



## THESIS / THÈSE

### MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

#### Analyse de l'expression des isoformes de NDF/Heréguline et de ses récepteurs proto-oncogènes dans les kératinocytes épidermiques *in vivo* et en culture

De Potter, Isabelle

*Award date:*  
1996

*Awarding institution:*  
Universite de Namur

[Link to publication](#)

#### General rights

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

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

#### Take down policy

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

FACULTES UNIVERSITAIRES  
NOTRE-DAME DE LA PAIX



NAMUR

**FACULTE DES SCIENCES**

-----

**"Analyse de l'expression des isoformes de NDF/Heréguline et de ses récepteurs proto-oncogènes dans les kératinocytes épidermiques *in vivo* et en culture"**

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

**Isabelle De Potter  
Décembre 1996**

**"Analyses de l'expression des isoformes de NDF/Heréguline et de ses récepteurs proto-oncogènes dans les kératinocytes épidermiques *in vivo* et en culture"**

De Potter Isabelle

Résumé

Le kératinocyte est le type cellulaire responsable de l'homéostasie de l'épiderme. Typiquement, les cellules de ce type passent par une phase de prolifération qui permet de renouveler constamment le stock cellulaire et qui précède une phase de différenciation produisant des cellules cornées prêtes à desquamer. Durant cette maturation cellulaire, la physiologie de la cellule est régulée notamment par des facteurs extérieurs tels les facteurs de croissance. Notre travail s'est intéressé à l'étude de l'expression d'un facteur appartenant à la famille de l'EGF, le NDF, et à ses récepteurs, HER2 et HER3, dans des kératinocytes *in vitro* et *in vivo*. L'expression de NDF diminue avec l'apparition de caractères de différenciation, tandis que l'expression de ses récepteurs augmente dans ces conditions. Cette diminution d'expression de NDF est aussi observée si différentes isoformes sont étudiées séparément bien que l'isoforme  $\beta 1$  semble être plus influencée par la confluence que les isoformes  $\alpha$  et  $\beta 3$ . L'EGF, qui retarde l'apparition des marqueurs de différenciation (K1/K10), a un effet inhibiteur sur l'expression de NDF et de HER3 aussi bien dans des cultures de kératinocytes en prolifération qu'en différenciation tandis qu'il ne joue un effet inhibiteur sur l'expression de HER2 que dans des cultures de kératinocytes en différenciation. Notre travail montre une régulation plus modulée de l'expression de NDF et de ses récepteurs dans des kératinocytes *in vivo*. Il semble donc que la différenciation cellulaire a un effet sur la régulation de l'expression de HER2 mais que d'autres facteurs tels que la densité cellulaire ont également un rôle à jouer dans la régulation de l'expression de HER3 et de NDF. Puisque l'expression de NDF et de ses récepteurs est régulée dans l'épiderme, l'hypothèse d'un rôle de ce système dans le contrôle de la physiologie de la peau peut être posée et l'étude de cette expression dans des conditions de cicatrisation ou d'hyperprolifération est une perspective à envisager.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Juin 1996

**Promoteur:** R. Leloup

**Co-promoteur :** Y. Poumay

## **Remerciements.**

Dix mois se sont écoulés depuis mon arrivée au département d'Histologie-Embryologie. Dix mois au cours desquels tous les membres de ce département m'ont soutenue dans la réalisation de mon mémoire.

J'aimerais tout d'abord remercier Monsieur le Professeur R. Leloup pour m'avoir accueillie avec tant de gentillesse dans son unité ainsi que Monsieur le Professeur Y. Poumay, co-promoteur, pour m'avoir guidée et conseillée tout au long de mon travail et pour avoir su me transmettre son enthousiasme.

J'exprime également mes plus vifs remerciements à :

Madame F. de Boch-Kemper-Herphelin pour sa grande compétence, sa disponibilité, sa gentillesse et l'intérêt qu'elle m'a témoigné au cours de cette année.

Madame M. Leclercq-Smekens et Monsieur R. Déom pour l'aide qu'ils m'ont apportée et pour leur sympathie.

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

Madame A. Degen pour ses conseils et sa bonne humeur.

Madame F. Zune pour son assistance amicale.

Monsieur J-M Pirson pour son aide technique.

Monsieur D. Van Acker pour sa compétence et la rapidité de son travail photographique.

Le personnel de "Ciné Photo Hall" pour la qualité et la ponctualité de la réalisation des photos couleurs.

Je souhaite également exprimer toute ma reconnaissance aux membres du département de microscopie électronique pour m'avoir accueillie avec tant de sympathie ainsi qu'à toutes les personnes qui ont contribué à me faire vivre dix mois exceptionnels.

Je remercie enfin mon époux pour m'avoir supportée et encouragée tout au long de ce travail ainsi que mes parents et mes grand-parents qui m'ont donné l'envie de faire de la biologie.

