellulaire.



Différenciation des kératinocytes (d'après R. Leloup)

Figure 3 : Illustration des compartiments de prolifération et de différenciation des kératinocytes au sein de l'épiderme.

2.2.3. La culture en croissance autonome

Contrairement à ce que l'on croyait, Cook *et al.* (1991) ont démontré que les facteurs de croissance mitogènes comme l'EGF, le TGF α et les FGF ne sont requis en culture que pour initier la croissance des kératinocytes à des densités clonales en culture et que la prolifération des cellules à des densités supérieures à 10³cellules/cm² se déroule en l'absence de ces facteurs. Ces observations ont amené ces auteurs à suggérer que les kératinocytes normaux produisent un facteur de croissance capable de stimuler par autocrinie leur propre prolifération. Cook *et al.* (1991) ont alors identifié ce facteur comme étant identique à l'amphiréguline (AR) et un peptide connu pour être un autre ligand du récepteur de l'EGF. Plus récemment, Pittelkow *et al.* (1993) ont précisé que la prolifération à haute densité des kératinocytes en culture en l'absence de tout peptide exogène dans le milieu est dépendante de l'occupation du récepteur de l'EGF. En effet, des anticorps bloquant l'activation du récepteur par son ligand sont capables d'inhiber la prolifération des kératinocytes cultivés à forte densité. Ce type de culture d'où sont absents tous facteurs exogènes sont qualifiées d'"autonomes".

2.3 PROLIFERATION ET DIFFERENCIATION DES KERATINOCYTES

2.3.1. Prolifération cellulaire

Au sein de l'épiderme, la prolifération se déroule dans la couche basale de kératinocytes attachés à la membrane basale sous-jacente, puis la différenciation terminale est induite dans les cellules lorsque celles-ci migrent au travers des couches suprabasales pour finalement devenir des cellules kératinisées mortes dans la couche cornée, cellules qui vont ensuite desquamer. En culture, la couche basale contient aussi les kératinocytes en prolifération, tandis que leur différenciation semble également induite lorsqu'ils rejoignent les couches suprabasales. Trois sous-populations de kératinocytes basaux ont pu être identifiées : il s'agit des cellules souches (stem cells) aux divisions lentes, des cellules transitoires d'amplification (transit-amplifying cells) aux divisions rapides et des cellules recrutées pour la différenciation (committed cells) post-mitotiques (Jones *et al.*, 1993,1995). Jones *et al.* (1993) ont démontré que la dernière catégorie de ces cellules pouvait encore se subdiviser en deux populations sur base de leur expression de certaines molécules d'adhésion, les intégrines de type β 1 (voir § 3.1.1) : on distingue ainsi des cellules basales recrutées pour la différenciation et ayant diminué leur expression d'intégrines β 1. Les cellules complètement différenciées suprabasales n'expriment plus aucune intégrine β 1.

Les cellules souches possèdent une grande capacité proliférative et la conservent tout au long de la vie. Ces cellules sont donc responsables du maintien de l'épiderme et de sa réparation éventuelle. Les cellules souches produisent des cellules transitoires d'amplification. Ces cellules

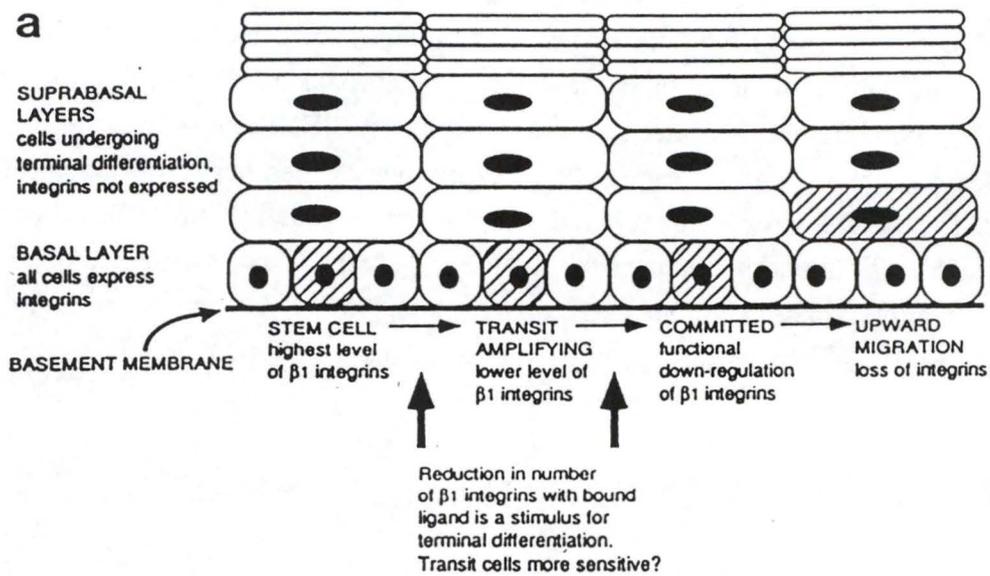


Figure 4 : Modèle proposé par Jones *et al.* (1993) afin de rendre compte de l'hétérogénéité fonctionnelle des kératinocytes de la couche basale de l'épiderme.

se divisent un nombre limité de fois mais produisent un grand nombre de cellules qui vont définitivement quitter le cycle cellulaire et sont recrutées pour la différenciation terminale. Les cellules ainsi recrutées perdent leur ancrage sur la membrane basale, peut être via un mécanisme impliquant l'inactivation des intégrines de type $\beta 1$ (Adams et Watt, 1991; Jones *et al.*, 1995). Dans les cultures de kératinocytes épidermiques, les cellules ayant des caractéristiques de cellules souches et de cellules amplificatrices transitoires peuvent être identifiées sur base des clones qu'elles produisent et sur leurs propriétés adhésives (Wille *et al.*, 1984; Barrandon et Green, 1987; Jones et Watt, 1993). Les cellules souches produisent de larges clones et expriment de fortes quantités des trois intégrines de la sous-famille $\beta 1$ ($\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$ et $\alpha 5\beta 1$) et adhèrent rapidement à la matrice extracellulaire. Les autres cellules basales expriment de plus faibles quantités d'intégrines $\beta 1$ et adhèrent plus lentement à la matrice.

Enfin, notons que les kératinocytes en prolifération n'expriment que des kératines de 50 et 58 kDa appelées respectivement K14 et K5 selon la classification de Moll (Moll *et al.*, 1982).

2.3.2. Contrôle de la prolifération cellulaire

La prolifération dans l'épiderme dépend non seulement de la nature des cellules en division, mais aussi de signaux externes auxquels elles répondent. Des agents stimulant la croissance des kératinocytes ont été identifiés lors d'essais visant à optimiser la composition des milieux de culture avec et sans sérum, notamment l'extrait pituitaire bovin (Boyce et Ham, 1983). Ces auteurs démontrèrent que le BPE, bien que possédant de faibles activités "EGF-like" et "insulin-like", est insuffisant pour soutenir la croissance clonale en absence d'EGF et d'insuline. Le sérum de veau foetal ainsi que les milieux conditionnés par une couche nourricière de cellules 3T3 possèdent aussi des facteurs mitogènes pour les kératinocytes (Rheinwald et Green, 1975). La croissance cellulaire est également stimulée par la transferrine, l'insuline et la triiodothyronine de même que par l'hydrocortisone (Rheinwald et Green, 1975) et la toxine cholérique. Le facteur de croissance épidermique (EGF) et le polypeptide qui lui est apparenté, le TGF- α , augmentent la clonogénicité des kératinocytes en culture sans affecter leur vitesse de croissance. Ils agissent en stimulant la migration latérale des cellules dans la périphérie des colonies en expansion (Barrandon & Green, 1987).

En plus des stimulateurs de croissance, un certain nombre d'inhibiteurs de croissance ont été identifiés incluant le "transforming growth factor β " (TGF β) qui entraîne la stagnation des kératinocytes en phase G1 du cycle cellulaire. Par ailleurs, les kératinocytes ne répondent pas seulement à des molécules régulatrices de la croissance, mais les expriment également (TGF- α , AR, TGF β). On peut donc conclure que la régulation de la prolifération des kératinocytes est complexe et implique probablement de nombreux facteurs différents impliqués dans une régulation autocrine de la prolifération (Watt, 1988).

2.3.3. Différenciation cellulaire

Depuis l'induction de sa différenciation terminale, il faut approximativement 2-4 semaines à une cellule épidermique pour quitter la couche basale et atteindre la surface de la peau pour y desquamer. L'épiderme adulte se régénère donc tous les mois environ (Fuchs, 1993). Plusieurs événements se succèdent lors de la différenciation.

Lorsque les cellules basales épidermiques se différencient, elles diminuent d'abord leur expression des kératines 5 et 14 et induisent l'expression de kératines spécifiques à la différenciation : K1 et K10. Jusque dans les couches épineuses, les filaments intermédiaires présents dans les cellules sont un mélange de kératines résiduelles 5 et 14 et de nouvelles kératines 1 et 10 nouvellement synthétisées. Lorsque les cellules épineuses progressent vers la surface de la peau, elles consacrent une grande partie de leur machinerie de synthèse protéique pour la fabrication des kératines 1 et 10 (Fuchs, 1993).

Quand les cellules épineuses atteignent la couche granuleuse, elles produisent la profilaggrine, une protéine basique riche en histidine contenue dans les grains de kératohyaline. Sa forme mature, la filaggrine, permet d'aggréger les filaments intermédiaires en microfibrilles dans lesquelles les filaments sont alignés en parallèle lorsque les grains de kératohyaline libèrent leur contenu à l'entrée des cellules dans la couche cornée (Fuchs, 1993).

L'involucrine est une protéine constitutive de l'enveloppe cornée. Cette enveloppe comprend aussi la loricrine et consiste en une structure réticulée de façon covalente qui se forme sous la membrane plasmique des cellules. L'involucrine est déjà présente dans les cellules de la couche basale mais en quantité très faible par rapport aux couches supérieures. La synthèse d'involucrine est réellement induite dans les couches suprabasales en culture, mais seulement dans la couche granuleuse *in vivo*. Lorsque les cellules quittent la couche granuleuse, elles se perméabilisent suite à une réduction de l'intégrité de la membrane cellulaire. Ce changement résulte en un influx de calcium qui stimule alors l'activité protéolytique de certaines enzymes (calpaïnes) et conduisent à la destruction de la plupart des organites cellulaires. Simultanément, cette augmentation de calcium active la transglutaminase membranaire. Cette enzyme catalyse la formation de ponts isopeptides ϵ -(γ -glutamyl) lysine entre l'involucrine, la loricrine et d'autres protéines de l'enveloppe.

Enfin, un autre événement dans la différenciation cellulaire consiste en la fusion des corps d'Odland avec comme conséquence le relarguage de leur contenu dans les espaces intercellulaires. Les hydrates de carbone complexés avec des protéines et les lipides qu'ils déversent y sont ensuite modifiés pour former un véritable ciment intercellulaire qui étanchéifie ces espaces (Eckert, 1989).

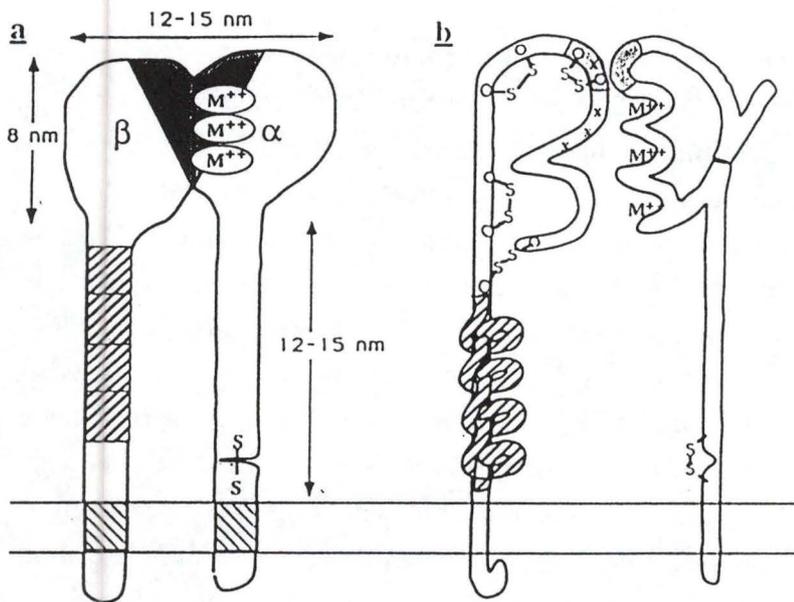
2.3.4. Contrôle de la différenciation

Grâce à la culture cellulaire, plusieurs études ont recherché les facteurs qui modulent la différenciation terminale des kératinocytes afin de cerner ceux qui sont impliqués dans son

contrôle. Un de ces facteurs est le calcium, nécessaire dans certains processus qui surviennent au cours de la différenciation, incluant la stratification, l'assemblage des desmosomes et l'activation de la transglutaminase épidermique. Une autre classe importante de régulateurs est constituée par les rétinoïdes qui diminuent l'induction de la différenciation terminale à la fois *in vivo* et *in vitro*. Par exemple, la concentration en vitamine A dans le milieu affecte la formation des enveloppes cornées et l'expression des kératines 1 et 10. Le retrait du cycle cellulaire est aussi un prérequis à la différenciation terminale. Le TGF β inhibe la synthèse d'ADN et la division cellulaire. Il faut aussi remarquer que le TGF β peut être régulé de façon positive suite à un traitement des cellules avec le TPA (un ester de phorbol activant la protéine kinase C). Curieusement, le TPA induit également l'expression de TGF- α , probablement dans les cellules basales épidermiques. Ce phénomène pourrait expliquer les effets apparemment antagonistes du TPA qui stimule d'une part la croissance et induit de l'autre la différenciation terminale dans l'épiderme. Enfin, la différenciation terminale requiert surtout la perte d'adhésion des cellules à la matrice extracellulaire afin de pouvoir migrer dans les couches suprabasales. La modulation de cette adhésion, qui a surtout été étudiée grâce à la culture cellulaire en suspension, a permis de souligner l'importance du rôle joué par les molécules d'adhésion de la famille des intégrines et aussi de l'existence d'une régulation dans l'expression et la fonction de ces molécules (Adams & Watt, 1991).

Dans le même ordre d'idées, des observations réalisées par Poumay *et al.* (1991, 1993) sur des feuilletts épidermiques cultivés *in vitro* et détachés par la dispase ont démontré que l'adhésion des cellules basales à un substrat est nécessaire pour le maintien d'une activité proliférative intense et que la différenciation terminale est induite si le stockage des feuilletts détachés est prolongé. La forme de la cellule pourrait aussi jouer un rôle non négligeable dans le maintien de la prolifération puisqu'une cellule étalée prolifère correctement alors qu'une cellule plus arrondie (cette forme est induite par le détachement à la dispase mais est aussi la forme rencontrée dans les cultures de kératinocytes en suspension) ne prolifère plus (Watt *et al.*, 1989; Poumay *et al.*, 1991).

Plus récemment, dans un système de culture autonome sans sérum, Poumay et Pittelkow (1995) ont observé que la confluence induit la différenciation terminale. Cette induction se caractérise par la perte importante de la clonogénicité des cellules et l'apparition des marqueurs précoces de la différenciation : les kératines suprabasales K1 et K10. Il faut toutefois remarquer qu'à faible densité cellulaire, l'expression des gènes de K1 et K10 peut être induite par le calcium sans affecter la clonogénicité des cellules. Enfin, l'addition au milieu de culture de facteurs de croissance, surtout l'EGF, diminue l'expression des ARNm des kératines suprabasales, mais l'EGF ne peut cependant pas empêcher la différenciation terminale induite par la confluence de la culture et la perte de clonogénicité qui l'accompagne.

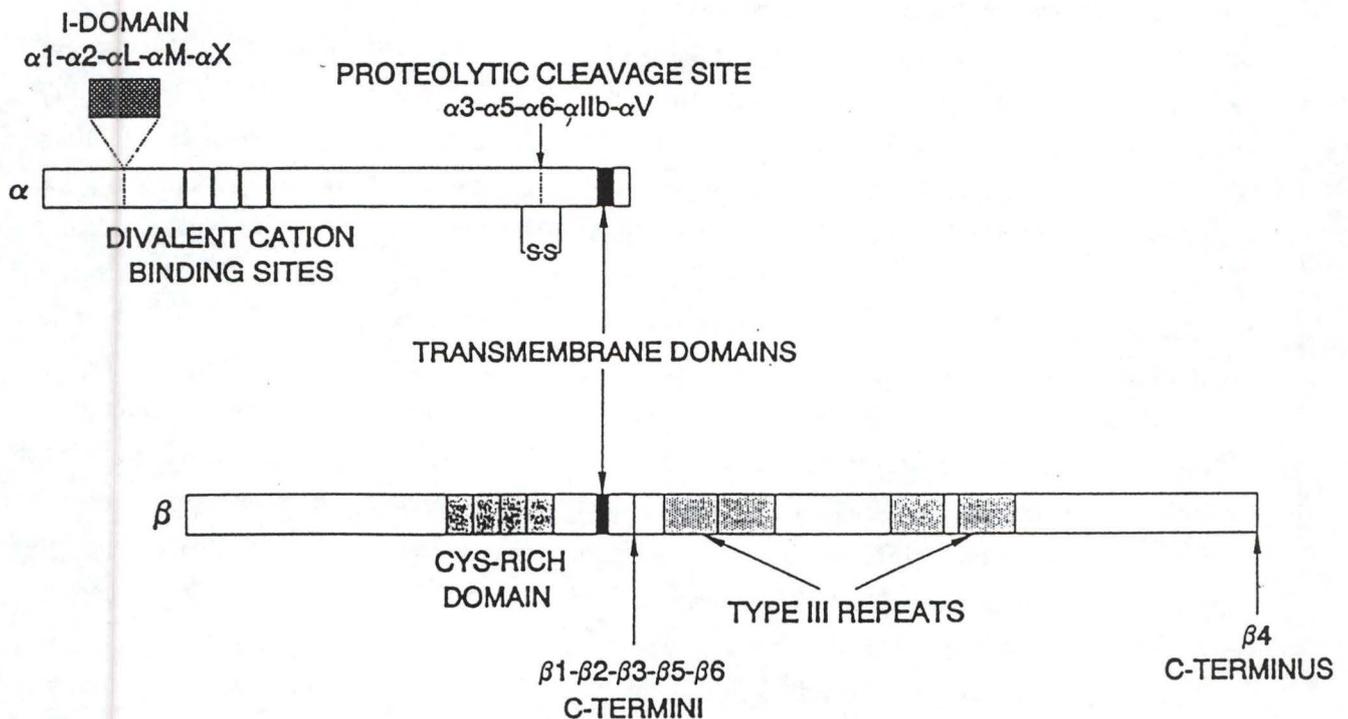


Structural Features of Integrin Receptors

(a) shows the overall shape, as deduced from electron microscopy, as well as the putative locations of the cysteine-rich repeats of the β subunit (crosshatched) and metal-binding sites in the α subunit (M^{++}). The shaded area represents the ligand-binding region that is known to be made up from both subunits based on cross-linking and binding data.

(b) schematizes the arrangement of the polypeptide chains with the cysteine repeats internally folded and the head region of the β subunit containing internal disulfide loops, some but not all of which are shown. A disulfide bond from the middle of the β subunit to a point close to the membrane has been proposed (Calvete et al., 1991) but is omitted here for clarity. Xs indicate positions of mutations (of human β_2 or β_3 subunits) known to affect ligand binding or $\alpha\beta$ dimerization. The positions of alternatively spliced segments in *Drosophila* subunits are shaded.

Figure 5 : Structure et association des deux sous-unités α et β en un dimère fonctionnel d'intégrine (Hynes, 1992).



Structure of integrin receptors. Each receptor is a heterodimer of α and β subunits. With the exception of β_4 , all subunits have a short cytoplasmic domain and a large extracellular domain. The locations of the I-domain (certain α subunits), the divalent cation-binding sites (all α subunits) and transmembrane regions (all α and β subunits) discussed in the text are shown, together with sites of proteolytic processing (certain α subunits), a cysteine-rich domain (all β subunits) and fibronectin type III homology units (β_4 subunit).

Figure 6 : Principales caractéristiques des domaines cytoplasmique et extracellulaire des sous-unités α et β (Humphries, 1990).

3. ADHESION CELLULAIRE DU KERATINOCYTE EPIDERMIQUE

Les kératinocytes épidermiques présentent deux types d'adhésion cellulaire : d'une part, les cellules basales adhèrent à la matrice extracellulaire et, d'autre part, les kératinocytes adhèrent à leurs cellules voisines jusqu'à leur desquamation.

3.1 ADHESION A LA MATRICE EXTRACELLULAIRE

L'adhésion à la matrice extracellulaire implique les molécules d'adhésion de type "intégrines" et des jonctions d'ancrage spécialisées, les hémidesmosomes.

3.1.1. Les intégrines

Les intégrines sont les récepteurs majeurs grâce auxquels les cellules s'attachent à la matrice extracellulaire. De plus, certaines intégrines interviennent dans les contacts entre cellules. A travers ces fonctions, elles jouent des rôles importants au cours du développement, mais aussi dans les organismes adultes. Plusieurs désordres génétiques touchant les intégrines démontrent leur importance dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques et la capacité d'interférer avec leurs fonctions par l'utilisation d'anticorps ou de peptides ouvre de nombreuses opportunités d'intervention thérapeutique dans des pathologies telles que la thrombose, l'inflammation et le cancer.

3.1.1.1. Structure et composition des intégrines

Toutes les intégrines sont des hétérodimères $\alpha\beta$. Chaque sous-unité α a une taille qui varie entre 120 et 180 kd et chacune est associée de façon non covalente avec une sous-unité β (90-110 kd). La plupart des intégrines sont exprimées sur une large variété de cellules et la plupart des cellules expriment plusieurs intégrines.

Il existe approximativement 40 à 50% d'homologie entre les différentes sous-unités appartenant aux différentes classes (sous-unités α et β). Les deux sous-unités contiennent un grand domaine extracellulaire (>75 kd pour les sous-unités β , et >100 kd pour les sous-unités α), une région transmembranaire hydrophobe et un court domaine cytoplasmique (50 acides aminés ou moins). La seule exception à cette règle est la sous-unité $\beta 4$ qui possède

un domaine cytoplasmique et extracellulaire de même taille. Toutes les sous-unités β sont caractérisées par une répétition en 4 exemplaires d'un segment riche en cystéine. L'extrémité N-terminale de 40-50 kd est étroitement repliée avec des boucles internes liées par ponts disulfures et fait partie du domaine de fixation au ligand (Hynes, 1992). Les sous-unités α contiennent toutes un segment homologue répété sept fois; les trois à quatre dernières séquences répétées sont homologues à la structure de fixation des cations bivalents rencontrée dans la calmoduline (Humphries, 1990). Ces cations sont indispensables pour la stabilité structurale des intégrines et ils peuvent aussi altérer la spécificité et l'affinité des intégrines pour leur ligand (Haas et Plow, 1994).

3.1.1.2. Interactions intégrine-ligand

Certaines intégrines (par exemple : $\alpha 2\beta 1$) peuvent se lier à plusieurs ligands, tandis que le même ligand (par exemple : la fibronectine) peut lui aussi être lié par plusieurs intégrines (Humphries, 1990). La majorité des ligands sont des protéines de la matrice extracellulaire impliquées dans l'adhésion d'une cellule à son substrat. Certaines intégrines reconnaissent des protéines membranaires appartenant à la superfamille des immunoglobulines (ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1) et interviennent donc dans l'adhésion intercellulaire (Hynes, 1992).

Les sous-unités α et β contribuent toutes deux à la fixation du ligand : les domaines amino-terminaux des deux sous-unités se combinent pour former une "tête" fixatrice du ligand sur chaque intégrine. Cette tête est reliée par deux tiges, chacune correspondant à une sous-unité, aux segments membranaires et aux domaines cytoplasmiques qui interagissent avec le cytosquelette et avec d'autres composants cytoplasmiques (Hynes, 1992). Les domaines cytoplasmiques de chaque sous-unité sont très importants pour médier des réponses cellulaires différentes face à un même ligand.

3.1.1.3. Site de fixation : séquence RGD

Le site de reconnaissance pour de nombreuses intégrines qui se fixent à la matrice extracellulaire est constitué par le tripeptide RGD (Arg-Gly-Asp). Cette séquence consensus exprimée par de nombreux ligands se présente souvent sous forme d'une boucle bien agencée. Celle-ci s'étend du centre de la protéine vers l'extérieur présentant ainsi la séquence RGD à son sommet dans une conformation renversée, ce qui la rend très accessible. L'influence des contraintes de structure secondaire imposées par les acides aminés adjacents à la séquence de fixation des intégrines est critique non seulement dans la détermination de l'affinité pour le ligand mais aussi pour la reconnaissance du ligand. Afin d'avoir une interaction correcte, deux conditions sont requises : premièrement, la séquence RGD doit pouvoir adopter la conformation correcte afin de s'arrimer au domaine de fixation du ligand des intégrines; deuxièmement, la séquence RGD doit être accessible à l'intégrine en n'étant pas masquée par la structure tertiaire ou quaternaire du ligand (Haas et Plow, 1994).

The Integrin Receptor Family			
Subunits	Ligands and Counterreceptors	Binding Site	
β_1^a	α_1	Collagens, laminin	
	α_2	Collagens, laminin	DGEA ^b
	α_3^c	Fibronectin, laminin, collagens ^d	RGD ± ? ^e
	α_4	Fibronectin (V25), VCAM-1	EILDV ^f
	α_5	Fibronectin (RGD)	RGD
	α_6^g	Laminin	
	α_7	Laminin	
	α_8	?	
	α_v	Vitronectin, fibronectin (?) ^h	RGD
β_2	α_L	ICAM-1, ICAM-2	
	α_M	C3b component of complement (inactivated), fibrinogen, factor X, ICAM-1	
	α_X	Fibrinogen, C3b component of complement (inactivated)?	GPRP
β_3^i	α_{IB}	Fibrinogen, fibronectin, von Willebrand factor, vitronectin, thrombospondin	RGD, KOAGDV ^j
	α_v	Vitronectin, fibrinogen, von Willebrand factor, thrombospondin, fibronectin, osteopontin, collagen	RGD
β_4^k	α_6^g	Laminin ?? ^l	
β_5	α_v	Vitronectin	RGD
β_6	α_v	Fibronectin ^m	RGD
$\beta_7 (= \beta_7?)$	α_4	Fibronectin (V25), VCAM-1 ⁿ	EILDV ^f
	α_{EL}^o	?	
β_8	α_v	?	

The current spectrum and interactions of vertebrate integrins are listed. cDNA sequences for all subunits except α_7 and α_{EL} have been reported (see data banks or earlier reviews for references). Several subfamilies exist, each with 2–9 α subunits and a common shared β subunit (β_1 , β_2 , β_3 , or β_7). In addition, several of the α subunits can interact with other β subunits (β_4 – β_6). Each $\alpha\beta$ receptor recognizes one or more extracellular ligands or counterreceptors on other cells. It should be noted that the ligand specificity of a given receptor can be markedly affected by its environment or state of activation (see text). The peptide recognition sequences in the ligands are given where known; where none is given, the evidence indicates that the recognition sequence is *not* RGD.

^a These subunits can have alternatively spliced cytoplasmic domains.

^b The subunit designated α_{EL} is expressed specifically on intraepithelial lymphocytes (IEL) in association with β_1 (Yuan et al., 1991; Parker et al., 1992). However, α_L has previously been used for α_6 in association with β_1 (Kajiji et al., 1989), so this term has not been used here to avoid confusion.

^c A recent paper (Carter et al., 1991) describes a ligand designated epiligrin that is not fully characterized.

^d Publications differ as to the specificity of this receptor (Bodary and McClean, 1990; Vogel et al., 1990).

^e The specificity of this receptor is controversial (Lotz et al., 1990; Sonnenberg et al., 1990).

^f Busk et al. (1992).

^g The specificity of this receptor is not yet clear. $\alpha_6\beta_1$ on some cells can apparently bind the same ligands as $\alpha_6\beta_1$ (Rüegg et al., 1992), whereas on others it requires activation and is much less effective than $\alpha_6\beta_1$ (Chan et al., 1992a).

^h Defined in type I collagen only (Staatz et al., 1991).

ⁱ Publications differ as to whether or not this receptor recognizes RGD (Wayner et al., 1988; Hynes et al., 1989; Elices et al., 1991).

^j Defined only in the alternatively spliced V segment of fibronectin.

^k RGD is recognized in all ligands; KOAGDV is recognized only in fibrinogen γ chain.

Figure 7 : Tableau récapitulatif des différents types d'intégrines rencontrées chez l'homme et de leurs récepteurs et sites de fixation (Hynes, 1992).

3.1.1.4. Sous-familles d'intégrines (Les intégrines épidermiques)

Les kératinocytes épidermiques expriment plusieurs intégrines qui possèdent la même sous-unité β : $\alpha 2\beta 1$ qui se lie au collagène et à la laminine-1, $\alpha 3\beta 1$ qui est un récepteur pour les laminines 1 et 5 et $\alpha 5\beta 1$, le récepteur de la fibronectine. Les kératinocytes expriment aussi $\alpha v\beta 5$ qui est un récepteur de la vitronectine et $\alpha 6\beta 4$ qui se retrouve surtout au niveau des hémidesmosomes et dont le ligand pourrait également être la laminine-5.

A) Sous-famille $\beta 1$

Les intégrines $\alpha 2\beta 1$ et $\alpha 3\beta 1$ sont exprimées par les kératinocytes *in vivo*. La présence d' $\alpha 5\beta 1$ est par contre beaucoup plus controversée : certains auteurs rapportent une faible expression dans l'épiderme alors que d'autres nient sa présence. En culture cellulaire, $\alpha 5\beta 1$ est exprimé par les kératinocytes en prolifération, comme c'est d'ailleurs le cas *in vivo* lors du processus de réépithélialisation qui accompagne la cicatrisation cutanée (Hertle & Watt, 1994 in Keratinocyte handbook). La distribution des intégrines de type $\beta 1$ est limitée à la couche basale de l'épiderme avec un marquage sur toute la périphérie des cellules basales. Carter *et al.* (1990) et Symington (1993) ont démontré que deux intégrines épidermiques, à savoir $\alpha 2\beta 1$ et $\alpha 3\beta 1$, peuvent sous certaines conditions intervenir dans l'adhésion entre cellules : ces intégrines de la sous-famille $\beta 1$ fonctionnent initialement dans l'adhésion à la matrice extracellulaire, mais elles peuvent aussi se relocaliser dans des zones de contacts intercellulaires pour participer à l'adhésion intercellulaire.

Lorsque la différenciation terminale est induite dans les kératinocytes épidermiques, l'expression et la fonction des intégrines de type $\beta 1$ sont sujettes à une régulation complexe tant au niveau transcriptionnel que post-translationnel. Adams et Watt (1991) et Hotchin *et al.* (1995) ont utilisé un modèle expérimental de kératinocytes cultivés en suspension afin d'étudier cette régulation : après 5 heures en suspension, le niveau des intégrines de type $\beta 1$ ne diminue pas à la surface cellulaire, mais l'apport de récepteurs nouvellement synthétisés est inhibé de manière spécifique et les récepteurs présents à la surface cellulaire perdent la capacité de fixer leur(s) ligand(s). Le contrôle de ces phénomènes n'est pas encore très clair. Hotchin *et al.* (1995) suggèrent une intervention de la calnexine, une chaperone du réticulum endoplasmique. L'association entre la calnexine et les intégrines serait prolongée suite à une glycosylation incomplète dans les kératinocytes en différenciation. L'inactivation des intégrines résulte probablement d'un changement de conformation qui pourrait fournir un signal d'internalisation des intégrines matures et leur transport vers les lysosomes (Hotchin *et al.*, 1995).

Après 24 heures en suspension, les intégrines de type $\beta 1$ ont complètement disparu de la surface cellulaire et la transcription des gènes est inhibée.

Par ailleurs, Hodivala et Watt (1994) ont rapporté que dans un milieu à faible concentration en calcium, les kératinocytes co-expriment les intégrines et un marqueur de la différenciation terminale (involucrine) et qu'il se produit une perte sélective des intégrines de la

surface des cellules en différenciation si on augmente la concentration en calcium extracellulaire. Ce phénomène coïncide avec la stratification et ces auteurs ont observé que des anticorps dirigés contre la cadhérine inhibent non seulement la stratification induite par le calcium, mais aussi la perte des intégrines sur des cellules différenciées. Par conséquent, les cadhérines pourraient réguler de façon négative l'expression des intégrines dans les kératinocytes.

Signalons aussi que la co-expression des intégrines et des marqueurs de la différenciation terminale a aussi été rapportée *in vivo*, lors de la cicatrisation, dans le psoriasis et dans certains carcinomes (Hodivala et Watt, 1994).

B) Sous-famille $\beta 4$

La sous-unité $\beta 4$ se combine avec la sous-unité $\alpha 6$ pour former un dimère se localisant au pôle basal des kératinocytes basaux et faisant partie des hémidesmosomes. La distribution tissulaire de ce dimère n'est cependant pas restreinte à l'épiderme. En effet, on le retrouve dans de nombreux tissus épithéliaux, dans les endothéliums, les nerfs périphériques et la cornée. Des études ont démontré que l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ n'existe pas sur les faces latérales des cellules et n'est donc pas impliquée dans l'adhésion intercellulaire (Hogervorst *et al.*, 1993). La localisation d' $\alpha 6\beta 4$ suggère que cette intégrine polarisée est d'une grande importance dans l'adhésion des cellules épidermiques à la membrane basale *in vivo* et *in vitro* via les hémidesmosomes. Selon Gil *et al.* (1994), l'épiligrine (ou laminine 5) serait le ligand d' $\alpha 6\beta 4$.

L'expression d' $\alpha 6\beta 4$ est restreinte à la membrane plasmique basale excepté lors du développement de l'épiderme avant la formation des hémidesmosomes (Gil *et al.*, 1994) et lors de la réépithélialisation (Jones *et al.*, 1994; Roland *et al.*, *manuscript en préparation*).

L'internalisation de l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ est un processus rapporté lors du détachement des kératinocytes épidermiques par la dispase (Poumay *et al.*, 1993, 1994). Cette internalisation se différencie de l'endocytose classique médiée par récepteur dans le sens où ce sont ici les plaques d'ancrage cytoplasmiques liées aux filaments intermédiaires qui caractérisent la majorité des puits au lieu d'une couche de clathrine. La redistribution d' $\alpha 6\beta 4$ à l'entièreté de la surface cellulaire, même en présence d'inhibiteurs de la synthèse protéique, suggère un recyclage partiel de l'intégrine internalisée.

D'autres auteurs ont rapporté que cette internalisation est aussi un processus constitutif (Gaietta *et al.*, 1994).

C) Sous-famille $\beta 5$

La sous-unité $\beta 5$ peut se lier avec la sous-unité αv pour former un dimère qui est exprimé à la face basale des kératinocytes en croissance et en migration, mais pas dans des kératinocytes stationnaires. Le ligand de cette intégrine est constitué par la vitronectine. Cependant, comme la

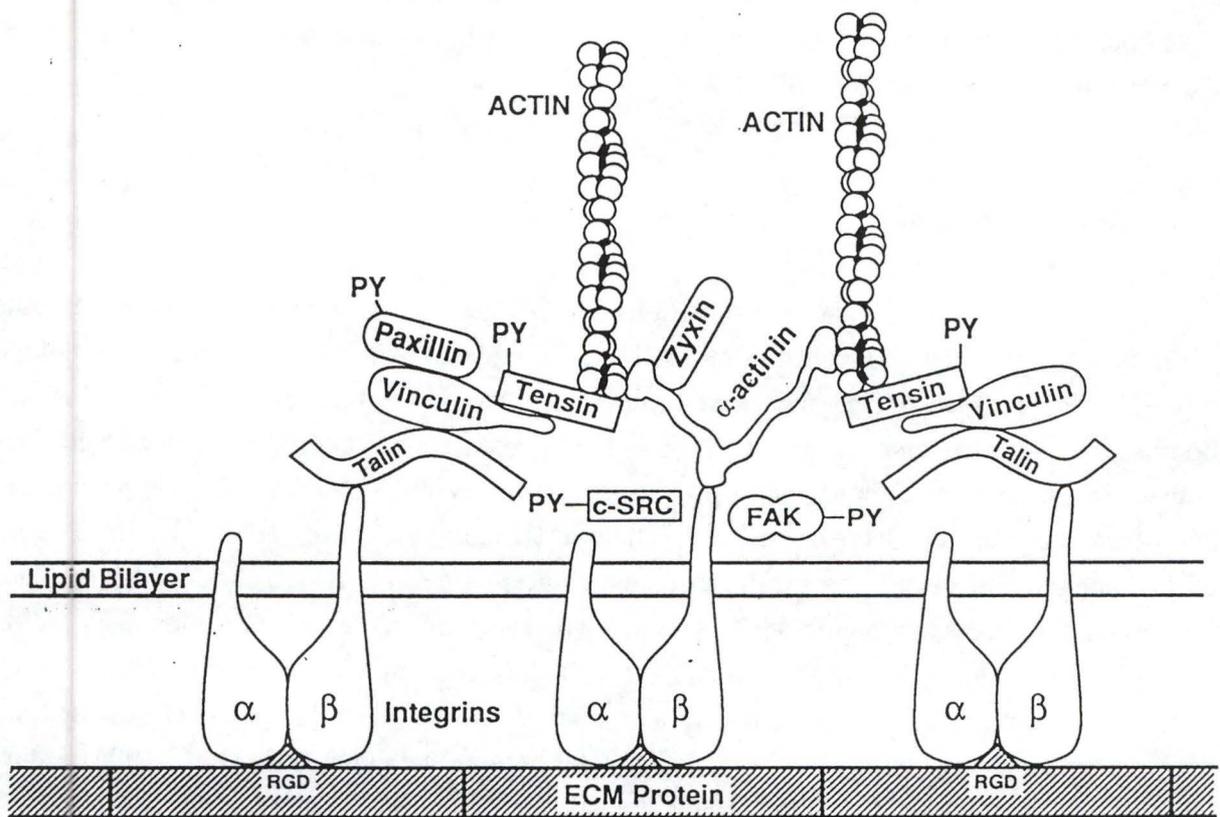


Figure 8 : Composants et caractéristiques structurales du contact focal (Schwartz, 1992).

vitronectine n'est apparemment pas produite par les kératinocytes, il est probable qu' $\alpha v \beta 5$ se lie à la fibronectine au niveau de plaques d'adhésion focales (Marchisio *et al.*, 1991).

3.1.1.5. Intégrines et transduction du signal

La fixation des ligands sur les récepteurs de type intégrine est à l'origine d'une multitude de réponses cellulaires incluant la prolifération, la différenciation, l'expression différentielle de gènes, l'assemblage du cytosquelette et la migration cellulaire. Ces réponses sont mises en place par l'aggrégation des récepteurs. Un des événements les plus précoces en réponse à la stimulation des intégrines est la phosphorylation de résidus tyrosines suite à la stimulation d'une activité tyrosine kinase, notamment celle de la FAK ou "Focal Adhesion Kinase". D'autres protéines comme la PKC et les MAP kinases sont aussi activées. D'autre part, la stimulation des intégrines peut également induire une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire (un médiateur clé dans la transduction du signal) ou modifier le pH intracellulaire.

Les intégrines affectent aussi la survie cellulaire en régulant l'apoptose (Clark et Brugge, 1995).

3.1.2. Le contact focal

Le contact focal constitue un type de jonction d'ancrage entre la cellule et la matrice extracellulaire où sont impliqués les microfilaments d'actine. Ce contact est présent *in vivo* et *in vitro* aux sites d'attachement des cellules sur leur substrat et forme une région dense aux électrons où la membrane est rapprochée du substrat. Des études immunocytochimiques et biochimiques ont révélé dans ces régions la présence des intégrines $\alpha 3 \beta 1$, $\alpha 2 \beta 1$ et $\alpha 5 \beta 1$, ainsi que la présence d' α -actinine, de taline, de vinculine et de paxilline sur la face intracellulaire. Ces protéines du cytosquelette relient les intégrines aux microfilaments. D'autre part, cet assemblage participe à la transduction du signal, via notamment l'activation de la "Focal Adhesion Kinase" (FAK) (Kaiser *et al.*, 1993).

3.1.3. Les hémidesmosomes et leurs principaux composants

Les hémidesmosomes sont des jonctions d'ancrage à la membrane basale dans certains épithéliums comme l'épiderme, la vessie, la trachée, le sein et l'amnios (épithélium simple atypique). Ils sont constitués d'éléments intra et extracellulaires sur chaque côté de la membrane plasmique. La plaque d'attache dense aux électrons et d'une épaisseur approximative de 20 à 40 nm est présente sur la face cytoplasmique de la membrane plasmique. Des filaments de kératine rayonnent vers la plaque d'attache. Une plaque sub-basale dense et extracellulaire se

trouve à mi-hauteur des filaments d'ancrage dans la lamina lucida. Chaque hémidesmosome se prolonge dans le derme par les fibrilles d'ancrage formées de collagène VII.

A) L'intégrine $\alpha6\beta4$ et son ligand la laminine 5

L'intégrine $\alpha6\beta4$ est de loin l'intégrine la plus abondante à la surface basale des cellules basales épidermiques. Elle joue un rôle important dans l'adhésion des cellules via les hémidesmosomes et la laminine 5, récemment identifiée comme ligand pour cette intégrine, est également un constituant hémidesmosomal. L'intégrine $\alpha6\beta4$ est la seule intégrine identifiée qui interagit avec les filaments intermédiaires. Cette association peut s'expliquer par le long domaine cytoplasmique composé d'environ 1000 résidus de la sous-unité $\beta4$. Cependant, par analogie avec les interactions intégrine-microfilaments, il apparaît peu probable qu'il existe une fixation directe entre l'intégrine et les filaments intermédiaires.

Des intermédiaires, l'IFAP300 et le BP230, sont des candidats pour établir cette association (Jones *et al.*, 1994).

B) Autres composants de l'hémidesmosome

Les antigènes de la pemphigoïde bulleuse (BPA 230 et BPA 180) sont des éléments constitutifs de l'hémidesmosome. Le BPA 230 (appartenant à une famille protéique incluant notamment la desmoplakine) se localise dans le cytoplasme aux sites d'interaction avec les filaments intermédiaires, tandis que l'antigène de 180 kDa (de nature collagénique) est un composant transmembranaire dont le domaine extracellulaire est impliqué dans l'association de l'hémidesmosome avec les éléments de la lame basale (Jones *et al.*, 1994).

Un autre composant de l'hémidesmosome, une protéine de 500 kDa nommée HD1, se localise au niveau de la plaque interne de l'hémidesmosome (Jones *et al.*, 1994). L'IFAP 300 (intermediate filament associated protein) est une protéine de 300 kDa dont la fonction serait parallèle à celle de la vinculine dans les jonctions de type adhérents. Jones *et al.* (1994) suggèrent qu'IFAP300 et HD1 sont une seule et même protéine.

3.2 ADHESION INTERCELLULAIRE

3.2.1. Les cadhérines

3.2.1.1. Généralités

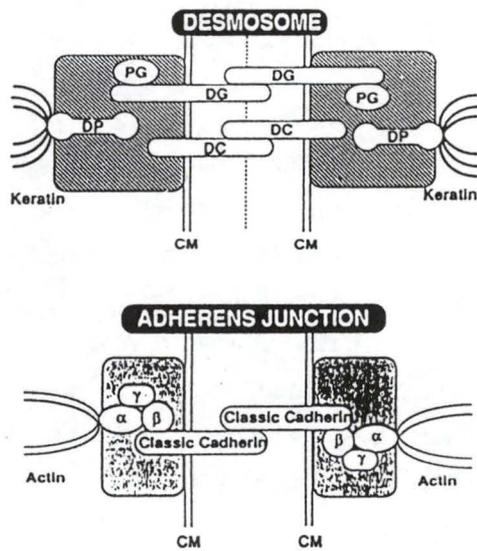
Les cadhérines sont des protéines transmembranaires homophiles d'adhésion intercellulaire et dépendantes du calcium (Grunwald, 1993).

Les cadhérines classiques les plus fréquemment rencontrées sont la E-,P- N-,R-, B-,U-, EP-,XB-cadhérine et la L-CAM. Ces molécules possèdent des domaines structuraux et fonctionnels similaires qui comprennent des sites pour l'adhésion, pour la fixation du calcium et pour les interactions avec le cytosquelette (Grunwald, 1993). La E-cadhérine est la principale cadhérine exprimée par les cellules épithéliales polarisées, mais elle est aussi exprimée avec la P-cadhérine par des cellules épithéliales pavimenteuses. Les cadhérines interagissent par leur face intracellulaire avec les caténines. Les caténines (α,β,γ) jouent un rôle central dans la fonction d'adhésion des cadhérines et les connectent au réseau de filaments d'actine. (Hoschuetzky *et al.*, 1994). L' α -caténine est une protéine de 102 kDa présentant de l'homologie de séquence avec la vinculine et nécessaire à la liaison entre les cadhérines et le cytosquelette. La β -caténine, polypeptide de 92 kDa est apparentée au produit du gène de polarité segmentaire *armadillo* ainsi qu'à la plakoglobine. Cette caténine est très fortement associée avec la région cytoplasmique des cadhérines. Enfin, la γ -caténine et la plakoglobine ne semblent former qu'une seule et même molécule qui s'associe également avec les cadhérines mais de façon instable et qui, sous certaines conditions, ne co-précipite pas avec les cadhérines (Amagai, 1995). Le système d'adhésion cadhérine-caténine peut être régulé de façon dynamique par une phosphorylation de résidus tyrosines, mais la phosphorylation d'autres résidus par la protéine kinase C pourrait également intervenir (Amagai, 1995).

3.2.1.2. Les cadhérines épidermiques

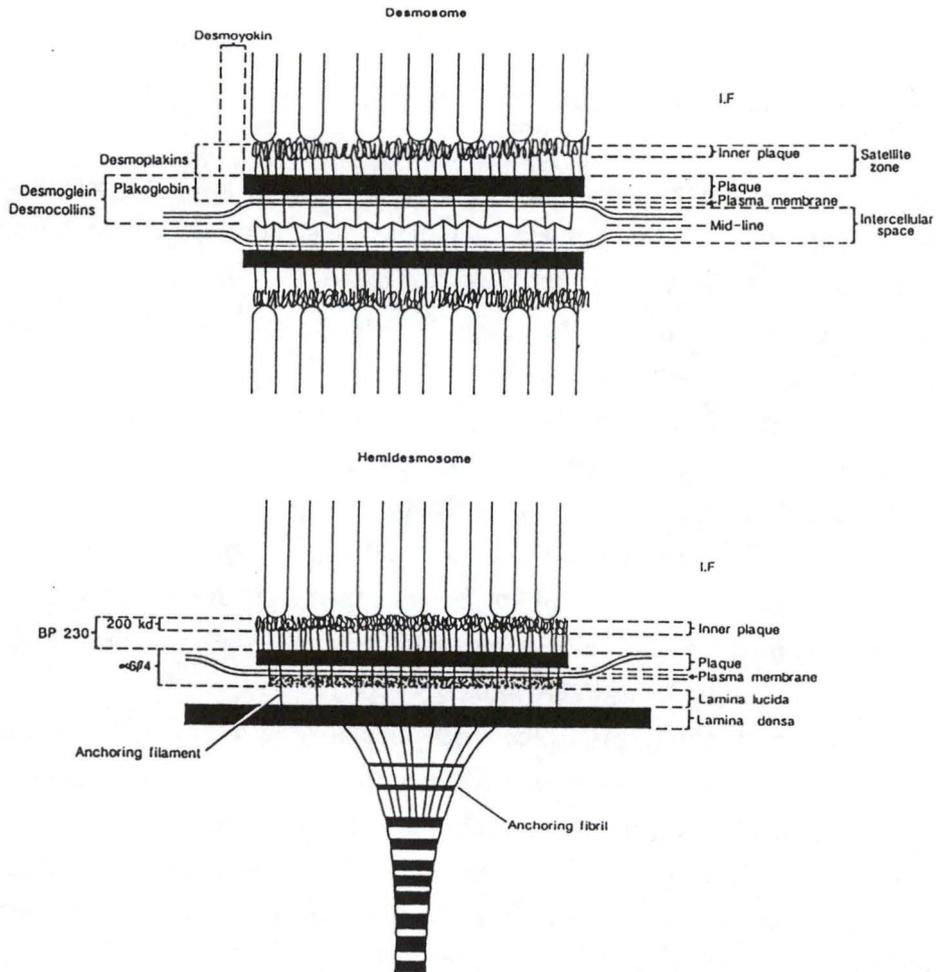
Les principales cadhérines exprimées par les kératinocytes sont la P-cadhérine, la E-cadhérine ainsi que les glycoprotéines desmosomales détaillées plus haut. Dans l'épiderme et dans les cultures stratifiées, la E-cadhérine est exprimée dans toutes les couches cellulaires tandis que la P-cadhérine est largement confinée à la couche basale (Hodivala et Watt., 1994). Ces deux molécules, en plus de leur fonction adhésive, jouent aussi un rôle important dans l'assemblage des desmosomes et dans la stratification en réponse au calcium. En effet, dans un milieu de culture à faible concentration en calcium (30 μ M), les kératinocytes poussent sous forme d'une monocouche et ne présentent pas de jonctions "adherens" ni de desmosomes. L'augmentation de la concentration en calcium induit la formation rapide de ces deux jonctions intercellulaires et initie de façon subséquente la stratification. Le réarrangement des éléments du cytosquelette comme les filaments intermédiaires et les filaments d'actine est temporairement et spatialement associé à la formation des jonctions intercellulaires.

Lewis *et al.* (1994) ont montré que dans les kératinocytes, en présence d'un anticorps bloquant l'activité de la E-cadhérine, la redistribution des composants des jonctions induite par le calcium est retardée de plusieurs heures, ce qui indique que la E-cadhérine est une molécule régulatrice importante dans l'organisation des desmosomes et des jonctions adhérentes. L'élévation du calcium induit également une réorganisation de la culture en une structure stratifiée ressemblant à un feuillet épithélial. Lewis *et al.* (1994) ont montré que lorsque la E et la P-cadhérine étaient



Schematic structure of desmosomes and adherens junctions. Desmosome complex includes desmogleins (DG) and desmocollins (DC) as membrane glycoproteins, and desmoplakin (DP) and plakoglobin (PG) as cytoplasmic plaque proteins. Desmogleins bind to plakoglobin through their cytoplasmic domain. Intermediate keratin filaments anchor at the plaque of desmosomes, possibly via the interaction with the carboxy-terminal domain of desmoplakin. The adherens junction complex contains classic cadherins as transmembrane glycoproteins. In the plaque α -, β -, and γ -catenins are found. β -catenin is associated most tightly with the cytoplasmic domain of classic cadherins. α -catenin is required for the binding of classic cadherins to the actin filaments.

Figure 9 : Comparaison de la structure du desmosome et de la jonction de type "adherens" (Amagai, 1995).



Diagrams showing the principal ultrastructural features of the desmosome and the hemidesmosome. Both structures are roughly circular membrane organelles usually less than 1 micrometre in diameter. The locations of some of the major glycoprotein and protein components as suggested by immuno-electron microscopy are indicated.

Figure 10 : Composants et principales caractéristiques structurales du desmosome et de l'hémidesmosome (Garrod, 1993)

toutes deux bloquées, la stratification ne se produisait pas, ce qui confirme l'implication de ces molécules dans le processus de stratification.

3.2.2. Les jonctions de type adherens

Les jonctions de type adherens sont des jonctions sur lesquelles s'attachent les microfilaments. Elles sont présentes dans l'épithélium intestinal, les cellules musculaires et la cornée. En 1993, Kaiser *et al.* ont démontré l'existence de ces jonctions dans l'épiderme. Aux sites de contact entre cellules, les jonctions adhérentes existent sous des formes assez diverses : elles se disposent sous forme de stries ou de points circulaires. La E-cadhérine et la P-cadhérine sont présentes au niveau de ces jonctions et les microfilaments sont attachés via des protéines intracellulaires comme les caténines, la vinculine, l' α -actinine et la plakoglobine.

3.2.3. Les desmosomes

3.2.3.1. Structure et composition

Les desmosomes sont des jonctions d'adhésion intercellulaires rencontrées dans toutes les cellules épithéliales. L'ancrage spécifique des filaments intermédiaires aux plaques desmosomales n'est pas réservé exclusivement aux filaments intermédiaires de kératine, mais peut aussi impliquer des filaments de desmine ou de vimentine.

Les desmosomes ont un diamètre de 0.5 μm approximativement et sont caractérisés par un espace intercellulaire de 30 nm d'épaisseur. Cet espace contient les domaines extracellulaires de protéines appartenant à la famille des cadhérines et est divisé par une ligne médiane, dense aux électrons. La plaque desmosomale est située sur la face cytoplasmique de chaque membrane où s'ancrent les filaments intermédiaires (Schmidt *et al.*, 1994).

A) Les composants du desmosome

Les desmoglénines et les desmocollines sont des protéines transmembranaires, N-glycosylées et fixatrices du calcium appartenant à la famille des molécules d'adhésion dépendantes du calcium, les cadhérines. Les desmoglénines existent sous 3 isoformes (Dsg 1, 2 et 3) dont une seule, la Dsg2, est exprimée dans tous les tissus et lignées cellulaires présentant des desmosomes. Dsg1 et Dsg3 sont restreints aux épithéliums pavimenteux stratifiés et à certaines tumeurs et lignées cellulaires qui en proviennent. Les desmoglénines (tout comme les desmocollines) présentent différents patterns d'expression dans les différentes couches du tissu. Ainsi, l'ARNm de Dsg1 est présent dans les cellules vivantes de toutes les couches, mais

l'ARNm de Dsg3 ne se retrouverait que dans les couches épineuses inférieures et celui de Dsg2 uniquement dans la couche cellulaire basale (Koch et Franke, 1994).

Les desmocollines humaines sont au nombre de deux (Dsc1 et Dsc2). Dsc1 est présente dans les cellules suprabasales de l'épiderme, tandis que Dsc2 est principalement synthétisé dans les cellules basales (Koch et Franke, 1994).

La plakoglobine est un polypeptide de 744 acides aminés qui constitue avec la desmoplakine I, un composant majeur de la plaque desmosomale. La plakoglobine n'est pas exclusivement localisée dans les desmosomes, mais se rencontre aussi dans les jonctions adhérentes où elle est associée aux cadhérines (Legan *et al.*, 1992). La plakoglobine est non seulement apparentée avec la β -caténine, mais aussi avec le produit du gène de polarité segmentaire de la Drosophile, *armadillo*, qui serait l'homologue de la β -caténine chez la Drosophile (Buxton *et al.*, 1992). Des études réalisées par Roh *et al.* (1995) ont démontré que la plakoglobine se lie aux desmoglénines 1 et 3 dans les kératinocytes et autres cellules épithéliales.

Les desmoplakines (DP I de 310 kDa et DP II de 240 kDa) sont localisées dans la région située entre la face interne de la plaque desmosomale et les filaments intermédiaires. Ceci permet de suggérer qu'elles jouent un rôle important dans la liaison des filaments intermédiaires à la plaque (Garrod, 1993).

B) Aspects dynamiques des interactions desmosomales

Loin d'être des structures statiques liant les cellules et les filaments intermédiaires, les desmosomes peuvent subir des modulations en réponse à des signaux précis. De telles modulations sont importantes aussi bien pour la motilité cellulaire, que pour la morphogénèse et la réparation des tissus matures et en développement (Garrod, 1993). L'assemblage et le désassemblage des desmosomes est contrôlé par le calcium extracellulaire, ce qui est cohérent avec les structures "cadherin-like" des desmoglénines et desmocollines. Par ailleurs, la présence de la E-cadhérine est nécessaire pour permettre la formation du desmosome (Buxton *et al.*, 1992).

3.2.4. Les intégrines $\alpha 2\beta 1$ et $\alpha 3\beta 1$ dans l'adhésion intercellulaire

Des études d'immunofluorescence sur des kératinocytes en culture ont démontré que la stratification épidermique était accompagnée d'une réduction de l'expression des intégrines $\alpha 3\beta 1$ et $\alpha 2\beta 1$ aux sites d'adhésion focale et d'une augmentation de l'expression de ces mêmes intégrines aux sites de contact intercellulaire. Ces données sont cohérentes avec une relocalisation de la face basale vers les faces latérales des intégrines $\alpha 2\beta 1$ et $\alpha 3\beta 1$ et suggèrent un rôle possible de ces intégrines dans l'adhésion intercellulaire.

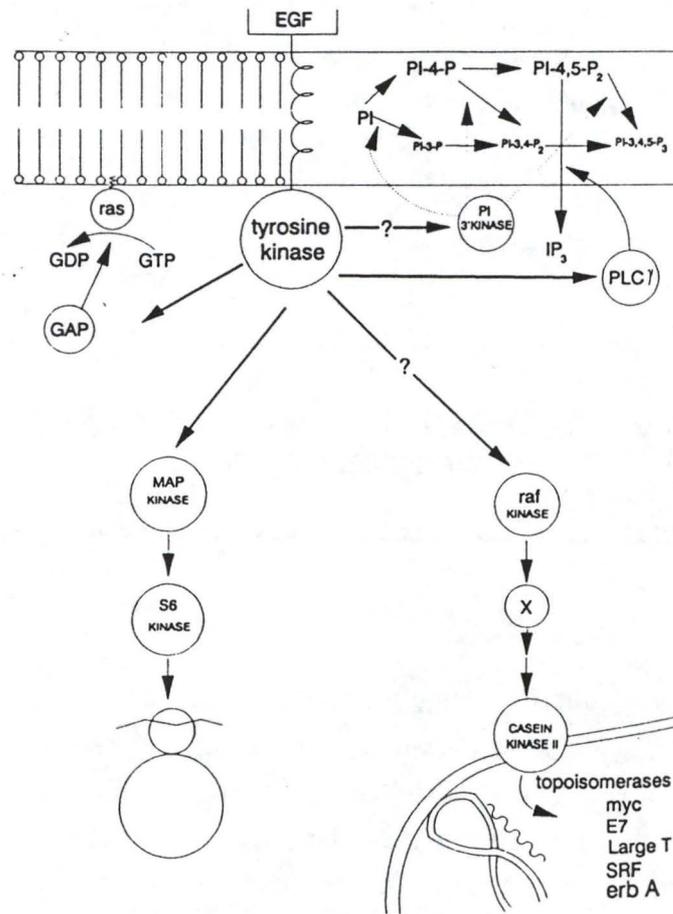
Symington *et al.* (1993) en utilisant un anticorps monoclonal (P1B5) dirigé contre $\alpha 3\beta 1$ ont induit l'adhésion intercellulaire, celle-ci étant alors médiée par une interaction hétérophile entre $\alpha 2\beta 1$ et $\alpha 3\beta 1$. D'autre part, ils ont aussi démontré que ces intégrines purifiées peuvent interagir *in vitro*. Il apparaît donc que la nature dynamique des interactions médiées par les intégrines peut être utilisée afin d'établir des contacts intercellulaires transitoires lorsque les cellules quittent la membrane basale. Symington *et al.* (1993) vont plus loin encore en proposant que des événements similaires puissent se produire lors de la stratification épidermique *in vivo*.

4. LES FACTEURS DE CROISSANCE ET HOMEOSTASIE EPIDERMIQUE

Les facteurs polypeptidiques stimulant ou inhibant la prolifération cellulaire sont dénommés facteurs de croissance. Les effets de ces facteurs sur les cellules dépendent de la nature du facteur, du type cellulaire, de l'environnement cellulaire, et de la condition physiologique de la cellule répondant au facteur. De plus, la présence d'autres facteurs, incluant des protéines de la matrice extracellulaire et d'autres facteurs de croissance résulte souvent en des effets synergiques ou antagonistes. Les facteurs de croissance ont souvent des effets multiples et sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques comme la cicatrisation, et le développement, mais aussi dans la formation et le maintien des tumeurs (Derynck, 1992).

4.1 L'EGF ET LES FACTEURS DE CROISSANCE APPARENTES

Plusieurs facteurs de croissance apparentés à l'EGF ou "epidermal growth factor" ont été récemment identifiés. Ces facteurs comprennent le "transforming growth factor α " (TGF α), l'amphiréguline (AR) et l'Héparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF). Tous ces peptides sont synthétisés sous forme de protéines précurseurs glycosylées intégrées dans la membrane et possédant des domaines extracellulaires contenant une séquence "EGF like". Tous les peptides apparentés à l'EGF se lient à un récepteur membranaire de 170 kDa. Ils partagent un spectre d'activités biologiques dont la plus évidente est la stimulation de la croissance cellulaire (Barnard *et al.*, 1994).



Tyrosine kinase substrates and potential pathways for signal transduction.

Figure 11 : Voies de transduction du signal pouvant être médiées par l'activation tyrosine kinase du récepteur de l'EGF (Carpenter, 1990).

4.1.1. L'EGF

L'EGF est un petit polypeptide de 53 acides aminés qui fut isolé dans les années '60 à partir d'extraits de glandes sous-maxillaires. On avait en effet rapporté que des injections de ces extraits à des souriceaux nouveaux-nés provoquaient une accélération de l'ouverture des paupières et de l'éruption des incisives (King *et al.*, 1983)

In vivo, l'EGF stimule la prolifération épithéliale de la peau, du poumon, de la cornée et de la trachée mais aussi du tractus gastro-intestinal. In vitro, l'EGF est un mitogène pour de nombreux types cellulaires. Cependant, ces effets mitogènes sur des kératinocytes normaux dépendent des conditions de culture utilisées. L'EGF et le TGF α qui lui est apparenté promeuvent la prolifération de manière indirecte en stimulant la migration latérale des kératinocytes de la zone périphérique des colonies en expansion (Watt, 1988). En effet, une augmentation de la migration cellulaire est détectée 15 minutes après l'ajout d'EGF. Cette réponse si rapide suggère un effet direct de l'EGF sur l'adhésion des kératinocytes et sur leur motilité. Chen *et al.* (1993) ont démontré à cet égard que l'EGF et le TGF α stimulent la migration des kératinocytes sur des matrices collagéniques de type I et IV en augmentant l'expression de la sous-unité $\alpha 2$ de l'intégrine $\alpha 2\beta 1$. L'EGF est aussi connu comme un inducteur de l'expression de TGF- α (Derynck, 1992).

4.1.2. Le TGF- α

Le "transforming growth factor α " ou TGF- α est un facteur de croissance polypeptidique partageant une homologie structurale et fonctionnelle avec l'EGF. Le TGF- α est synthétisé sous forme d'un précurseur transmembranaire de 160 acides aminés. C'est à partir de cette forme que le peptide mature TGF- α de 50 acides aminés est relargué suite à un clivage protéolytique (Mann *et al.*, 1993). Les formes membranaires du TGF- α sont biologiquement actives et interagissent avec les récepteurs de l'EGF présents sur les cellules voisines. Par conséquent, un simple contact cellule-cellule est suffisant pour induire une réponse mitogène dans une cellule avoisinante. Cependant, la forme soluble étant diffusible, peut atteindre un plus grand nombre de cellules (Derynck, 1992).

L'expression de TGF- α , à l'origine découverte dans les cellules néoplasiques, est aussi présente chez l'adulte au niveau de la peau normale (Mann *et al.*, 1993).

Le TGF- α joue un rôle important dans le contrôle de la prolifération épithéliale, mais aussi de la prolifération d'autres types cellulaires exprimant le récepteur de l'EGF (comme les fibroblastes et les cellules endothéliales). Il joue aussi un rôle dans le développement ainsi que dans la transformation tumorale de certaines lignées cellulaires (Derynck, 1992).

Le traitement de nombreuses lignées cellulaires avec du TGF- α provoque une augmentation de l'expression des ARNm et des protéines TGF- α . Ce phénomène est dénommé "auto-induction" et est aussi observé pour d'autres facteurs de croissance. L'intérêt biologique

de cette auto-induction reste incertaine, mais elle pourrait représenter un mécanisme par lequel un signal initial fourni par un facteur de croissance est amplifié et maintenu (Barnard *et al.*, 1994). Le TGF- α est aussi impliqué dans certaines pathologies comme le psoriasis. Le psoriasis résulte en une inflammation locale et une hyperprolifération des kératinocytes. Des mesures du taux de TGF- α indiquent que le niveau d'expression de ce facteur de croissance est fortement accru par rapport à une peau normale, suggérant ainsi que le TGF- α contribue à la surprolifération caractéristique du psoriasis (Elder *et al.*, 1989).

4.1.3 L'amphiréguline (AR) et le "Heparin-binding EGF-like growth factor" (HB-EGF)

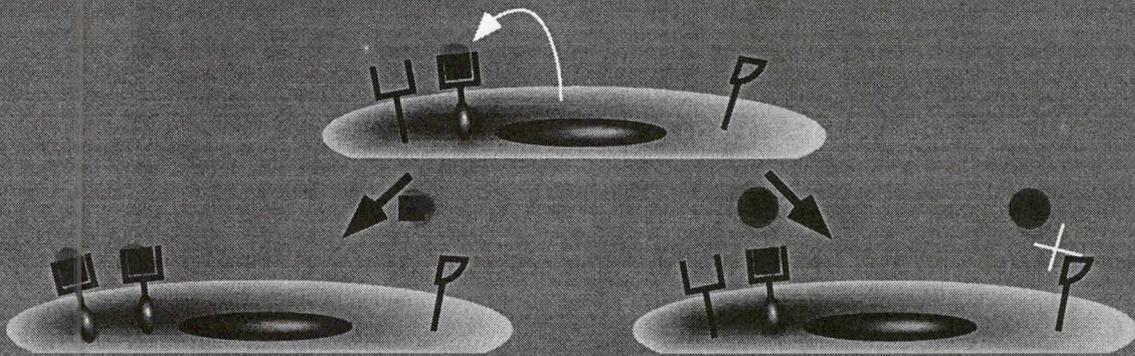
L'AR et le HB-EGF sont deux membres récemment identifiés de la famille de l'EGF. Ces deux facteurs de croissance partagent avec l'EGF la capacité d'interagir avec le récepteur de l'EGF, mais ils en diffèrent cependant par le fait qu'ils peuvent se lier à l'héparine. L'AR possède un effet stimulateur de croissance mais aussi un effet inhibiteur, ce qui permet de suggérer qu'elle agit comme régulateur positif ou négatif dans la croissance des cellules épithéliales. Cook *et al.* (1991) ont démontré que l'AR peut fonctionner comme facteur autocrine dans les cultures de kératinocytes en croissance autonome.

4.2 LE RECEPTEUR DE L'EGF

Le récepteur de l'EGF est une glycoprotéine membranaire de 170 kDa possédant un domaine extracellulaire de fixation du ligand, une région transmembranaire, et un domaine intracellulaire à activité tyrosine kinase. La fixation du ligand au récepteur déclenche une activation de l'activité kinasique et aboutit à une autophosphorylation d'au moins cinq tyrosines situées dans l'extrémité COOH-terminale. Ces événements sont suivis par une phosphorylation de tyrosines sur de nombreux substrats protéiques (PLC- γ 1, IP-3 kinase, GAP, MAP kinase, raf kinase, lipocortine I et c-erb B-2) ce qui déclenche une myriade de signaux et d'activités cellulaires incluant notamment une rapide altération dans la morphologie cellulaire, une stimulation de la synthèse d'ADN, une réorganisation du cytosquelette et une redistribution du récepteur (Fry *et al.*, 1994). La surexpression du récepteur de l'EGF ou de ses ligands (EGF, TGF- α , AR, HB-EGF) peut produire un phénotype néoplasique dans les cellules. Pour ces raisons, les inhibiteurs du récepteur tyrosine kinase de l'EGF sont potentiellement utiles en tant qu'agents chimiothérapeutiques dans le traitement de certains cancers (Fry *et al.*, 1994).

Dans les cellules épithéliales, l'EGF contrecarre la fonction adhésive de la E-cadhérine. En effet, le récepteur de l'EGF semble co-localisé avec le complexe cadhérine-caténine dans les cellules épithéliales. Hoschuetzky *et al.* (1994) ont démontré que l'EGF induit une phosphorylation de tyrosines de la β caténine et de la plakoglobine. La conséquence biologique de cette phosphorylation pourrait induire un désassemblage du complexe cadhérine-caténine du

Subconfluent epidermal keratinocytes



Confluent epidermal keratinocytes

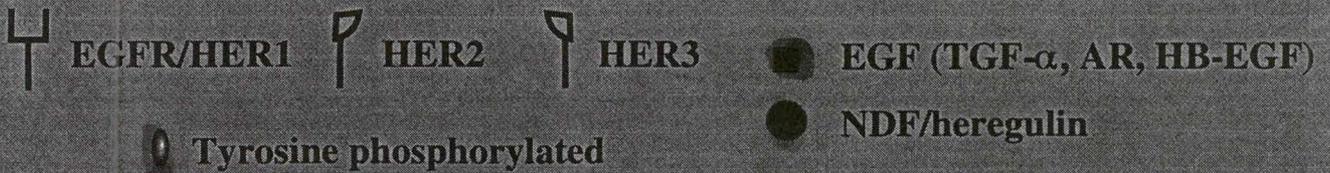
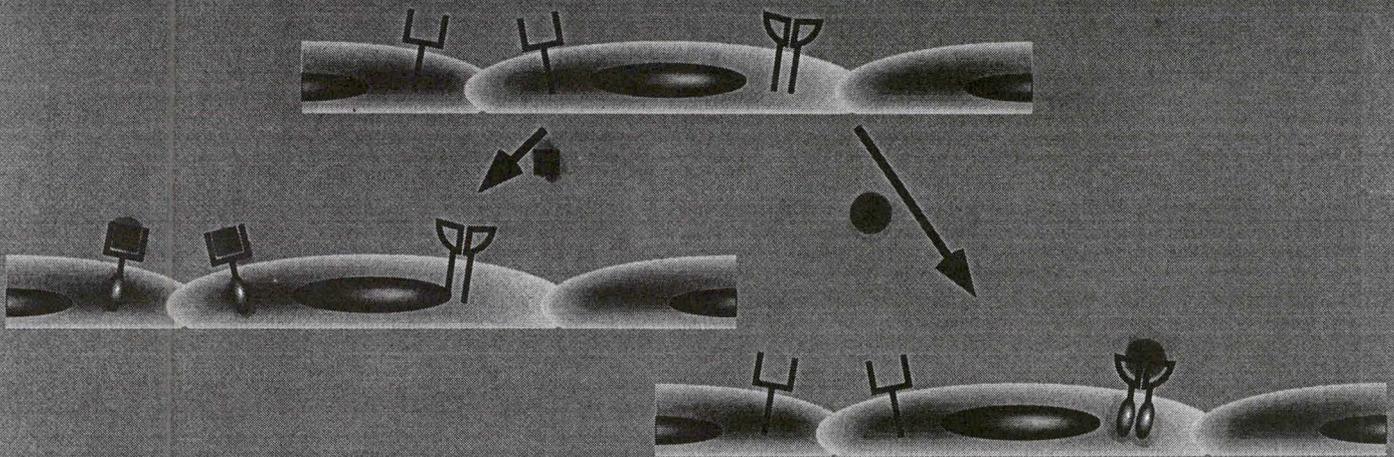


Figure 14 : Effet de l'ajout d'EGF et de NDF au milieu de culture sur l'activation de leur(s) récepteur(s) respectifs sur des kératinocytes épidermiques sous-confluent et confluent.

réseau de filaments d'actine. Ces résultats suggèrent que les caténines représentent un lien important entre la transduction du signal induite par l'EGF et la fonction des cadhérines dans l'adhésion intercellulaire.

4.3 LE NDF/HEREGULINE ET LES AUTRES MEMBRES DE LA FAMILLE DU RECEPTEUR DE L'EGF

Le NDF ou "neu differentiation factor" ou héréguiline est une glycoprotéine de 44 kDa , membre de la famille des facteurs de croissance apparentés à l'EGF. Il existe au moins 12 isoformes différentes de NDF. On distingue surtout les isoformes α et β , différant dans le domaine "EGF-like" de fixation au récepteur (Danilenko *et al.*, 1995). Le NDF/héréguiline se fixe sur les récepteurs HER3 (Human EGF receptor 3) et HER4 et active leur tyrosine kinase. Le récepteur HER3 est présent dans les cellules épidermiques, alors que HER4 n'est pas présent dans l'épiderme. Un autre récepteur, HER2 également appelé "neu" ou "c-erb B2", présent dans plusieurs tissus normaux adultes et foetaux comprenant la peau où il se localise dans les kératinocytes, est également activé par le NDF. HER2 ne peut être seul activé par la fixation du NDF/héréguiline mais il requiert la co-expression de HER3.

Poumay et Pittelkow (1995, sous presse) ont démontré que le NDF/héréguiline est exprimé par les kératinocytes en prolifération et que, contrairement à HER2 et HER3, son expression diminue fortement (surtout les isoformes β) lorsque les cellules sont recrutées pour la différenciation. L'observation que, tout comme l'EGF, le NDF/héréguiline diminue l'expression des marqueurs de la différenciation (K1 et K10) dans des cultures à confluence, a amené ces auteurs à comparer les rôles de l'EGF et du NDF. Ils ont démontré que le NDF ne possède pas d'activité mitogène pour les kératinocytes en prolifération contrairement à l'EGF. Par contre, dans les cellules en différenciation, la réduction de K1 et K10 est produite par les deux facteurs.

5. OBJECTIFS DU TRAVAIL

Le kératinocyte est par sa physiologie responsable du maintien de l'homéostasie épidermique. Par sa prolifération, il permet à l'épiderme de constamment se régénérer et par sa différenciation il assure la formation de la couche cornée.

Après leur prolifération, les kératinocytes en différenciation vont devoir quitter l'assise basale pour entamer une migration vers les couches suprabasales de l'épiderme. Lors de cette migration, les cellules subissent des modifications morphologiques et métaboliques et sont amenées à modifier leurs propriétés adhésives. L'adhésion des kératinocytes est médiée par deux grandes familles de molécules : les intégrines responsables de l'adhésion à la matrice extracellulaire et parfois aussi de l'adhésion intercellulaire et les cadhérines au sens large médiant uniquement l'adhésion entre cellules. Parmi les cadhérines, les desmocollines et desmogléines participent à la formation des desmosomes, tandis que les cadhérines P et E sont présentes au niveau des jonctions "adherens" intercellulaires. Parmi les intégrines, l' $\alpha 6\beta 4$ est un constituant hémidesmosomal tandis que l' $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$ et l' $\alpha 5\beta 1$ font partie des contacts focaux. In vivo et in vitro, des expériences basées sur des marquages immunologiques ont démontré que les intégrines de type $\beta 1$, ainsi que l'intégrine $\alpha 6\beta 4$, sont localisées dans l'assise basale de l'épiderme et donc absentes des couches suprabasales.

Il apparaît donc que les intégrines subissent des variations au niveau de leur expression et de leur fonction lorsque les kératinocytes se différencient et doivent quitter l'assise basale.

Par ailleurs, vu la régulation de l'adhésion intercellulaire par le calcium et le rôle important joué par les facteurs de croissance pour contrôler la physiologie du kératinocyte, notre travail s'est intéressé aux modulations de l'adhésion cellulaire entre le stade de prolifération et celui de différenciation, ainsi qu'à l'influence de deux paramètres dans ces variations, à savoir la concentration en calcium extracellulaire et l'EGF.

Nos conditions de culture des kératinocytes utilisent un milieu sans sérum afin d'éliminer le plus possible de variables. Les cultures à sous-confluence sont en prolifération rapide. Le stade de la différenciation est obtenu par des cultures menées à confluence où les cellules sont en arrêt de croissance et en contact intime les unes avec les autres (Poumay et Pittelkow, 1995).

Les variations de l'expression des intégrines $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ et $\alpha 6\beta 4$ et de la E-cadhérine ont été étudiées par différentes méthodes.

Nous avons également examiné le rôle joué par l'EGF dans la modulation de l'expression des molécules d'adhésion des kératinocytes en prolifération et en différenciation. Enfin, l'influence du calcium, rapportée comme favorisant la stratification et influençant la différenciation des cultures cellulaires, et par ailleurs indispensable à l'établissement de jonctions intercellulaires, a également retenu notre attention.

Matériel & méthodes

Nous avons travaillé sur des kératinocytes humains, isolés et mis en culture au laboratoire, sur lesquels nous avons appliqué des techniques de marquages immunologiques et de cytométrie de flux afin de localiser les intégrines et la E-cadhérine, mais aussi des northern blots pour quantifier l'expression de ces mêmes molécules et de l'hybridation in situ. Des études en microscopie électronique à transmission et à balayage ont permis d'observer les variations morphologiques des kératinocytes cultivés dans différentes conditions.

1. LA CULTURE DES KERATINOCYTES EPIDERMQUES

1.1. ETABLISSEMENT DE CULTURES PRIMAIRES A PARTIR DES PRELEVEMENTS CUTANES

Les biopsies cutanées provenant d'abdominoplasties ou de plasties mammaires nous ont été gracieusement fournies par le Docteur Bienfait, clinique Saint-Luc à Bouge. Les prélèvements sont effectués au dermatome et recueillis immédiatement après l'intervention dans du sérum physiologique (NaCl 0.9%) et stockés à 4°C. Ce conditionnement permet ainsi le transport jusqu'au laboratoire où commence l'isolement des cellules. Toutes les manipulations s'effectuent dans des conditions stériles sous hotte à flux vertical.

Les biopsies sont débitées en petits carrés de 1 à 2 cm de côté dans de la solution A (glucose 10.0 mM, KCl 3.0 mM, NaCl 130.0 mM, Na₂HPO₄ 1.0 mM, rouge phénol 0.0033 mM et Hepes 30.0 mM, pH 7.4, solution stérilisée par filtration sur Sterivex-GV 0.22 µm). Les fragments découpés sont placés avec l'épiderme par dessus dans de la trypsine (Sigma T825) 0.17% et incubés pendant une nuit à 4°C dans cette solution. Le lendemain, ils sont transférés dans un milieu de base sans sérum (Keratinocyte-SFM de Gibco-Brl) qui est une modification du milieu MCDB153 (Boyce et Ham, 1983) auquel sont ajoutés de l'EGF (EGF recombinant à 5 ng/ml), du BPE (bovine pituitary extract à 50 µg/ml), de l'éthanolamine 10⁻⁴ M, de la phosphoéthanolamine 10⁻⁴ M, de l'hydrocortisone 5X10⁻⁷ M et des antibiotiques (50 unités/ml de pénicilline G et de 50 µg/ml de streptomycine). Ce milieu sera par la suite dénommé "milieu complet" et permet d'initialiser la prolifération des kératinocytes en culture en leur fournissant tous les facteurs de croissance et hormones nécessaires. Le même milieu, mais dépourvu d'insuline, d'EGF et de BPE est utilisé pour les cultures en conditions autonomes, c'est-à-dire en absence de tout facteur peptidique exogène.

Avant d'être ajouté au milieu complet, le BPE nécessite une étape de purification (centrifugation à 4000 RPM, 10 minutes à 4°C suivie d'une filtration sur Stérivex-GV 0.22 µm) pour éliminer divers inhibiteurs de croissance. L'épiderme peut alors être mécaniquement détaché du derme au moyen de pinces. Une fois détachées, les cellules épidermiques sont alors dissociées par plusieurs aspirations du tissu au travers d'une pipette, puis la suspension cellulaire est filtrée afin d'éliminer les agrégats et les cellules sont récoltées par centrifugation à 1000 tours (10 minutes à 4°C). Le surnageant est aspiré jusqu'à un centimètre au-dessus du culot et les cellules sont remises en suspension dans ce petit volume.

Les cultures primaires sontensemencées dans des boîtes de 175 cm² en présence de milieu complet et incubées dans une étuve à 37°C sous atmosphère humide et 5% de CO₂. Le milieu est renouvelé tous les deux jours.

Avant que les cultures n'atteignent la confluence, les cellules des cultures primaires peuvent être congelées et stockées avant leur utilisation pour établir des cultures secondaires. Le détachement des cellules se réalise à l'aide de trypsine 0.025% et d'EDTA 0.01% dissout dans de la solution A. Après détachement, l'action de la trypsine est bloquée par du sérum dialysé de veau foetal à 2% dans de la solution A. Après comptage et centrifugation des cellules, celles-ci sont resuspendues dans du milieu complet à une densité choisie. Un même volume de milieu complet additionné de 20% de DMSO et de 20% de sérum dialysé de veau foetal est alors ajouté et les cellules réparties dans des cryotubes (NUNC 1ml). Les tubes sont congelés pendant une nuit à -70°C transférés le lendemain dans de l'azote liquide à -180°C.

1.2 ETABLISSEMENT DE CULTURES SECONDAIRES

Les kératinocytes primaires sous-confluents sont utilisés après décongélation pour la culture secondaire à une densité choisie (5000 ou 10000 cellules/cm² dans nos expériences) et sont incubés dans du milieu complet. Le lendemain de la mise en culture, ce milieu est renouvelé afin d'éliminer le DMSO. Le milieu sera en suite renouvelé tous les deux jours. Lorsque les cellules occupent approximativement 50% de la surface de la boîte, le milieu complet est remplacé, après trois lavages par la solution A, par du milieu sans facteur peptidique exogène contenant éventuellement de l'EGF. Des acides aminés sont également ajoutés à ce milieu à raison de L-histidine 8X10⁻⁵ M, L-isoleucine 1.5X10⁻⁵ M, L-méthionine 3X10⁻⁵ M, L-phénylalanine 3X10⁻⁵ M, L-tryptophane 1.5X10⁻⁵ M et L-tyrosine 1.5X10⁻⁵ M. Ce milieu est renouvelé comme ci-dessus jusqu'à ce que les cellules atteignent 70-80% de confluence ou la confluence complète où la prolifération cellulaire est stoppée.

Pour certaines expériences nous avons testé l'effet d'une augmentation du calcium dans le milieu (0.09 mM→1.5 mM), 24 heures avant l'analyse des cellules.

2. EXTRACTION D'ARN-POLY(A) A PARTIR DE CULTURES CELLULAIRES

La manipulation des ARN messagers nécessite l'utilisation de matériel traité au diéthyl pyrocarbonate (DEPC) afin d'éliminer toute trace d'ARNase.

Les oligos-dT sont des chaînes de 30 nucléotides uniquement pourvus de bases thymidines. Ces chaînes sont attachées de manière covalente à de la cellulose par l'extrémité 5'-phosphate de l'oligonucléotide. Sous des conditions ioniques favorables, la thymidine et l'adénosine s'apparient par formation de ponts hydrogènes. Les ARN messagers marqués par une queue poly-A peuvent ainsi être séparés des autres types d'ARN (ARN ribosomal et ARN de transfert). Les oligos-dT-cellulose doivent être préalablement traités avant leur utilisation. Une quantité équivalente à 0.025g pour une boîte de culture de 75 cm² est lavée deux fois dans du NaOH 0.1M puis rincée une fois avec de l'eau distillée. Les oligos dT-cellulose sont ensuite incubés 30 minutes en présence de DEPC 0.1%. Après cette incubation, ils sont relavés trois fois avec de l'eau traitée par le DEPC, puis une fois avec un tampon riche en sels. Ce tampon est composé de Tris-HCl 0.01M, NaCl 0.5M, EDTA 0.001M et SDS 0.2%. Après ce dernier lavage, les oligos-dT sont resuspendus dans ce même tampon et stockés à 4°C.

Pour extraire les ARN poly(A), le milieu de chaque boîte de culture est ôté et les cellules sont lysées avec 6 ml d'un tampon de lyse constitué de Tris-HCl 0.01M, NaCl 0.1M, EDTA 0.002M, et SDS 1% et contenant 25 µg/ml de protéinase K (sérine protéase non spécifique utilisée afin d'inactiver rapidement les nucléases endogènes comme les ARNases et les ADNases). Lorsque le lysat devient très visqueux, il est ôté de la boîte et passé 6-8 fois au travers d'une seringue 21G. La concentration en protéinase K est ajustée à 75 µg/ml et le lysat incubé 30 minutes à 37°C. La concentration initiale en sels dans le lysat (0.1M) est portée à 0.5M par l'ajout du volume approprié de NaCl 5M et les oligos-dT sont ajoutés au mélange (l'augmentation de la concentration en sels est nécessaire à la fixation des oligos-dT sur les queues poly(A)). L'incubation des oligos-dT avec la préparation cellulaire se réalise à température ambiante pendant un minimum de 2 heures. Après incubation, les oligos-dT sont lavés avec du tampon riche en sels, puis sont resuspendus dans le même tampon et déposés dans une colonne (Poly-prep chromatography column, Bio-Rad) traitée DEPC et équipée d'un support en polymère poreux retenant les ARNm poly (A)-oligos-dT. Lorsque la totalité du mélange s'est écoulé au travers de la colonne, une solution à faible concentration en sels (Tris-HCl 0.01M, NaCl 0.1M, EDTA 0.001M, SDS 0.2%) permet de décrocher les hybridations non spécifiques impliquant les oligos-dT.