**INTRODUCTION.**

1. La peau.	1
1.1 Généralités.	1
1.2 Epiderme.	2
1.2.1 Généralités.	2
1.2.2 Première classification des kératinocytes épidermiques.	2
1.2.3 Seconde classification.	3
1.2.4 Culture des kératinocytes épidermiques.	5
2. Facteurs de croissance et récepteurs tyrosine kinase.	6
2.1 Généralités.	6
2.1.1 Epithelial Growth Factor et facteurs apparentés.	6
2.1.1.1 Epithelial Growth Factor (EGF).	7
2.1.1.2 Transforming Growth Factor alpha (TGF-a).	8
2.1.1.3 Amphiréguline (AR).	8
2.1.1.4 Heparin-Binding EGF (HB-EGF).	8
2.1.2 Récepteurs tyrosine kinase.	9
2.2 Récepteurs HER2-HER3-HER4.	12
2.2.1 Récepteur HER2/c-erbB-2/neu.	12
2.2.2 Récepteur HER3/c-erbB-3.	13
2.2.3 Récepteur HER4.	14
2.3 Neu Differentiation Factor (NDF)/Heregulin.	14
3. Théorie sur la RT-PCR in situ.	18
4. Objectifs du travail.	22

**MATERIEL & METHODES.**

1. Culture des kératinocytes épidermiques.	24
1.1 Matériel.	24
1.2 Méthode.	24
1.2.1 Etablissement des cultures primaires et secondaires de kératinocytes à partir des prélèvements cutanés.	24
1.2.2. Etablissement de cultures tertiaires.	25
1.2.2.1 Culture en milieu GF $\theta$ et GF $\theta$ + EGF.	25
1.2.2.2 Culture en milieu complet.	26
2. Extraction d'ARN total.	26
2.1 Matériel.	26
2.2 Méthode.	26
3. Extraction d'ARN(polyA).	27
3.1 Matériel.	27

3.2 Méthode.	27
3.2.1 Extraction proprement dite.	28
4. Northern blot.	29
4.1 Matériel.	29
4.2 Méthode.	29
5. Hybridation des northern blots par sondes ADN marquées au <sup>32</sup> P.	30
5.1 Matériel.	30
5.2 Méthode.	30
5.2.1 Préhybridation des membranes.	31
5.2.2 Préparation des sondes marquées au <sup>32</sup> P et hybridation.	31
5.2.3 Post-hybridation.	31
5.2.4 Révélation.	31
6. Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR).	32
6.1 Matériel.	32
6.2 Méthode.	32
7. Fabrication de sondes ARN marquées par la Digoxygénine.	34
7.1 Matériel.	34
7.2 Méthode.	34
8. Hybridation in situ.	35
8.1 Matériel.	
8.2 Méthode.	
9. Marquage ImmunoHistoChimique.	36
9.1 Matériel.	36
9.2 Méthode.	36

## **RESULTATS & DISCUSSION.**

1. Analyse morphologique en microscopie à contraste de phase des cultures de cellules.	38
1.1 Cellules cancéreuses mammaires et fibroblastes.	38
1.2 Fibroblastes.	38
1.3 Kératinocytes.	38
1.3.1 Culture en milieu sans ou avec EGF à sous-confluence ou à confluence.	38
1.3.2 Culture en milieu complet à différents moments de confluence.	39
2. Détection de NDF et de HER4 dans l'épiderme humain.	39
2.1 RT-PCR.	40
2.2 Etude de l'expression de HER4 par RT-PCR.	40
2.3 Analyse du Southern par hybridation de sondes ARN marquées au <sup>32</sup> P.	40
3. Etude par Northern blots de l'expression de NDF et des récepteurs appartenant à la famille de l'EGFR (HER1, HER2 et HER3).	41

3.1 Etude des kératinocytes.	41
3.1.1. Analyse des cultures en milieu complet.	41
3.1.1.1 Analyse de l'expression de marqueurs de prolifération et de différenciation au cours d'une culture de kératinocytes.	41
3.1.1.2 Analyse de l'expression de NDF/heréguline et des récepteurs HERs au cours d'une culture de kératinocytes.	41
3.1.2 Analyse des cultures autonomes (sans EGF ni facteurs peptidiques exogènes).	42
3.1.2.1 Analyse de l'expression de marqueurs de prolifération et de différenciation au cours d'une culture autonome.	42
3.1.2.2 Analyse de l'expression de NDF/heréguline et des récepteurs HERs au cours d'une culture autonome.	43
3.1.3 Analyse de l'effet de l'EGF sur les expressions des kératinocytes.	43
3.1.3.1 Analyse de l'expression de marqueurs de prolifération et de différenciation.	43
3.1.3.2 Analyse de l'expression de NDF/heréguline et des récepteurs HERs.	44
3.2 Etude des fibroblastes.	45
4. Analyse par RT-PCR des variations existant dans l'expression des différentes isoformes de NDF dans des cultures de kératinocytes épidermiques.	46
4.1 Choix des amorces.	46
4.2 Mise au point du nombre de cycles.	47
4.3 Détection des différentes isoformes.	48
4.4 Confirmation de l'identité des séquences amplifiées.	48
4.5 PCR semi-quantitative.	49
5. Détection des messagers codant pour NDF dans des kératinocytes en culture par la technique d'hybridation in situ.	49
5.1 Détection de K10 dans des kératinocytes.	50
5.2 Détection de NDF dans des kératinocytes.	50
6. Détection de K10, NDF et HERs par marquage immunohistochimique de kératinocytes épidermiques en culture.	51
7. Etude in vivo de l'expression de NDF/Heréguline et des récepteurs HERs.	52
7.1 Etude par HIS de l'expression de K10, NDF et HERs dans l'épiderme in vivo.	52
7.2 Etude par IHC de l'expression de K10, NDF et HERs dans l'épiderme in vivo.	53
8. Détection des messagers sur des kératinocytes in vivo par la technique de RT-PCR in situ.	54
<b><u>DISCUSSION GENERALE.</u></b>	56
<b><u>BIBLIOGRAPHIE.</u></b>	60