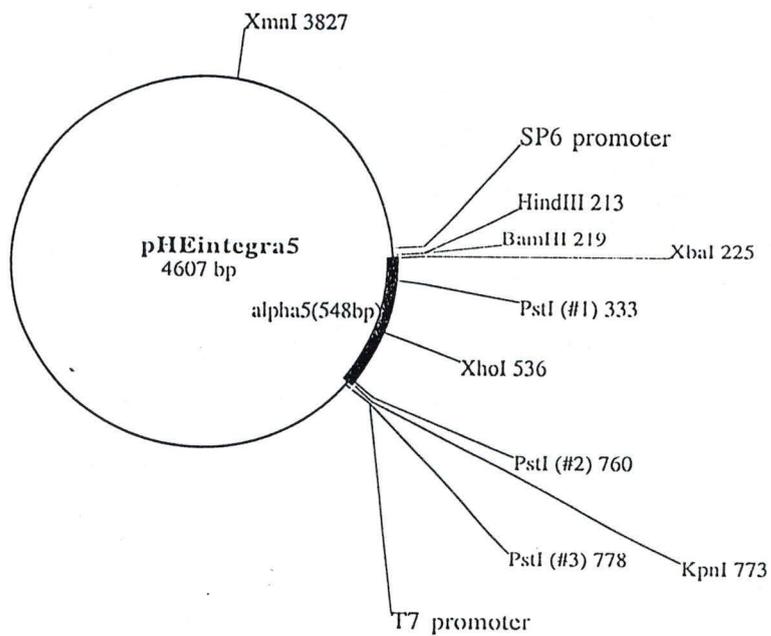


Figure c : Sous-clonage du fragment encodant la sous-unité d'intégrine $\alpha 5$ dans le plasmide pSport.

L'éluat des ARN poly (A) est réalisée par une solution sans sels composée de Tris-HCl 0.005M, EDTA 0.001M, SDS 0.2%. La concentration en sels de l'éluat est réajustée à 0.5M, puis les ARN sont précipités par addition de deux fois le volume d'éthanol froid 95% et incubation à -20°C pendant une nuit. Le lendemain, les échantillons sont centrifugés (15 minutes à 12000 tours à 4°C) et les culots sont séchés puis resuspendus dans 25 µl de tampon TE (Tris base 9mM, EDTA-2H₂O 0.9mM, pH 8) contenant 2 µg/ml de protéinase K.

Afin de procéder à la mesure de la concentration en ARNm, 2 µl des échantillons sont dilués dans 98 µl de tampon TE. La mesure de la densité optique est effectuée à 260 et 280 nm.

3. PREPARATION DE LA SONDE $\alpha 5$ (SOUS-CLONAGE PAR RT-PCR)

Pour obtenir une sonde spécifique de la sous-unité d'intégrine $\alpha 5$, des ARN poly (A) de fibroblastes dermiques humains sont transcrits par la transcriptase réverse en présence d'hexamères comme amorce. Une séquence de 548 bp correspondant à une région unique propre à la sous-unité $\alpha 5$ est amplifiée, à partir de cDNA obtenu, par PCR (35 cycles) grâce aux primers HINT-1454s (5'TGACTCTAGAGTCCTTTGGTGTGGACAA3') et HINT-1999a (5'TGACGGTACCACTTCCAGCTGCAGGTCA3') établis pour introduire les sites de restriction XbaI et KpnI (soulignés) aux extrémités du fragment. Ce fragment est sous-cloné de façon orientée entre ces deux sites du plasmide pSPORT 1 (Gibco-Brl) pour produire une large quantité de cDNA correspondant à la sous-unité $\alpha 5$ et permettre la synthèse de sondes ARN antisens et sens.

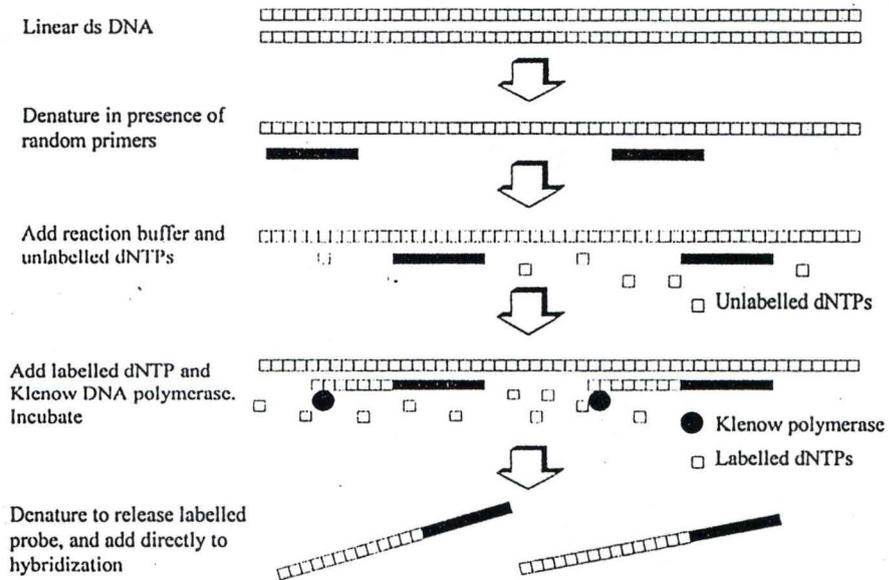


Figure d : Etapes de fabrication des sondes radioactives par random priming en présence de la polymérase de Klenow.

4. NORTHERN BLOT

Les échantillons d'ARN sont dissouts dans un tampon constitué de formamide désionisée (50%), MOPS 1X, formaldéhyde 6.5%. Les échantillons sont incubés à 65°C pendant 35 minutes. Le gel utilisé pour analyser les ARN est constitué d'agarose (ultraPure agarose GibcoBRL, 15510-027) à 1.2% dans une solution tamponnée (0.2M MOPS, 50mM acétate de sodium, 10mM EDTA, pH 7) contenant de la formaldéhyde 6.5%. La séparation des échantillons se réalise à 75 volts pendant 3 heures.

Avant de procéder au transfert des ARN, le gel est lavé quatre fois dans de l'eau distillée. La membrane de nylon (Bio Rad, Zeta Probe GT) est mouillée dans un premier temps dans de l'eau distillée, puis dans du tampon SSC 20X (NaCl 2.9M et citrate de sodium 0.29M; pH 7).

L'appareillage et les papiers filtres utilisés pour réaliser le transfert sur membrane font partie du "Turbo Blotter" de Schleicher & Schuell. Ce transfert s'effectue dans du SSC 20X pendant toute une nuit. Le lendemain, les ARN sont fixés sur la membrane de façon covalente par une exposition aux UV 120 millijoules/cm² et les membranes emballées dans un papier filtre pour la conservation.

5. HYBRIDATION DES NORTHERN BLOTS PAR SONDÉS ³² P

Les membranes sont hybridées avec des sondes d'ADN complémentaire marquée au phosphore 32 sur tous leurs nucléotides dCTP.

Les étapes de l'hybridation sont décrites ci-dessous et tirées du manuel d'utilisation du four à hybridation micro-4 Hybaid de Biozym.

Sondes cDNA	Plasmide	Source	Sites de restriction
α 2 clone 2.72L 3.6 Kb	Bluescript II KS +	M. Hemler (Boston)	Eco RI
α 3 clone 3410 1.9 Kb	Bluescript II KS +	M. Hemler (Boston)	Sal I
α 5 548 bp	pSPORT	Histologie (Namur)	Xba I / Kpn I
α 6 clone 1363 680 bp	pUC 18	A. Sonnenberg (Amsterdam)	Eco RI
β 1	-	Dr Foidart (Liège)	Eco RI / Hind III
β 4 clone K163 600 bp	pUC 18	A. Sonnenberg (Amsterdam)	Pst I / Eco RI
E-cadhérine	pBAT EM2	Pittelkow (Rochester)	Xho I
K1 1925 bp	p GEM 3 \oplus	D. Roop (Houston)	Pst I / Bam HI
K10 2039 bp	p GEM 3 \oplus	D. Roop (Houston)	Pst I
K14 141 bp	p GEM 3 \oplus	D. Roop (Houston)	Eco RI / BstXI
Involucrine 852 bp	pSPORT	R. Eckert (Cleveland)	Pst I
1B15 695 bp	p SP65	Pittelkow (Rochester)	Xba I / Pst I

Tableau 1. Sondes utilisées pour l'hybridation des membranes de Northern blot

5.1. PREHYBRIDATION DES MEMBRANES

Les membranes sont placées, séparées les unes des autres par un treillis de nylon dans une solution de SSC 2X, puis sont roulées en cigare et introduites dans une bouteille à hybridation Hybaid (medium and small hybridisation bottles) en présence de SSC 2X. Cette solution est ensuite remplacée par un premier volume (10 ml) de solution de préhybridation (Na_2HPO_4 0.12M, NaCl 0.24M, SDS 7% dans un mélange 1/1 d'eau DEPC et de formamide désionisée 50%, pH final 7.2), chauffée à 43°C, puis vidée et remplacée par un second volume de la même solution. La bouteille est alors placée sur la rotisserie dans le four d'hybridation (Hybaid micro 4 hybridisation oven) à 43°C pendant 1 heure.

Lorsque les membranes ont déjà été hybridées au préalable, il faut décrocher les sondes avant une nouvelle utilisation. Les membranes sont placées dans le four à 80°C et incubées avec la solution de "décrochage" (SSC 0.1X/ 0.5% SDS). La bouteille est ensuite placée 10 minutes dans un bain en ébullition. Cette étape est répétée une seconde fois, avant de replacer les membranes dans le SSC 2X à 43°C, puis dans la solution de préhybridation.

Les sondes utilisées lors des expériences d'hybridation des membranes de Northern blots sont reprises dans le tableau 1 avec leurs caractéristiques et leurs origines.

5.2 MARQUAGE DES SONDES AU ^{32}P ET HYBRIDATION DES NORTHERN BLOTS

Les sondes ADN pour l'hybridation des Northern blots sont marquées au ^{32}P par "random priming" et incorporation de (α - ^{32}P) dCTP (50 μCi , "Isoblu", ICN Pharmaceuticals). La sonde radioactive est purifiée par une colonne de chromatographie Bio-Spin 30 (Bio-Rad) centrifugée à 1200 RPM. Après purification, 1 μl de sonde est prélevé afin d'estimer l'activité incorporée dans un compteur à scintillation BECKMAN LS 6000 IC. Le nombre de cpm/ μl est au minimum de 10^5 et varie jusqu'à 2×10^6 .

Avant hybridation, la sonde est incubée dans un bain à ébullition puis immédiatement refroidie sur glace. Elle est ensuite mélangée à 5 ml de solution d'hybridation. Cette solution est ajoutée à la solution de préhybridation des membranes dans une bouteille du four d'hybridation à 43°C pour incubation jusqu'au lendemain.

Après hybridation, les membranes sont soumises à trois lavages à 25°C avec de la solution SSC 2X/0.1% SDS, suivis de deux lavages à 43°C avec de la solution SSC 0.5X/0.1% SDS et enfin de deux autres lavages à 65°C avec la solution SSC 0.5X/0.1% SDS pour décrocher les sondes hybridées de façon non spécifique. Pour les membranes hybridées avec les sondes pour les kératines, trois lavages supplémentaires à 65°C avec la solution SSC 0.1X/0.1% SDS sont nécessaires pour augmenter la spécificité de l'hybridation.

Anticorps	Désignation	Isotype/source	Dilution utilisée
anti-intégrine humaine α 2	CLB Clone CLB-150	isotype IgG1 murin	1/20
anti-intégrine humaine α 3	Gibco BRL Clone P1B5	isotype IgG1 murin	1/20
anti-intégrine humaine α 5	CLB Clone CLB-705	isotype IgG2b murin	1/25
anti-intégrine humaine α 6	Organon Teknika	isotype IgG1 de rat	1/100
anti-intégrine humaine β 1	DH12	souris	1/50
anti-intégrine humaine β 4	Engvall	souris	1/50
anti-E-cadhérine humaine	Organon Teknika	IgG1 murin	1/20
anti-kératine 10 humaine	Organon Teknika DE10	souris	1/10
Ac secondaire FITC anti-souris	Amersham N1031	mouton	1/50
Ac secondaire FITC anti-rat	(Prosam) F234	lapin	1/50

Tableau 2. Anticorps et dilutions utilisées lors des marquages immunocytochimiques

Les membranes sont enveloppées dans un cellophane et exposées avec un film Kodak (X-Omat AR) à -70°C .

Des analyses densitométriques ont été réalisées sur un Power Macintosh (7100/80AV) en utilisant le programme de domaine public NIH Image (écrit par Wayne Rasband du "U.S. National Institutes of Health" et disponible sur Internet par ftp anonyme à partir de zippy.nimh.nih.gov).

6. MARQUAGES IMMUNOCYTOCHIMIQUES DES KERATINOCYTES CULTIVES SUR COUVRE-OBJETS

Les cellules sont fixées 30 minutes dans une solution de formaldéhyde 3,7% dans du PBS/ABC (CaCl_2 0.9 mM, KCl 2mM, KH_2PO_4 1.4mM, MgCl_2 0.5 mM, NaCl 0.13M, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 8mM, pH 7.2). Après fixation, les cellules sont rincées trois fois dans le PBS/ABC et conservées à 4°C avant la suite du marquage.

Les lamelles sont rincées trois fois dans une solution de glycine 0.1M dans du PBS/ABC, puis deux fois dans une solution de PBS/BSA (PBS/ABC, BSA (Sigma, fraction V) 0.1%, Triton X-100 0,02% et NaN_3 0.02%).

Les anticorps monoclonaux primaires utilisés ainsi que leur dilution sont repris dans le tableau 2 ci-contre. Ces dilutions s'effectuent dans du PBS/BSA. L'incubation en présence des anticorps primaires se réalise dans une chambre humide, à température ambiante et pendant 1h. Les couvre-objets sont ensuite rincés trois fois dans du PBS/BSA, puis incubés en présence de l'anticorps secondaire dans les mêmes conditions. Après incubation, trois rinçages au PBS/BSA sont à nouveau effectués et les couvre-objets sont montés dans une solution de glycérol 90% PBS/ABC 10%, pH 9.

Sonde	Plasmide utilisé	Sites de restriction pour la linéarisation sens/antisens	Promoteur
β 4 (clone k163) 600 bp initialement cloné dans PUC 18 en PstI-EcoRI (position 3180-3780) Sonnenberg A.	Psport 1 (4109 bp) + insert β 4 Pst - Eco RI	Eco RI (sens) Hind III (antisens)	SP6 T7
α 2 (clone 2.72L ; 3,6 KB) dans Bluescript/KS \oplus en Eco RI M. Hemler (Boston)	Bluescript KS \oplus + insert α 2 en Eco RI	Spe I (sens) Sal I (antisens)	SP6 T7
K10	p Gem-3Zf+ + insert K10 en Pst I	Sal I (sens) Hind III (antisens)	SP6 T7

Tableau 3. Sondes utilisées lors des expériences d'hybridation in situ

7. ANALYSES PAR CYTOMETRIE DE FLUX

Les cellules sont soumises à deux lavages dans la solution A avant trypsinisation par la solution de trypsine 0.025% EDTA 0.01%. Après détachement des cellules, l'action de la trypsine est bloquée par 10% de sérum de veau foetal dans de la solution A à 4°C. Les cellules sont centrifugées à 1000 tours et à 4°C, puis lavées une fois à la solution A (4°C). Une estimation du pourcentage de cellules vivantes est ensuite réalisée par un comptage en présence de bleu trypan. Les cellules sont distribuées dans des puits et incubées à 4°C avec l'anticorps primaire dilué dans du PBS/BSA 0.1% pendant 30 minutes. Après incubation, 50 µl de sérum de veau foetal est ajouté et les cellules sont rincées une fois avec de la solution A puis incubées avec l'anticorps secondaire couplé au FITC pendant 30 minutes à 4°C. Ensuite, du sérum de veau foetal est ajouté avant de resuspendre les cellules dans du PBS/ABC et de procéder à un nouveau comptage en présence de bleu trypan.

Enfin, les cellules sont fixées par une solution de paraformaldéhyde 1% dans du PBS/ABC.

Les analyses sont effectuées sur un cytomètre de flux FACStar (Becton Dickinson).

8. HYBRIDATION IN SITU

8.1 PREPARATION DES SONDAS ARN

Les sondes utilisées dans le cadre de nos expériences concernent les sous-unités d'intégrine $\alpha 2$, $\beta 4$, ainsi que la kératine 10 (cfr. tableau 3).

Les plasmides contenant les ADNc correspondants sont d'abord linéarisés au niveau des sites de restriction adéquats afin de produire un support pour la transcription par les ARN polymérase SP6 ou T7, à partir de leurs promoteurs respectifs, et produire les sondes sens ou antisens.

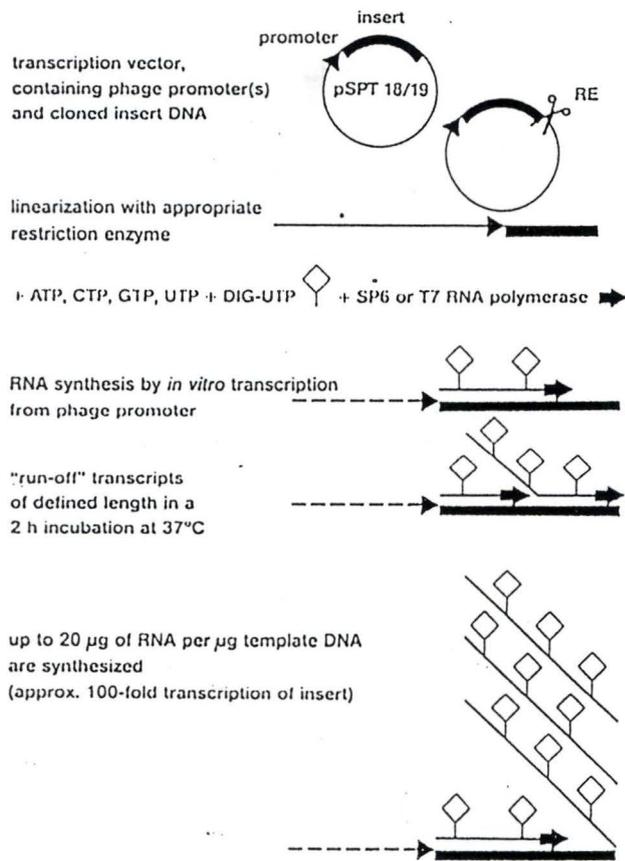


Figure 1: Nonradioactive DIG RNA-Labeling by *in vitro* transcription.

Figure e : Illustration des étapes de transcription et de marquage des sondes ARN par la digoxygénine.

La vérification de l'efficacité de la linéarisation est effectuée sur gel d'agarose 1% en utilisant comme témoins les plasmides non linéarisés. Le produit de linéarisation est alors purifié par utilisation d'un kit Nucleotrap et resuspendu dans 20 µl de TE.

L'étape de transcription et de marquage des sondes en ARNm se déroule dans un tampon (Tris-HCl 400 mM, MgCl₂ 60mM, DTT 100 mM, NaCl 100 mM, spermidine 20 mM, inhibiteur d'ARNase 1U/µl; kit DIG RNA labeling SP6/T7 Boehringer Mannheim) en présence de NTP 1X (ATP 10mM, CTP 10mM, GTP 10mM, UTP 6.5mM, DIG-11-UTP 3.5mM dans Tris-HCl, pH 7.5) et de l'ARN polymérase (SP6 ou T7) adéquate à 2 unités/ml pendant 2h à 37°C. La concentration des plasmides pour la transcription est de 0.05 µg/µl. Le brin matrice d'ADNc est ensuite dégradé par une ADNase (15 min à 37°C) et l'ARN marqué est précipité en présence d'acétate de sodium 3M (2.5 µl), pH 5.5 et d'éthanol absolu froid (75 µl) pendant 30 min à -70°C. La sonde est ensuite récupérée par centrifugation et le culot est lavé avec de l'éthanol froid 70% (v/v). Après un bref séchage du culot sous vide, la sonde est dissoute dans de l'eau par une incubation de 30 min à 37°C. L'incorporation de digoxygénine est vérifiée par "dot blot" et détection chémioluminescente par un anticorps de mouton anti-digoxygénine couplé à de la phosphatase alcaline.

8.2. PREPARATION DES CELLULES ET HYBRIDATION

Les cellules cultivées sur couvre-objets sont fixées par une solution de paraformaldéhyde 4% dans du PBS (NaCl 0.13M, KCl 2mM, Na₂HPO₄ 8mM, KH₂PO₄ 1.7mM, pH 7.4) pendant 20 minutes, puis rincées trois fois dans le PBS seul et conservées dans de l'éthanol 70% à 4°C.

Pour préparer les cellules à l'hybridation, les couvre-objets sont incubés dans de l'HCl 0.2N pendant 20 minutes à température ambiante, puis rincés trois fois dans le PBS pH 7.4. Leur perméabilisation s'effectue ensuite dans du Triton X-100 0.3% pendant 15 minutes et est suivie par trois rinçages dans le PBS. Après incubation pendant une minute dans de la glycine 0.2%-PBS, les cellules sont post-fixées dans de la paraformaldéhyde 4% pendant 5 minutes, puis rincées deux fois dans le PBS.

Une étape de préhybridation dans le SSC 2X/50% formamide pendant 1h à 37°C précède l'ajout de la sonde. Celle-ci est diluée de façon adéquate dans du tampon d'hybridation (Tris HCl pH 7.5 à 0.01M, Denhardts 12.5X (Ficoll 20g/l, PVP 20g/l et BSA 20g/l), SSC 2X, formamide désionisée à 50%, SDS 0.1%, ADN simple brin de sperme de saumon 0.25 mg/ml, Dextran sulphate 5%), chauffée 5 minutes à 80°C avant d'être conservée sur glace. L'incubation des couvre-objets avec la sonde s'effectue dans une chambre humide (SSC 2X) à 42°C pendant une nuit.

8.3 LAVAGES ET DETECTION DES SONDÉS

L'étape de lavage des cellules après hybridation vise à décrocher les sondes liées de façon aspécifique en jouant sur la concentration en sels et la température des solutions. Après incubation, les couvre-objets sont d'abord rincés dans le SSC 4X, puis incubés deux fois dans le SSC 2X à température ambiante et une fois dans le SSC 2X + ARNase (20mg/ml) à 37°C. Deux lavages dans le SSC 0.1X (42°C) et un lavage dans le SSC 2X à température ambiante terminent l'étape de posthybridation.

Après lavage dans le tampon Tris HCl pH 7.5 100 mM, NaCl 150 mM, les lamelles sont incubées avec l'anticorps anti-digoxigénine couplé à la phosphatase alcaline pendant 2-4h à température ambiante. Après incubation, les cellules sont lavées deux fois par le même tampon puis incubées dans le tampon Tris pH 9.5 100 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 50 mM et la solution de coloration (NBT 4.4%, BCIP 3.33%, levamisol 0.24 mg/ml) à l'obscurité une nuit à température ambiante. Le lendemain, les couvre-objets sont rincés dans l'eau distillée avant leur montage sur lame dans le Daco (Prosan).

9. PREPARATION DES ECHANTILLONS POUR LA MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

9.1 MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION

Les cellules sont fixées 1h à 4°C par de la glutaraldéhyde à 2.5% dans du tampon cacodylate de sodium 0.1M CaCl₂ 0.1% (pH 7.4). La fixation est suivie de trois rinçages (10 min à 4°C) dans le tampon cacodylate, puis les cellules sont postfixées en présence de tétr oxyde d'osmium à 1% pendant 30 minutes à 4°C. Trois nouveaux rinçages dans les mêmes conditions que celles décrites ci-dessus sont alors effectués avant la déshydratation dans des solutions à concentration croissante d'éthanol.

Les cellules sont incubées une nuit dans un dessiccateur en présence d'un mélange éthanol/Epon (v/v), puis deux fois 1h30 min à 37°C dans de l'Epon pur. La polymérisation s'effectue en présence d'Epon à 37°C pendant les premières 24h, puis à 45°C encore pendant 24h et enfin à 60°C pendant 48h. Les coupes ultrafines sont réalisées perpendiculairement par rapport à la surface de culture et contrastées par l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb avant leur observation à 60 kV dans un microscope Philips EM 301.

9.2 MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE

Les étapes de fixation et de rinçages s'effectuent de la même manière que pour la microscopie à transmission. Les lamelles couvre-objets portant les cellules passent ensuite dans de l'acétone 25%, 50%, 70%, 95%, puis 100%.

Une fois déshydratées, les cellules sont séchées par passage dans du CO₂ au point critique et les échantillons collés sur un support à l'aide d'une colle à l'argent sont finalement ombrés à l'or. L'observation est réalisée dans un microscope Philips XL20.

RESULTATS

1. ANALYSE MORPHOLOGIQUE DES KERATINOCYTES EPIDERMiques HUMAINS EN CULTURE AUTONOME OU EN PRESENCE D'EGF A SOUS-CONFLUENCE ET A CONFLUENCE, DANS UN MILIEU A FAIBLE CONCENTRATION EN CALCIUM (0.09 mM) OU DANS UN MILIEU A CONCENTRATION EN CALCIUM ELEVEE (1.5 mM)

1.1 ANALYSE DES CONDITIONS DE CULTURE

Les kératinocytes épidermiques sontensemencés ($5-10 \times 10^3$ cellules/cm²) dans du milieu complet. Lorsque les cellules recouvrent environ 50% de la surface disponible pour leur croissance, le milieu complet est remplacé par le même milieu mais ne contenant aucun facteur peptidique exogène, ou contenant de l'EGF. La sous-confluence est caractérisée par la prolifération des kératinocytes (ils occupent alors environ 60-80% de la surface disponible). La confluence est caractérisée par l'occupation de l'entièreté de la surface disponible par les cellules, par l'arrêt de la prolifération cellulaire et par un début de stratification.

La culture des kératinocytes en milieu complet (fig. 1a) permet la formation de colonies à partir des cellules isolées.

La culture autonome montre à sous-confluence en microscopie à contraste de phase (fig. 1.b) des kératinocytes de forme allongée et aux pourtours réfringents. Les mitoses sont fréquentes. En microscopie électronique à transmission (fig. 2a), les contacts intercellulaires apparaissent lâches avec seulement quelques interdigitations. Quelques hémidesmosomes attachent les kératinocytes à leur support. A confluence (fig. 1d), la morphologie cellulaire est différente : les kératinocytes montrent une forme polyédrique et leurs contours cellulaires ne sont plus réfringents et apparaissent jointifs les uns aux autres. Les mitoses sont rarement visibles. En microscopie électronique, les kératinocytes montrent une stratification et des contacts cellulaires beaucoup plus étroits (fig. 2b et 3a), avec la formation de desmosomes (fig. 2b).

Quand la culture est réalisée en présence d'EGF (fig. 1c), les kératinocytes à sous-confluence, ne montrent pas de différences morphologiques majeures par rapport aux kératinocytes cultivés de façon autonome. Lorsque la culture maintenue en présence d'EGF atteint la confluence (fig. 1e), les kératinocytes gardent leur forme oblongue et leur halo réfringent et ils apparaissent moins jointifs que les cellules des cultures autonomes. En microscopie électronique (fig. 2d et 3c), les kératinocytes montrent des jonctions lâches, semblables à ce que l'on observe dans une culture autonome à sous-confluence.

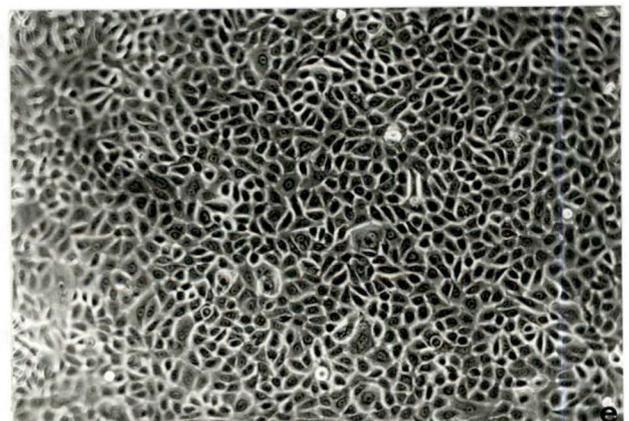
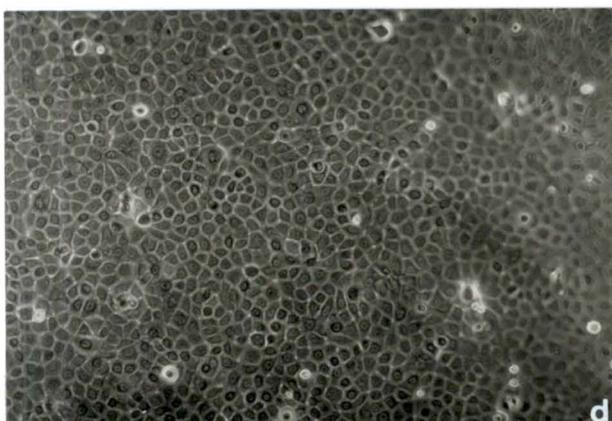
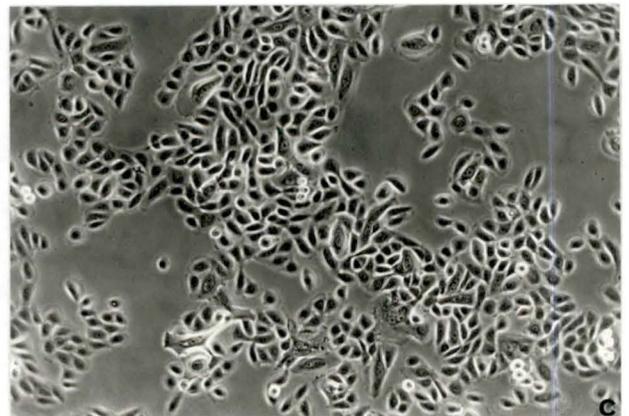
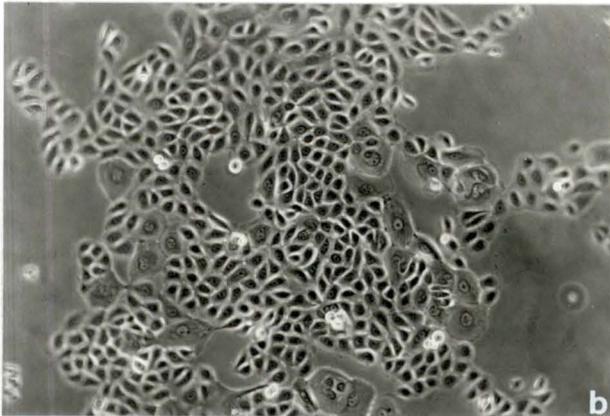
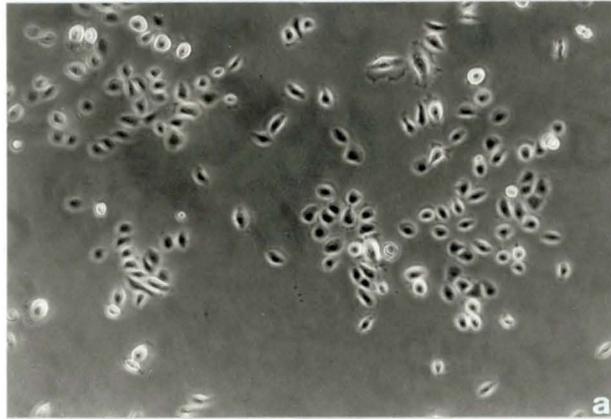


Figure 1. Aspect en microscopie optique à contraste de phase des cultures de kératinocytes épidermiques ($5000 \text{ cellules/cm}^2$) dans un milieu à 0.09 mM en calcium extracellulaire. **a** : aspect de la culture en milieu complet 3 jours après ensemencement des cellules, **b** et **d** : culture autonome à sous-confluence (soit 7 jours après ensemencement) et à confluence (soit 13 jours après ensemencement), **c** et **e** : culture supplémentée en EGF à sous-confluence et à confluence, $G=71X$.

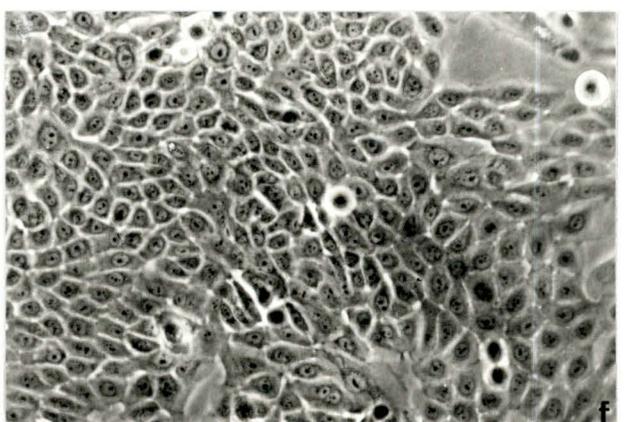
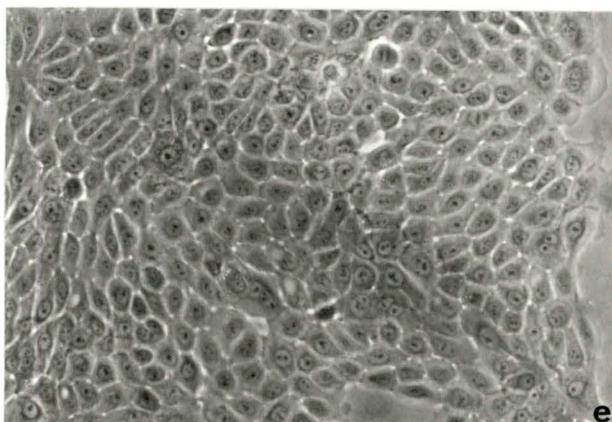
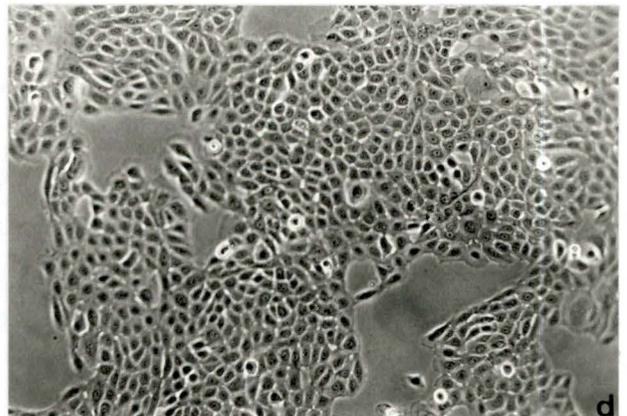
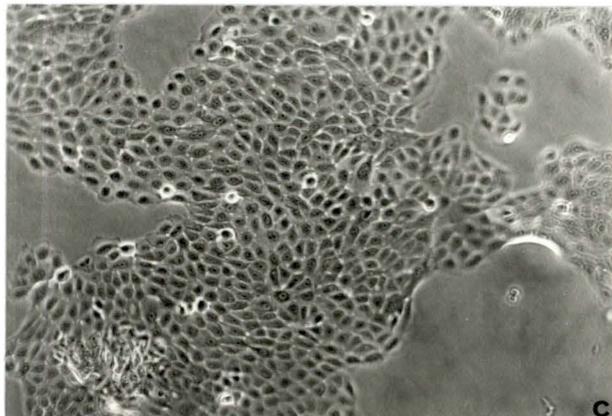
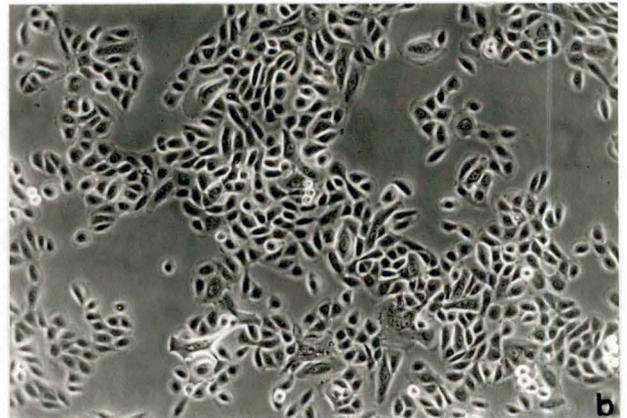
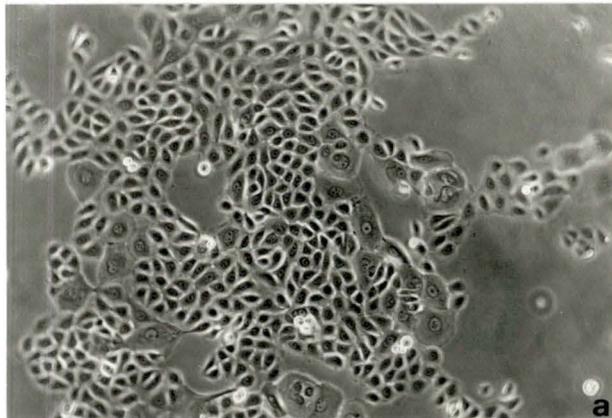


Figure 4. Aspect en microscopie optique à contraste de phase des cultures de kératinocytes épidermiques (5000 cellules/cm²) à sous-confluence en culture autonome et à 0.09 mM en calcium extracellulaire (**a**, G=71X) et à 1.5 mM en calcium extracellulaire (**c**, G=71X et **e**, G=142X); **b**, **d** et **f** : aspect à sous-confluence de la culture supplémentée en EGF (5 ng/ml) à 0.09 mM en calcium extracellulaire (**b**, G=71X) et à 1.5 mM en calcium extracellulaire (**d**, G=71X et **f**, G=142X)

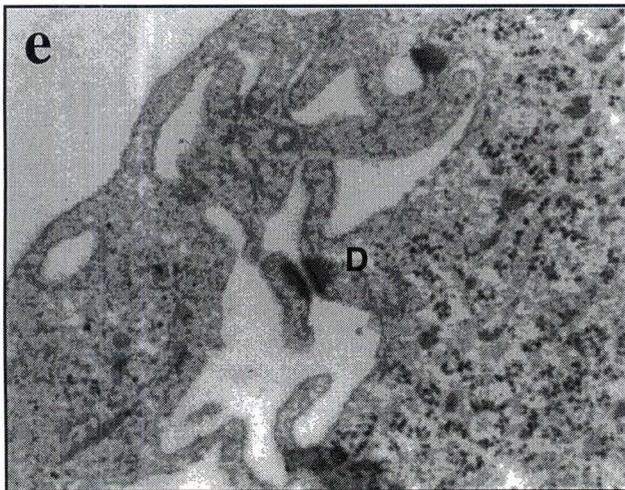
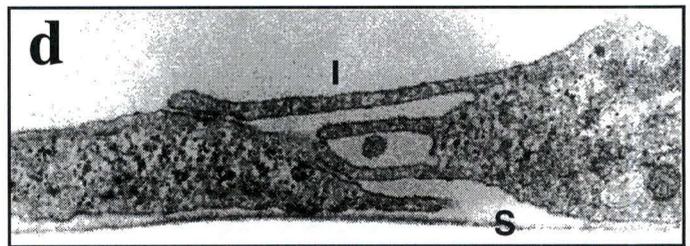
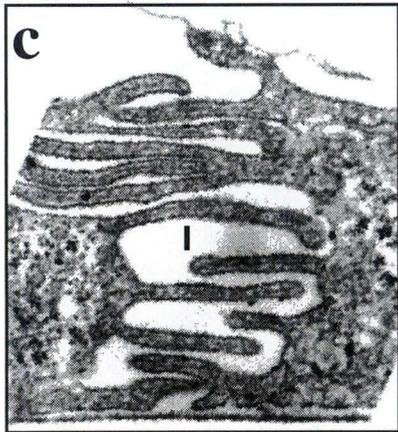
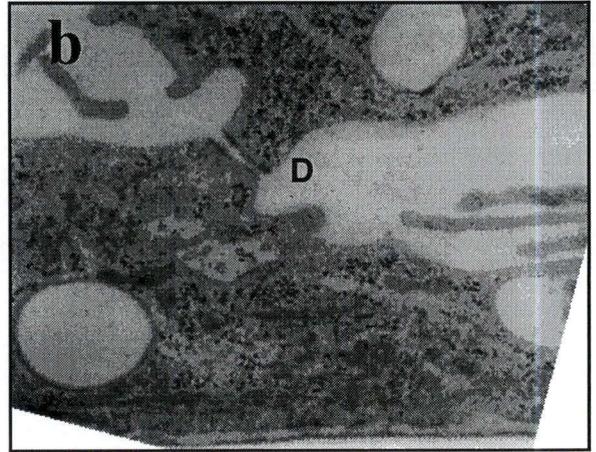
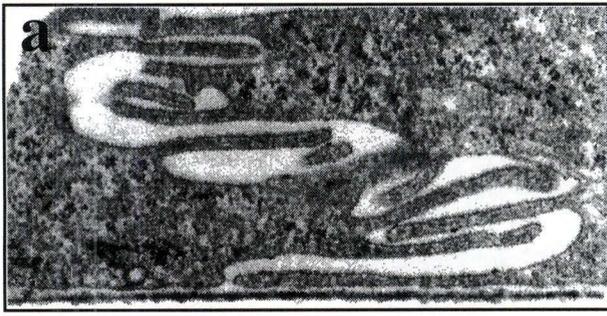


Figure 2 : Aspect en microscopie électronique à transmission de kératinocytes épidermiques cultivés à sous-confluence et à confluence en absence d'EGF (a et b) et en présence d'EGF 5 ng/ml (c et d) dans un milieu à 0,09 mM en calcium extracellulaire (G= 60000X). e : aspect de kératinocytes cultivés à sous-confluence en absence d'EGF dans un milieu à 1,5 mM en calcium extracellulaire (G= 78000X). D= desmosome, I= interdigitation, S= support

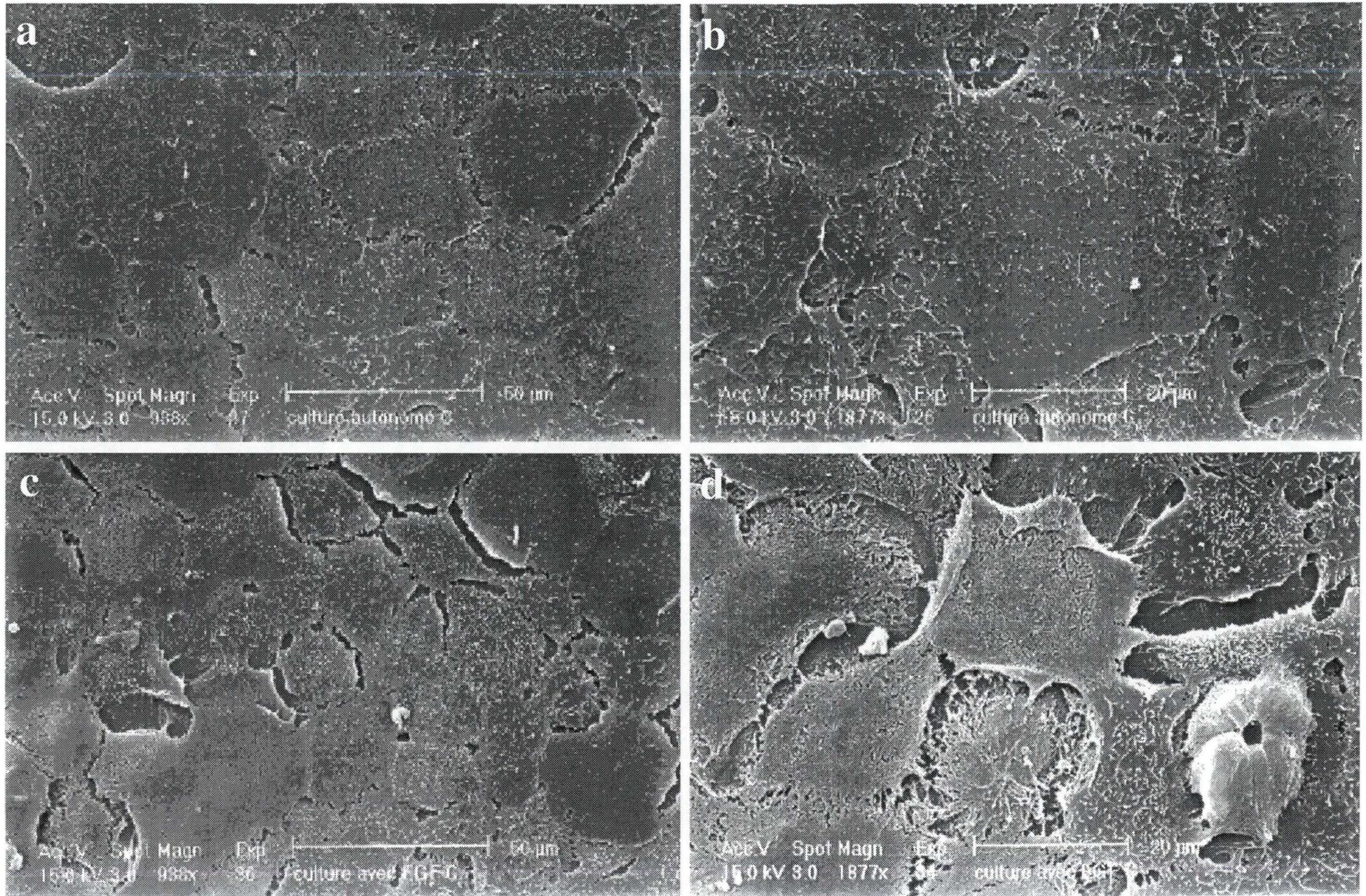


Figure 3 : Aspect en microscopie électronique à balayage de cultures confluentes de kératinocytes épidermiques en croissance autonome (a et b) et incubées en présence d'EGF (5 ng/ml) (c et d).

La culture autonome en concentration élevée en calcium extracellulaire (1.5 mM) montre à sous-confluence (fig. 4c) des kératinocytes rassemblés les uns à côté des autres qui montrent (fig. 4e) déjà des ponts d'union. Les pourtours des colonies sont plus réguliers que ceux des colonies obtenues en culture autonome à faible concentration en calcium et on n'observe plus de cellules isolées. En microscopie électronique (fig. 2e), les kératinocytes montrent une tendance à se stratifier et de nombreux desmosomes relient les cellules. Les ions calcium en concentration supérieure à 1 mM favorisent en effet l'aggrégation cellulaire par la formation de desmosomes, mais aussi par l'interaction de molécules adhésives comme la E-cadhérine. A confluence, la morphologie de la culture reste semblable à celle de la sous-confluence (résultats non montrés).

Enfin, la culture en présence d'EGF et à forte concentration en calcium extracellulaire (fig. 4d) montre les mêmes caractéristiques que la culture autonome à forte concentration en calcium, mais les contours cellulaires sont réfringents. Malgré l'établissement de quelques ponts d'union (fig. 4f), l'EGF semble contrecarrer l'établissement de jonctions entre les kératinocytes et s'oppose donc à l'effet produit par le calcium. Nous avons observé un résultat identique à confluence (résultats non montrés).

2. MARQUAGES IMMUNOCYTOCHIMIQUES DES INTEGRINES , DE LA E-CADHERINE ET DE LA KERATINE 10 DANS UN MILIEU DE CULTURE A FAIBLE CONCENTRATION EN CALCIUM EXTRACELLULAIRE (0,09 mM)

Afin d'étudier la répartition de molécules d'adhésion épidermiques de la famille des intégrines ($\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ et $\alpha 6\beta 4$) et des cadhérines (E-cadhérine), nous avons réalisé des marquages immunocytochimiques sur des kératinocytes cultivés dans les conditions décrites ci-dessus.

2.1 LES INTEGRINES DE TYPE $\beta 1$

Les figures 5a, e et 6a illustrent respectivement les localisations des sous-unités d'intégrines $\alpha 2$, $\alpha 3$ et $\beta 1$ dans des kératinocytes épidermiques à sous confluence.

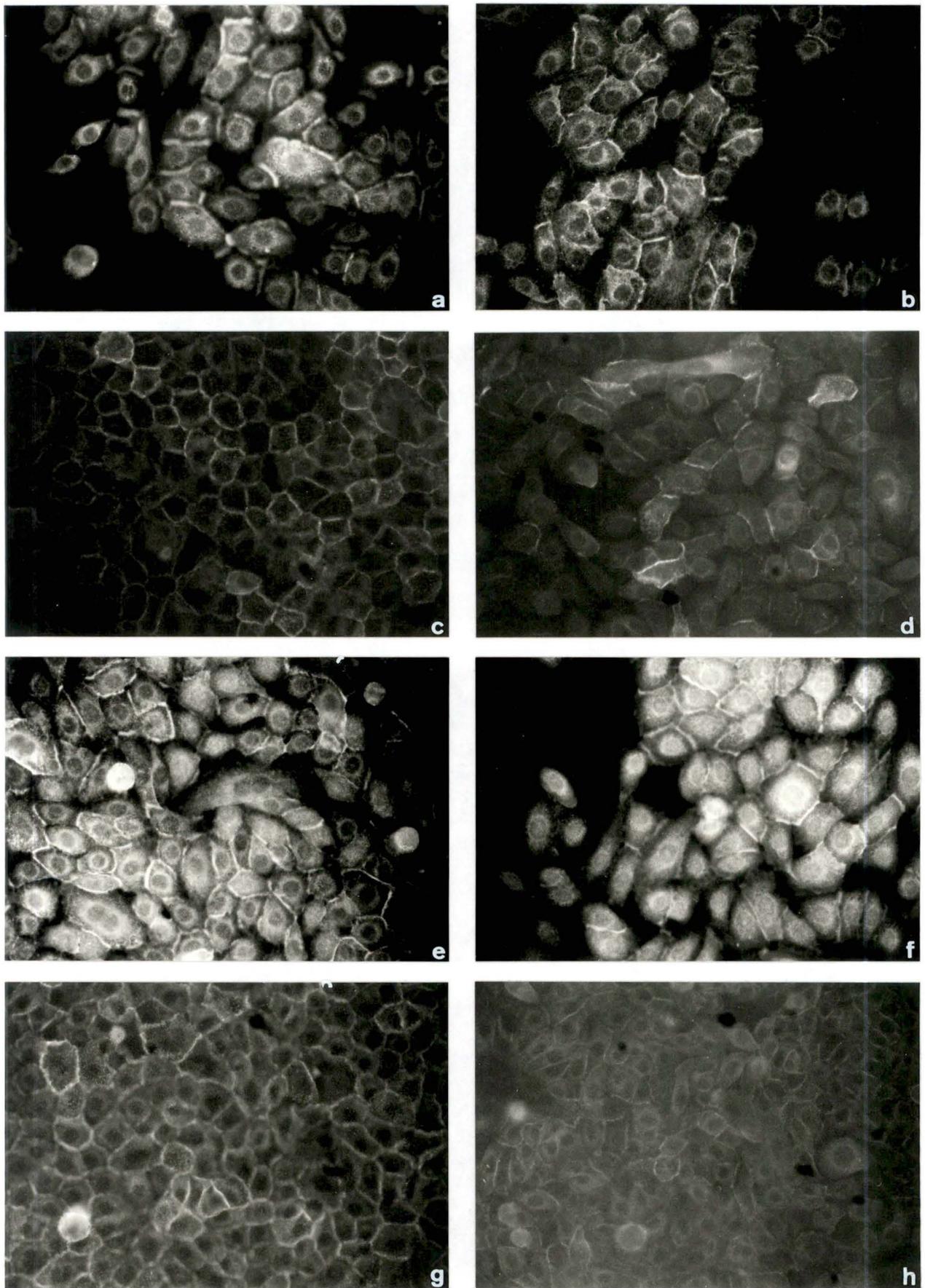


Figure 5. Marquages en immunofluorescence de la sous-unité d'intégrine $\alpha 2$ sur des kératinocytes sous-confluents (a) et confluents (c) en culture autonome et en culture supplémentée en EGF (5 ng/ml) à sous-confluence (b) et à confluence (d). Marquages de la sous-unité d'intégrine $\alpha 3$ sur des kératinocytes sous-confluents (e) et confluents (g) en culture autonome et en culture supplémentée en EGF à sous-confluence (f) et à confluence (h). Concentration en calcium extracellulaire = 0.09 mM. G=222X

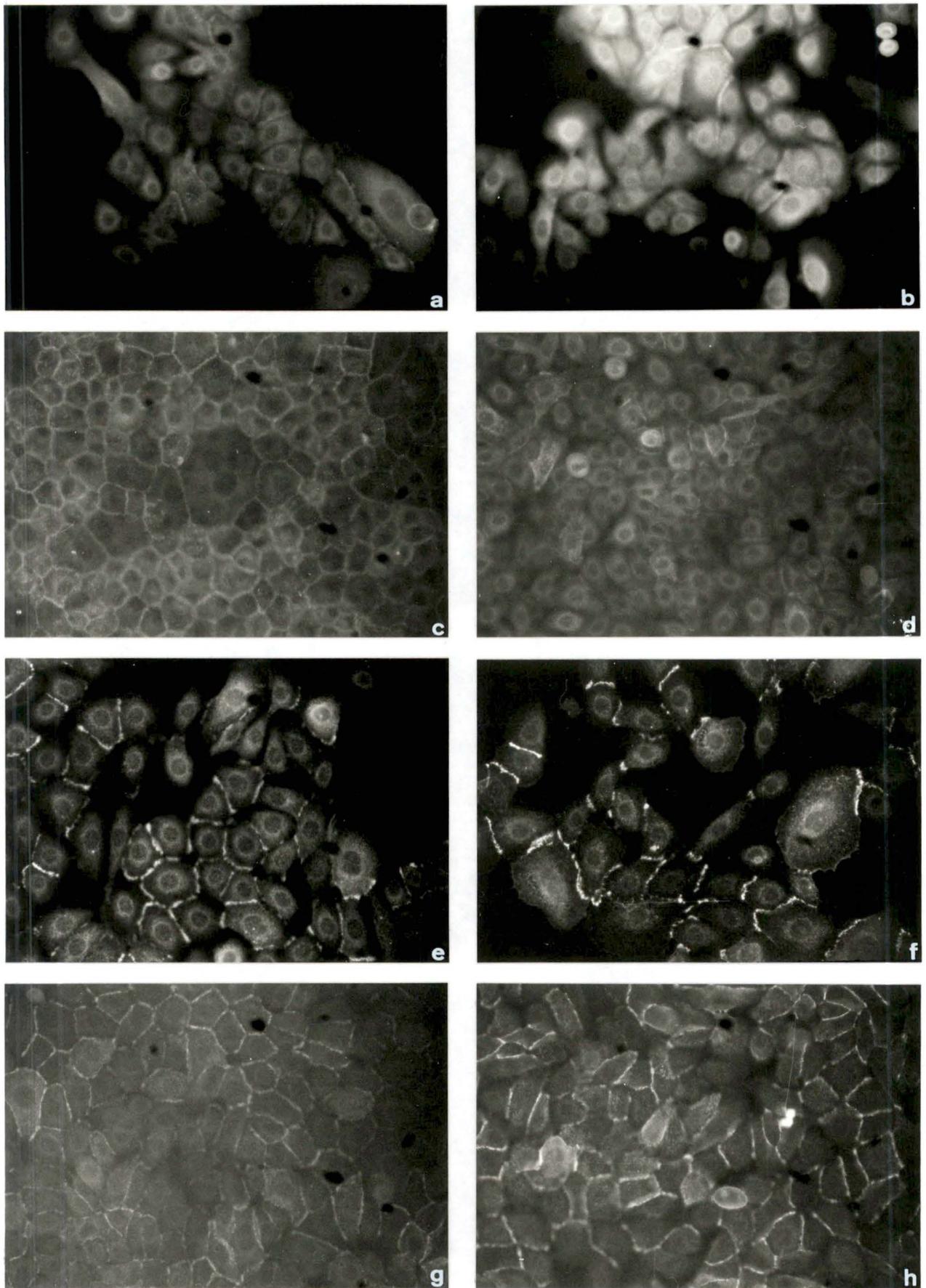


Figure 6. Marquages en immunofluorescence de la sous-unité d'intégrine $\beta 1$ sur des kératinocytes sous-confluents (a) et confluents (c) en culture autonome et en culture supplémentée en EGF (5 ng/ml) à sous-confluence (b) et à confluence (d). Marquages de la E-cadhérine sur des kératinocytes sous-confluents (e) et confluents (g) en culture autonome et en culture supplémentée en EGF à sous-confluence (f) et à confluence (h). Concentration en calcium extracellulaire = 0.09 mM. G = 222X

Dans les trois cas, nous observons ces sous-unités en position intercellulaire sur la plupart des cellules et nous notons également une localisation intracellulaire. Cette dernière correspond probablement à la fois à la synthèse des précurseurs et à l'internalisation des intégrines. Ces résultats correspondent avec des observations réalisées par Ryyänen *et al.* (1991) sur la distribution d'intégrines $\beta 1$ dans des kératinocytes cultivés dans un milieu sans sérum à faible concentration en calcium et en présence d'EGF (localisation périnucléaire et aux sites de contact intercellulaire). Par ailleurs, Symington *et al.* (1993) ont plus récemment démontré un rôle possible dans l'adhésion intercellulaire pour les intégrines $\alpha 2\beta 1$ et $\alpha 3\beta 1$.

La localisation à confluence des mêmes sous-unités (fig. 5c, g et 6c) se généralise à l'ensemble des cellules, mais il ne semble plus y avoir de présence intracytoplasmique importante, ce qui suggère que la synthèse de ces intégrines est alors ralentie.

Dans un milieu de culture contenant l'EGF (fig. 5b, f et 6b), à sous-confluence des kératinocytes, la répartition des intégrines ne semble pas évoluer par rapport aux conditions de culture autonome. Ces résultats correspondent avec les observations de la morphologie des cultures en présence d'EGF. A confluence (fig. 5d, h et 6d), le marquage n'est localisé que sur quelques cellules au niveau des contacts intercellulaires. Les kératinocytes cultivés dans ce type de milieu n'établissent que peu de contacts intimes entre eux (ce qui pourrait expliquer la faible détection des intégrines $\alpha 2\beta 1$ et $\alpha 3\beta 1$).

Nous avons également étudié à sous-confluence et à confluence, dans les deux types de milieu, la localisation de la sous-unité d'intégrine $\alpha 5$. Les résultats obtenus (non montrés) correspondent avec ceux détaillés ci-dessus pour les sous-unités $\alpha 2$, $\alpha 3$ et $\beta 1$.

2.2 L'INTEGRINE $\alpha 6\beta 4$

La localisation des sous-unités $\alpha 6$ et $\beta 4$ est illustrée à la figure 7. A sous-confluence, dans les cultures autonomes, comme dans les cultures en présence d'EGF (fig. 7a, b, e et f) on peut observer une polarisation de l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ déjà rapportée par de nombreux auteurs (Ryyänen *et al.*, 1991; Carter *et al.*, 1990) vers une face latérale des kératinocytes. Cette polarisation est présente sur le pôle basal des kératinocytes et suggère une mobilité cellulaire dirigée dans le sens opposé de la polarisation. La caractéristique du marquage d' $\alpha 6\beta 4$ est la présence de spicules qui, selon Ryyänen *et al.* (1991), rappelle l'expression préférentielle de l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ au niveau des projections microvilleuses du pôle basal des cellules basales de l'épiderme. Par rapport aux intégrines de type $\beta 1$, l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ ne présente qu'un faible marquage intracellulaire à sous-confluence. Ceci pourrait suggérer que le pool intracellulaire de l' $\alpha 6\beta 4$ est relativement faible dans ces conditions (Ryyänen *et al.*, 1991).

A confluence, les kératinocytes cultivés de façon autonome (fig. 7c et g), montrent un marquage de l' $\alpha 6\beta 4$ où la polarisation latérale semble avoir disparu (pour la sous-unité $\alpha 6$) ou être atténué (pour la sous-unité $\beta 4$). En effet, les kératinocytes à confluence sont tassés les uns sur les autres, ce qui ralentit certainement la mobilité cellulaire et pourrait expliquer la diminution de cette polarisation. La localisation intercellulaire de l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ sur les illustrations des

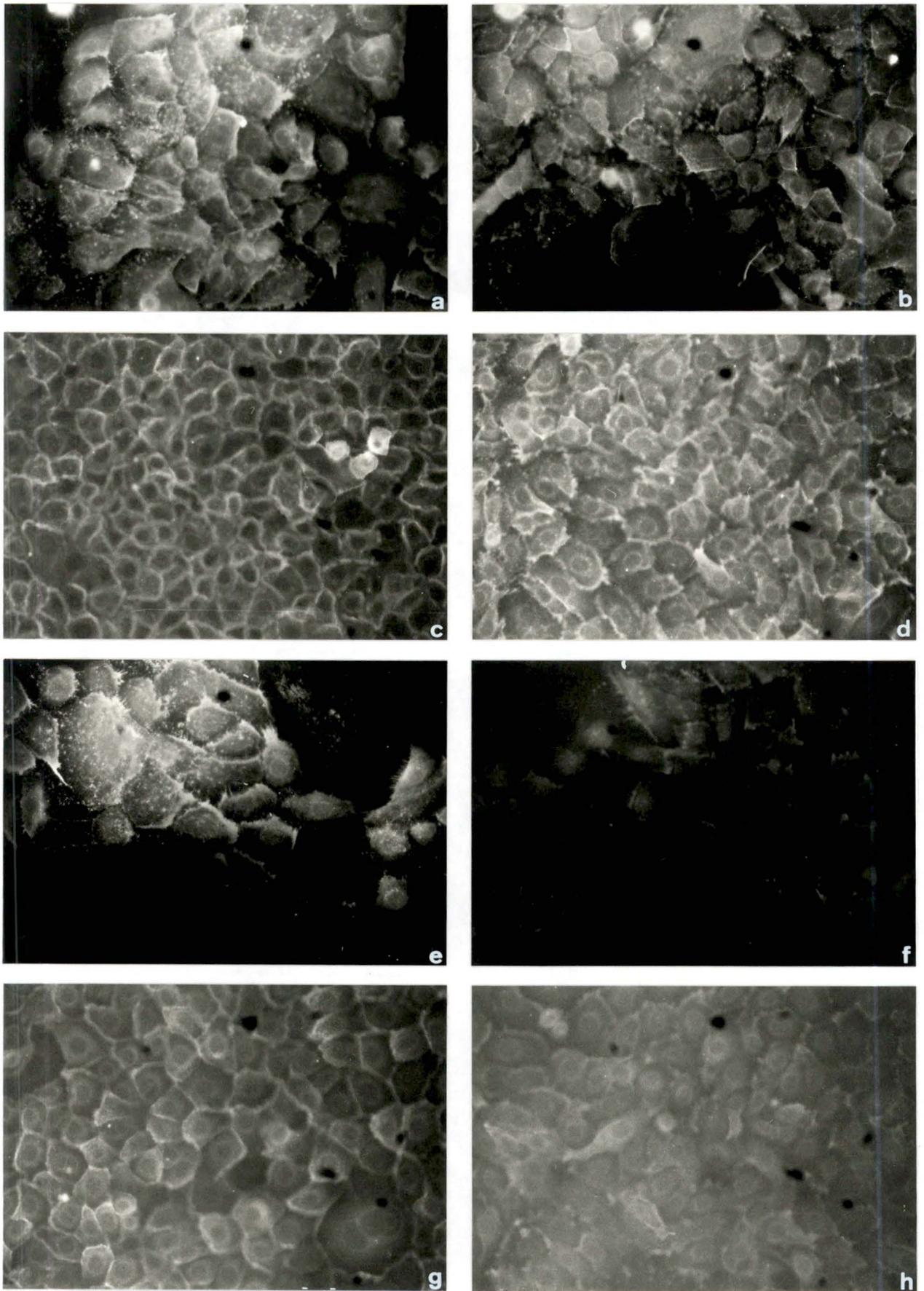


Figure 7. Marquages en immunofluorescence de la sous-unité d'intégrine $\alpha 6$ sur des kératinocytes sous-confluents (a) et confluents (c) en culture autonome et en culture supplémentée en EGF (5 ng/ml) à sous-confluence (b) et à confluence (d). Marquages de la sous-unité d'intégrine $\beta 4$ sur des kératinocytes sous-confluents (e) et confluents (g) en culture autonome et en culture supplémentée en EGF à sous-confluence (f) et à confluence (h). Concentration en calcium extracellulaire = 0.09 mM. G=222X

cultures menées à confluence résulte d'une mise au point microscopique ne permettant pas la visualisation de cette intégrine sur la face basale des kératinocytes basaux.

Le marquage de l' $\alpha 6 \beta 4$ dans les kératinocytes confluent cultivés en présence d'EGF (fig. 7d et h) montre l'existence de la polarisation latérale. L'EGF, agissant comme facteur favorisant la mobilité cellulaire (Barrandon et Green 1987) permet probablement aux kératinocytes même confluent de se mouvoir plus librement (ce qui expliquerait la polarisation).

2.3 LA E-CADHERINE

Les figures 6e et f représentent la localisation de la E-cadhérine à sous-confluence. Nous pouvons observer que dans une culture autonome (fig. 6e), comme dans une culture en présence d'EGF (fig. 6f) à faible concentration en calcium extracellulaire, la E-cadhérine est présente aux sites de contacts intercellulaires sur la quasi totalité des cellules. Cette observation est en contradiction avec celles de certains auteurs (Hodivala & Watt, 1994), où la E-cadhérine ne se localise aux zones de contact entre cellules que lorsque les kératinocytes sont mis en présence d'un milieu où la concentration en calcium extracellulaire est de 1.8 mM. Toujours selon ces auteurs, des kératinocytes cultivés selon Rheinwald et Green dans un milieu où la concentration en calcium extracellulaire est de 0.1 mM montrent un marquage diffus de la E-cadhérine et une co-localisation partielle de celle-ci avec des filaments d'actine dans les microvillosités. A cet égard, nos résultats mettent aussi en évidence une localisation cytoplasmique de la E-cadhérine.

A confluence, on observe très peu de différences entre les kératinocytes en culture autonome (fig. 6g) et ceux cultivés en présence d'EGF (fig. 6h) : le marquage de la E-cadhérine se généralise à la quasi totalité des cellules. Des études récentes menées par Hoschuetzky *et al.* (1994) ont démontré que l'EGF induit une phosphorylation immédiate de tyrosines sur la β -caténine et la plakoglobine grâce à une association entre le récepteur de l'EGF et le complexe caténine-cadhérine lorsque ce facteur est présent dans le milieu de culture cellulaire. Une conséquence possible de cette phosphorylation consiste en un désassemblage du complexe caténine-cadhérine empêchant par là l'établissement de contacts intercellulaires. Ces résultats pourraient expliquer nos observations dans les cultures incubées avec l'EGF où l'on détecte néanmoins la présence de E-cadhérine aux frontières entre les cellules. L'EGF en induisant une phosphorylation des caténines empêcherait l'interaction stable de celles-ci avec la E-cadhérine, mais la synthèse de la E-cadhérine et son transport en membrane aux sites de contacts intercellulaires ne seraient pas inhibés. Ceci expliquerait sa détection mais n'implique pas nécessairement que la E-cadhérine fonctionne comme molécule d'adhésion intercellulaire à ce moment. D'autres études menées par Bracke *et al.* (1995) ont démontré que suite à la phosphorylation de tyrosines sur la β -caténine, il se produit des modifications posttraductionnelles dans la E-cadhérine, ainsi qu'une régulation négative de la fonction cette protéine.

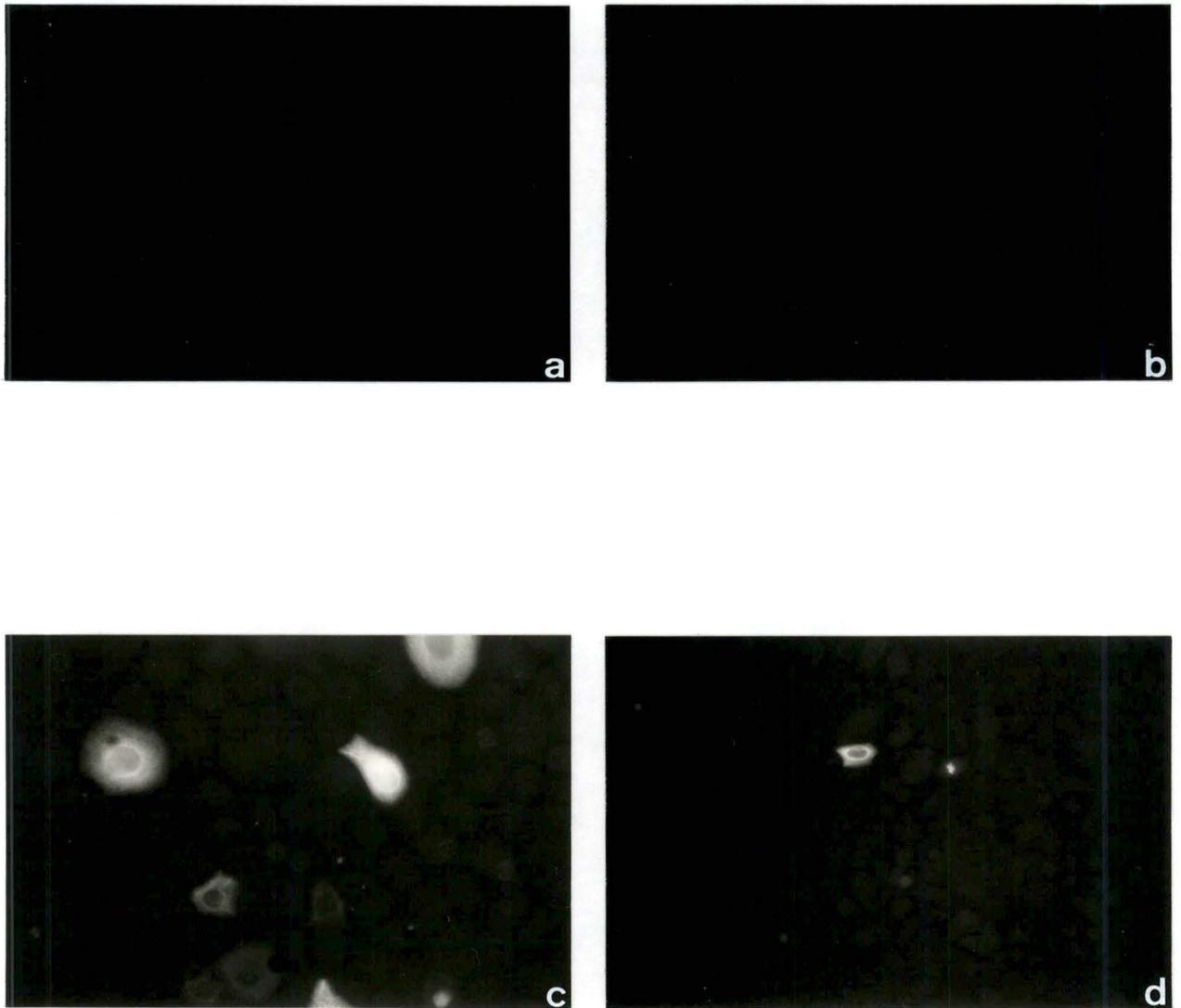


Figure 8. Marquages en immunofluorescence de la kératine 10 sur des kératinocytes en culture autonome à sous-confluence (**b**) et à confluence (**c**) et en culture supplémentée en EGF à confluence (**d**). Contrôle réalisé en absence d'anticorps primaire sur des kératinocytes confluents (**a**). G=222X

2.4 KERATINE 10 (K10)

Le marquage de la kératine suprabasale K10 dans des kératinocytes cultivés à sous-confluence dans un milieu sans EGF est illustré à la fig. 8b. Aucune détection de cette kératine n'a pu être observée, ce qui confirme les observations réalisées par Poumay et Pittelkow (1995) sur des kératinocytes de nouveau-nés. Cette observation est d'ailleurs confirmée par l'analyse de l'expression des kératines épidermiques dans nos expériences de Northern blot (voir § 4.1).

Le marquage des kératinocytes sous-confluents dans un milieu où l'EGF est présent (résultat non repris) ne montre aucune différence avec celui réalisé sur des cultures autonomes.

A confluence, en culture autonome (fig. 8c), le marquage de K10 est localisé dans le cytoplasme de certaines cellules. Ce marquage met en évidence les kératinocytes confluent en phase de différenciation terminale puisque la présence de la kératine 10 est un marqueur de la différenciation (Roop *et al.*, 1988). Nos résultats concernant la détection immunologique de K10 correspondent ici aussi à ceux obtenus par Poumay et Pittelkow (1995) qui ont observé ce marquage sur des cellules isolées ou groupées en petits amas et distribuées localement mais uniformément dans l'ensemble de la culture confluent. Ils ont également observé que ces cellules en différenciation ont une plus grande taille et une morphologie plus angulaire par rapport à la majorité des petits kératinocytes basaux n'exprimant pas K10, ce qui se confirme aussi dans nos expériences effectuées avec des cellules adultes.

Les kératinocytes confluent cultivés en présence d'EGF (fig. 8d) ne montrent qu'une très faible détection de la kératine 10, en accord avec le rôle inhibiteur de l'EGF sur l'expression de cette kératine (Poumay & Pittelkow, 1995 et résultats non publiés).

3. MARQUAGE DES INTEGRINES ET DE LA E-CADHERINE DANS UN MILIEU DE CULTURE A FORTE CONCENTRATION EN CALCIUM EXTRACELLULAIRE (1.5 mM)

Nous avons réalisé les expériences suivantes de marquage sur des cultures autonomes ou des cultures réalisées en présence d'EGF à sous-confluence.

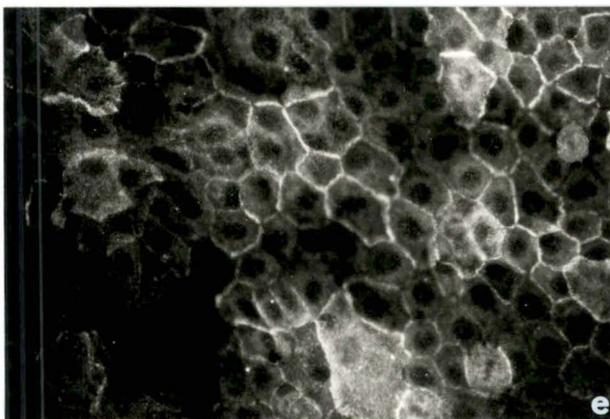
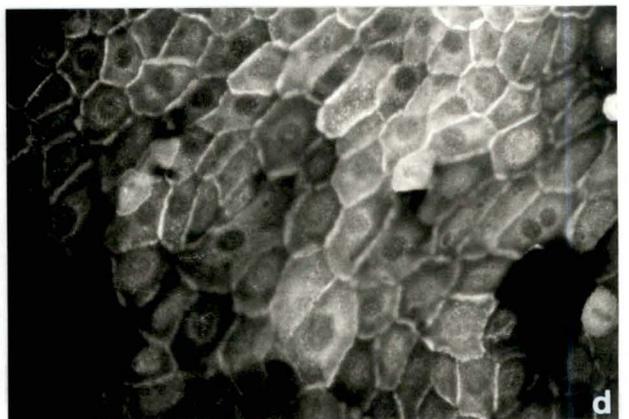
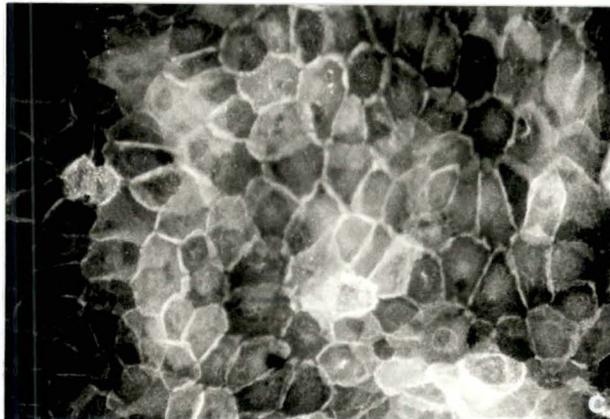
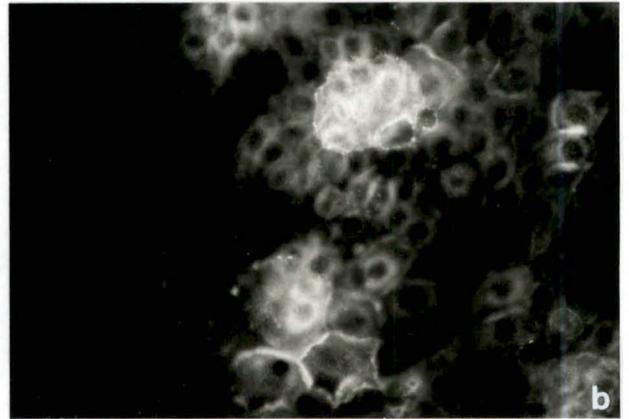
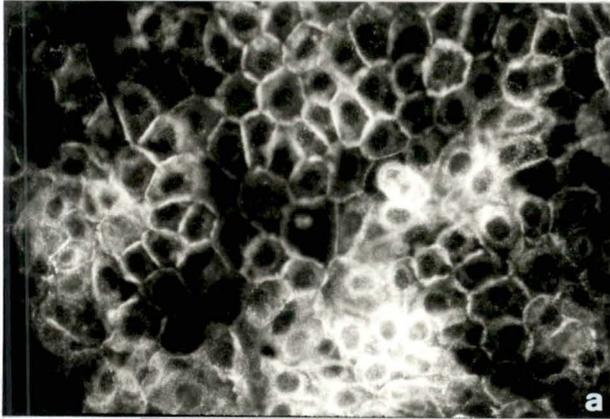


Figure 9. Marquages en immunofluorescence des sous-unités d'intégrine $\alpha 2$ et $\alpha 3$ sur des kératinocytes sous-confluents en culture autonome (a et c) et en culture supplémentée en EGF (5 ng/ml) (b et d). Marquages de la E-cadhérine sur des kératinocytes sous-confluents en culture autonome (e) et en culture supplémentée en EGF (f). Concentration en calcium extracellulaire = 1.5 mM. G=222X

3.1 LES INTEGRINES DE TYPE $\beta 1$

Les sous-unités d'intégrine $\alpha 2$ et $\alpha 3$ montrent en culture autonome une même distribution du marquage (fig. 9a et c). Celui-ci se localise au niveau des contacts intercellulaires et est aussi présent de façon non négligeable dans le cytoplasme. La localisation intercellulaire du marquage rappelle celle observée sur les mêmes sous-unités pour des kératinocytes confluents en croissance autonome dans un milieu à faible concentration en calcium (fig. 5c et g). Le rôle du calcium comme agent promoteur de l'aggrégation et de la stratification cellulaires semble clairement illustré. Dans ces conditions, les cellules établissent des contacts intercellulaires plus intimes peut-être via les intégrines $\alpha 2\beta 1$ et $\alpha 3\beta 1$. La présence du marquage intracytoplasmique que nous observons correspond vraisemblablement à une synthèse de nouvelles intégrines (comme le confirme l'analyse des ARN messagers dans ces mêmes conditions à la fig. 13b). Cette synthèse peut se comprendre comme une réponse des cellules à la nécessité de former des contacts intercellulaires plus nombreux.

Les kératinocytes cultivés en présence d'EGF (fig. 9b et d) montrent un marquage de la sous-unité $\alpha 2$ qui semble plus diffus que le marquage de la sous-unité $\alpha 3$ mais néanmoins localisé aux contacts intercellulaires et dans le cytoplasme de certains kératinocytes. Nous n'observons pas de variations significatives dans la localisation de ces deux sous-unités entre les cultures autonomes et les cultures où l'EGF est présent.

Ryynänen *et al.* (1991) ont observé que lorsque les kératinocytes cultivés à faible concentration en calcium (0.15 mM) sont mis en présence d'un milieu à plus forte concentration (1.2 mM), il se produit un transfert de la sous-unité $\beta 1$ vers la surface cellulaire et une localisation intercellulaire après 24-48 heures d'incubation. Ces auteurs rapportent une diminution du marquage intracytoplasmique de $\beta 1$ endéans les 48 heures et une perte des épitopes antigéniques aux sites de contacts intercellulaires après 72 heures. Nous n'observons pas ici de diminution dans le marquage intracellulaire d' $\alpha 2$ et $\alpha 3$. Cette différence pourrait s'expliquer par une incubation des kératinocytes dans le milieu à concentration élevée en calcium (1.5 mM) pendant seulement 24 heures.

3.2 LA E-CADHERINE

Le marquage de la E-cadhérine pour des kératinocytes cultivés en absence d'EGF est illustré à la fig. 9e et la stratification induite par le calcium est ici aussi bien visible. Le marquage est localisé aux contacts intercellulaires et dans le cytoplasme mais certaines cellules basales en sont totalement dépourvues. Dans ces cellules basales, d'autres molécules comme la P-cadhérine ou encore les desmoglénines et desmocollines pourraient prendre le relais de la E-cadhérine dans l'adhésion intercellulaire. Pour compléter nos observations, des études mises en oeuvre pour détecter la présence de ces molécules dans les mêmes conditions seraient nécessaires. Par rapport aux observations réalisées à faible concentration en calcium, la E-cadhérine se localise ici sur le pourtour de la plupart des cellules, ce qui semble indiquer un

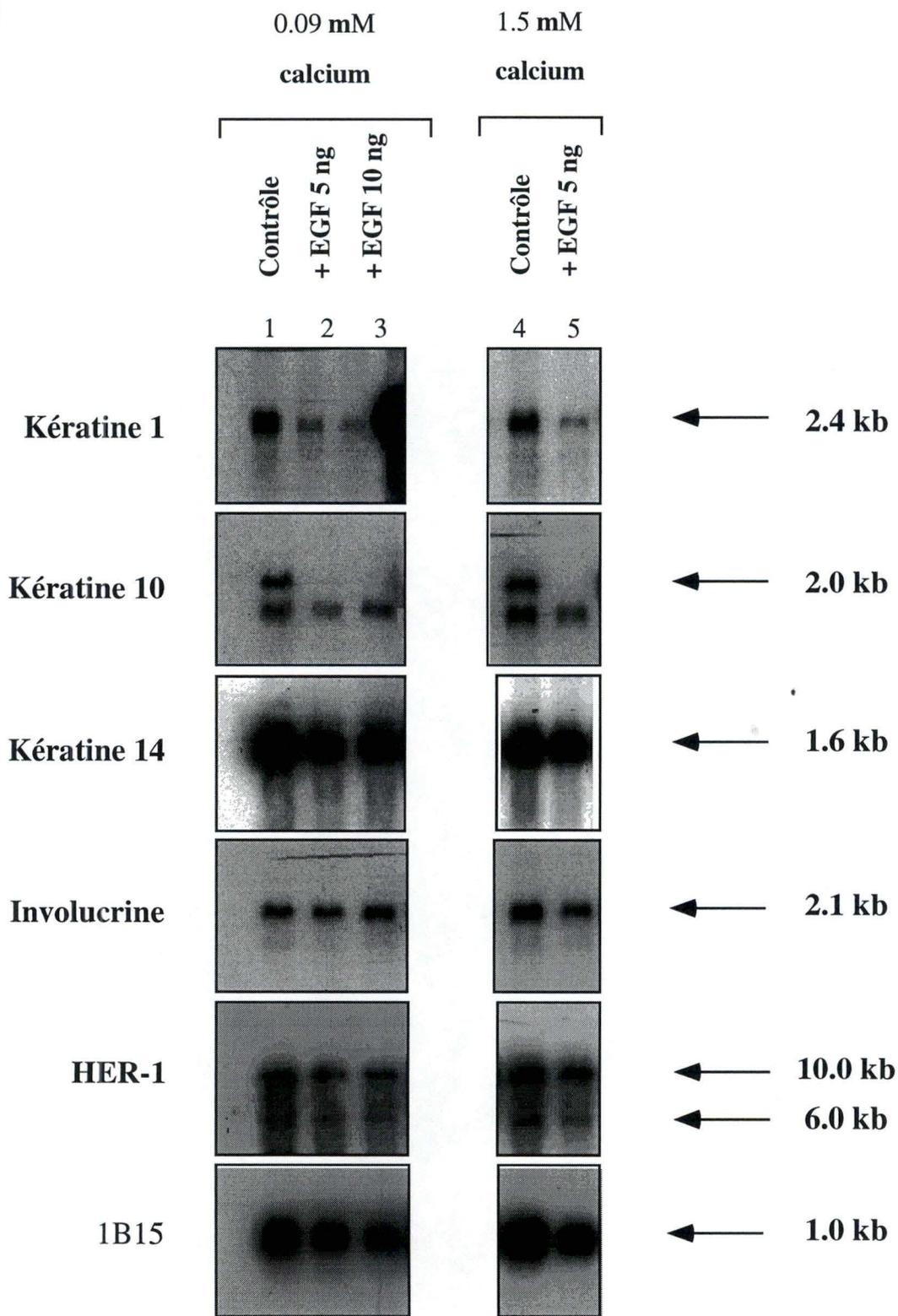


Figure 10 A : détection à sous-confluence de l'expression des kératines (1, 10 et 14) ainsi que de l'involucrine et du HER-1 par rapport à l'expression d'un gène rapporteur (1B15)

rôle dans l'adhésion intercellulaire des kératinocytes. La présence d'EGF dans le milieu de culture (fig. 9f) ne semble pas interférer avec cette localisation en accord avec nos expériences de northern blot (§ 4.4). On observe cependant une stratification moindre. L'EGF pourrait contrecarrer la stratification induite par le calcium, sans pour autant empêcher l'expression de la E-cadhérine ce qui permettrait d'expliquer leur localisation intercellulaire d'une part, mais aussi l'absence de stratification suite à la perte de contact avec le cytosquelette d'autre part.