# INTRODUCTION



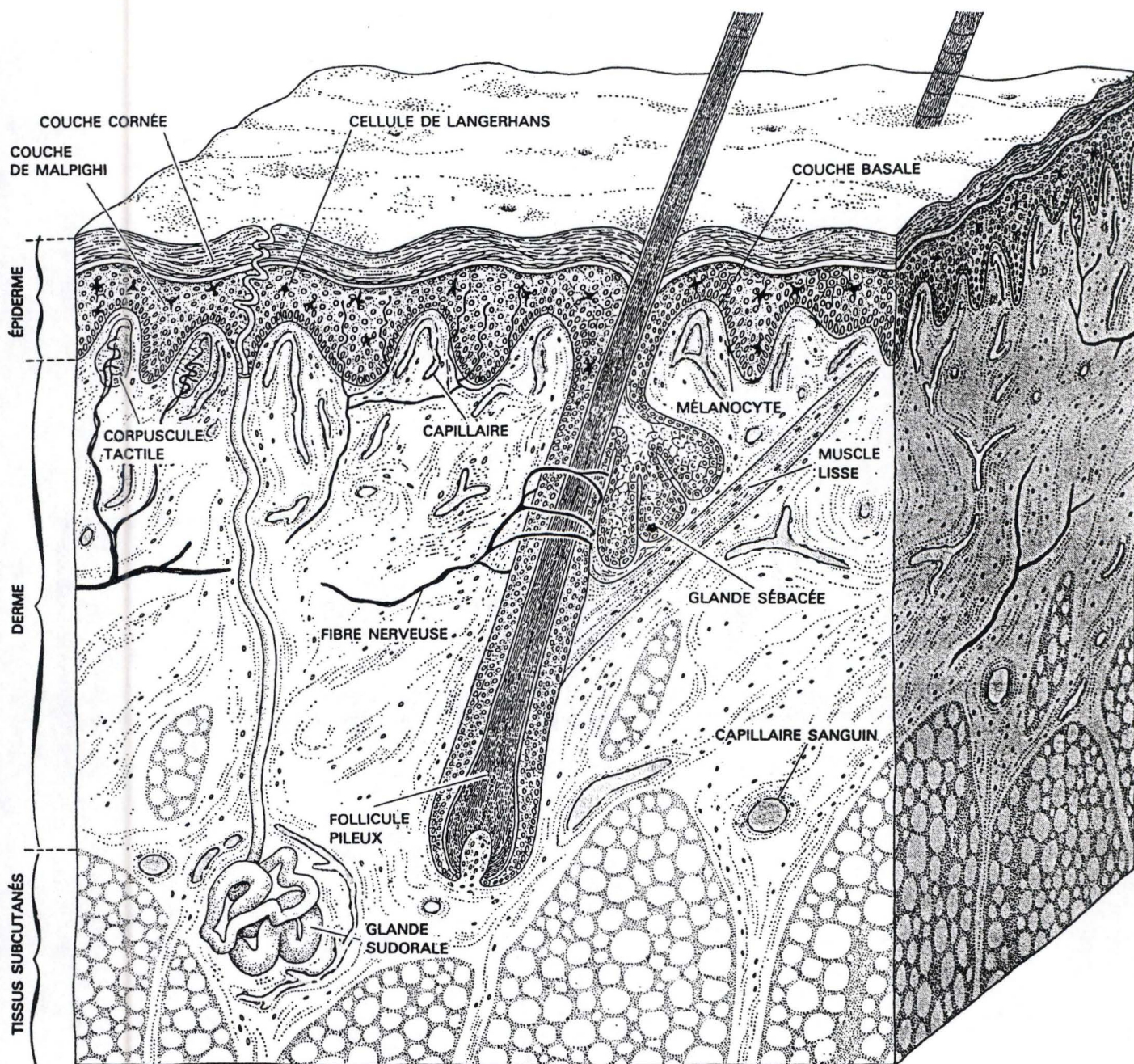


Figure 1.1 : structure générale de la peau par Thivolet (1986).

# 1. La peau.

## 1.1 Généralités.

L'organe peau, présentant en moyenne une surface de 1,7 m<sup>2</sup> chez l'adulte, est l'organe le plus volumineux du corps humain. Quatre fonctions essentielles lui sont associées :