4. ETUDE QUANTITATIVE DE L'EXPRESSION DES ARN MESSAGERS DES MOLECULES D'ADHESION (INTEGRINES ET E-CADHERINE) DANS DES CULTURES DE KERATINOCYTES EPIDERMiques HUMAINS ADULTES ET CULTIVES EN PRESENCE OU EN ABSENCE D'EGF A SOUS-CONFLUENCE ET A CONFLUENCE

4.1 ANALYSE DE L'EXPRESSION DES KERATINES SUPRABASALES K1 ET K10 ET DE LA KERATINE 14

Les kératines K1 et K10 sont des kératines suprabasales et sont considérées comme des marqueurs de la différenciation épidermique. Poumay et Pittelkow (1995) ont démontré que l'expression de ces deux kératines, très faible à sous-confluence, est induite lorsque des kératinocytes de nouveaux-nés atteignent la confluence. Les résultats que nous obtenons (fig 10a. et 11a) se rapprochent de ces observations. La figure 12 établie sur base de mesures densitométriques nous confirme cette tendance en illustrant quantitativement les variations d'expression des kératines lors du passage de la sous-confluence à la confluence. Les études réalisées par Poumay et Pittelkow (1995) ont également montré que l'EGF diminue l'expression de K1 et K10, ce que nous constatons aussi bien à faible qu'à forte concentration en calcium extracellulaire dans le milieu (fig. 10a, 11a et 10b, 11b). Le rôle du calcium induisant l'expression des kératines suprabasales et notamment l'expression de la kératine 1 n' apparaît pas dans nos expériences et reste controversé. Huff *et al.* (1993) ont démontré que dans un système de culture avec sérum l'augmentation du calcium extracellulaire en induisant la différenciation des kératinocytes produit une augmentation coordonnée de l'expression de K1. Mais par ailleurs, Drozdoff et Pledger (1993) ont montré que dans des kératinocytes murins cette même expression est indépendante du calcium.

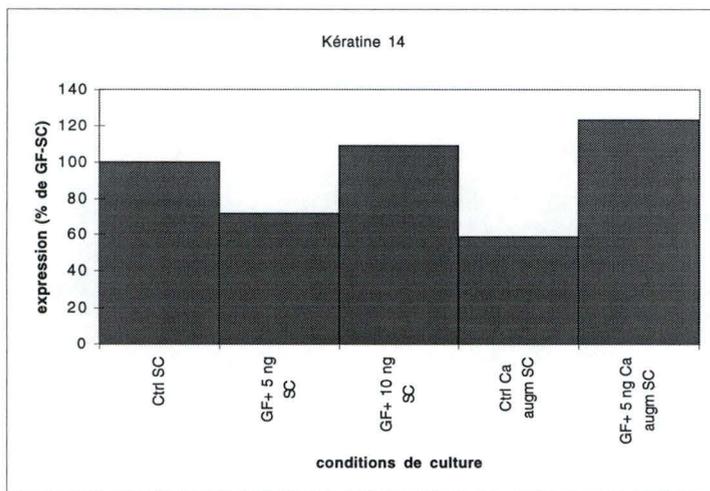
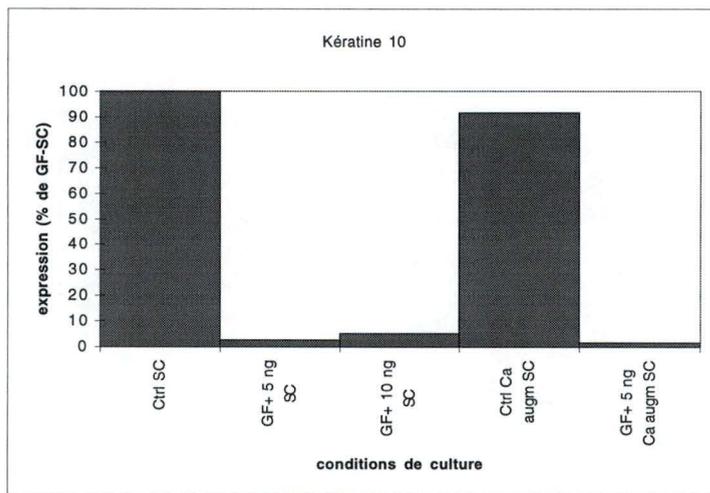
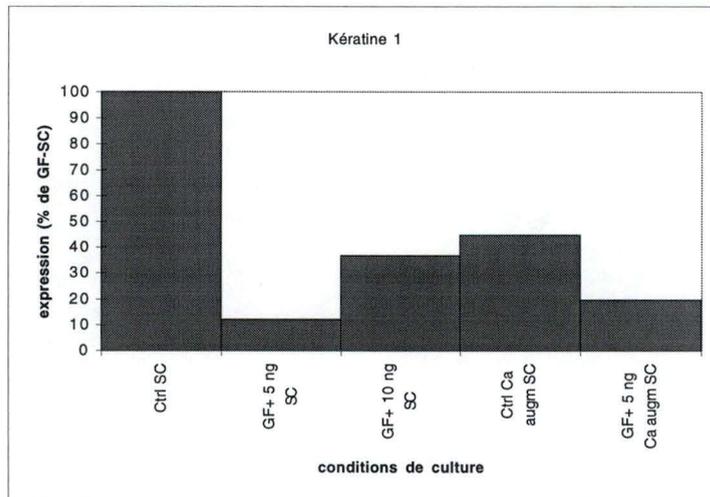


Figure 10b : Analyse densitométrique à sous-confluence de l'expression relative des kératines 1, 10 et 14 par rapport au contrôle (culture autonome sous-confluente) pour des kératinocytes cultivés à sous-confluence (SC) en présence d'EGF (5ng/ml; GF+) et/ou dans un milieu contenant une concentration augmentée en ions calcium (1,5 mM; Ca augm).

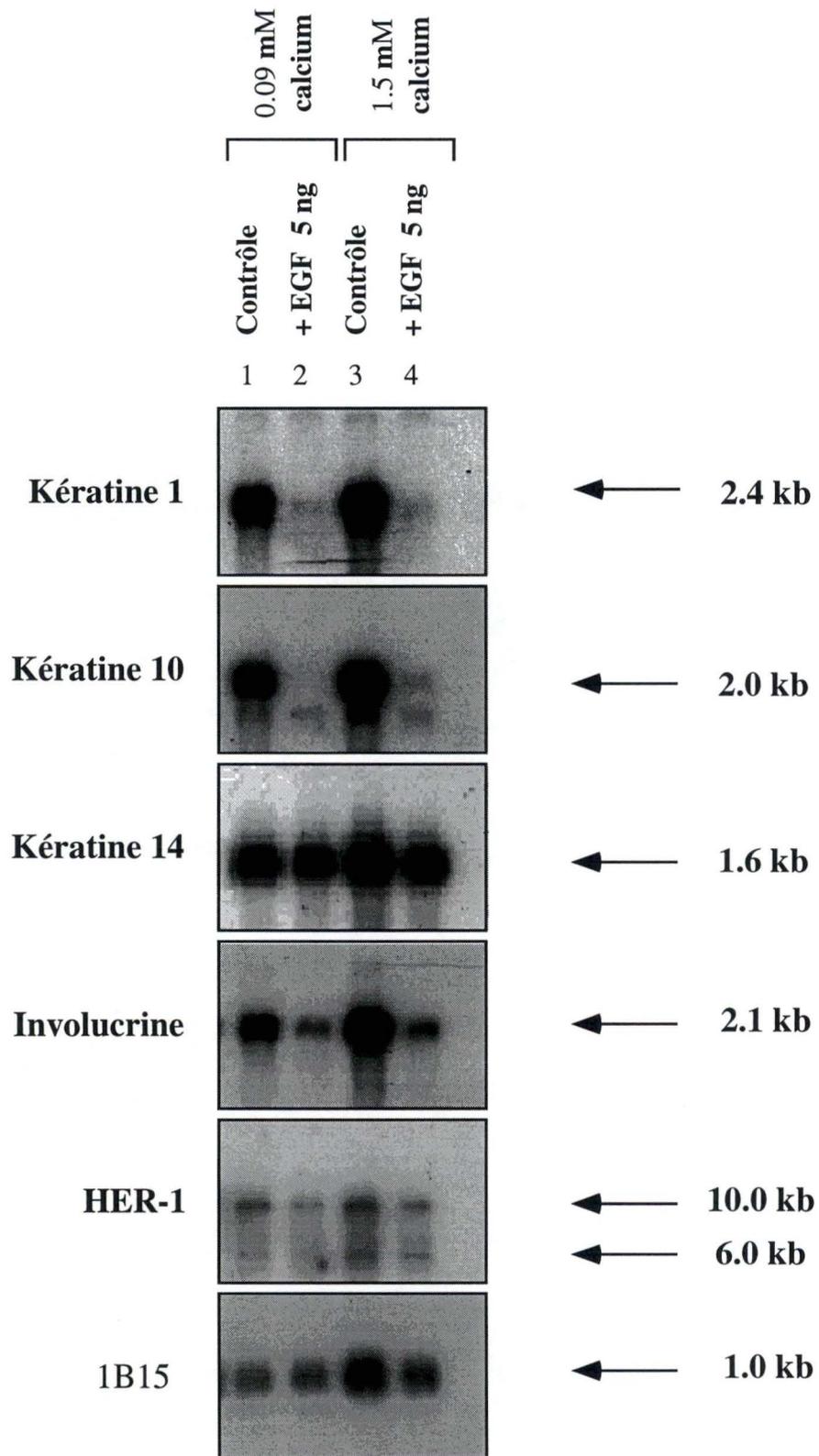


Figure 11 A : Détection à confluence de l'expression des kératines (1, 10 et 14) ainsi que de l'involucrine et du HER-1 par rapport à l'expression d'un gène rapporteur (1B15)

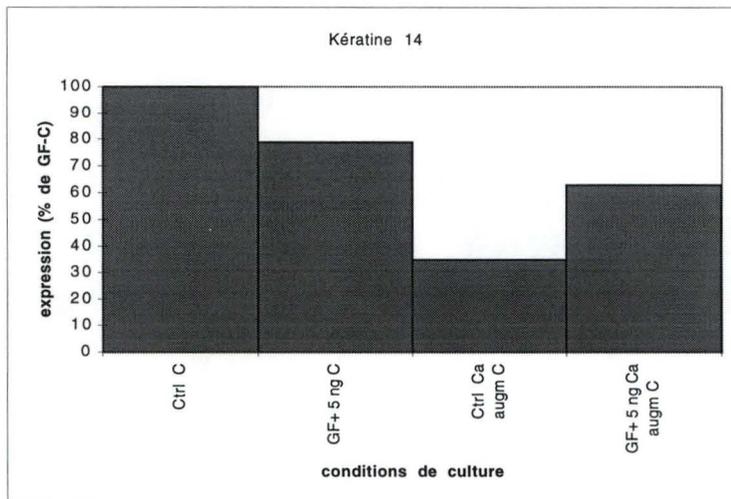
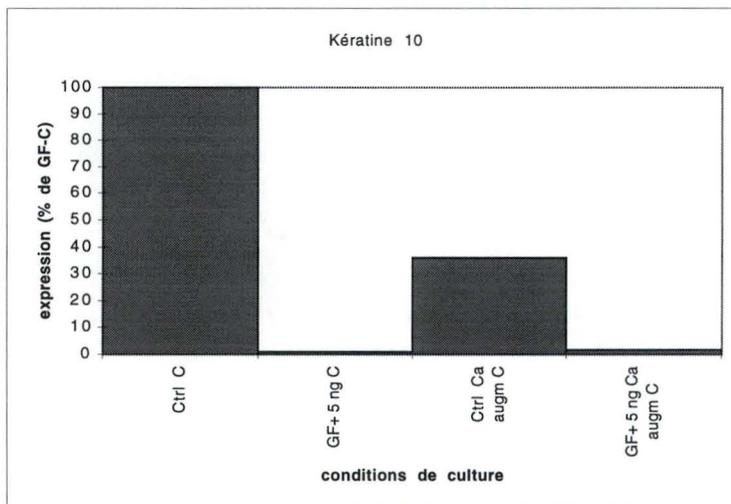
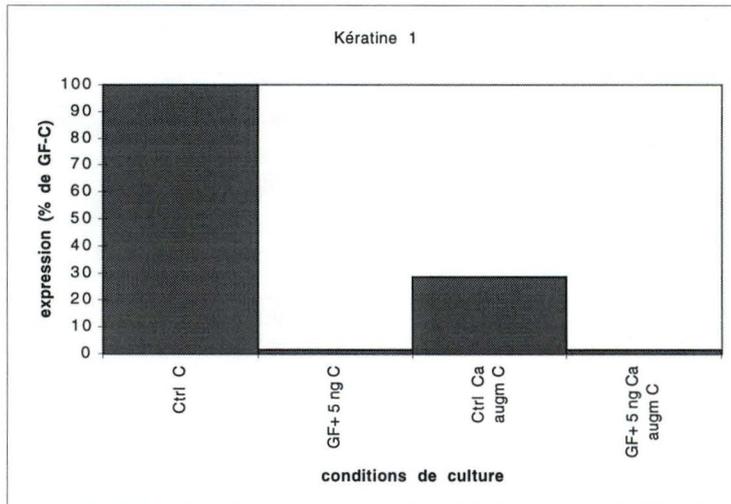


Figure 11 b : Analyse densitométrique à confluence (C) de l'expression relative des kératines 1, 10 et 14 par rapport au contrôle (culture autonome confluyente) pour des kératinocytes cultivés en présence d'EGF 5 ng/ml; GF+) et/ou dans un milieu contenant une concentration augmentée en ions calcium (1,5 mM; Ca augm)

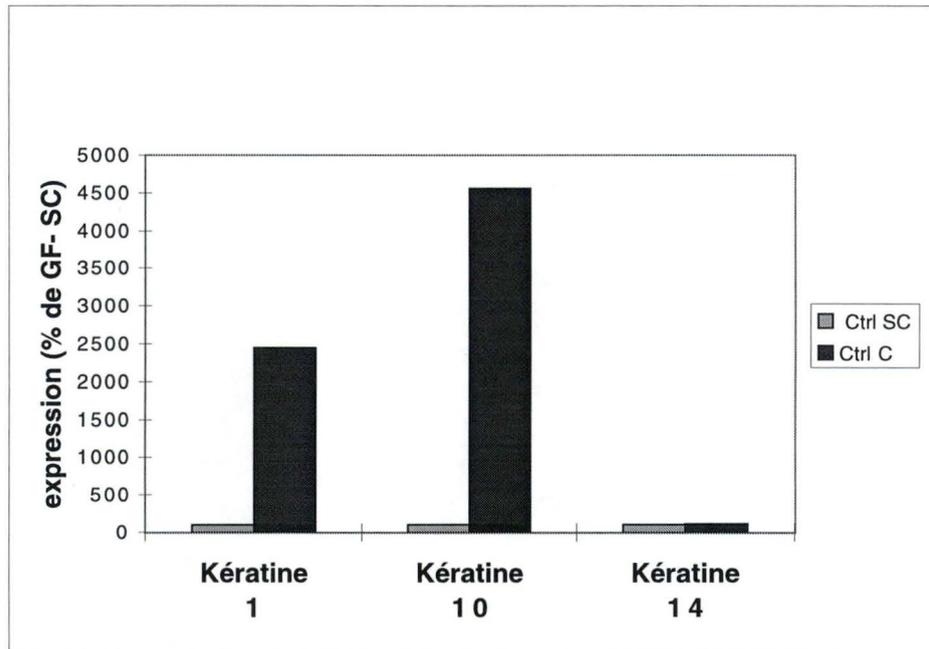


Figure 12 : Graphique comparatif de l'expression relative des kératines 1, 10 et 14 dans une culture autonome entre l'état de sous-confluence et celui de confluence (sur base des mesures densitométriques)

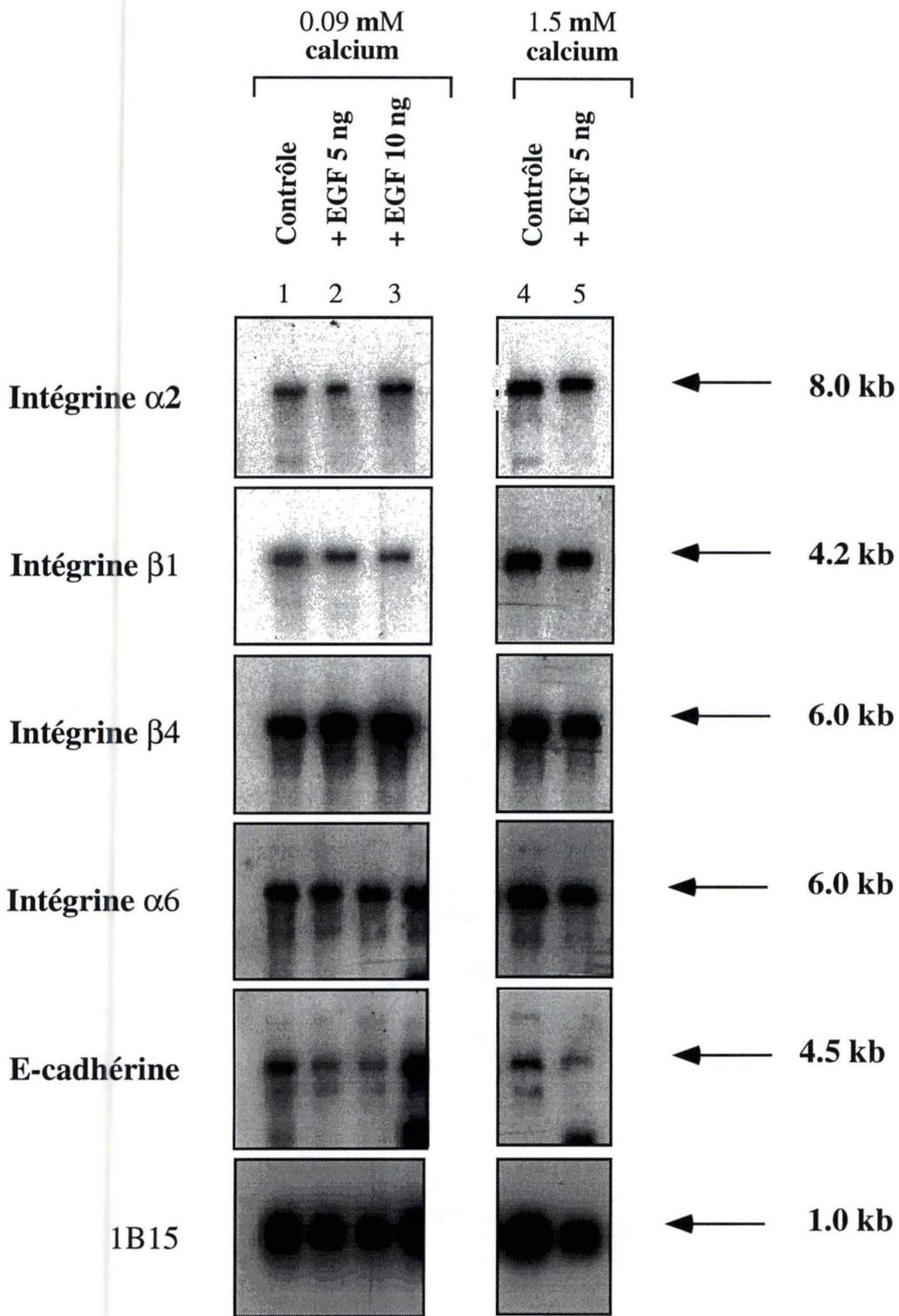


Figure 13 A : Détection à sous-confluence de l'expression des intégrines de type $\beta 1$, de l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ et de la E-cadhérine par rapport à l'expression d'un gène rapporteur (1B15)

C'est sur base des variations d'expression de ces kératines suprabasales (caractéristiques de la différenciation), observées entre la sous-confluence et la confluence, et de l'effet de l'EGF (mais aussi du calcium extracellulaire) sur cette même expression que nous avons décidé de rechercher si l'expression des intégrines de type $\beta 1$ et de l'intégrine $\alpha 6\beta 4$, exprimées in vivo dans la couche basale proliférative, subissait des variations importantes entre l'état de sous-confluence (caractérisé par une prolifération intense) et celui de confluence (caractérisé par une perte de la clonogénicité cellulaire) dans des cultures de kératinocytes (Wille *et al.*, 1983; Poumay et Pittelkow, 1995). Des études menées par Hotchin *et al.* (1995) ont en effet démontré que les intégrines de type $\beta 1$ sont soumises à une régulation négative lorsque les kératinocytes se différencient, mais les conditions de culture utilisées par ces auteurs incluent sérum et facteurs de croissance.

Nous avons également étudié l'effet des mêmes paramètres sur l'expression de la E-cadhérine, mais aussi sur celles de l'involucrine et du récepteur de l'EGF (HER-1). Des analyses densitométriques ont permis de quantifier les variations obtenues et de les comparer.

Notons d'emblée que l'expression de la kératine 14 (K14) basale varie très peu, (fig. 10a et 11a et 10b et 11b) ce qui indique que, malgré une proportion croissante de cellules recrutées pour la différenciation terminale, une population basale relativement constante continue à exprimer K14.

4.2 ANALYSE DE L'EXPRESSION DES INTEGRINES DE TYPE $\beta 1$

L'expression des sous-unités d'intégrine $\alpha 2$ et $\beta 1$ semble peu varier à sous-confluence lorsque les kératinocytes sont en présence d'EGF (5 ng/ml) et dans un milieu à faible concentration en calcium extracellulaire (fig. 13a et 14a). Ces résultats sont en accord avec les observations réalisées en immunocytochimie. L'analyse quantitative (fig. 13b) permet cependant de constater que la concentration en EGF de 10 ng/ml dans le milieu s'accompagne d'une augmentation de l'expression de la sous-unité $\alpha 2$. Ceci correspond au fait que l'EGF favorise la prolifération en stimulant la migration des kératinocytes (Barrandon et Green, 1987). L'augmentation de l'expression d' $\alpha 2$ est associée à la mobilité accrue observée dans ces conditions (Chen *et al.*, 1993).

Par contre, l'expression de la sous-unité $\beta 1$ ne semble pratiquement pas varier lorsque l'EGF est augmenté dans le milieu. Un recrutement par $\alpha 2$ de la sous-unité $\beta 1$, au détriment des sous-unités $\alpha 3$ et $\alpha 5$, serait donc possible. L'effet de l'EGF (5 ng/ml) à confluence, semble provoquer une légère augmentation de l'expression d' $\alpha 2$ et $\beta 1$ (fig. 14a et 14b) dans un milieu à 0.09 mM en calcium extracellulaire. Une analyse comparative (fig. 15) permet d'illustrer la diminution drastique de l'expression des sous-unités $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$ et $\beta 1$ par les cellules qui atteignent la confluence.

Lorsque la concentration en calcium dans le milieu est augmentée (1.5 mM) (fig. 13a et b), l'expression de $\beta 1$ à sous-confluence augmente alors que celle d' $\alpha 2$ ne varie presque pas. Ces observations semblent confirmer celles des marquages immunocytochimiques

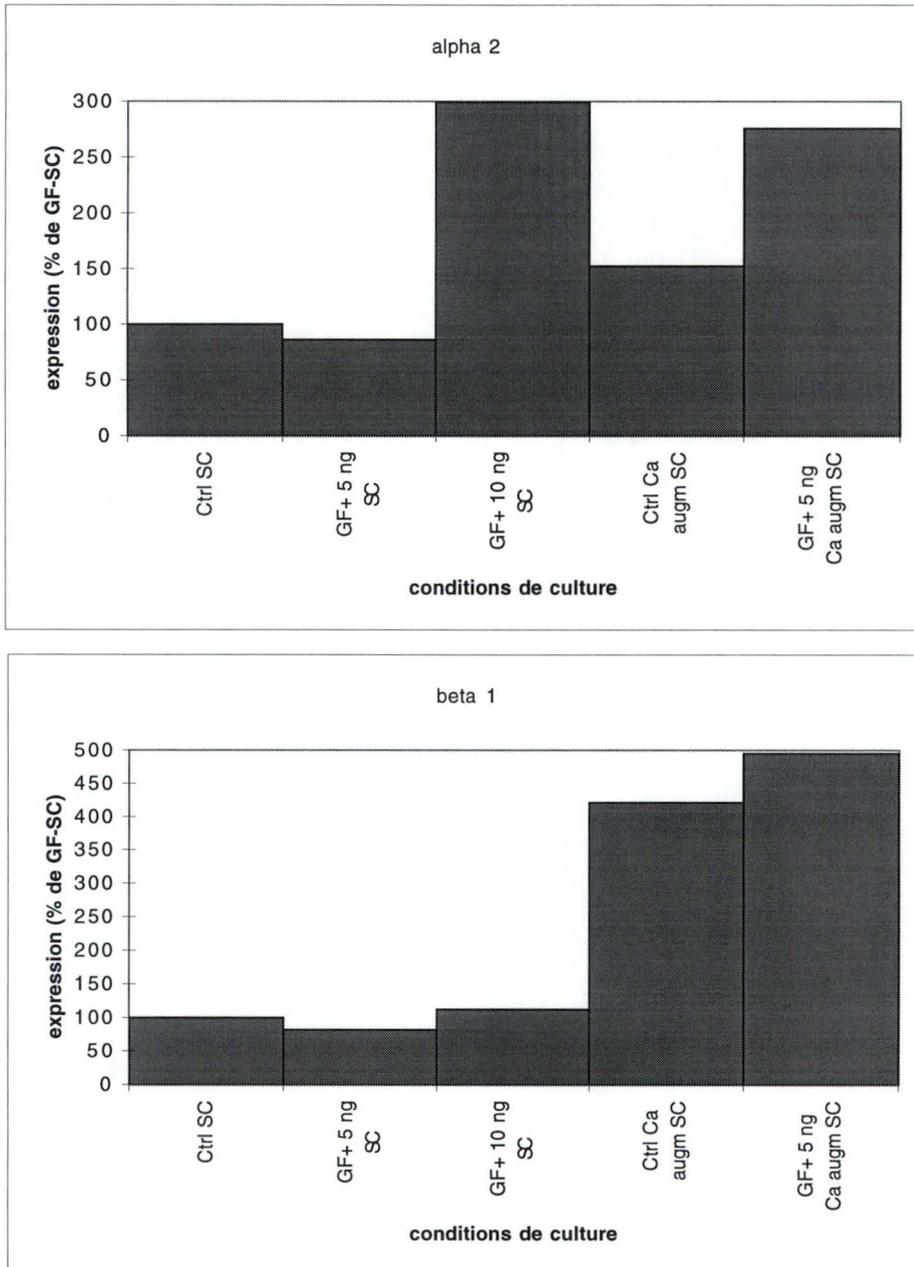


Figure 13 b : Analyse densitométrique à sous-confluence de l'expression relative des sous-unités alpha 2 et beta 1 par rapport au contrôle (culture autonome sous-confluente) pour des kératinocytes cultivés à sous-confluence (SC) en présence d'EGF (5ng/ml; GF+) et/ou dans un milieu contenant une concentration augmentée en ions calcium (1,5 mM; Ca augm).

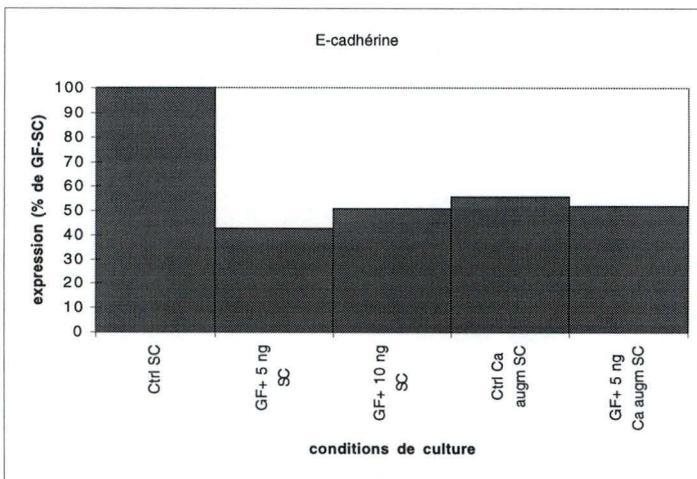
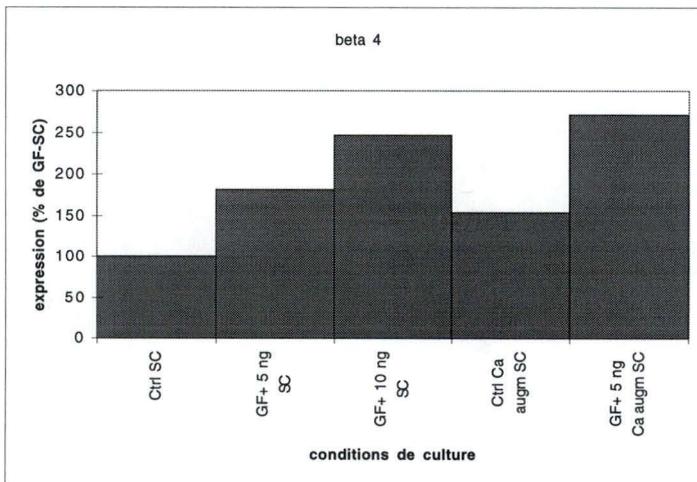
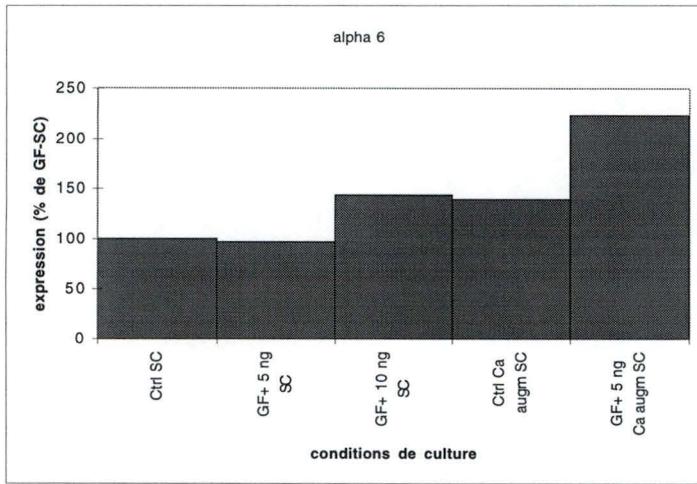


Figure 13 c : Analyse densitométrique à sous-confluence de l'expression relative des sous-unités alpha 6 et beta 4 et de la E-cadhérine par rapport au contrôle (culture autonome sous-confluente) pour des kératinocytes cultivés à sous-confluence (SC) en présence d'EGF (5ng/ml; GF+) et/ou dans un milieu contenant une concentration augmentée en ions calcium (1,5 mM;Ca augm).

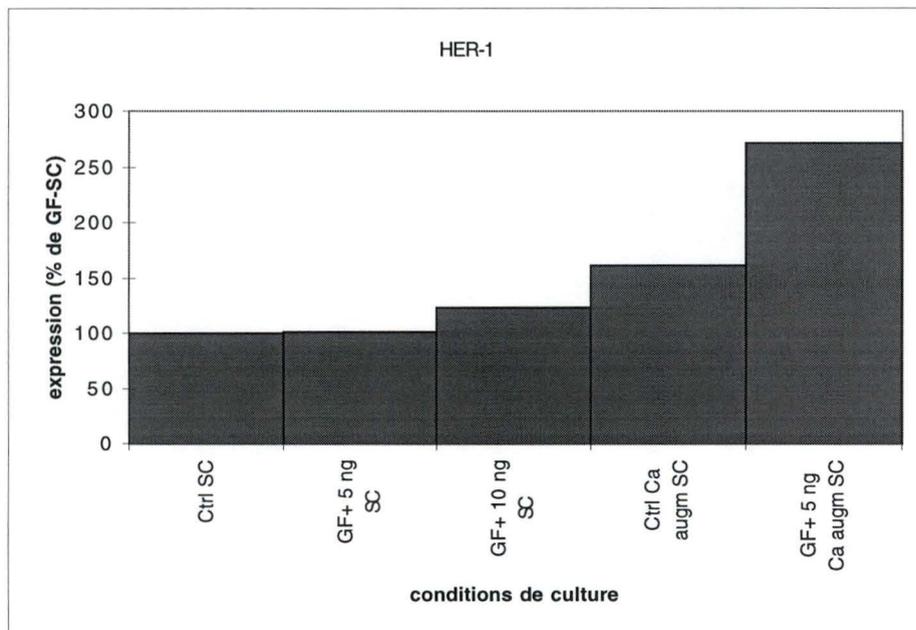
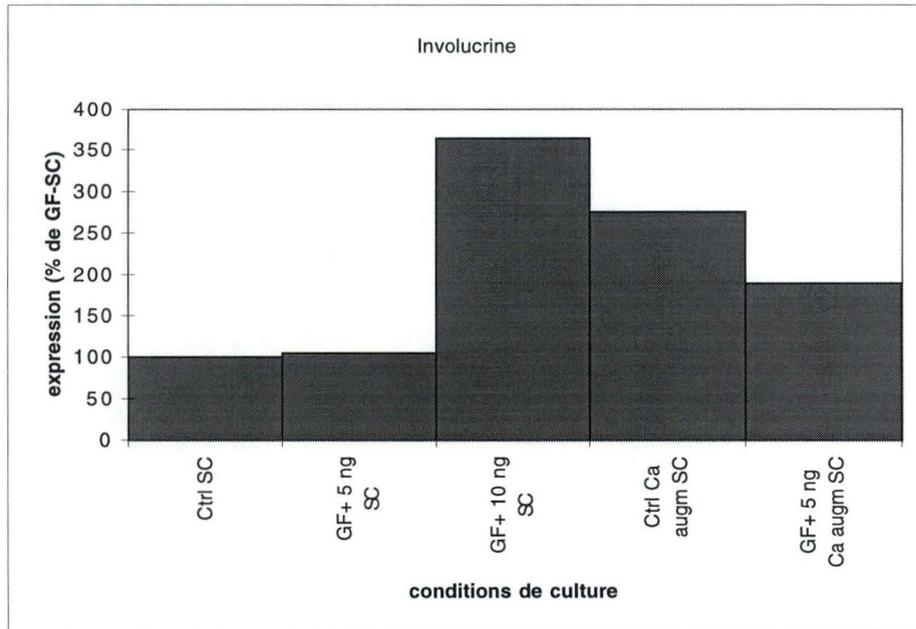


Figure 13 d : Analyse densitométrique à sous-confluence de l'expression relative de l'involucrine et du HER-1 par rapport au contrôle (culture autonome sous-confluente) pour des kératinocytes cultivés à sous-confluence (SC) en présence d'EGF (5ng/ml; GF+) et/ou dans un milieu contenant une concentration augmentée en ions calcium (1,5 mM; Ca augm).

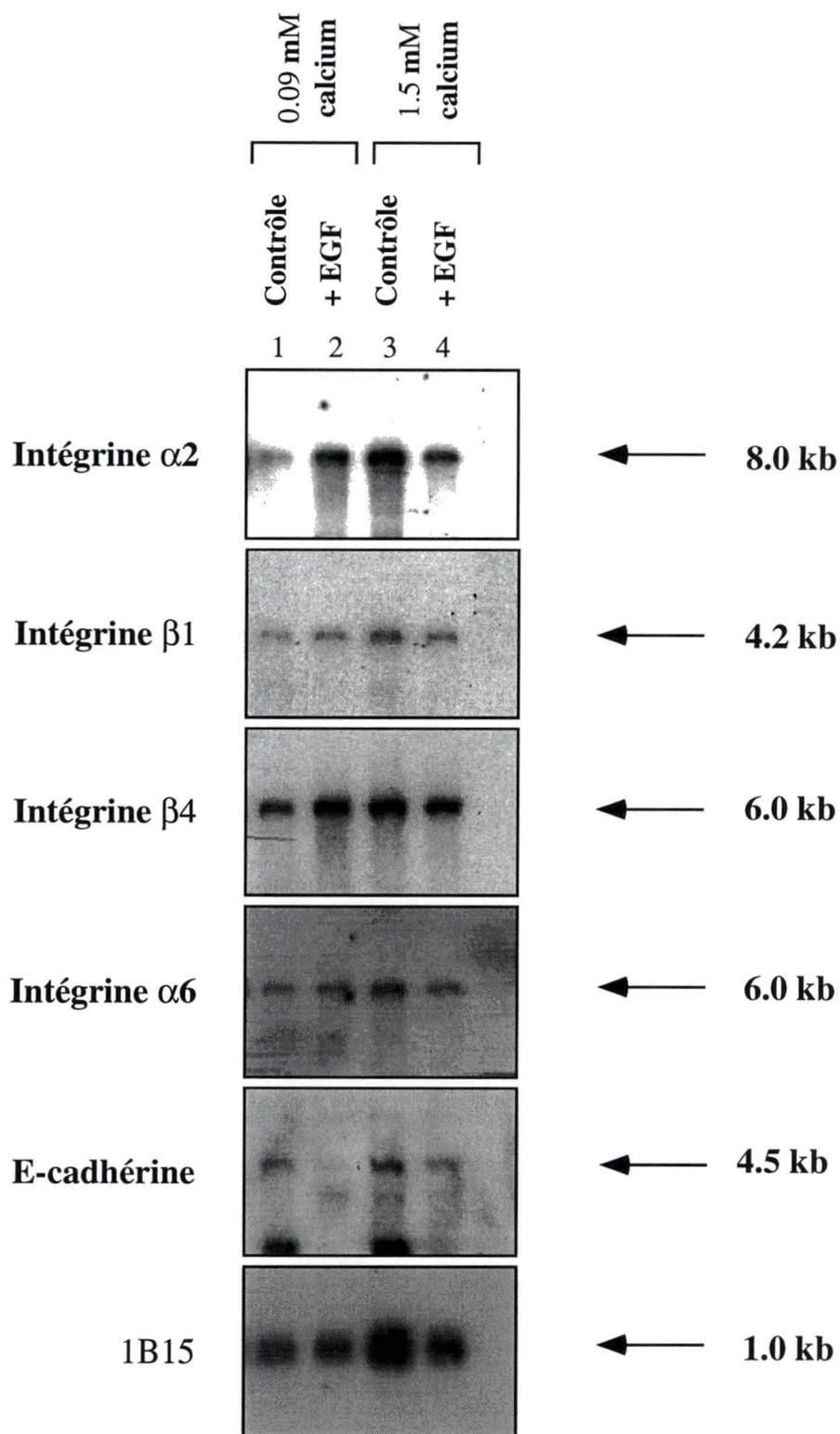


Figure 14 A : Détection à confluence de l'expression des intégrines de type $\beta 1$, de l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ et de la E-cadhérine par rapport à l'expression d'un gène rapporteur (1B15)

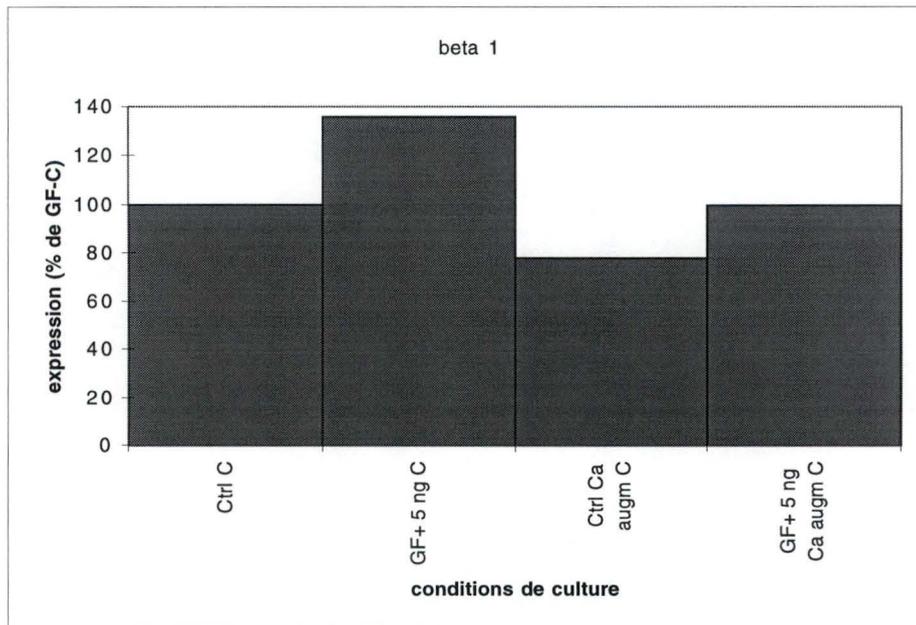
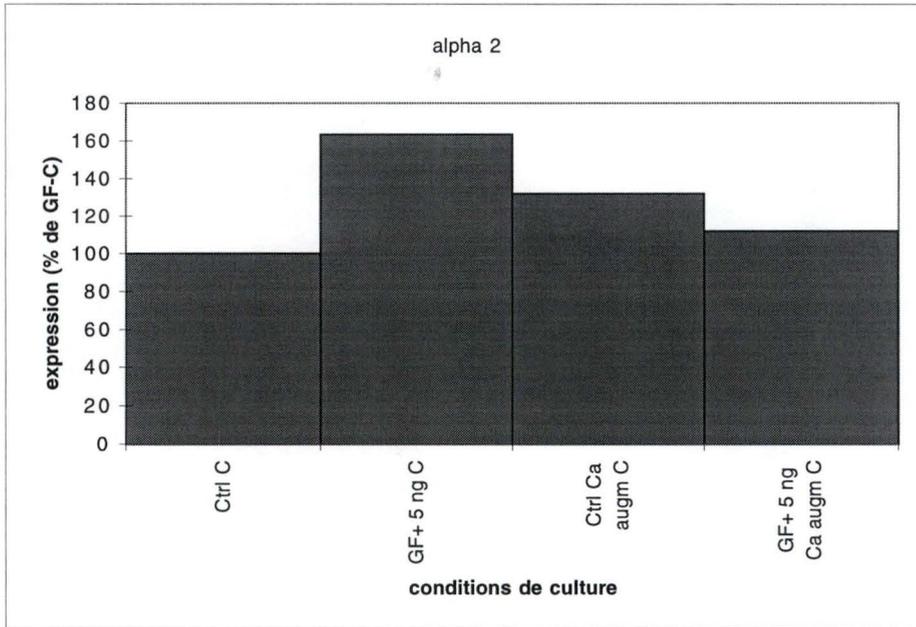