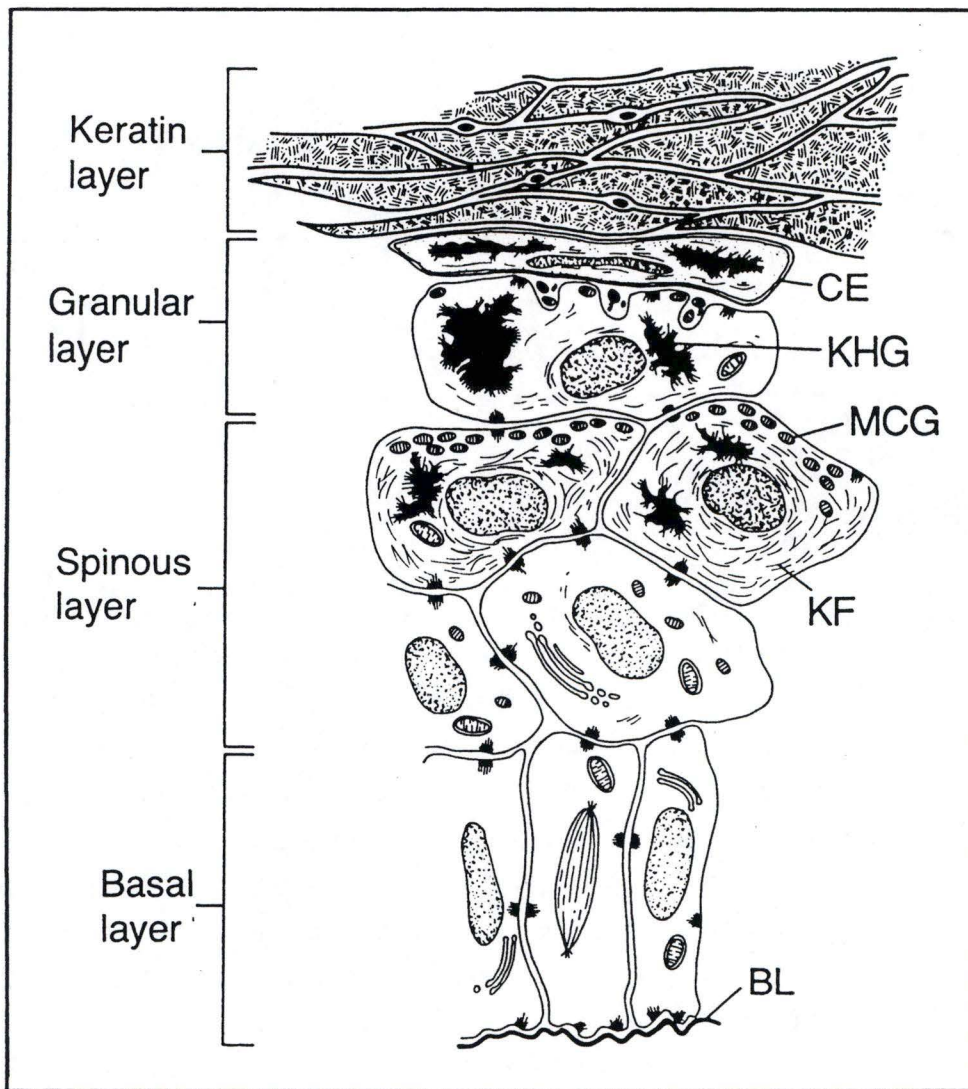
- la protection contre toute agression extérieure (mécanique, chimique, thermique, les rayonnements ultraviolets, les micro-organismes pathogènes,...),
- la sensibilité par la présence de nombreuses terminaisons nerveuses libres ou encapsulées,
- la thermorégulation (la présence de tissu adipeux empêche une déperdition de chaleur trop importante tandis que la présence de glandes sudoripares et de nombreux capillaires sanguins au niveau du derme permet d'éviter une élévation trop importante de la température corporelle),
- la participation au métabolisme corporel (synthèse de vitamine D au niveau de l'épiderme et réserve énergétique sous forme de triglycérides dans l'hypoderme).

La peau possède une structure de base relativement conservée malgré quelques différences selon les besoins fonctionnels locaux. Trois couches y sont décrites : l'épiderme, le derme et l'hypoderme (figure I.1).

L'épiderme est constitué à 95% de kératinocytes et montre une épaisseur variant de 75 µm à 150 µm en dehors des régions plantaires et palmaires où il est plus épais. L'épiderme repose sur une lame basale jouant un rôle de barrière et de soutien permettant l'adhésion au derme.

Le derme se compose de tissu conjonctif (fibres de collagène pour la résistance, d'élastine pour la souplesse et de fibroblastes). Il faut y noter également la présence d'annexes cutanées (ongles, poils, glandes sudoripares et sébacées). Richement vascularisé et innervé, le derme permet notamment de nourrir l'épiderme par diffusion des nutriments à partir des capillaires sanguins situés au niveau des papilles dermiques.

L'hypoderme est un tissu conjonctif lâche contenant essentiellement des lobules adipeux.



*Figure I.2* : structure générale de l'épiderme montrant les quatre couches différentes et les caractéristiques acquises lors de la différenciation (d'après Farmer et Hood). Enveloppe cornée (CE), granules de kératohyaline (KHG), corps d'Odland (MCG), filaments de kératine (KF) et lame basale (BL).

## 1.2 Epiderme.

### 1.2.1 Généralités.

L'épiderme est un épithélium stratifié à l'interface entre l'environnement et l'organisme. Le rôle de protection joué par l'épiderme est permis par sa population cellulaire majoritaire : les kératinocytes. Trois autres types cellulaires sont présents et assurent différentes fonctions :

- les cellules de Langerhans assurent une protection immunologique (ce sont des cellules provenant de la moelle osseuse dont le rôle est de présenter les antigènes aux cellules du système immunitaire),
- les mélanocytes permettant une protection contre les rayons ultraviolets (ce sont des cellules pigmentaires originaires de la crête neurale),
- les cellules de Merckel participant à la sensibilité cutanée (ces cellules sont reliées à une terminaison nerveuse).