Figure 14 b : Analyse densitométrique à confluence (C) de l'expression relative des sous-unités alpha 2 et beta 1 par rapport au contrôle (culture autonome confluente) pour des kératinocytes cultivés en présence d'EGF 5 ng/ml; GF+) et/ou dans un milieu contenant une concentration augmentée en ions calcium (1,5 mM; Ca augm)

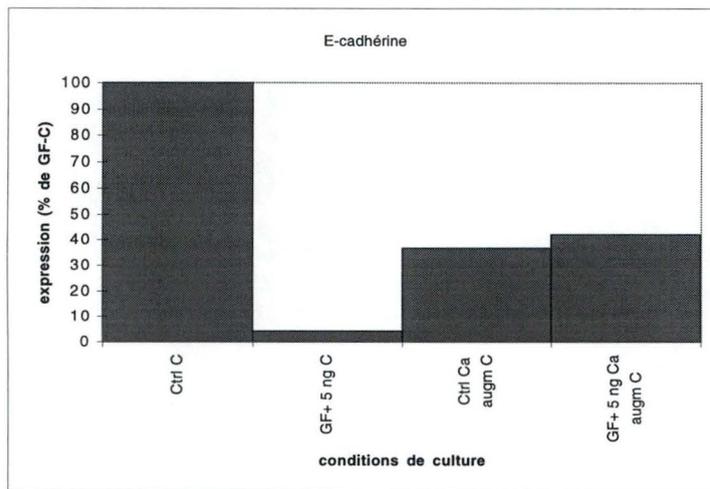
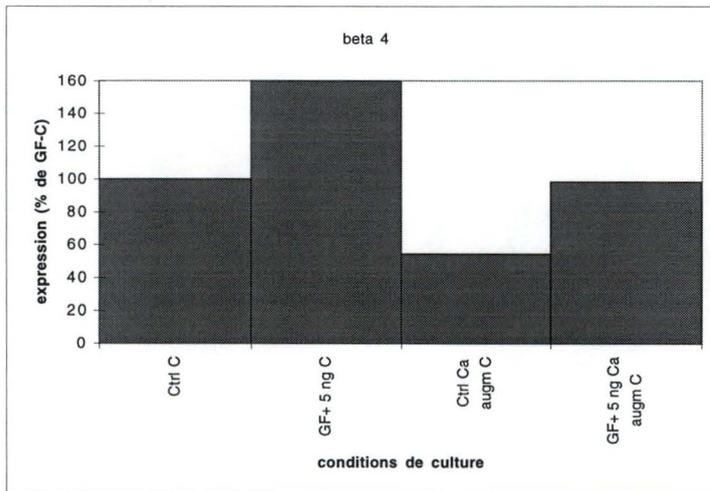
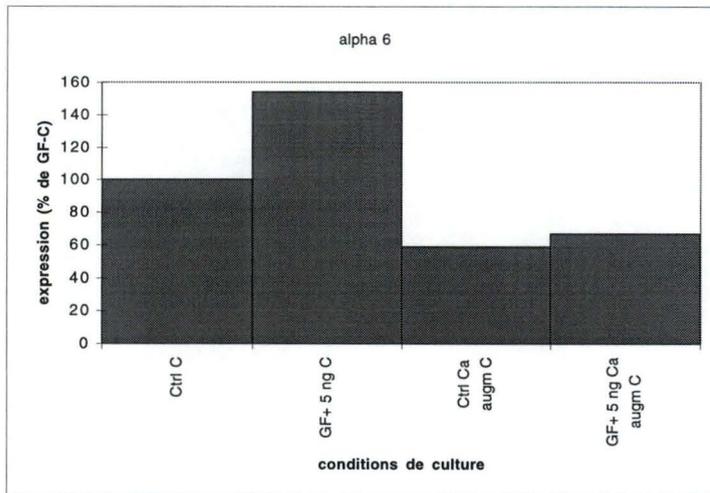


Figure 14 c : Analyse densitométrique à confluence (C) de l'expression relative des sous-unités alpha 6 et beta 4 et de la E-cadhérine par rapport au contrôle (culture autonome confluyente) pour des kératinocytes cultivés en présence d'EGF 5 ng/ml; GF+) et/ou dans un milieu contenant une concentration augmentée en ions calcium (1,5 mM; Ca augm)

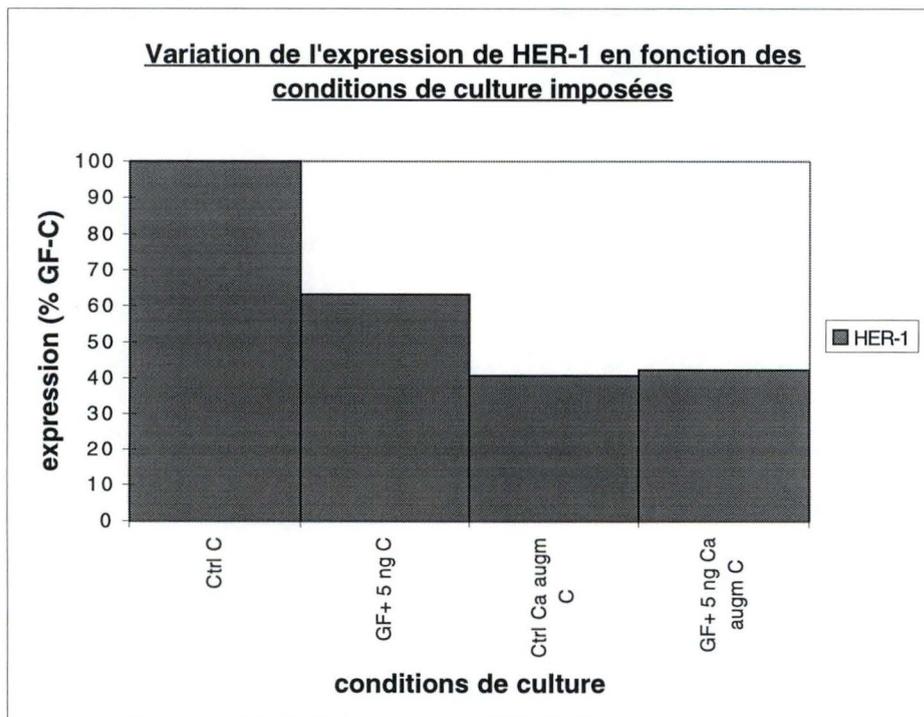
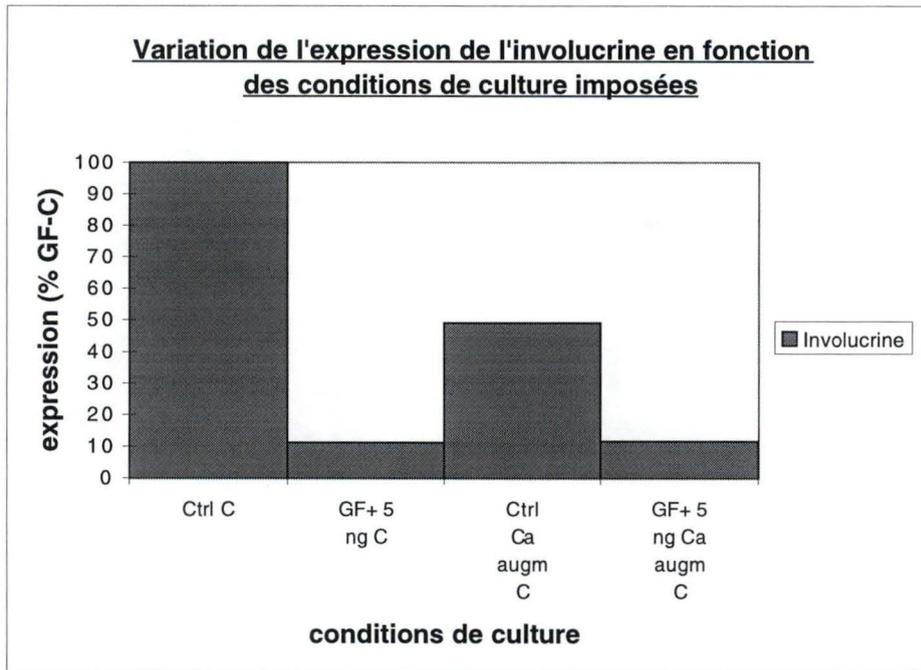


Figure 14 d : Analyse densitométrique à confluence (C) de l'expression relative de l'involucrine et du HER-1 par rapport au contrôle (culture autonome confluente) pour des kératinocytes cultivés en présence d'EGF 5 ng/ml; GF+) et/ou dans un milieu contenant une concentration augmentée en ions calcium (1,5 mM; Ca augm)

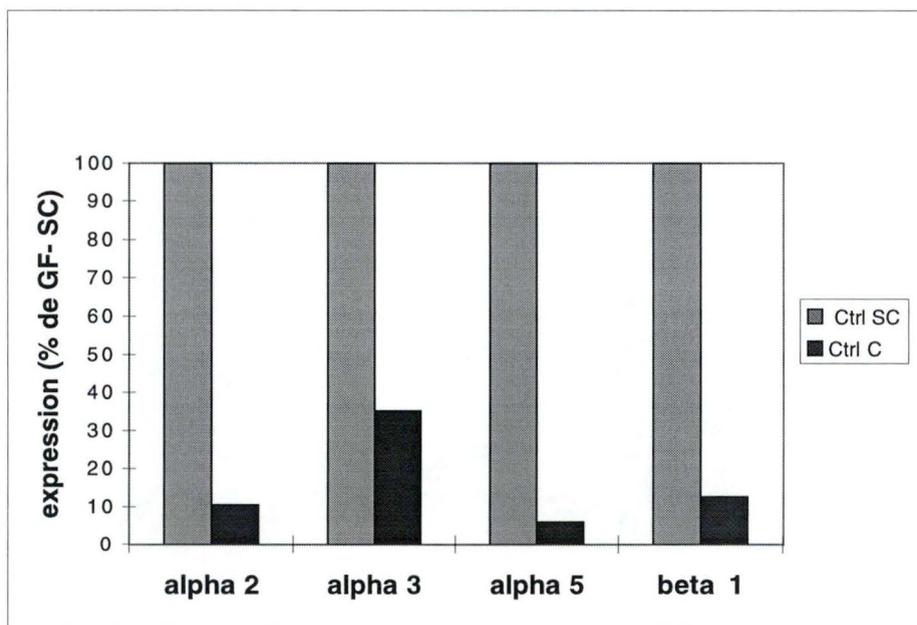


Figure 15 : Graphique comparatif de l'expression relative des intégrines de type beta 1 dans une culture autonome entre l'état de sous-confluence et celui de confluence (sur base des mesures densitométriques)

où nous avons pu constater que l'augmentation du calcium extracellulaire provoque une aggrégation des cellules et force les kératinocytes à former plus de contacts intercellulaires, peut-être via les intégrines de type $\beta 1$. La présence de l'EGF dans ces conditions stimule l'expression des deux sous-unités. A confluence (fig. 14a et 14b), la présence de calcium à 1.5 mM, avec ou sans EGF, ne semble pas s'accompagner de différences significatives dans l'expression des deux sous-unités par rapport au contrôle.

Il ressort donc de ces analyses que l'EGF (5 ng/ml) n'affecte pratiquement pas l'expression des sous-unités d'intégrine $\alpha 2$ et $\beta 1$ lorsque les kératinocytes sont à sous-confluence, mais qu'il provoque une augmentation de leur expression lorsque la concentration en calcium extracellulaire est augmentée dans le milieu. La confluence s'accompagne d'une diminution drastique de l'expression d' $\alpha 2$ et $\beta 1$ qui peut être partiellement contrecarrée par l'ajout d'EGF dans le milieu. L'EGF pourrait agir en maintenant l'expression des intégrines par un mécanisme impliquant le blocage de l'activité de la E-cadhérine (Braga *et al.*, 1995; Hodivala et Watt, 1994). En effet, en se fixant sur son récepteur, l'EGF induit la phosphorylation de la β -caténine et empêche ainsi le complexe caténines-E-cadhérine de se former. L'expression des intégrines pourrait alors être maintenue suite à l'absence de régulation négative (Hodivala et Watt, 1994) de leur expression par la E-cadhérine. L'effet du calcium à confluence ne semble pas affecter l'expression des intégrines de type $\beta 1$.

4.3 ANALYSE DE L'EXPRESSION DES SOUS-UNITES D'INTEGRINE $\alpha 6$ ET $\beta 4$

Dans un milieu à faible concentration en calcium extracellulaire, à sous-confluence et à confluence, les kératinocytes ne semblent pas montrer (fig. 13a et 14a) de fortes variations d'expression entre les différentes conditions de culture. Les analyses densitométriques nous révèlent cependant qu'à sous-confluence, l'expression d' $\alpha 6$ ne semble pas affectée lorsque l'EGF est présent (sauf pour une concentration de 10 ng/ml), alors que la sous-unité $\beta 4$ réagit déjà à une concentration de 5 ng/ml (fig. 13c). A confluence, où l'expression d' $\alpha 6$ et de $\beta 4$ a fortement diminué par rapport à la sous-confluence comme le montre la figure 16, l'EGF (5 ng/ml) induit par contre une augmentation parallèle de l'expression d' $\alpha 6$ et de l'expression de $\beta 4$ (fig. 14c).

L'augmentation de la concentration en calcium dans le milieu s'accompagne à sous-confluence d'une légère tendance à l'augmentation de l'expression d' $\alpha 6\beta 4$ (fig.13c). En favorisant la stratification, le calcium pourrait augmenter l'expression d' $\alpha 6\beta 4$ afin d'assurer à l'ensemble des cellules un bon ancrage à la matrice extracellulaire avant toute stratification. Par ailleurs, certains auteurs (Gimond *et al.*, 1995) ont rapporté que le domaine cytoplasmique de la sous-unité $\alpha 6$ est un substrat pour la protéine kinase C. Cette kinase est stimulée par le calcium et pourrait en phosphorylant $\alpha 6$ conduire à une modulation de l'affinité pour les ligands extracellulaires ou modifier une voie de transduction du signal médiée par cette sous-unité. A confluence (fig. 14c), l'augmentation du calcium favorise la stratification des kératinocytes et s'accompagne

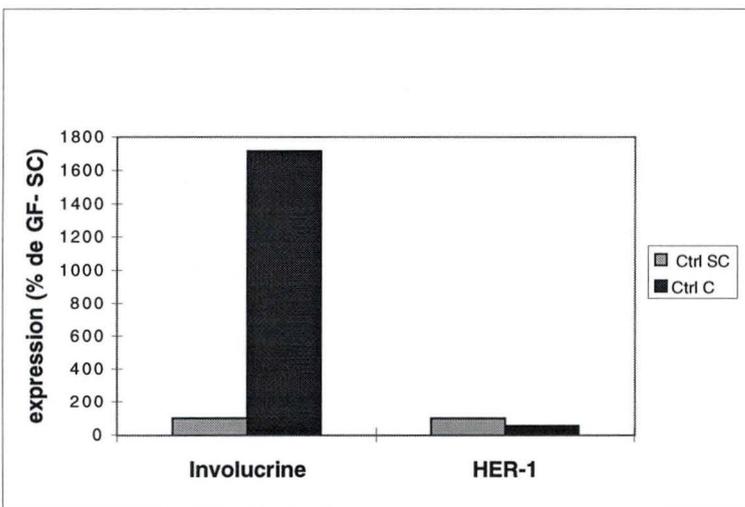
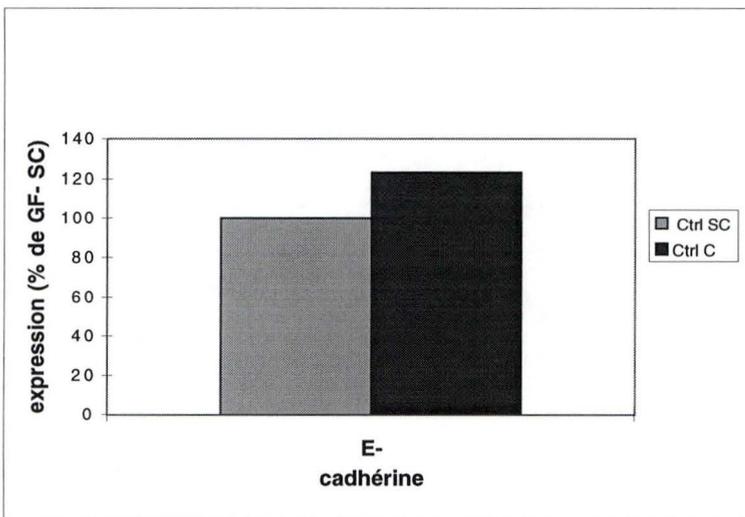
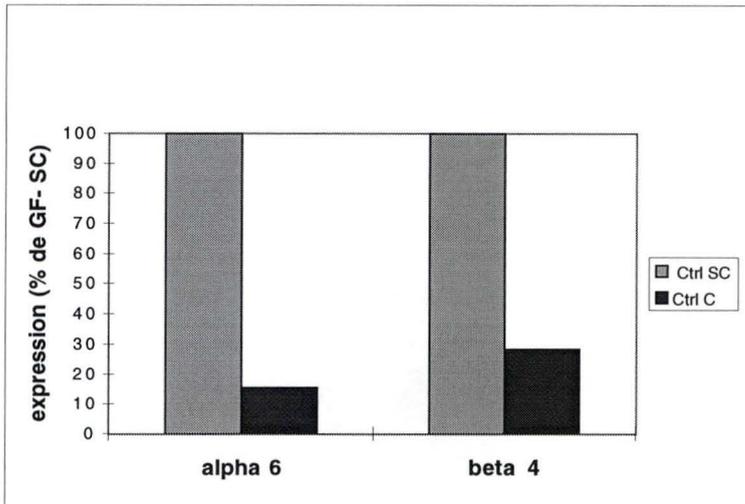


Figure 16 : Graphique comparatif de l'expression relative de l'intégrine alpha 6 beta 4 dans une culture autonome entre l'état de sous-confluence et celui de confluence (sur base des mesures densitométriques)

probablement d'une diminution de l'expression d' $\alpha6\beta4$. En effet, la stratification nécessite une perte de l'adhésion de cellules basales, afin de permettre leur migration vers les couches suprabasales. La présence d'EGF dans un milieu à forte concentration en calcium extracellulaire semble provoquer à sous-confluence une augmentation dans l'expression des deux sous-unités. Par contre, à confluence l'augmentation n'est observée que pour $\beta4$.

Nous pouvons donc retenir de ces observations que, tout comme les intégrines de type $\beta1$, l'expression de l'intégrine $\alpha6\beta4$ diminue avec la différenciation cellulaire et n'est réellement affectée par l'EGF que dans ces conditions. Cette observation conforte l'hypothèse que l'EGF favorise l'expression globale des intégrines à confluence de la culture. L'influence des ions calcium reste quant à elle minime.

4.4 ANALYSE DE L'EXPRESSION DE LA E-CADHERINE

La figure 16 nous montre que la variation d'expression de la E-cadhérine entre l'état de sous-confluence et celui de confluence est relativement faible. La détection de cette molécule d'adhésion intercellulaire correspond avec nos expériences de marquages immunocytochimiques. Lorsque les kératinocytes sont cultivés dans un milieu contenant l'EGF à 5 ou 10 ng/ml, nous pouvons noter une diminution dans l'expression de la E-cadhérine par rapport au contrôle, aussi bien à sous-confluence (fig. 13a et c) qu'à confluence (fig. 14a et c). Lorsque le calcium est augmenté dans le milieu (1.5 mM), l'effet de l'EGF (à sous-confluence et à confluence) semble moins marqué par rapport à un milieu à faible concentration en calcium. L'EGF, en tant que facteur favorisant la prolifération et la mobilité cellulaire, s'oppose apparemment à la formation des contacts intercellulaires. La détection de la E-cadhérine en ces mêmes sites de contact dans les expériences de marquage immunofluorescent ne semblait cependant pas montrer de différences entre culture autonome et culture en présence d'EGF.

A forte concentration en calcium extracellulaire, en culture autonome, à sous-confluence et à confluence, l'expression de la E-cadhérine est plus faible par rapport au contrôle (fig. 13a et 14a et 13c et 14c), bien que certains auteurs aient observé une stimulation de la synthèse de la E-cadhérine lorsque la concentration en calcium extracellulaire est augmentée (Braga *et al.*, 1995). Cependant, leurs conditions de culture utilisées divergent par rapport aux nôtres. Des expériences complémentaires effectuées dans les mêmes conditions de culture que celles que nous avons utilisées seraient à envisager afin de confirmer l'une ou l'autre tendance. Nous pourrions par exemple envisager que, lorsque la concentration en calcium est augmentée dans le milieu, d'autres protéines comme la P-cadhérine ou des protéines desmosomales (desmoglénines ou desmocollines) pourraient relayer la E-cadhérine. Des expériences réalisées par Matthey *et al.* (1990) ont démontré que pour des cellules rénales de chien, l'augmentation de la concentration en calcium (1.8 mM) dans le milieu de culture s'accompagne d'une accumulation progressive à la surface cellulaire de la desmoglénine 2/3 a,b détectable endéans 45 minutes et maximale entre 24-32 heures. Ils ont également observé que dans un milieu à

faible concentration en calcium (<0.05 mM) les protéines desmosomales sont déjà présentes mais de manière diffuse dans le cytoplasme.

4.5 ANALYSE DE L'EXPRESSION DE L'INVOLUCRINE ET DU HER-1

L'involucrine est un marqueur tardif de la différenciation épidermique puisqu'elle est exprimée abondamment par les cellules de la couche granuleuse de l'épiderme. Pourtant aussi, la figure 16 montre que l'expression de l'involucrine existe à sous-confluence et révèle l'augmentation de son expression à confluence.

Cette détection à sous-confluence de l'expression de l'involucrine, protéine précurseur de l'enveloppe cornée, (fig. 10a et 13d) semble confirmer les observations effectuées par certains auteurs (Eckert, 1989) sur la synthèse en faible quantité de cette protéine dans les cellules basales prolifératives. Des variations d'expression étant difficilement observées sur les membranes de Northern, nous nous intéresserons donc plus spécifiquement aux résultats des analyses densitométriques. La présence d'EGF à 10 ng/ml semble avoir à sous-confluence un effet positif sur l'expression de l'involucrine (fig. 13d), tandis qu'à confluence l'expression de la protéine semble fortement inhibée par la présence de l'EGF (fig. 14d), aussi bien dans un milieu à 0.09 mM qu'à 1.5 mM en calcium extracellulaire. A confluence, l'EGF en s'opposant à la stratification cellulaire induite par le calcium pourrait expliquer cette observation.

L'augmentation de la concentration en calcium dans le milieu favorise à sous-confluence l'expression de l'involucrine (fig. 13d), peut-être en induisant une stratification des kératinocytes. Selon Eckert (1989), la synthèse d'involucrine ne devient en effet significative que dans les kératinocytes en culture situés en position suprabasale. A confluence (fig. 14d), le calcium semble curieusement provoquer une diminution d'expression de l'involucrine par rapport au contrôle.

Le graphique de la figure 16 illustre les variations d'expression de HER-1 entre l'état de sous-confluence et confluence des kératinocytes. Nous n'observons pas de différence notable. L'expression du récepteur de l'EGF (HER-1) ne montre qu'une faible augmentation à sous-confluence lorsque les kératinocytes sont cultivés en présence d'EGF et à faible concentration en calcium extracellulaire (fig. 13d). Des observations réalisées par Poumay et Pittelkow (sous presse) démontrent que l'expression de HER-1 ne varie pratiquement pas entre des kératinocytes en culture autonome et en culture en présence d'EGF, mais à confluence son expression semble augmenter, indépendamment de la présence ou de l'absence d'EGF dans le milieu. Nos résultats semblent en légère discordance avec ces observations (fig. 14d). En effet, l'expression de HER-1 semble diminuer à confluence de façon assez similaire pour des kératinocytes en culture autonome ou en présence d'EGF, ainsi qu'à faible et forte concentration en calcium extracellulaire.

Lorsque la concentration en calcium est élevée, l'expression de HER-1 semble légèrement augmenter à sous-confluence et augmente franchement dans les mêmes conditions mais en

présence d'EGF. Si l'on admet que le calcium peut favoriser le processus de différenciation terminale, l'augmentation de l'expression de HER-1 que nous observons peut correspondre à l'augmentation observée à confluence par Poumay et Pittelkow. Il faut cependant modérer cette suggestion car l'expression de HER-1 ne semble pas induite par l'augmentation de la concentration en calcium extracellulaire dans des kératinocytes confluent (fig. 14d).

De même, l'effet de l'EGF dans une culture sous-confluente à forte concentration en calcium semble aussi produire une augmentation supplémentaire de l'expression de HER-1. Cette observation pourrait être due à la stimulation par l'EGF de la synthèse de son propre récepteur (Thompson et Rosner, 1989).

5. ETUDE QUANTITATIVE DE L'EXPRESSION DES MOLECULES D'ADHESION (INTEGRINES ET E-CADHERINE) POUR DES KERATINOCYTES DE NOUVEAUX-NES CULTIVES EN PRESENCE OU EN ABSENCE DE NDF A CONFLUENCE.

Ces cultures ont été réalisées dans le laboratoire de Dermatology Research (Dr. Mark R. Pittelkow) de la Mayo Clinic (Rochester MN, USA) et traitées par des formes recombinantes de Neu Differentiation Factor (NDF) au moment où les cellules atteignent la confluence (il est à noter que la concentration en ARN poly(A) déposés dans les puits est de 2µg/piste dans la fig 18a et de 0.75 µg/piste dans la figure 17a). Les isoformes de NDF proviennent du Dr. D. Danilenko (Amgen, Thousand Oaks CA, USA).

5.1 ANALYSE DE L'EXPRESSION DES KERATINES 1 ET 10 ET DE LA KERATINE 14

L'expression des kératines suprabasales 1 et 10 qui caractérisent l'état de confluence de nos cultures (fig. 17a-18a 17b-18b) et l'induction de la différenciation diminue drastiquement lorsque les kératinocytes sont cultivés en présence de NDF β 1 et β 2 et ce, de façon dépendante de la concentration (observations rapportées par Poumay et Pittelkow (1995 et sous presse) sur des cultures confluentes). Cette tendance plaide pour attribuer au NDF un rôle semblable à celui de l'EGF. L'isoforme β est plus efficace que l'isoforme α dans l'inhibition de l'expression des deux kératines en accord avec les différences d'affinités de ces facteurs pour leur récepteur

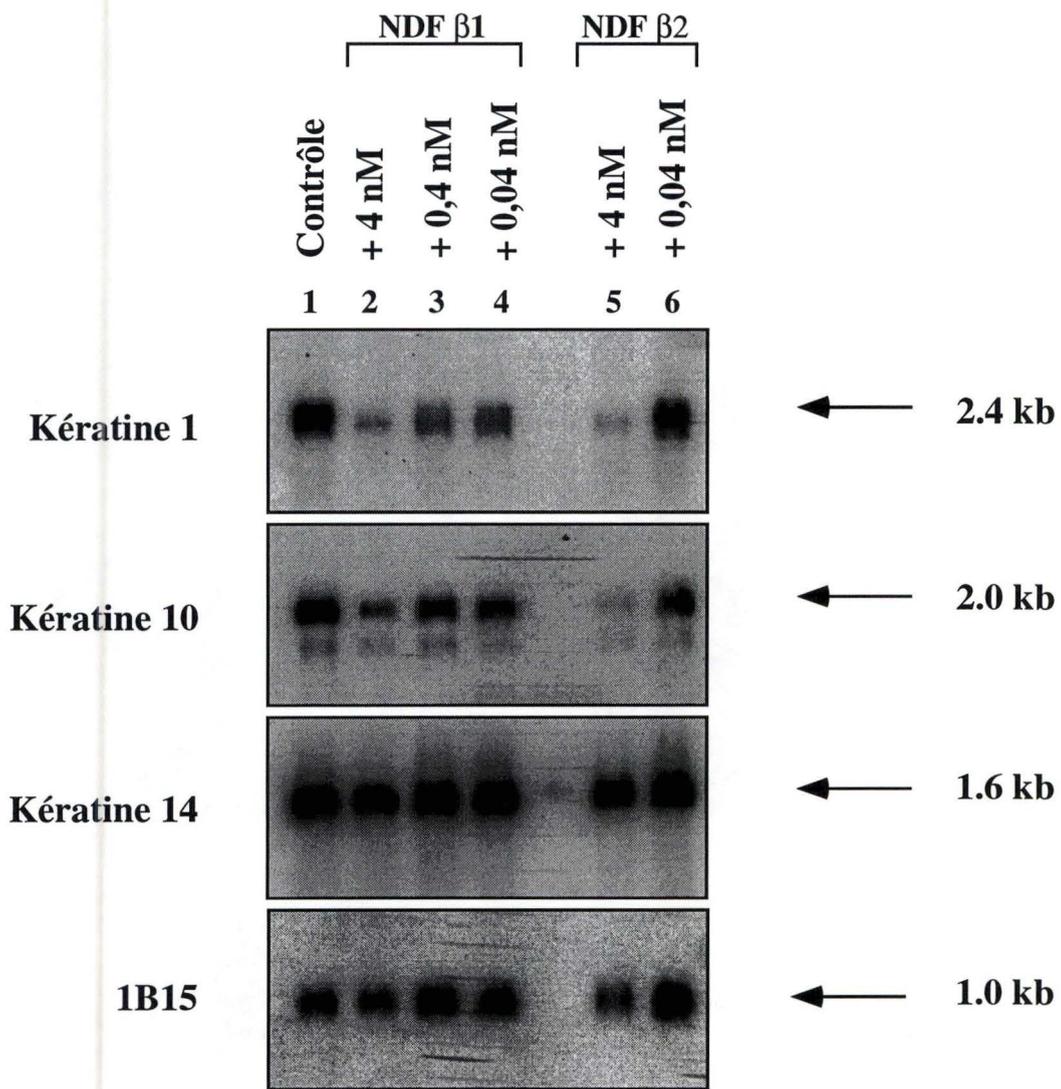


Figure 17 A : Détection à confluence de l'expression des kératines 1, 10 et 14 par rapport à l'expression d'un gène rapporteur (1B15) lorsque les kératinocytes sont traités au NDF (β 1 et β 2)

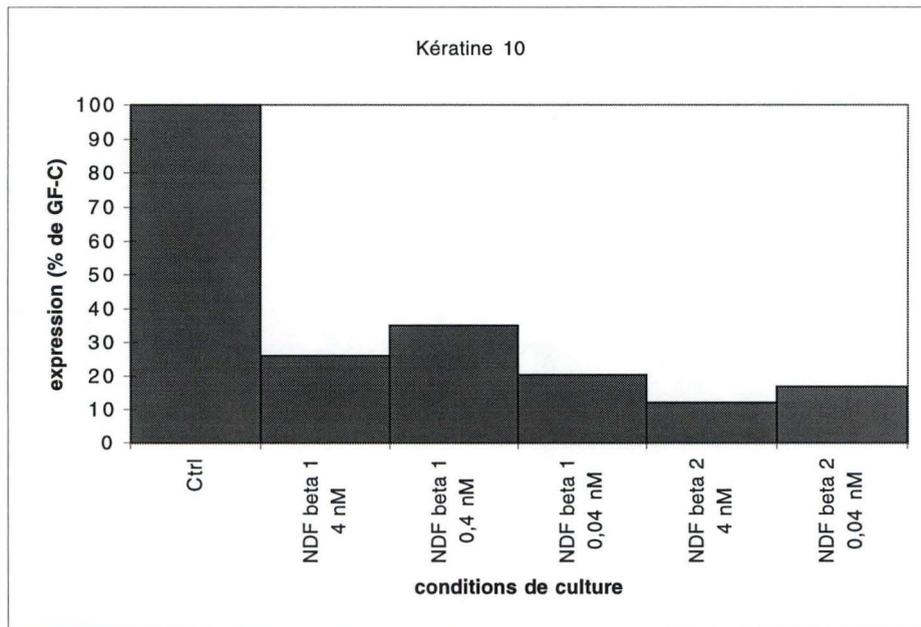
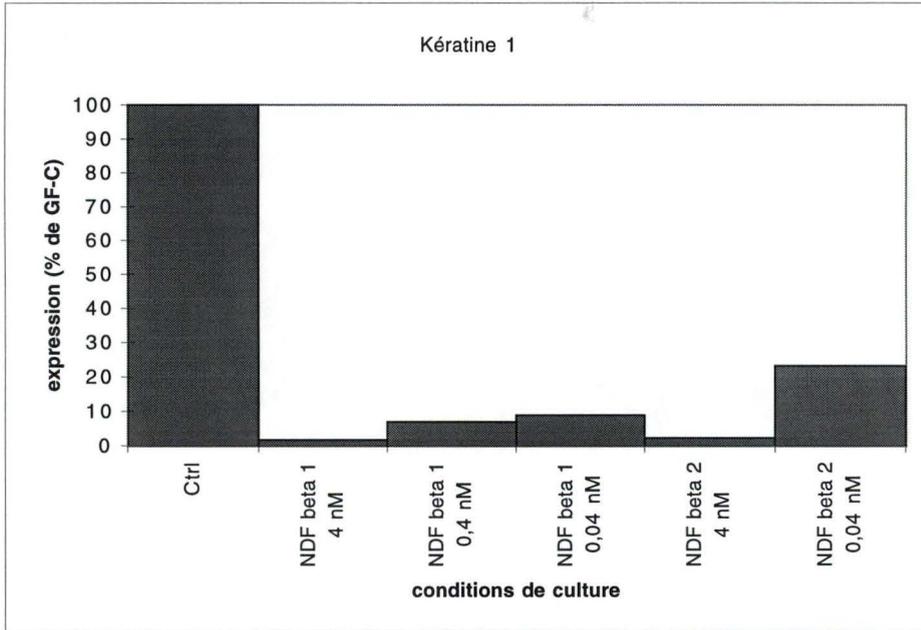


Figure 17 b : Analyse densitométrique à confluence de l'expression relative des kératines 1 et 10 par rapport au contrôle (culture autonome confluente) pour des kératinocytes incubés en présence d'isoformes de NDF beta 1 et beta 2

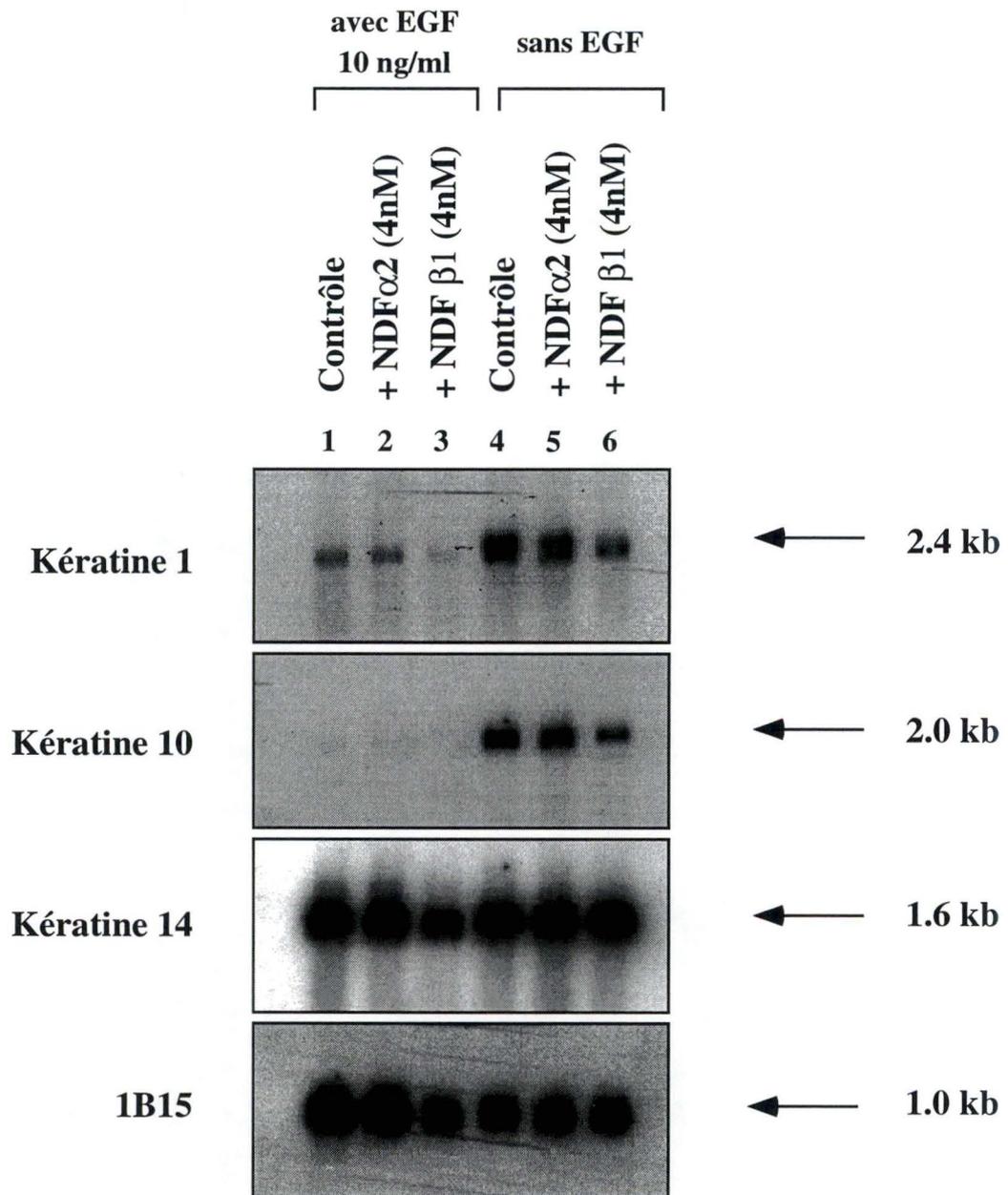


Figure 18A : Détection à confluence de l'expression des kératines 1, 10 et 14 par rapport à l'expression d'un gène rapporteur (1B15) lorsque les kératinocytes sont traités au NDF (β 1 et α 2)

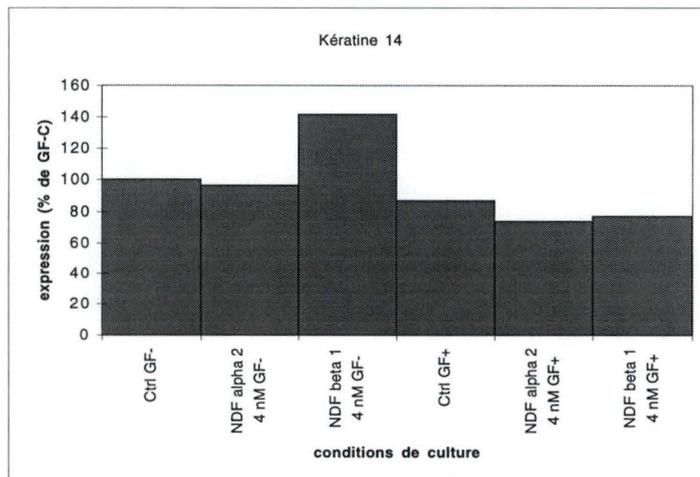
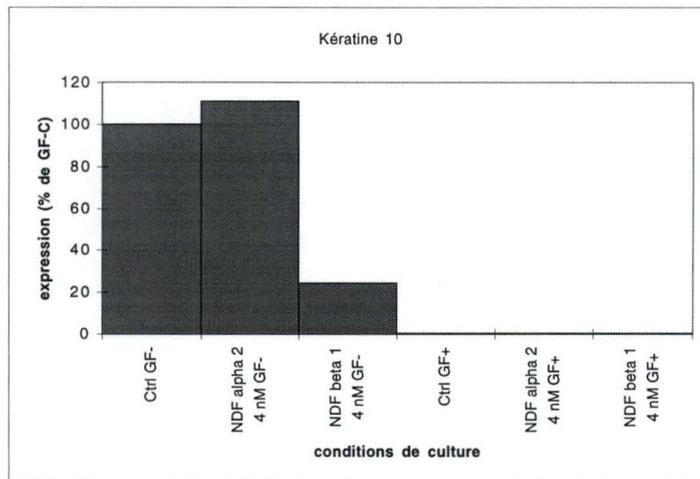
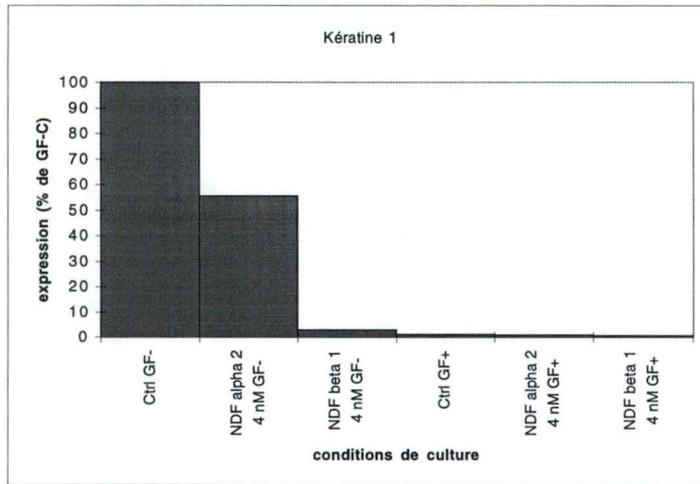


Figure 18 b : Analyse densitométrique à confluence de l'expression relative des kératines 1, 10 et 14 par rapport au contrôle (culture autonome confluyente) pour des kératinocytes incubés en présence des isoformes de NDF beta 1 et alpha 2, en présence ou en absence d'EGF (10 ng/ml)

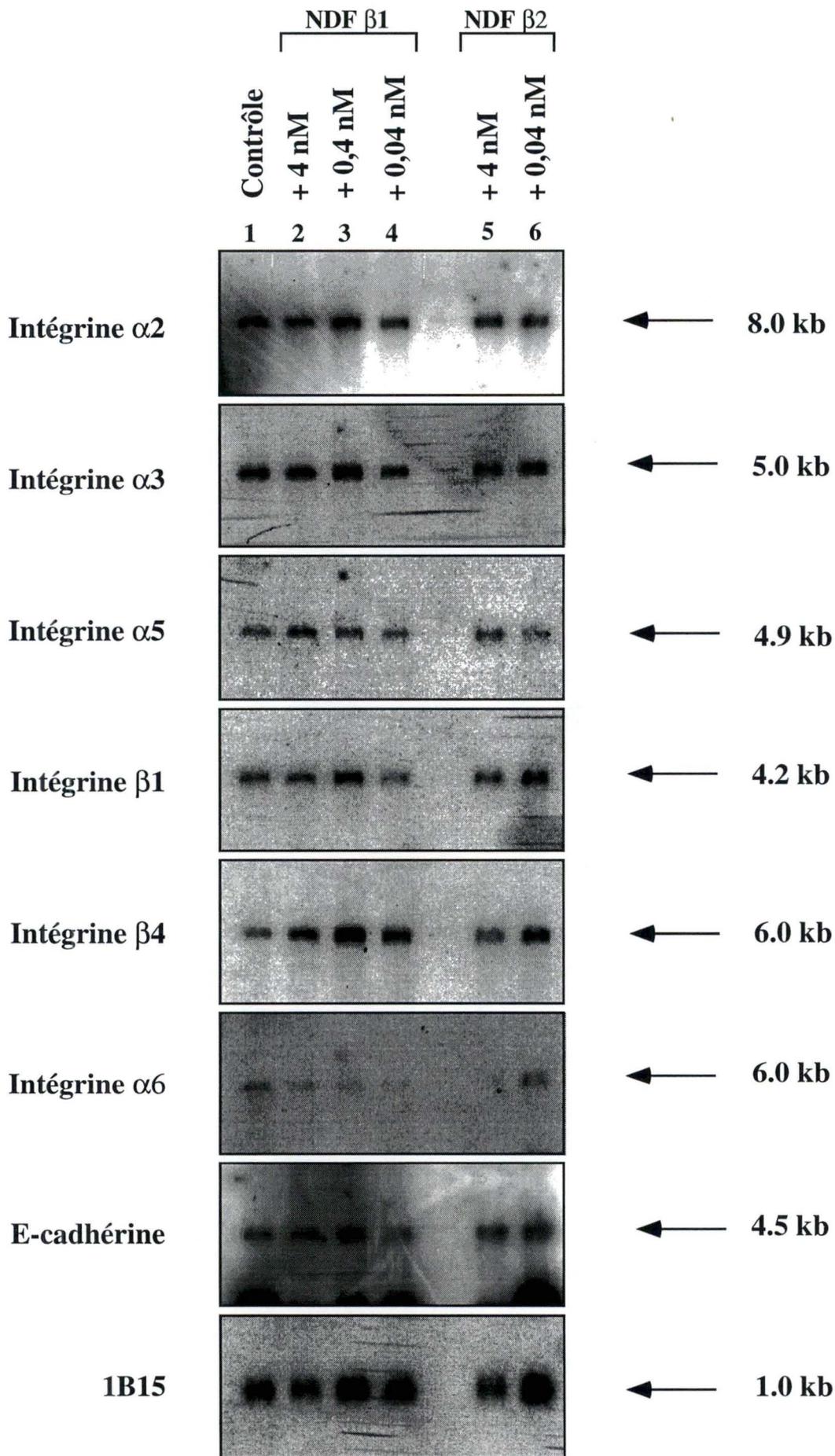
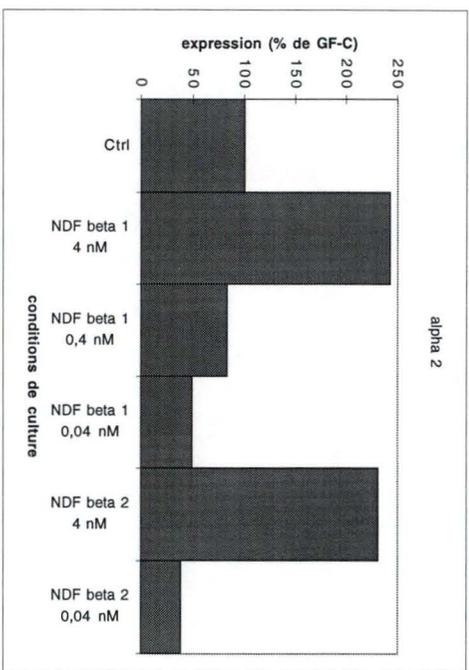
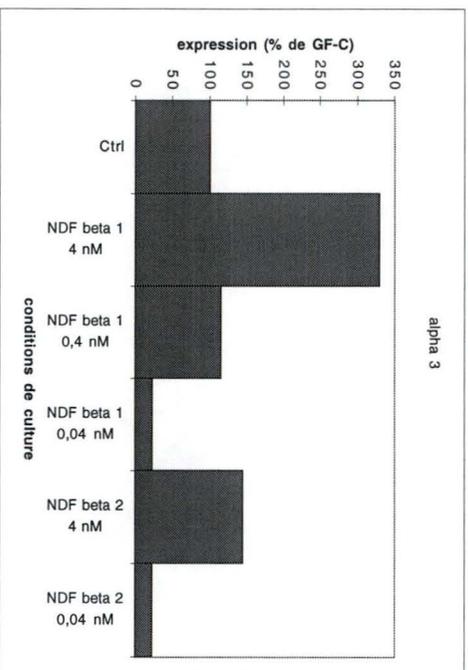
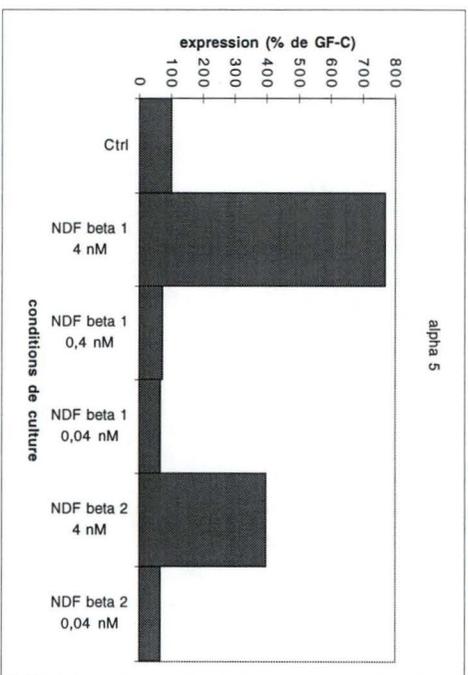
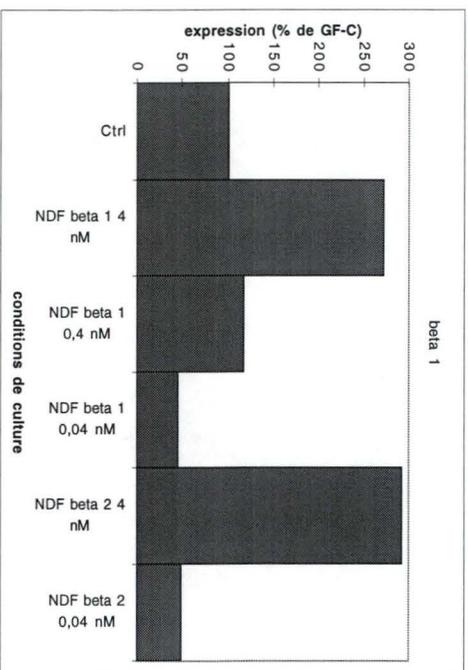


Figure 19 A : Détection à confluence de l'expression des intégrines de type β 1, de l'intégrine $\alpha\beta$ 4 et de la E-cadhérine par rapport à l'expression d'un gène rapporteur (1B15) lorsque les kératinocytes sont traités au NDF (β 1 et β 2)

Figure 19 b : Analyse densitométrique à confluence de l'expression relative des sous-unités d'intégrine alpha 2, alpha 3, alpha 5 et beta 1 par rapport au contrôle (culture autonome confluente) pour des kératinocytes incubés en présence d'isoformes de NDF beta 1 et beta 2



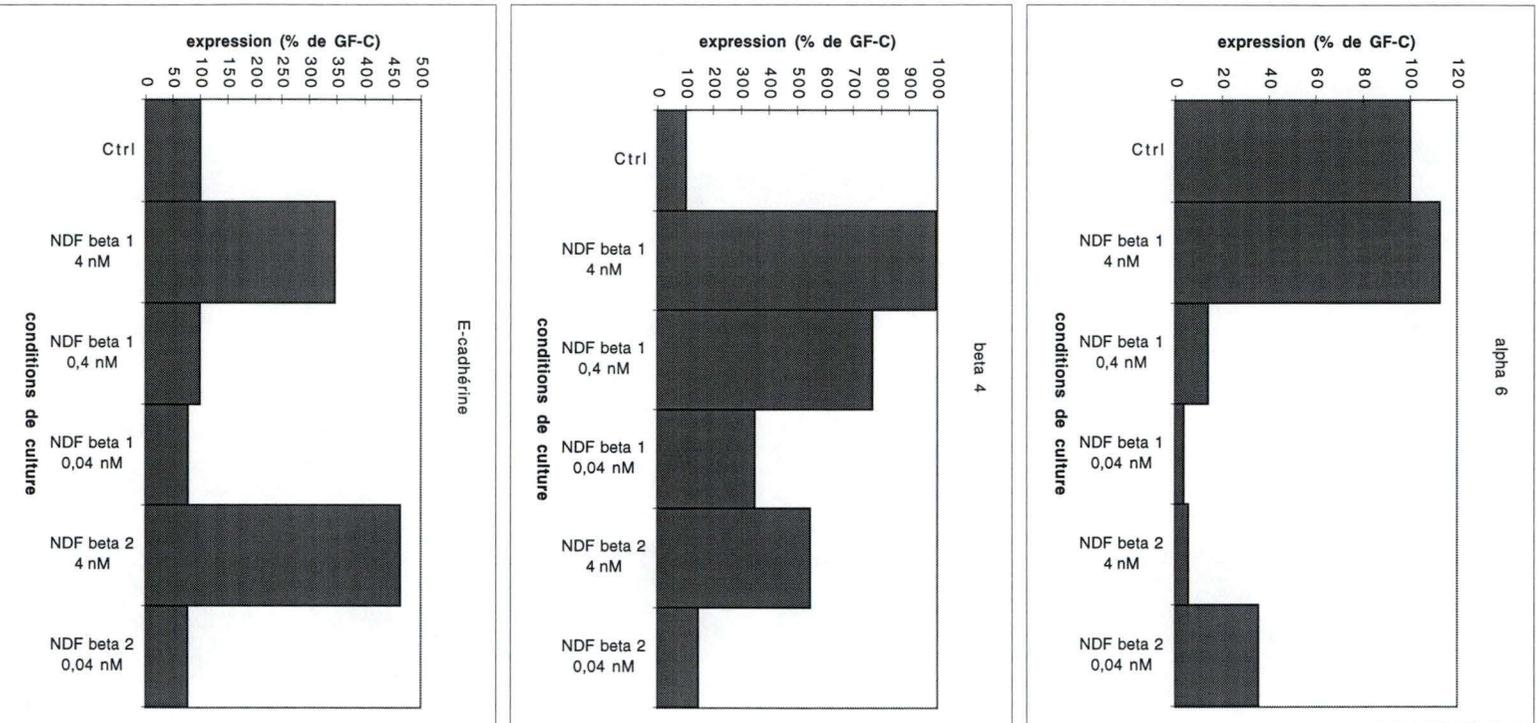


Figure 19 c : Analyse densitométrique à confluence de l'expression relative des sous-unités d'intégrine alpha 6 et beta 4 et de la E-cadherine par rapport au contrôle (culture autonome confliente) pour des kératinocytes incubés en présence d'isoformes de NDF beta 1 et beta 2

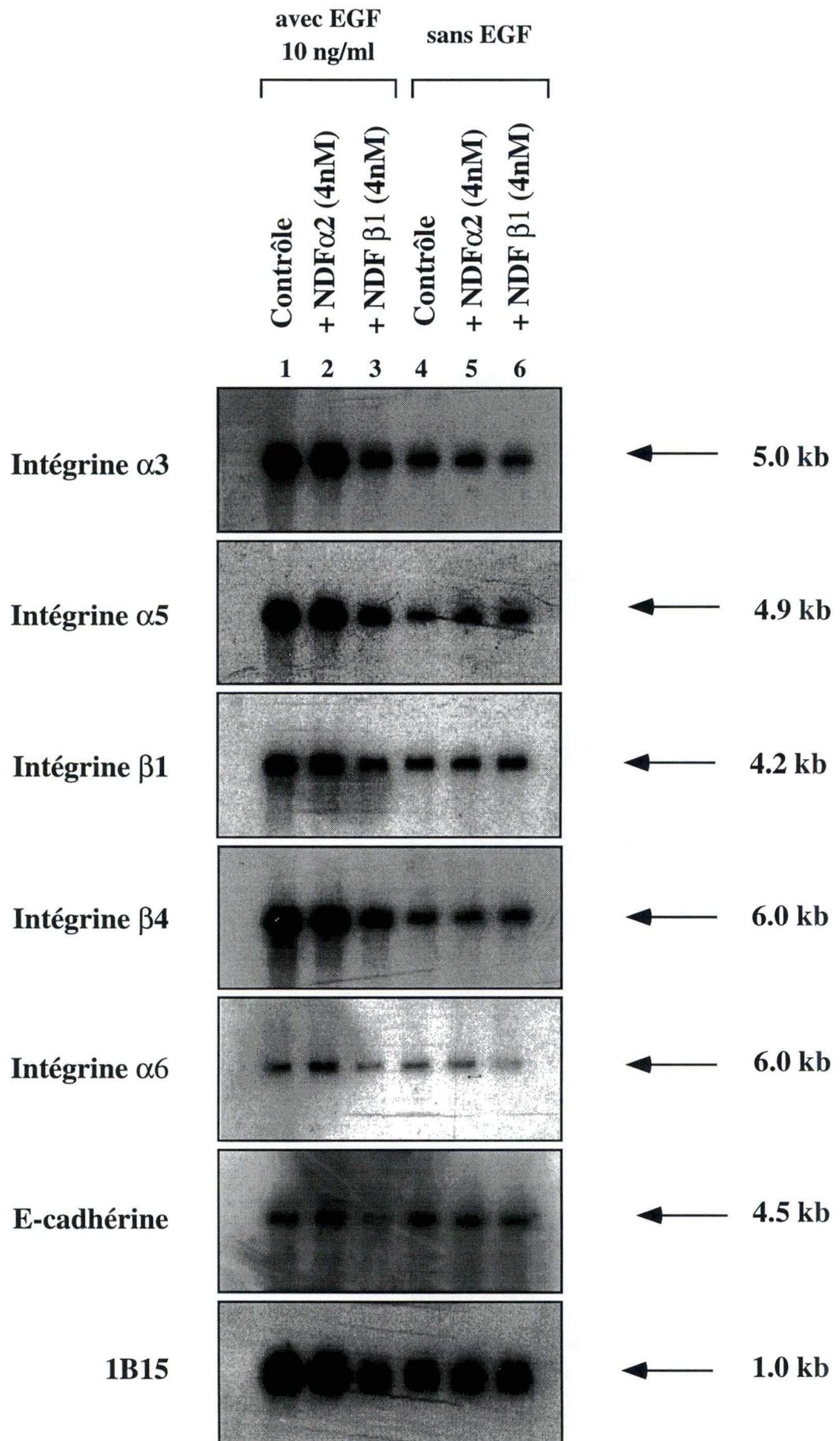


Figure 20A : Détection à confluence de l'expression des intégrines de type β 1, de l'intégrine α 6 β 4 et de la E-cadhérine par rapport à l'expression d'un gène rapporteur (1B15) lorsque les kératinocytes sont traités au NDF (β 1 et α 2)

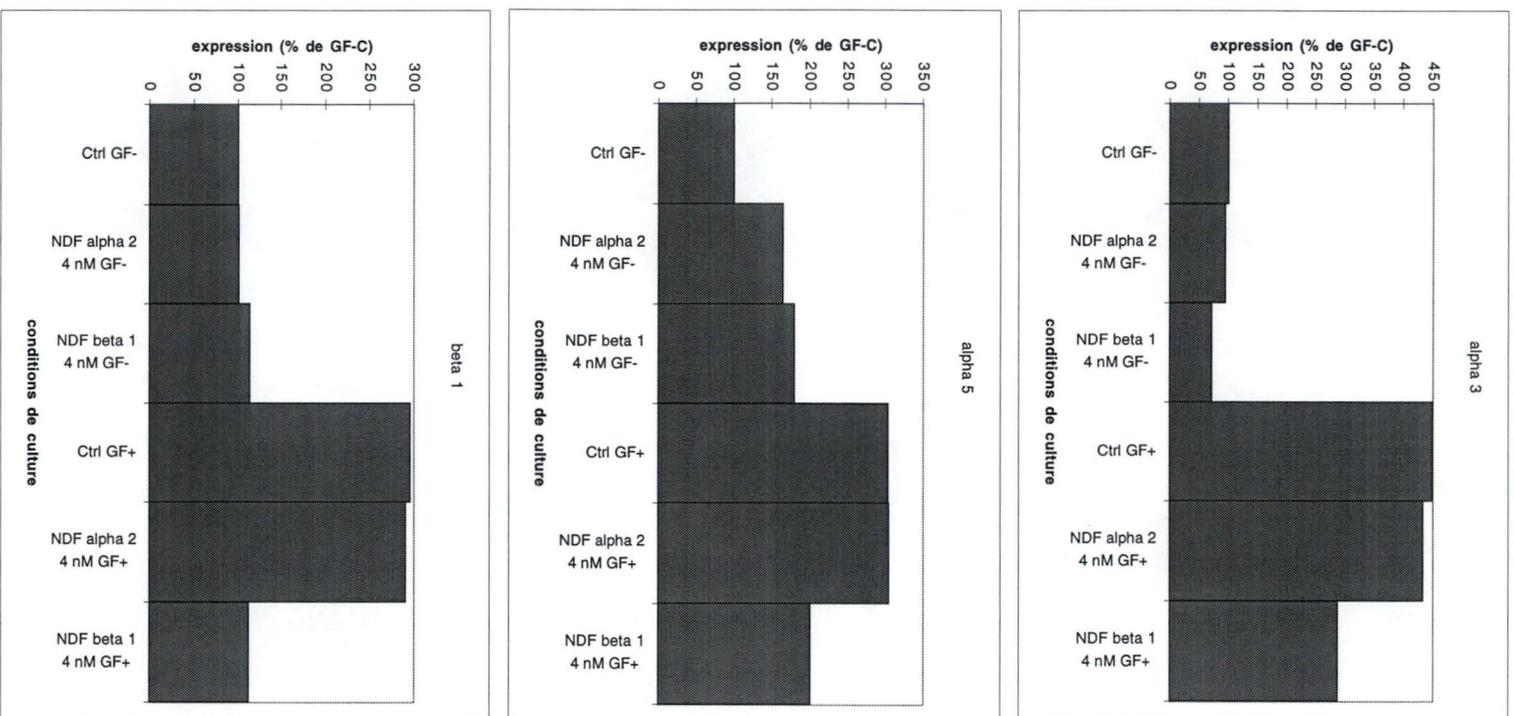


Figure 20 b : Analyse densitométrique à confluence de l'expression relative des sous-unités alpha 3, alpha 5 et beta 1 par rapport au contrôle (culture autonome confluite) pour des kératinocytes incubés en présence des isoformes de NDF beta 1 et alpha 2, en présence ou en absence d'EGF (10 ng/ml)

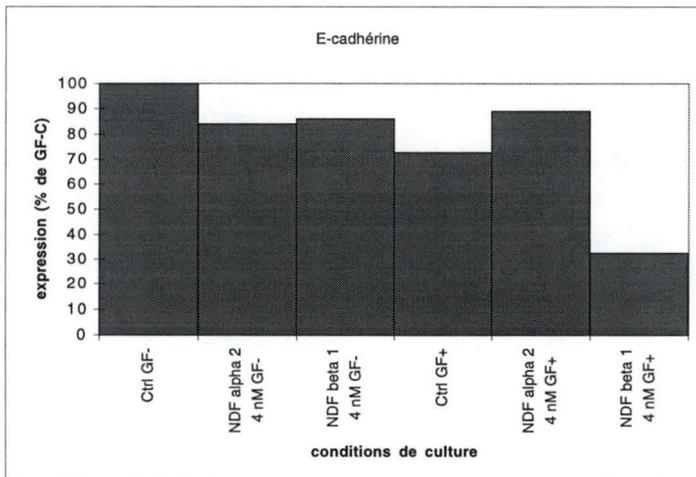
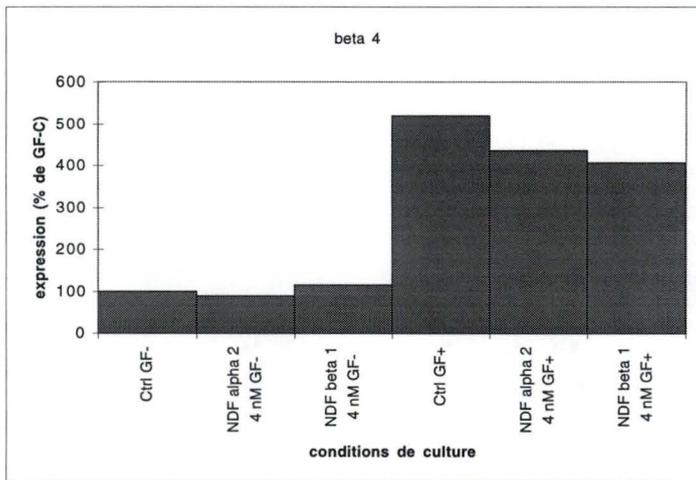
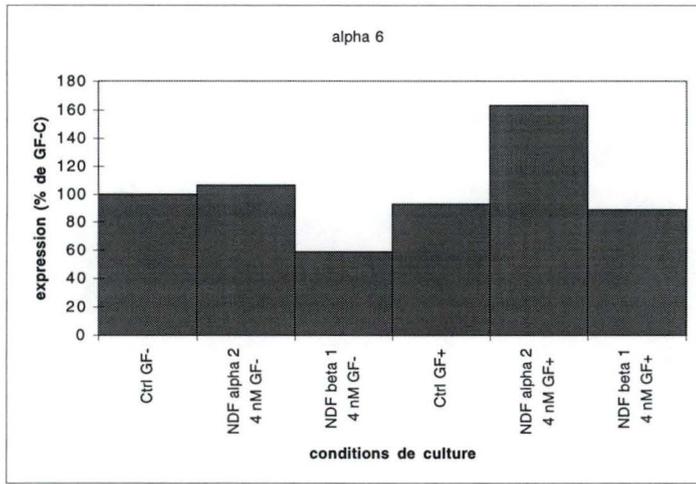


Figure 20 c : Analyse densitométrique à confluence de l'expression relative des sous-unités d'intégrine alpha 6 et beta 4 et de la E-cadhérine par rapport au contrôle (culture autonome confluente) pour des kératinocytes incubés en présence des isoformes de NDF beta 1 et alpha 2, en présence ou en absence d'EGF (10 ng/ml)

HER2/HER3 (Wen *et al.*, 1994). Il est à noter que l'expression de la kératine 14 ne varie pratiquement pas (fig. 18b).

Nous avons décidé d'étudier l'effet de trois isoformes du NDF sur l'expression des intégrines et de la E-cadhérine et de le comparer à celui de l'EGF.

5.2 ANALYSE DE L'EXPRESSION DES INTEGRINES DE TYPE $\beta 1$

L'expression relative des sous-unités d'intégrine $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$ et $\beta 1$ a été analysée par densitométrie (fig. 19b et 20b). Dans les 4 cas, nous observons une augmentation de l'expression pour une concentration en NDF de 4 nM quelque soit l'isoforme utilisé, une évolution qui n'est pas sans rappeler celle que l'on observe lorsque à confluence, l'EGF est ajouté au milieu de culture. Les effets de concentrations inférieures en NDF ($\beta 1$ et $\beta 2$) dans le milieu semblent s'accompagner d'une très légère diminution probablement non significative d'expression des intégrines de type $\beta 1$ par rapport au contrôle (fig. 19b).

Le NDF appartient à la famille de l'EGF et est produit (entre autres) par les kératinocytes en phase de prolifération (Poumay et Pittelkow, sous presse). Son rôle physiologique reste cependant controversé puisqu'il semble intervenir dans les cellules cancéreuses comme facteur mitogène mais semble aussi impliqué dans le processus de différenciation (Peles *et al.*, 1992). L'effet de l'isoforme $\alpha 2$ (fig. 20b) sur l'expression des sous-unités $\alpha 3$, $\alpha 5$ et $\beta 1$ ne semble pas différer de celui de l'isoforme $\beta 1$ lorsque les kératinocytes sont en culture autonome. Les deux isoformes n'induisent apparemment pas de grosses variations d'expression par rapport à celles que nous avons observé dans les mêmes conditions à la figure 19b (ceci pourrait s'expliquer par un état de différenciation légèrement différent entre les deux cultures et qui ne permettrait pas au NDF (fig. 20b) d'exercer un effet significatif sur l'expression des intégrines). Par contre, la présence de l'EGF dans le milieu favorise clairement l'augmentation de l'expression des différentes sous-unités (contrôle GF+ de la fig. 20b). L'ajout de NDF dans ce milieu ne s'accompagne pas de différences significatives d'expression par rapport à l'ajout d'EGF seul. Cette observation pourrait s'expliquer par un effet de "masquage" du NDF par l'EGF (l'EGF pourrait en se fixant sur son récepteur induire par transduction du signal les mêmes effets que le NDF se liant sur ses récepteurs HER2/HER3 à activité tyrosine kinase). Un effet de compétition entre les deux facteurs est exclu puisque l'EGF et le NDF se fixent sur des récepteurs différents (Holmes *et al.*, 1992). Des études effectuées par Danilenko *et al.* (1995) ont démontré que l'isoforme $\alpha 2$ du NDF recombinant humain stimule *in vivo* dans un modèle de cicatrisation cutanée l'expression des intégrines $\alpha 2\beta 1$ et $\alpha 3\beta 1$.

5.3 ANALYSE DE L'EXPRESSION DES SOUS-UNITES $\alpha 6$ ET $\beta 4$

L'expression de la sous-unité $\alpha 6$ ne semble pas varier significativement lorsque les kératinocytes sont cultivés en présence de NDF $\beta 1$ à 4 nM (fig. 19c et 20c). La sous-unité $\beta 4$

voit par contre son expression augmenter fortement (fig. 19c) suite au même traitement (cependant l'expression de cette même sous-unité ne semble pas varier dans des conditions identiques à la fig. 20c). Ceci pourrait s'expliquer par un état de différenciation de la culture légèrement retardé, où le NDF n'agirait pas encore). L'isoforme $\beta 2$ (fig. 19c) semble provoquer une augmentation de l'expression de $\beta 4$ par rapport au contrôle mais une diminution de l'expression d' $\alpha 6$. Il est cependant à noter que l'intensité des bandes visibles sur la membrane de Northern blot est très faible pour cette sous-unité (problème d'incorporation de la radioactivité par la sonde). Par conséquent, l'appréciation de la variation d'expression par densitométrie est rendue moins précise, ce qui pourrait expliquer ces résultats contradictoires. Globalement, ces résultats suggèrent que l'expression d' $\alpha 6$ et de $\beta 4$ semble augmenter à confluence suite au traitement par le NDF et d'une manière dépendante de la concentration. L'isoforme $\beta 1$ semble plus efficace à induire l'expression de l' $\alpha 6\beta 4$ par rapport à l'isoforme $\beta 2$. Cet effet du NDF semble correspondre à celui de l'EGF.

L'isoforme $\alpha 2$ ne semble pas affecter l'expression des deux sous-unités lorsque les kératinocytes sont en culture autonome (fig. 20c). Dans une culture supplémentée en EGF, l'effet est par contre beaucoup plus marqué et consiste en une nette augmentation de l'expression d' $\alpha 6$ et de $\beta 4$. Ici aussi, nous pouvons constater qu'en présence d'EGF, c'est l'isoforme $\alpha 2$ qui semble plus efficace. Danilenko *et al.* (1995) ont à cet égard rapporté que l'isoforme $\alpha 2$ du NDF augmentait *in vivo* l'expression de l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ dans un modèle de cicatrisation cutanée.

5.4 ANALYSE DE L'EXPRESSION DE LA E-CADHERINE

Les variations d'expression de la E-cadhérine observées lorsque les cellules sont traitées par les NDF $\beta 1$ et $\beta 2$ (fig. 19c) ne correspondent pas à l'effet de l'EGF. L'EGF fait en effet diminuer l'expression de la E-cadhérine à confluence. Une expérience complémentaire serait à envisager afin d'élucider ce phénomène.

L'expression de la E-cadhérine semble diminuer très légèrement dans les kératinocytes en culture autonome et traités par le NDF $\beta 1$ ou $\alpha 2$ (fig. 20c). Cette observation supporte cette fois l'hypothèse pour le NDF de jouer un rôle semblable à l'EGF mais aux effets moins marqués. La diminution de l'expression de la E-cadhérine est plus marquée lorsque le milieu reçoit de l'EGF, ce qui est une fois encore en accord avec les observations réalisées précédemment (fig. 13c et 14c).

6. IDENTIFICATION PAR HYBRIDATION IN SITU DES POPULATIONS CELLULAIRES CONTENANT LES ARN MESSAGERS CODANT POUR LES SOUS-UNITES D'INTEGRINE $\alpha 2$ ET $\beta 4$ ET POUR LA KERATINE 10 DANS DES CULTURES SOUS-CONFLUENTES ET CONFLUENTES; EFFET DE L'EGF.

Dans l'ensemble, la détection des ARN messagers codant pour la kératine 10, marqueur de la différenciation, dans des cultures autonomes confluentes (fig. 21b et c) est en accord les observations réalisées dans les expériences de quantification. Parmi l'ensemble de la population cellulaire, seule une partie des cellules contiennent les transcrits. Ceci permet de suggérer que toutes les cellules n'ont pas encore entamé la différenciation. La présence de l'EGF (5 ng/ml fig. 21d et e et 10 ng/ml fig. 21f et g) dans le milieu de culture s'accompagne d'une nette diminution dans la détection des ARNm. Seules quelques cellules entament la différenciation. La diminution de la détection est à mettre en parallèle avec la diminution d'expression de cette kératine observée à confluence dans des cultures traitées par l'EGF (fig. 11b) et analysées par marquages immunocytochimiques (Fig. 8d).

Si l'on compare la synthèse des ARN messagers codant pour la sous-unité d'intégrine $\alpha 2$ dans des kératinocytes en culture autonome à sous-confluence (fig. 22b) et à confluence (fig. 22c), il apparaît que la présence de ces ARN diminue lorsque les cellules atteignent la confluence mais ne subit pas une extinction dans la majorité des cellules. Cette observation est confirmée par l'analyse quantitative de l'expression d' $\alpha 2$ évoquée plus haut et reprise à la fig 15. Nous pouvons y constater que l'expression de cette sous-unité reste présente à environ 10 % de l'expression obtenue à sous-confluence. Ces résultats correspondent également avec la détection en immunofluorescence d' $\alpha 2$ dans une culture confluite. Il est cependant à remarquer que certaines cellules de grande taille (flèche, fig. 22d) ne semblent pas synthétiser la sous-unité $\alpha 2$ quand la culture est à sous-confluence.

L'ajout d'EGF à 5 ng/ml (fig. 22d) ou à 10 ng/ml (fig. 22f) dans le milieu s'accompagne à sous-confluence d'une détection plus importante des ARNm correspondant à $\alpha 2$ par rapport à la culture autonome. A confluence, l'EGF semble stimuler la synthèse des ARNm.

Nous pouvons aussi observer sur les fig. 22e et g que le traitement par l'EGF s'accompagne d'une modification dans la morphologie des cellules; celles-ci étant plus allongées.

Certaines cellules présentent à sous-confluence et en présence d'EGF (fig. 22d et f) un marquage plus faible mais leur proportion semble moins élevée que dans la culture autonome.

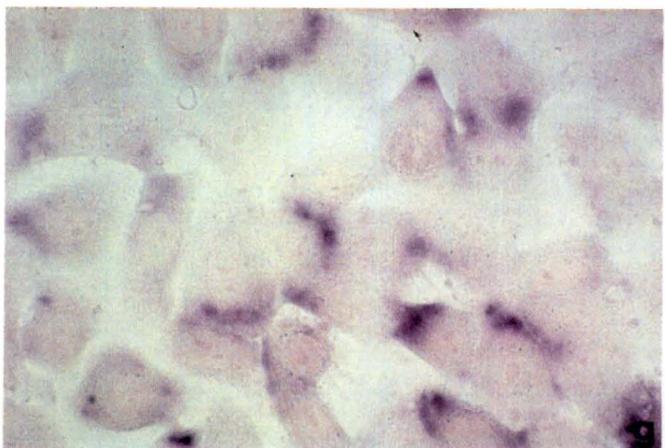
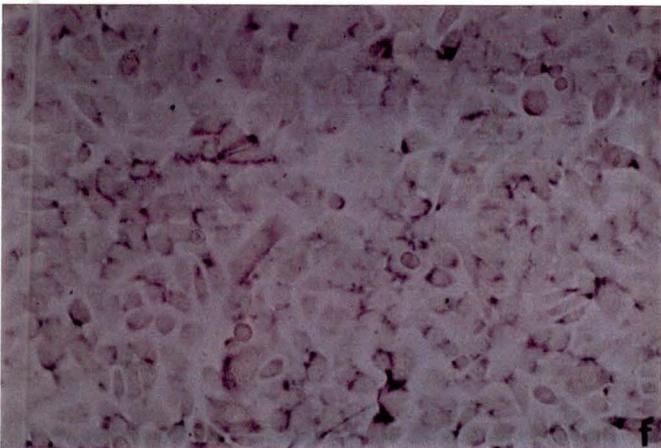
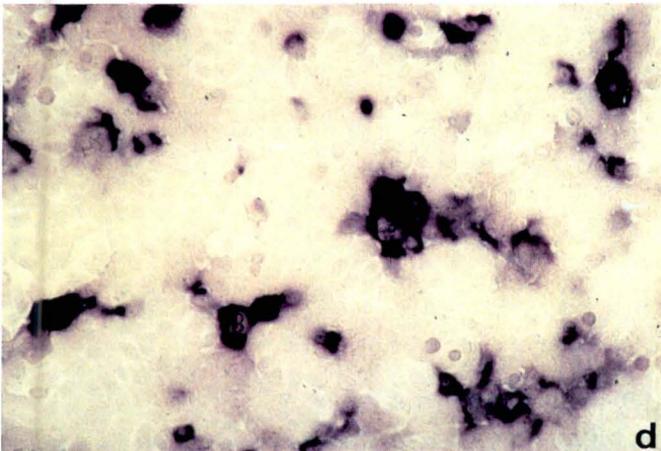
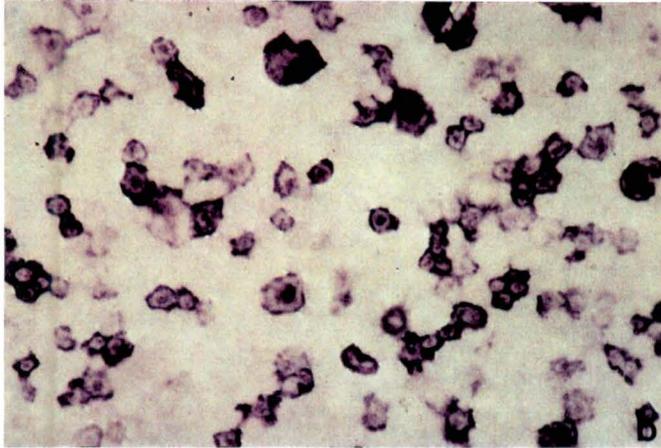


Figure 21 : Hybridation in situ du transcrit encodant la kératine 10. Les kératinocytes épidermiques sont cultivés à confluence en condition autonome (b. G=1666X et c. G=6666X) et dans un milieu en présence d'EGF 5 ng/ml (d. G=1666X et e. G=6666X) et 10 ng/ml (f. G=1666X et g. G=6666X). a : Contrôle réalisé sur une culture en croissance autonome par incubation avec la sonde sens G=4166X.

Par contre, à confluence lorsque les cellules sont en présence d'EGF, il semble que toutes les cellules en voie de synthèse.

La présence d'ARN messagers codant pour la sous-unité d'intégrine $\beta 4$ est bien visible à sous-confluence en culture autonome (fig. 23b). L'ensemble des cellules semble en voie de synthèse même si certaines cellules présentent ici aussi une plus faible détection. Nous pouvons remarquer à nouveau la présence de cellules de plus grande taille (cfr flèche fig.23b). A confluence (fig 23c), la détection des ARN messagers est plus faible. La figure 16 confirme cette observation en présentant une expression de $\beta 4$ à confluence qui se maintient jusqu'à environ 25% (contre 10% pour $\alpha 2$) par rapport à l'expression obtenue à sous-confluence. Ceci reflète les différences parfois observées dans la régulation des intégrines de type $\beta 1$ et de l'intégrine $\alpha 6\beta 4$.

Lorsque l'EGF est présent dans le milieu (fig. 23d et f), nous pouvons noter une augmentation à sous-confluence du marquage caractérisant les ARN. Cette observation est en accord avec l'augmentation de l'expression de $\beta 4$ constatée dans les mêmes conditions à la fig. 13c. A confluence, la présence de l'EGF stimule la transcription de $\beta 4$ comme le suggère les fig. 23e et g. L'entièreté de la population cellulaire semble en voie de synthèse.

Il ressort de ces résultats d'hybridation in situ que la détection des ARN messagers codant pour les sous-unités d'intégrines $\alpha 2$ et $\beta 4$ est plus faible dans des cultures confluentes. L'ajout d'EGF dans le milieu stimule la transcription des deux sous-unités aussi bien à sous-confluence qu'à confluence, mais avec un effet plus prononcé à confluence. Nous pourrions émettre l'hypothèse que, la sous-unité $\alpha 2$ se liant exclusivement à $\beta 1$ dans des kératinocytes épidermiques, les observations constatées sur cette sous-unité pourraient être généralisées aux intégrines de type $\beta 1$. Il semble aussi difficile de lier, de façon individuelle dans les kératinocytes, l'apparition de transcrits pour la kératine 10 suprabasale et les modulations des expressions des sous-unités d'intégrine. La relation proposée par Hotchin *et al.* (1995) entre l'apparition de marqueurs tardifs de la différenciation épidermique (involucrine) et la diminution de l'expression des sous-unités d'intégrines ne semble pas toujours strictement respectée dans ces conditions de culture en absence de sérum et en recherchant l'expression de marqueurs précoces (kératines suprabasales) pour apprécier la différenciation. Toutefois, de manière globale, nous pouvons dire que l'expression des marqueurs précoces correspond à la diminution de synthèse des intégrines.

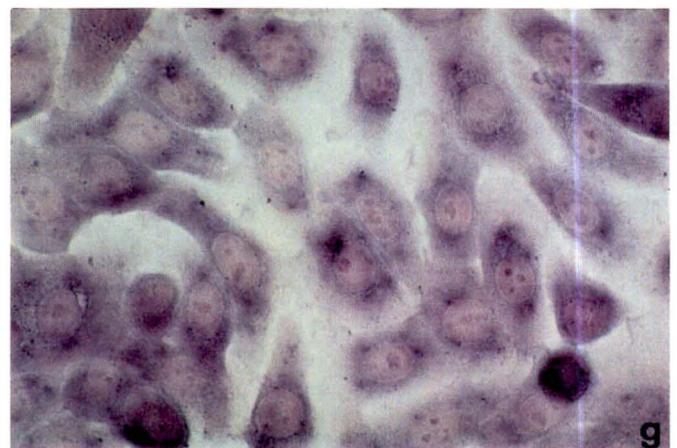
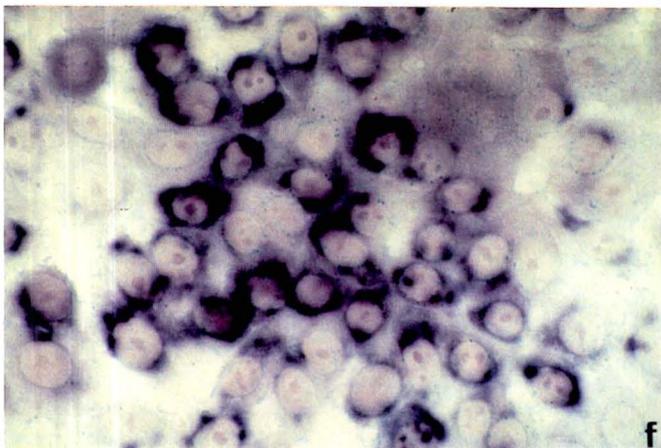
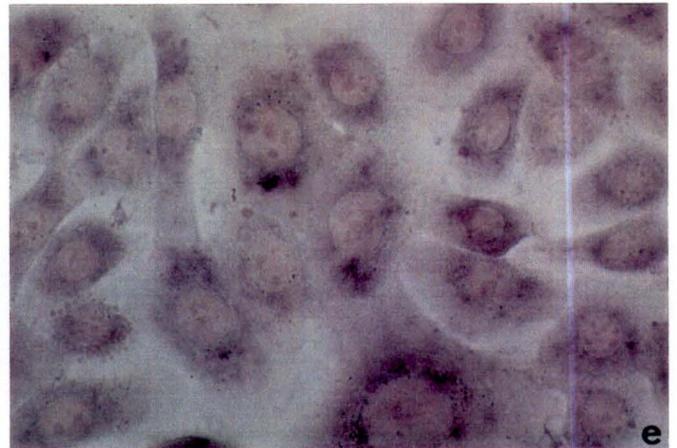
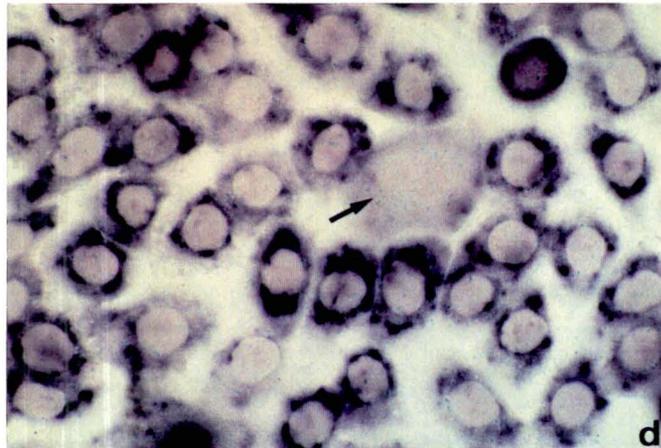
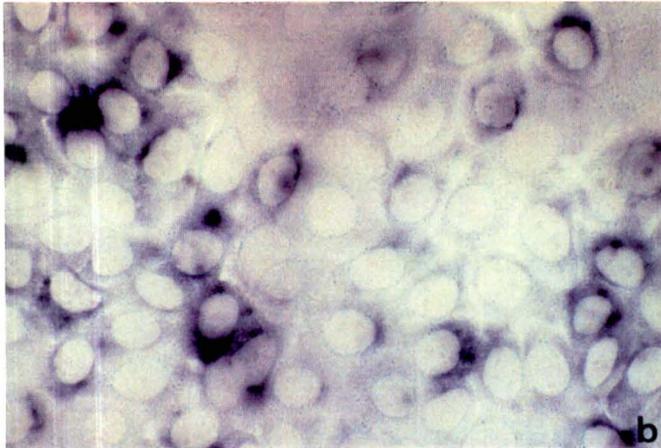


Figure 22 : Hybridation in situ du transcrit encodant la sous-unité d'intégrine $\alpha 2$. Les kératinocytes épidermiques sont cultivés à sous-confluence et à confluence en condition autonome (b. et c) et dans un milieu en présence d'EGF 5 ng/ml (d. et e.) et 10 ng/ml (f. et g.) G= 6666X. a : Contrôle réalisé sur une culture en croissance autonome par incubation avec la sonde sens G=4166X. Flèche : cellule de taille supérieure.