Sur la majorité du corps, on retrouve un Epithélium Pavimenteux Stratifié Kératinisé (EPSK) de type B présentant une desquamation importante et une couche cornée assez fine. Aux endroits de forte friction, la paume des mains et la plante des pieds, cet épithélium présente une couche cornée beaucoup plus importante assurant une meilleure résistance.

### 1.2.2 Première classification des kératinocytes épidermiques.

Quatre couches distinctes peuvent être définies en se basant essentiellement sur la morphologie des kératinocytes (figure I.2) :

#### - le Stratum Basal ou couche basale.

La couche basale est formée de kératinocytes cylindriques ancrés sur la lame basale par l'intermédiaire d'hémidesmosomes et attachés les uns aux autres par des desmosomes. Des communications sont établies entre ces cellules au moyen de jonctions de type "gap".

Malgré une homogénéité morphologique, la couche basale présente une hétérogénéité fonctionnelle et biochimique. A côté de cellules souches au potentiel de division illimité, on retrouve des cellules intermédiaires amplificatrices ainsi que des cellules post-mitotiques qui subiront ensuite une migration vers la surface du tissu pendant leur maturation kératosique. Les cellules souches sont responsables du renouvellement continu de l'épiderme au cours de la vie en produisant les cellules intermédiaires amplificatrices. Comme l'épiderme possède une épaisseur plus ou moins fixe, ce renouvellement entraîne obligatoirement une migration des cellules néoformées vers la périphérie et une desquamation des couches les plus superficielles pour respecter l'homéostasie du tissu.

- le stratum spinosum ou couche épineuse.

Cette zone comprend trois à quatre couches de cellules montrant des "épines" sur les préparations histologiques classiques. Au fur et à mesure que les cellules montent dans cette couche, elles passent d'une forme polygonale à une forme plus aplatie.

De nouveaux organites apparaissent dans les couches les plus superficielles de la couche épineuse : les granules lamellaires ou corps d'Odland. Ceux-ci sont des structures de 300 à 500 nm de diamètre bordées par une membrane et contenant une série de bicouches lipidiques disposées en lamelles.

- le stratum granulosum ou couche granuleuse.

La couche granuleuse est constituée de deux ou trois couches de cellules dont la particularité est non seulement de s'aplatir en montant dans l'épiderme, mais également de posséder dans le cytoplasme de nombreux grains de kératohyaline. C'est à ce niveau que les corps d'Odland déversent leur contenu en fusionnant avec la membrane plasmique. Ces organites sont responsables du déversement de lipides et d'hydrates de carbone, ainsi que d'enzymes, au niveau de la jonction entre la couche granuleuse et la couche cornée. Les lipides et les hydrates de carbone sont responsables du maintien de l'hydratation de la peau, tandis que les enzymes jouent un rôle dans la desquamation des cellules cornées.

La couche granuleuse est la dernière couche vivante avant la couche cornée. A ce niveau, de nouvelles protéines sont synthétisées, telle la loricrine,... et la cellule s'apprête à remanier son contenu cytoplasmique pour devenir une cellule cornée capable d'assurer son rôle de protection.

- le stratum corneum ou couche cornée.

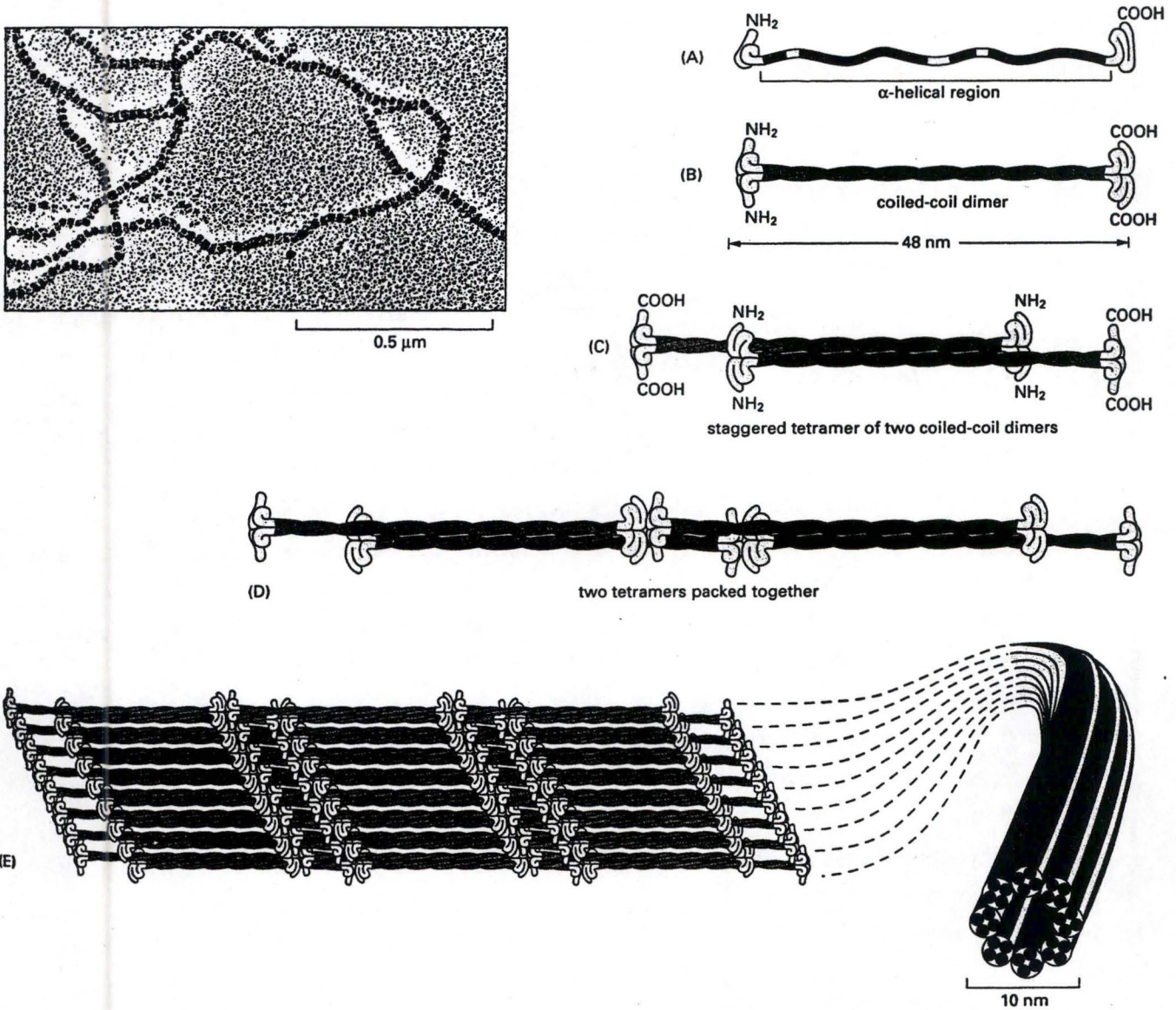
Selon Elias, la couche cornée (couche qui varie le plus en épaisseur selon les régions) est une série de briques, les kératinocytes, attachées entre elles par un mortier, les lipides provenant des corps d'Odland.

Les kératinocytes sont à ce niveau tout à fait aplatis, sans noyau ni organites. Leur contenu cellulaire est constitué à 85 % de protéines complexées. Leur différenciation est terminée.

Dans les premières couches de la couche cornée, les cellules sont encore bien attachées les unes aux autres par des desmosomes et par l'imbrication de villosités. Cependant, au fur et à mesure que l'on monte dans la couche cornée, ces points d'attaches vont disparaître pour permettre aux cellules de desquamer (Holbrook, 1994).

### 1.2.3 Seconde classification.

A côté de la première classification morphologique en 4 couches, l'épiderme peut également être divisé en deux compartiments, le compartiment de prolifération (compartiment germinatif où s'effectuent les mitoses) et le compartiment de différenciation (figure I.2). La kératinisation de l'épiderme effectuée dans les couches épineuse, granuleuse et cornée représente un processus de différenciation par lequel les cellules subissent une série de modifications morphologiques et biochimiques successives pour aboutir à la formation des cellules cornées. Pour maintenir



*Figure 1.3* : modèle de la construction des filaments intermédiaires. Deux monomères (a) s'associent pour former un dimère hélicoïdal (b). Ces dimères s'assemblent ensuite pour former des tétramères (c). L'association de plusieurs tétramères (d) formera l'unité de base du protofilament de kératine (e).  
 (Molecular biology of the cell)

l'épaisseur de l'épiderme, des mécanismes régulateurs permettent l'équilibre entre les états de prolifération et de différenciation cellulaires. Le contrôle de ces phénotypes épidermiques est sous la dépendance de deux types de facteurs :

1°) Des facteurs de croissance stimulant la prolifération des cellules basales.

2°) Des facteurs de différenciation inhibant la prolifération cellulaire et activant les gènes exprimés dans les cellules matures (Pittelkow et al., 1992).

Le passage d'un compartiment à l'autre peut être défini par des données histomorphologiques. Le compartiment de prolifération montre un nombre élevé de mitoses, tandis que le compartiment de différenciation montre un accroissement de la taille et de la densité du contenu cellulaire.

Au cours de la différenciation cellulaire, une série de modifications se mettent en place :

1°) La modification des filaments intermédiaires de kératines. Les kératines représentent 30 à 85 % des protéines cellulaires. Elles sont spécifiques des différentes couches épidermiques selon la classification de Moll et al. (1982). Les kératines appartiennent à la classe des protéines fibreuses formées d'hélices  $\alpha$ . Elles comportent de nombreux ponts S-S permettant la cohésion de l'ensemble. L'unité de base des filaments intermédiaires, le protofilament de 3 nm de diamètre, est formé par l'association de 4 sous-unités polypeptidiques enroulées en hélice. L'assemblage de 8 protofilaments forment le filament de 10 nm de diamètre (figure I.3). Une sous-unité de kératine comporte un domaine central hélicoïdal de plus ou moins 300 acides aminés. Ce domaine est bordé par 2 domaines amino et carboxy-terminaux variant en séquence et en conformation selon la kératine.