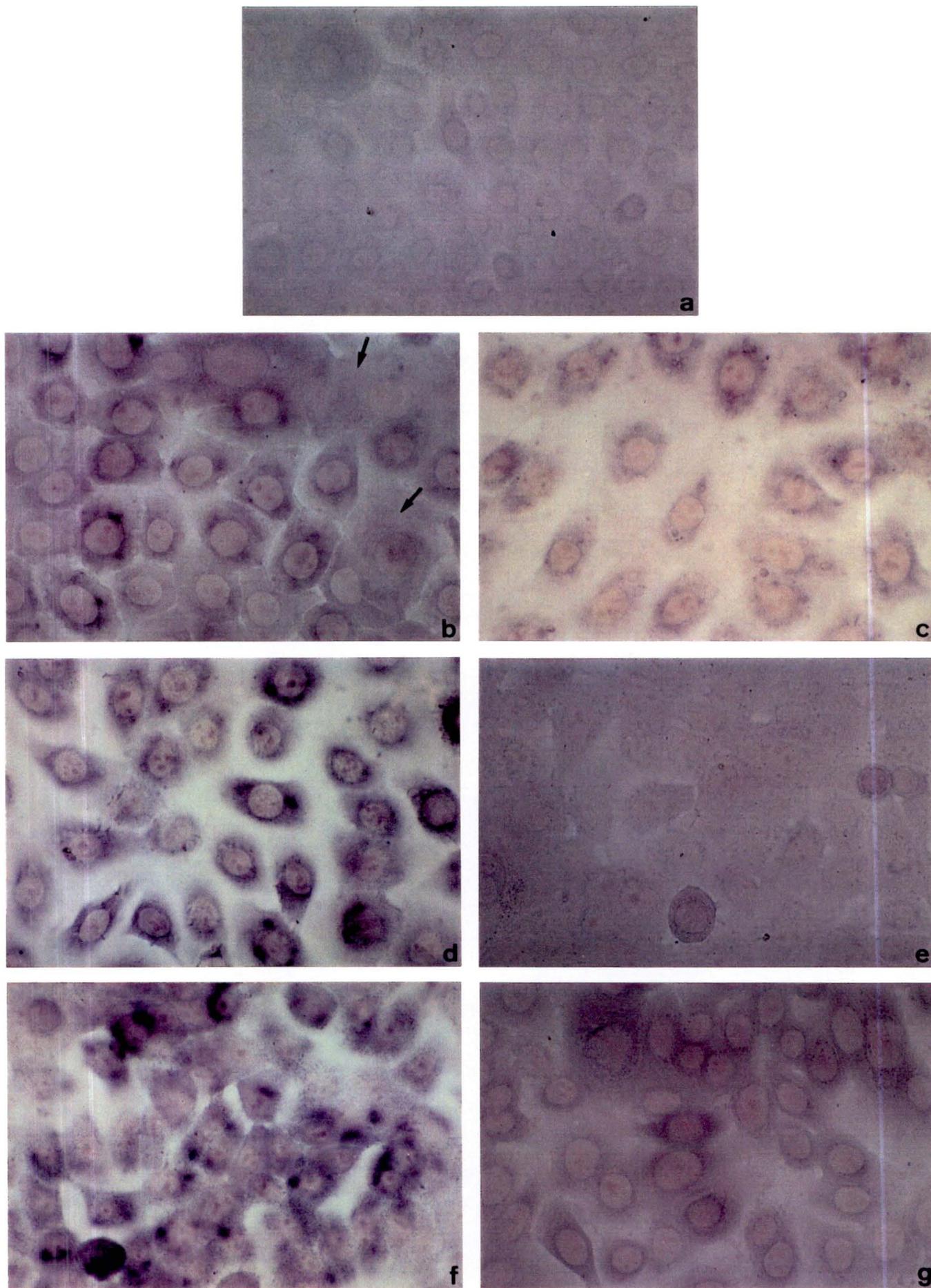


Figure 23 : Hybridation in situ du transcrite encodant la sous-unité d'intégrine $\beta 4$. Les kératinocytes épidermiques sont cultivés à sous-confluence et à confluence en condition autonome (b. et c) et dans un milieu en présence d'EGF 5 ng/ml (d. et e.) et 10 ng/ml (f. et g.) G= 6666X. a : Contrôle réalisé sur une culture en croissance autonome par incubation avec la sonde sens G=4166X. Flèche : cellule de taille supérieure.

7. ANALYSE QUANTITATIVE PAR CYTOMETRIE DE FLUX DES SOUS-UNITES D'INTEGRINE $\alpha 2$ ET $\alpha 6$ PRESENTES EN SURFACE DES CELLULES DANS DES CULTURES SOUS-CONFLUENTES ET CONFLUENTES.

Afin de compléter notre étude concernant l'expression des molécules d'adhésion, nous avons utilisé la cytométrie de flux pour quantifier la présence en surface des kératinocytes des sous-unités d'intégrine $\alpha 2$ et $\alpha 6$. Ces analyses ont été réalisées sur deux populations cellulaires (une culture en condition autonome et une culture réalisée en présence d'EGF) à sous-confluence et à confluence.

Seuls les résultats obtenus à sous confluence sont repris ici. L'étude réalisée à confluence a révélé des difficultés pratiques telles que l'aggrégation des cellules de la culture autonome immédiatement après leur trypsinisation ainsi qu'un pourcentage anormalement élevé de cellules mortes. Des expériences complémentaires seront à envisager sur des cultures confluentes si un éventuel traitement de cellules permet de solutionner le problème d'aggrégation.

Les résultats obtenus à sous-confluence pour des kératinocytes en culture autonome indiquent que la majorité des cellules, soit 90,2 % expriment à leur surface l'épitope de la sous-unité d'intégrine $\alpha 2$ (fig. 24b). En présence d'EGF (5 ng/ml fig. 24c), nous ne constatons pas de différences majeures dans la proportion des cellules exprimant $\alpha 2$ (84,2 %). Ces résultats sont en accord avec ceux décrits précédemment.

La présence de la sous-unité $\alpha 6$ sur 96 % des kératinocytes en culture autonome (fig. 24d) et sur 93,6% des cellules cultivées en présence d'EGF (fig. 24e) semble indiquer que cette sous-unité se comporte à sous-confluence comme $\alpha 2$. Les résultats obtenus correspondent ici aussi avec les observations réalisées dans les expériences de Northern blot et d'immunofluorescence.

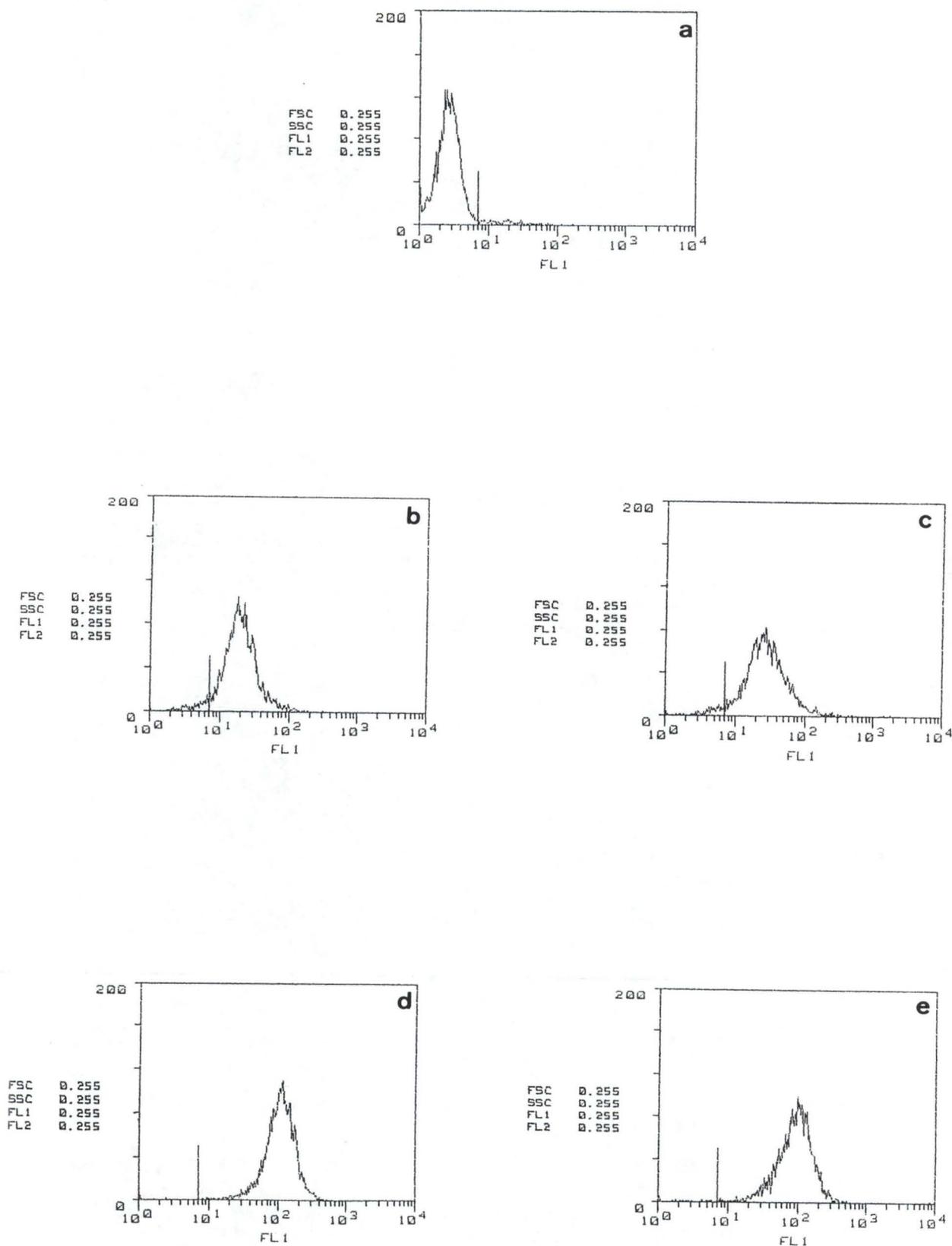


Figure 24 : Quantification par cytométrie de flux à sous-confluence de la présence des épitopes des sous-unités d'intégrine $\alpha 2$ (dil. 1/30) et $\alpha 6$ (dil. 1/100) sur des kératinocytes épidermiques en culture autonome (b et d) et en culture en présence d'EGF (c et e).
a : Contrôle réalisé en absence d'anticorps primaire

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

L'épiderme humain est un épithélium stratifié organisé en deux compartiments : un compartiment de prolifération constitué par une population de kératinocytes directement apposés à la membrane basale et un compartiment de différenciation comprenant les cellules situées dans les couches moyennes et les plus externes de l'épiderme. Le passage des kératinocytes du compartiment de prolifération à celui de différenciation implique une modulation de l'adhésion cellulaire qui est médiée dans l'épiderme par deux grandes familles de molécules : les intégrines et les cadhérines. Cette relation entre adhésion épidermique intercellulaire et adhésion à la matrice extracellulaire d'une part et le contrôle de l'équilibre qui régit prolifération et différenciation terminale des kératinocytes d'autre part a déjà été abondamment étudiée mais uniquement dans les modèles de culture complexes, en présence de sérum et de facteurs de croissance divers.

De l'ensemble des observations que nous avons effectuées *in vitro* dans un système de culture sans sérum, il ressort que l'expression des molécules qui interviennent dans l'adhésion des kératinocytes à la matrice extracellulaire, comme dans l'adhésion intercellulaire est soumise à une régulation complexe. Nous avons pu constater que lorsque les kératinocytes sont en phase proliférative (c'est-à-dire à sous-confluence), l'expression des molécules d'adhésion de la famille des intégrines est élevée, aussi bien pour les intégrines $\alpha 2\beta 1$ et $\alpha 3\beta 1$ dont la localisation en immunofluorescence suggère aussi un rôle dans l'adhésion intercellulaire, que pour l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ strictement impliquée dans l'adhésion à la matrice extracellulaire (Carter *et al.*, 1990).

Lorsque les kératinocytes en culture atteignent la confluence, ils perdent leur pouvoir de clonogénicité (Poumay et Pittelkow, 1995) et entament progressivement leur programme de différenciation. L'expression des kératines suprabasales 1 et 10 par ces cellules est caractéristique de cette phase de transition (Poumay et Pittelkow, 1995). A partir de ce moment, les kératinocytes entament une migration de la couche basale vers une couche supérieure ce qui conduit à une stratification progressive de la culture. La stratification implique pour les cellules une diminution de leur adhésion à la matrice, mais aussi une augmentation de leur adhésion avec les cellules voisines (Watt, 1984). Certains auteurs (Braga *et al.*, 1995; Hotchin *et al.*, 1995) ont démontré que la différenciation et la stratification des kératinocytes s'accompagne d'une régulation négative de l'expression des intégrines de type $\beta 1$, conduisant à la perte de ces récepteurs à la surface cellulaire. Nos expériences sont en accord avec ces observations et suggèrent également que la régulation de l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ suit le même chemin.

accord avec ces observations et suggèrent également que la régulation de l'intégrine $\alpha 6 \beta 4$ suit le même chemin.

Lors de la stratification, les contacts intercellulaires qui s'établissent entre kératinocytes voisins impliquent une autre famille de molécules d'adhésion : les cadhérines. Dans l'épiderme, la E-cadhérine et la P-cadhérine participent à l'établissement de ces contacts avec les cadhérines desmosomales. Nous avons pu remarquer au cours des différentes expériences réalisées que la présence de la E-cadhérine n'est pas limitée, comme le pensent certains auteurs (Hodivala et Watt, 1994), aux couches suprabasales et n'est donc pas uniquement exprimée quand les cellules en culture atteignent la confluence. Nos résultats suggèrent en effet que cette molécule est déjà présente lorsque les kératinocytes sont en phase proliférative et que le passage de la sous-confluence à la confluence ne s'accompagne pas d'une augmentation importante dans l'expression de la E-cadhérine. D'autre part, il semble que la E-cadhérine soit également exprimée indépendamment de la concentration en calcium extracellulaire du milieu de croissance où sont incubés les kératinocytes. Watt *et al.* (1984) ont par ailleurs démontré que la présence de la E-cadhérine aux sites de contacts intercellulaires n'était observée que lorsque la concentration en calcium était de 1.8 mM. Dans nos conditions de culture, nous observons cette localisation intercellulaire alors que la concentration en calcium du milieu est de 0,09 mM.

Le processus de différenciation terminale se déroule dans un épiderme normal lorsque les kératinocytes migrent au travers des couches suprabasales pour atteindre la surface tissulaire. Dans la couche granuleuse, ils expriment alors massivement (entre autres) une protéine précurseur de l'enveloppe cornée, l'involucrine (Watt, 1984). A cet égard, nous avons observé que l'involucrine est déjà exprimée quoique faiblement, à sous-confluence, et son expression augmente fortement après la confluence.

Au cours de cette étude, nous nous sommes également intéressés aux variations d'expression des intégrines et de la E-cadhérine lorsque les kératinocytes sont cultivés en présence d'EGF. L'EGF est un facteur de croissance nécessaire *in vitro* aux kératinocytes afin de stimuler leur croissance au cours des premiers jours suivant l'ensemencement, lorsque la densité est clonale. Cependant, lorsque la densité cellulaire augmente, les kératinocytes deviennent capables de proliférer en absence de tout facteur de croissance exogène (EGF ou TGF- α); ils sont alors en croissance autonome et sont stimulés par effet autocrine et paracrine des facteurs qu'ils secrètent (AR, TGF- α , HB-EGF; Cook *et al.*, 1991). L'effet mitogène de l'EGF a été illustré dans la littérature et l'ajout de ce facteur de croissance au milieu de culture s'accompagne d'une modification dans la morphologie des cellules et d'une inhibition de la formation de contacts intimes entre cellules. Nous avons pu constater qu'en phase proliférative l'expression des intégrines ne varie presque pas lorsque l'EGF est présent. Par contre, lorsque les kératinocytes ont atteint la confluence, l'EGF maintient l'expression de ces mêmes molécules qui diminue sinon de façon importante dans une culture autonome. Par ailleurs, l'EGF semble

inhiber l'expression de la E-cadhérine aussi bien à sous-confluence qu'à confluence. A cet égard, il a déjà été démontré que l'EGF en se fixant sur son récepteur peut induire une phosphorylation des caténines et empêcher celles-ci d'interagir avec les cadhérines. Hovidala et Watt (1994) ont ainsi proposé que le blocage de la E-cadhérine à confluence permet aux cellules de conserver leurs intégrines et ont par là démontré que la E-cadhérine joue un rôle dans la régulation négative de l'expression des intégrines lors de la différenciation. Par ailleurs, il serait intéressant d'étudier si d'autres membres de la famille de l'EGF, comme le TGF- α , l'amphiréguline ou l'heparin binding-EGF like growth factor (et qui se fixent aussi sur le récepteur de l'EGF) agissent sur l'expression des molécules d'adhésion de façon similaire à celle de l'EGF.

Nous avons aussi testé l'effet de l'ajout de NDF dans la culture sur l'expression des molécules d'adhésion épidermiques et nous avons pu constater que globalement l'effet du NDF est semblable à celui de l'EGF. Cependant, comme le NDF a été récemment identifié comme facteur produit par les kératinocytes épidermiques en prolifération (Poumay et Pittelkow, sous presse), d'autres recherches restent encore à accomplir avant de pouvoir élucider le rôle que ce type de facteur activant d'autres tyrosines kinases que l'EGF tient au sein de l'épiderme in vivo.

L'étude des moyens de contrôle de l'expression des molécules de type intégrines et cadhérines dans un système de culture in vitro permet notamment de mieux comprendre leurs implications dans des processus physiologiques in vivo, comme la cicatrisation. En effet, le processus de cicatrisation nécessite un détachement des kératinocytes de la membrane basale, une migration latérale vers le site de la blessure, une prolifération cellulaire et une régénération finale de la membrane basale au site lésé. Larjava *et al.* (1993) ont observé que l'expression des intégrines de type $\beta 1$ est augmentée dans les kératinocytes au cours de la migration. Les sous-unités $\alpha 2$ et $\alpha 3$ et l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ sont continuellement exprimées par les kératinocytes, tandis que la sous-unité $\alpha 5$ n'apparaît qu'au cours de la phase de réépithélialisation, lorsque des composants de la membrane basale comme les collagènes de type IV et VII ou la laminine sont à nouveau synthétisés par les cellules. D'autre part, la distribution des intégrines est modifiée dans les kératinocytes en migration. En effet, alors que les intégrines de type $\beta 1$ sont localisées principalement sur les faces latérales et que l' $\alpha 6\beta 4$ se situe à la face basale des kératinocytes basaux en conditions normales, lors d'une blessure, ces intégrines se retrouvent dans les filipodes des kératinocytes en migration et aussi tout autour des cellules dans plusieurs couches cellulaires du feuillet migratoire. Ces observations indiquent que les kératinocytes en migration élargissent leur répertoire et leur distribution d'intégrines. Il est probable que ces changements soient régulés à la fois par les cytokines présentes dans la zone lésée et par des ligands de la matrice extracellulaires provisoire.

L'implication des intégrines et cadhérines a également été démontrée dans plusieurs pathologies allant du psoriasis au cancer. Plus de 85% des tumeurs malignes chez l'homme sont des carcinomes, c'est-à-dire trouvent leur origine dans un tissu épithélial. Dans de nombreux

(Doyle *et al.*, 1995). L'expression des cadhérines a été étudiée dans de nombreux cancers. Il ressort de ces études que la réduction de l'activité des cadhérines semble être corrélée avec la capacité infiltrative des cellules tumorales. Cette corrélation apparaît également dans la formation à distance de métastases dans de nombreux cancers. Dans certaines tumeurs, l'expression des cadhérines est hétérogène ce qui suggère l'existence d'un mécanisme permettant de réguler transitoirement l'expression des cadhérines en aboutissant à une perte locale de ces molécules. Un autre mécanisme possible implique la phosphorylation de la β -caténine via des récepteurs de facteurs de croissance comme l'EGF et conduit à une déstabilisation des contacts intercellulaires (Takeichi, 1993). Les tumeurs épithéliales se caractérisent également par un manque d'organisation spatiale dans l'expression des intégrines. En effet, alors que dans les épithéliums normaux, les intégrines comme $\alpha 2\beta 1$ ou $\alpha 6\beta 4$ sont principalement exprimées sur la face basale des cellules basales, leur arrangement est désordonné dans les carcinomes et leur distribution intracellulaire apparaît moins abondante (Juliano et Varner, 1993). Cependant beaucoup d'inconnues subsistent.

Nous avons abordé par notre travail les questions qui concernent le contrôle de l'expression des molécules d'adhésion dans des cellules épidermiques normales, et nous avons vu que particulièrement des facteurs de croissance modulent cette expression. Or, pour maintenir l'homéostasie de l'épiderme, il est essentiel de contrôler prolifération et différenciation cellulaires. Pour ce contrôle, deux types de signaux en provenance de l'environnement cellulaire semblent impliqués : d'une part la matrice extracellulaire et d'autre part les facteurs de croissance qui agissent sur les kératinocytes. Mais ces deux signaux doivent également interagir en de multiples circonstances. Aussi, la perspective d'étudier et de comparer dans notre système de culture le contrôle, ou l'absence de contrôle de l'expression des intégrines et cadhérines dans des cellules transformées par rapport à des cellules normales, ou encore d'étudier l'influence de facteurs de croissance tels que l'EGF, s'ouvre sur une voie particulièrement attractive et stimulante d'une meilleure compréhension du phénomène de tumorigenèse.

BIBLIOGRAPHIE

ADAMS J.C. et WATT F.M. (1991)

"Expression of $\beta 1$, $\beta 3$, $\beta 4$ and $\beta 5$ integrins by human epidermal keratinocytes and non-differentiating keratinocytes"»

J. Cell. Biol.; Vol.115, No.3 : 829-841

AMAGAI Masayuki (1995)

"Adhesion molecules. I : keratinocyte-keratinocyte interactions; cadherins and pemphigus"

J. Invest. Dermatol.; Vol.104, No.1 : 146-151

BARNARD J.A., GRAVES-DEAL R., PITTELKOW M.R., DUBOIS R., COOK P., RAMSEY G.W., BISHOP P.R., DAMSTRUP L. et COFFEY R.J. (1994)

"Auto- and cross-induction within the mammalian epidermal growth factor-related peptide family"

J; Biol. Chem; Vol.269, No.36 : 22817-22822

BARRANDON Y. et GREEN H. (1987)

"Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication"

Proc. Natl. Acad. Sci; Vol.84 : 2302-2306

BARRANDON Y. et GREEN H. (1987)

"Cell migration is essential for sustained growth of keratinocyte colonies : the roles of transforming growth factor- α and epidermal growth factor"

Cell; Vol.50 : 1131-1137

BOYCE S.T. et HAM R.G. (1983)

"Calcium-regulated differentiation of normal human epidermal keratinocytes in chemically defined clonal culture and serum-free serial culture"

J. Inv. Dermatol.; 81 : 33s-40s

BRACKE M., MAREEL M., VAN HOORDE L., VAN MARCK V., VAN ROY F., et VERMEULEN S. (1995)

"Regulation of the invasion suppressor function of the cadherin/catenin complex"»

Sous presse

- BRAGA V.M.M., HODIVALA K.J., et WATT F.M. (1995)
"Calcium-induced changes in distribution and solubility of cadherins, integrins and their associated cytoplasmic proteins in human keratinocytes"»
Cell Adhesion and Communication; Vol.3 : 201-215
- BRIGGAMAN Robert A. et GOLDSMITH Lowell A. (1982)
"Biochemical composition of the epidermal-dermal junction and other basement membrane"
J; Inv. Dermatol.; 78 : 1-6
- BUXTON R.S. et MAGEE A.I. (1992)
"Structure and interactions of desmosomal and other cadherins"
Seminars in Cell Biology, Vol.3 : 157-167
- CARPENTER G. et COHEN S. (1990)
"Epidermal growth factor"»
J. Biol. Chem.; Vol.265, No.14 : 7709-7712
- CARTER W.G., WAYNER E.A., BOUCHARD T.S., et KAUR P. (1990)
"The role of integrins $\alpha 2\beta 1$ and $\alpha 3\beta 1$ in cell-cell and cell-substrate adhesion of human epidermal cells"
J. Cell. Biol.; Vol.110 : 1387-1404
- CHEN J.D., KIM J.P., ZHANG K., SARRET Y., WYNN K., KRAMER R.H., et WOODLEY D.T. (1993)
"Epidermal growth factor (EGF) promotes human keratinocyte locomotion on collagen by increasing the $\alpha 2$ integrin subunit"
Exp. Cell. Res.; 209 : 216-223
- CLARK E.A. et BRUGGE J.S. (1995)
"Integrins and signal transduction pathways : the road taken"
Science; Vol.268 : 233-238
- COOK P.W., MATTOX P.A., KEEBLE W.W., PITTELKOW M.R., PLOWMAN G.D., SHOYAB M., ADELMAN J.P, et SHIPLEY G.D. (1991)
"A heparin sulfate-regulated human keratinocyte autocrine factor is similar or identical to amphiregulin"
Mol. Cell. Biol.; Vol.11, No.5 : 2547-2557

DANILENKO D.M., RING B.D., LU J.Z., TARPLEY J.E., CHANG D., LIU N., WEN D.,
et PIERCE G.F. (1995)

"Neu differentiation factor upregulates epidermal migration and integrin expression in excisional
wounds"

J. Clin. Invest.; Vol.95 : 842-851

DERYNCK Rik (1992)

"The physiology of transforming growth factor- α "

Adv. Canc. Res.; Vol.58 : 27-52

DOYLE J.P., STEMPAK J.G., COWIN P., COLMAN D.R., et D'URSO D. (1995)

" Protein zero, a nervous system adhesion molecule, triggers epithelial reversion in host
carcinoma cells"»

J. Cell. Biol.; Vol.131, No.2 : 465-482

DROZDOFF V. et PLEDGER W.J. (1993)

" Commitment to differentiation and expression of early differentiation markers in murine
Keratinocytes in vitro are regulated independently of extracellular calcium concentrations "

J. Cell. Biol.; Vol.123, No.4 : 909-919

ECKERT Richard L. (1989)

"Structure, function, and differentiation of the keratinocyte"

Physiol. Rev.; Vol.69 : 1316-1346

ELDER J.T., FISCHER G.J., LINDQUIST P.B., BENNETT G.L., PITTELKOW M.R.,
COFFEY R.J.Jr., ELLINGSWORTH L., DERYNCK R., et VOORHEES J.J. (1989)

" Overexpression of transforming growth factor α in psoriatic epidermis"»

Science, 243 : 811-814

FRY D.W., KRAKER A.J., MCMICHAEL A., AMBROSO L.A., NELSON J.M.,
LEOPOLD W.R., CONNORS R.W., et BRIDGES A.J. (1994)

"A specific inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase"

Science; Vol.265 : 1093-1095

FUCHS Elaine (1993)

"Epidermal differentiation and keratin gene expression"

J; Cell. Sci.; supplément 17 : 197-208

GAIETTA G., REDELMEIER T.E., JACKSON M.R., TAMURA R.N., et QUARANTA V. (1994)

"Quantitative measurement of $\alpha 6\beta 1$ and $\alpha 6\beta 4$ integrin internalization under cross-linking : a possible role for $\alpha 6$ cytoplasmic domains "

J. Cell. Sci.; 107 : 3339-3349

GARROD David R. (1993)

"Desmosomes and hemidesmosomes"

Curr. Op. Cell. Biol.; 5 : 30-40

GIL S.G, BROWN T.A., RYAN M.C., CARTER W.G. (1994)

"Junctional epidermolysis bullosis : defects in expression of epiligrin/nicein/kalinin and integrin $\beta 4$ that inhibit hemidesmosome formation"

J. Invest. Dermatol.; Vol.103, No.5 : 31s-38s

GIMMOND C., DE MELKER A., AUMAILLEY M., et SONNENBERG A. (1995)

"The cytoplasmic domain of $\alpha 6A$ integrin subunit is an vitro substrate for protein kinase C"

Exp. Cell. Res.; 216 : 232-235

GRUNWALD Gerald B. (1993)

"The structural and functional analysis of cadherin calcium-dependent cell adhesion molecules"

Curr. Op. Cell. Biol.; 5 : 797-805

HAAS Thomas A. et PLOW Edward F. (1994)

"Integrin-ligand interactions : a year in review"

Curr. Op. Cell. Biol.; 6 : 656-662

HODIVALA K.J. et WATT F. (1994)

"Evidence that cadherins play a role in the downregulation of integrin expression that occurs during keratinocytes terminal differentiation"

J. Cell. Biol.; Vol.124, No.4 : 589-600

HOGERVORST F., ADMIRAAL L.G., NIESSEN C., KUIKMAN I., JANSSEN H., DAAMS H., et SONNENBERG A. (1993)

"Biochemical characterization and tissue distribution of the A and B variants of the integrin $\alpha 6$ subunit"

J. Cell. Biol.; Vol.121, No.1 : 179-191

HOLBROOK Karen A. (1994)

"Ultrastructure of the epidermis"

The Keratinocyte Handbook : 3-39

HOLMES W.E., SLIWKOWSKY M.X., AKITA R.W., HENZEL W.J., LEE J., PARK J.W., YANSURA D., ABADI N., RAAB H., LEWIS G.D., SHEPARD M., KUANG W.J., WOOD W.I., GOEDDEL D.V., VANDLEN R.L. (1992)

" Identification of heregulin, a specific activator of p185^{erbB2} "

Science; Vol.256 : 1205-1210

HOSCHUETZKY H., ABERLE H., et KEMLER R. (1994)

" β -catenin mediates the interaction of the cadherin-catenin complex with epidermal growth factor receptor"

J. Cell. Biol.; Vol.127, No.5 : 1375-1380

HOTCHIN N.A., GANDARILLAS A., et WATT F.M. (1995)

"Regulation of cell surface β 1 integrin levels during keratinocyte terminal differentiation"

J. Cell. Biol.; Vol.128, No.6 : 1209-1219

HUFF C.A., YUSPA S.H., et ROSENTHAL D. (1993)

" Identification of control elements 3' to the human keratin 1 gene that regulate cell type and differentiation-specific expression"»

J. Biol. Chem.; Vol.268, No.1 : 377-384

HUMPHRIES Martin J. (1990)

"The molecular basis and specificity of integrin-ligand interactions"

J. Cell. Sci.; 97 : 585-592

HYNES Richard O. (1992)

"Integrins : versatility, modulation, and signaling in cell adhesion"

Cell; vol.69 : 11-25

JONES J.C.R., ASMUTH J., BAKER S.E., LANGHOFER M., ROTH S.I., et HOPKINSON S.B. (1994)

"Hemidesmosomes : extracellular matrix/intermediate filament connectors"

Exp. Cell. Res.; 213 : 1-11

JONES P.H., HARPER S., et WATT F.M. (1995)

"Stem cell patterning and fate in human epidermis"

Cell; Vol.80 : 83-93

JONES Philip H. et WATT Fiona M. (1993)

"Separation of human epidermal stem cells from transit amplifying cells on basis of differences in integrin function and expression"

Cell; Vol.73 : 713-724

JULIANO Rudy L. et VARNER Judy A. (1993)

"Adhesion molecules in cancer : the role of integrins"

Curr. Op. Cell. Biol.; 5 : 812-818

KAISER H.W., NESS W., JUNGBLUT I., BRIGGAMAN R.A., KREYSEL H.W., et O'KEEFE E.J. (1993)

"Adherens junctions : demonstration in human epidermis"

J. Invest. Dermatol.; Vol.100, No.2 : 180-185

KAISER H.W., NESS W., OFFERS M., O'KEEFE E., et KREYSEL H.W. (1993)

"Talin : adherens junction protein is localized at the epidermal-dermal interface in skin"

J; Invest. Dermatol.; Vol.101, No.6 : 789-793

KING L.E., STOSCHECK C.M., GATES R.E., et NANNEY L.B. (1991)

"Epidermal growth factor and transforming growth factor- α "

Physiology, Biochemistry and molecular biology of the skin, second edition, Vol.1

KOCH P.J. et FRANKE W.W. (1994)

"Desmosomal cadherins : another growing multigene family of adhesion molecules"

Curr. Op. Cell. Biol.; 6 : 682-687

LARJAVA H., SALO T., HAAPASALMI K., KRAMER R.H., et HEINO J. (1993)

" Expression of integrins and basement membrane components by wound keratinocytes"»

J. Clin. Invest.; Vol.92 : 1425-1435

LEGAN P.K., COLLINS J.E., et GARROD D.R. (1992)

"The molecular biology of desmosomes and hemidesmosomes : 'what's in a name?'"

Bioessays; vol.14, No.6 : 385-393

LEIGH I.M., et WATT F.M. (1994)

" The culture of human epidermal keratinocytes"»

The keratinocyte handbook : 43-53

LEWIS J.E., JENSEN P.J., et WHEELLOCK M.J. (1994)

"Cadherin function is required for human keratinocytes to assemble desmosomes and stratify in response to calcium"

J. Invest. Dermatol.; Vol.102, No.6 : 870-877

MANN G.B., FOWLER K.J., GABRIEL A., NICE E.C., WILLIAMS R.L., et DUNN A.R. (1993)

"Mice with a null mutation of the TGF α gene have abnormal skin architecture, wavy hair, and curly whiskers and often develop corneal inflammation"

Cell; Vol.73 : 249-261

MARCHISIO P.C., BONDANZA S., CREMONA O., CANCEDDA R. et DELUCA M. (1991)

"Polarized expression of integrin receptors ($\alpha 6\beta 4$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, and $\alpha v\beta 5$) and their relationship with the cytoskeleton and basement membrane matrix in cultured human keratinocytes"

J. Cell. Biol.; Vol.112, No.4 : 761-773

MATTEY D.L., BURDGE G., et GARROD D.R. (1990)

"Development of desmosomal adhesion between MDCK cells following calcium switching "

J. Cell. Sci.; 97 : 689-704

MERCURIO Arthur M. (1995)

"Laminin receptors : achieving specificity through cooperation"

Trends. Cell. Biol.; Vol.5 : 419-423

MOLL R., FRANKE W.W., et SCHILLER D.L. (1982)

" The catalog of human cytokeratins : patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells"»

Cell; Vol. 31 : 11-24

PELES E., BACUS S.S., KOSKI R.A., LU H.S., WEN D., OGDEN S.G., LEVY R.B., et YARDEN Y. (1992)

" Isolation of the neu/HER-2 stimulatory ligand : a 44 kd glycoprotein that induces differentiation of mammary tumor cells"»

Cell, 69 : 205-216

PELES E., et YARDEN Y. (1993)

« Neu and its ligands : from an oncogene to neural factors »

Bioassays; 15 : 815-824

POUMAY Y., BOUCHER F., DEGEN A., et LELOUP R. (1991)

"Inhibition of basal cell proliferation during storage of detached cultured epidermal keratinocyte sheets"

Acta Derm Venereol (Stockh); 71 : 195-198

POUMAY Y., BOUCHER F., LECLERCQ-SMEKENS M., DEGEN A., et LELOUP R. (1993)

"Basal cell adhesion to a culture substratum controls the polarized spatial organization of human epidermal keratinocytes into proliferating basal and terminally differentiating suprabasal populations"

Epith. Cell. Biol.; 2 : 7-16

POUMAY Y., ECKERT R.L., et PITTELKOW M.R. (1995)

" Expression of suprabasal K1/K10 keratins and the expression of involucrin are differently regulated in serum-free cultures of human epidermal keratinocytes"»

Sous presse

POUMAY Y., LECLERCQ-SMEKENS M., GRAILLY S., DEGEN A., et LELOUP R. (1992)

"Specific internalization of basal membrane domains containing the integrin $\alpha 6\beta 4$ in dispase-detached cultured human keratinocytes"

Eur. J. Cell. Biol.; 60 : 12-20

POUMAY Y. et PITTELKOW M.R. (1995)

"Cell density and culture factors regulate keratinocyte commitment to differentiation and expression of suprabasal K1/K10 keratins"

J. Invest. Dermatol.; Vol.104, No.2 : 271-276

POUMAY Y. et PITTELKOW M.R. (1995)

"Neu differentiation factors (NDF)/heregulins are differentially expressed by human epidermal keratinocytes and suppress expression of differentiation markers through activation of HER2 in differentiating keratinocytes"

Sous presse

POUMAY Y., ROLAND I.H., LECLERCQ-SMEKENS M., LELOUP R. (1994)

"Basal detachment of the epidermis using dispase : tissue spatial organization and fate of integrin $\alpha 6\beta 4$ and hemidesmosomes"

J. Invest. Dermatol.; Vol.102, No.1 : 111-117

PITTELKOW Mark R., COOK Paul W., SHIPLEY Gary D., DERYNCK Rik, et COFFEY Robert J., Jr (1993)

"Autonomous growth of human keratinocytes requires epidermal growth factor receptor occupancy"

Cell Growth & Differentiation; Vol.4 : 513-521

RHEINWALD James G. et GREEN Howard (1975)

"Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes : the formation of keratinizing colonies from single cells"

Cell; Vol.6 : 331-344

ROH Joo-Young et STANLEY John R. (1995)

"Intracellular domain of desmoglein 3 (Pemphigus vulgaris antigen) confers adhesive function on the extracellular domain of E-cadherin without binding catenins"

J. Cell. Biol.; Vol.128, No.5 : 939-947

ROUSSELLE P., LUNSTRUM GP., KEENE DR., et BURGESSON RE. (1991)

"Kalinin : an epithelium-specific basement membrane adhesion molecule that is a component of anchoring filaments"

J. Cell. Biol.; 114 : 567-576

RYYNANEN J., JAAKOLA S., ENGVALL E., PELTONEN J. et UITTO J. (1991)

" Expression of b4 integrins in human skin : comparison of epidermal distribution with β 1-integrin epitopes, and modulation by calcium and vitamin D₃ in cultured keratinocytes"»

J. Invest. Dermatol.; Vol.97 , No.3 : 562-567

SCHMIDT A., HEID H.W., SCHAFFER S., NUBER U.A., ZIMBELMANN R. et FRANKE W.W. (1994)

"Desmosomes and cytoskeletal architecture in epithelial differentiation : cell type-specific plaque components and intermediate filament anchorage"

Eur. J. Cell. Biol.; 65 : 229-245

SCHWARTZ Martin Alexander (1992)

" Transmembrane signalling by integrins "

Trends. Cell. Biol.; Vol.2 : 304-307

SMITH J.W., PIOTROWICZ R.S., et MATHIS D. (1994)

"Mechanism for divalent cation regulation of β 3-integrins"

J. Biol. Chem.; Vol.269, No.2 : 960-967

SYMINGTON B.E., TAKADA Y., et CARTER W.G. (1993)

"Interaction of integrins α 3 β 1 and α 2 β 1 : potential role in keratinocyte intercellular adhesion"

J. Cell. Biol.; Vol.120, No.2 : 523-535

TAKEICHI Masatoshi (1993)

"Cadherins in cancer : implications for invasion and metastasis"

Curr. Opin. Cell. Biol.; 5 : 806-811

THOMPSON K.L., ROSNER M.R. (1989)

" Regulation of epidermal growth factor receptor gene expression by retinoic acid and epidermal growth factor "

J. Biol. Chem.; 264 (6) : 3230-3234

VERRANDO Patrick (1989)

"La jonction dermo-épidermique"

Séminaire INSERM; Vol.201 : 97-107

WATT Fiona M. (1984)

" Selective migration of terminally differentiating cells from the basal layer of cultured human epidermis "

J. Cell. Biol.; Vol.98 : 16-21

WATT Fiona M. (1988)

"Keratinocyte cultures : an experimental model for studying how proliferation and terminal differentiation are co-ordinated in the epidermis"

J. Cell. Sci.; 90 : 525-529

WATT F.M., MATTEY D.L., et GARROD D.R. (1984)

" Calcium-induced reorganization of desmosomal components in cultured human keratinocytes "

J. Cell. Biol.; Vol.99 : 2211-2215

WATT F.M., JORDAN P.W., et O'NEILL C. (1988)

" Cell shape controls terminal differentiation of human epidermal keratinocytes "

Proc. Natl. Acad. Sci.; Vol.85 : 5576-5580

WEN D., SUGGS S.V., KARUNAGARAN D., LIU D., CUPPLES R.L., LUO Y., JANSSEN A., BEN-BARUCH N., TROLLINGER D.B., JACOBSEN V.L., MENG S.Y., LU H.S., HU S., CHANG D., YANG W. YANIGAHARA D.K., YARDEN Y. (1994)

" Structural and functional aspects of the multiplicity of neu differentiation factors "

Mol. Cell. Biol., 14 : 1909-1919

WILLE J.J., PITTELKOW M.R., SHIPLEY G.D., et SCOTT R.E. (1984)

" Integrated control of growth and differentiation of normal human prokeratinocytes cultured in serum-free medium : clonal analyses, growth kinetics and cell cycle studies "

J. Cell. Physiol.; 121 : 31-44