La classification de Moll détermine un profil de dispersion des différents polypeptides de kératine variant de manière quantitative et qualitative selon la localisation anatomique de l'épiderme et selon les couches de l'épiderme :

- les cellules de la couche basale expriment les kératines K5 et K14. In vivo, l'expression de K14 semble disparaître dans les couches suprabasales,
- dans le compartiment de différenciation, des kératines de plus haut poids moléculaires apparaissent (K1 et K10). Ce sont donc des marqueurs de différenciation qui apparaissent dans les cellules en culture lorsque celles-ci atteignent la confluence en absence de facteurs de croissance (Poumay et Pittelkow, 1995),
- d'autres kératines peuvent également se retrouver dans les kératinocytes dans des conditions particulières (par exemple : la paire K6/K16 apparaît dans des cellules en cicatrisation ou dans le psoriasis).

Les différentes kératines épidermiques représentent une famille de protéines d'origine multigénique. L'expression des différentes sous-unités est contrôlée au niveau génétique et correspond à une synthèse ou non des ARNm. Les promoteurs contrôlant l'expression des kératines sont connus. Il semble de plus que des facteurs de croissance peuvent jouer un rôle régulateur par l'intermédiaire de leurs récepteurs membranaires à activité tyrosine kinase (Fuchs, 1994).

2°) L'augmentation du nombre de desmosomes. Ces sites d'attache entre les kératinocytes, dont la fonction essentielle est l'adhésion cellulaire, sont interconnectés avec le réseau de filaments de kératine, ce qui permet de répartir et de transmettre les forces appliquées au tissu. Au niveau de la plaque desmosomale, on retrouve les desmoplakines (côté interne) associées avec des plakoglobines (protéines non glycosylées), tandis que les molécules d'adhésion transmembranaires sont les desmoglénines associées au desmocollines (Garrod, 1993).

3°) L'apparition de kératohyaline, un marqueur de la kératinisation, se présentant sous forme de grains répartis en amas plus ou moins denses. Ces grains contiennent la profilaggrine (300 Kd), une protéine phosphorylée riche en histidine représentant une forme inerte de stockage, qui formera la filaggrine (37 Kd) après déphosphorylation. La filaggrine contribue à former le complexe cytoplasmique protéique insoluble de la couche cornée en jouant le rôle de catalyseur pour la formation de ponts S-S entre les filaments de kératine. De plus, après protéolyse dans les couches superficielles de la couche cornée, les peptides et acides aminés obtenus jouent un rôle important dans l'hydratation de la couche cornée.

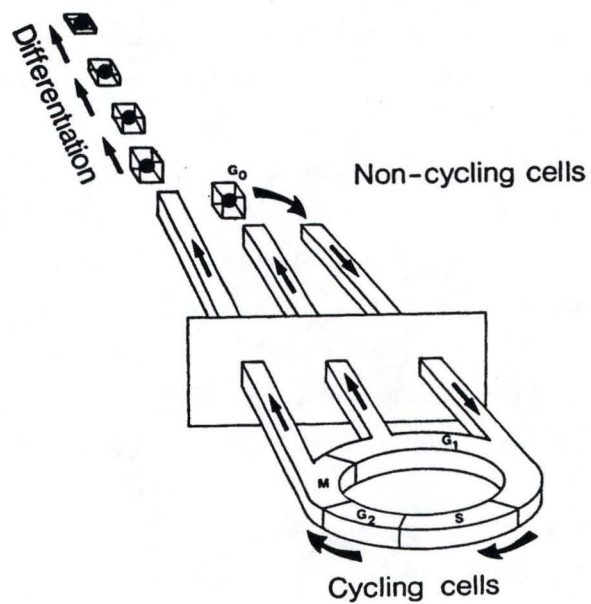
4°) La formation de l'enveloppe cornée. Cette enveloppe est située sous la membrane plasmique et entoure les cellules cornées dépourvues d'organites cellulaires pour augmenter l'épaisseur de la membrane plasmique de 8 à 15 nm. Cette enveloppe résulte de l'action de la transglutaminase de type 1 sur des protéines telles que l'involucrine et la loricrine, leur permettant de former de larges polymères. Activée par le calcium, la TGase-1 est aussi un marqueur de la différenciation terminale. L'involucrine est une protéine non fibreuse et riche en glutamine exprimée principalement dans la partie supérieure de la couche épineuse et dans la couche granuleuse de l'épiderme normal (Banks-Schlegel et Green, 1981).

#### 1.2.4 Culture des kératinocytes épidermiques.

Différentes techniques de culture ont été mises au point pour permettre une croissance des kératinocytes in vitro. Au départ, Rheinwald et Green (1975) ont utilisé un milieu complexe contenant du sérum de veau foetal (10%) et divers facteurs de croissance. De plus, cette technique de culture nécessite la présence d'une couche nourricière de -fibroblastes capables de fournir eux aussi toute une série de facteurs de croissance mal définis et difficiles à contrôler.

Pour permettre des études plus spécifiques de l'action des facteurs de croissance sur les kératinocytes, il était indispensable de développer un milieu de culture dont toutes les caractéristiques seraient bien définies. La première étape fut franchie par Boyce et Ham (1983) avec la mise au point d'un milieu ne contenant pas de sérum de veau foetal : le MCDB 153. Cependant, ce milieu doit toujours être complété avec de l'EGF et de l'insuline à activité mitogène et l'ajout d'une petite quantité d'extrait pituitaire bovin (BPE) est indispensable pour l'initiation des cultures primaires.





*Figure I.4* : représentation du cycle cellulaire et des relations existants avec les cellules en latence et en différenciation.  
 (Physiology, biochemistry, and molecular biology of the skin)

Par la suite, Cook et al. (1991) ont pu prouver que des facteurs de croissance mitogènes tels que l'EGF et le TGF- $\alpha$  ne sont pas indispensables pendant toute la culture. En effet, bien que l'initiation de la culture primaire nécessite toujours un apport exogène de facteurs de croissance (en général, 10 ng/ml d'EGF, 50  $\mu$ g/ml de BPE et 5  $\mu$ g/ml d'insuline) pour permettre la croissance clonale des kératinocytes, celle-ci à haute densité devient autonome. L'acquisition de cette autonomie est possible dès que la densité cellulaire atteint  $10^3$  cellules/cm<sup>2</sup>. Par cette observation, Cook et al. (1991) ont pu conclure que les kératinocytes étaient capables de synthétiser un facteur de croissance endogène qui fut identifié par la suite comme étant semblable à l'Amphiréguline (facteur de croissance synthétisé sous forme d'un précurseur membranaire jouant un rôle dans la croissance des cellules à haute densité). Par la suite, Pittelkow et al. (1993) ont démontré que la croissance autonome des kératinocytes nécessitait l'occupation du récepteur de l'EGF, soit par une forme soluble ou encore par juxtacrine (le TGF $\alpha$  et l'AR agissent sur la cellule voisine).

## 2. Facteurs de croissance et récepteurs tyrosine kinase.

### 2.1 Généralités.

#### 2.1.1 Epidermal Growth factor et facteurs apparentés.

Les facteurs de croissance sont des protéines qui contrôlent la croissance cellulaire par leur effet mitogène d'une part et qui contrôlent aussi la différenciation cellulaire d'autre part. Les facteurs de croissance sont synthétisés par de nombreux tissus et agissent selon trois modes d'action selon l'hypothèse de George Todaro :

- le mode endocrine correspond à un facteur qui après avoir été sécrété par un tissu est transporté, par voie sanguine, vers un autre tissu ou une cellule-cible,
- le mode paracrine correspond à un facteur synthétisé au sein d'un tissu et qui agit sur des cellules avoisinantes de type différent,
- le mode autocrine correspond à un facteur synthétisé par un type cellulaire qui agit sur lui-même et sur les cellules de même type.

Une deuxième notion importante est celle de réceptivité de la cellule-cible, selon les travaux de Pledger et al. (1977). Le facteur de croissance agit à un moment bien précis du cycle cellulaire (figure I.4), en général au cours de la transition G0-G1 vers la phase S. En dehors de ce moment précis, le facteur de croissance n'a pas d'effet sur la division cellulaire. De plus, un seul facteur n'est généralement pas suffisant pour induire la synthèse d'ADN et la multiplication

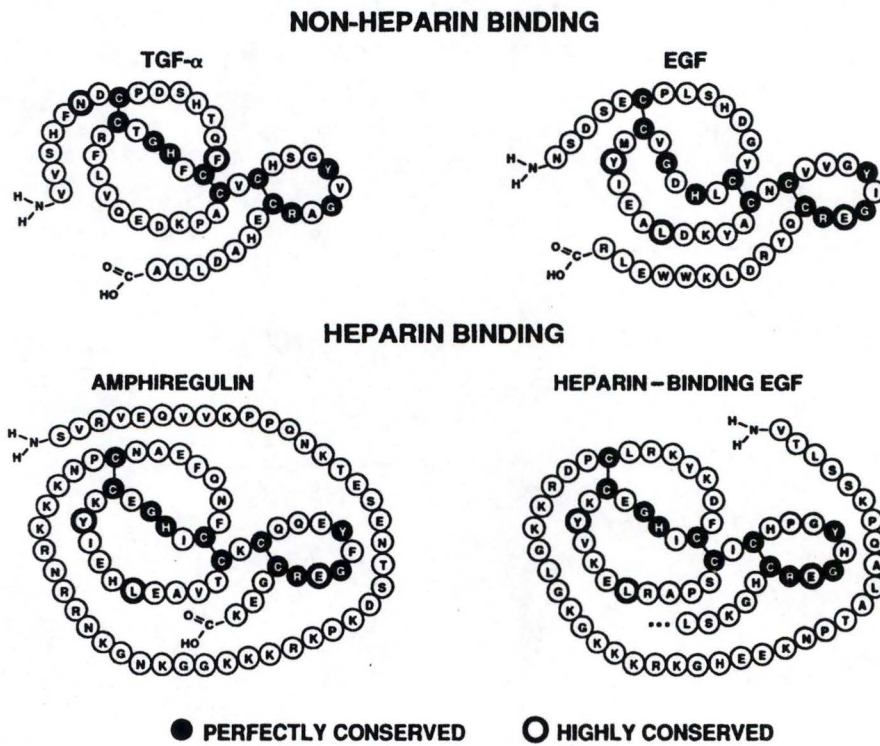


Figure 1.5 : structure des facteurs de croissance appartenant à la famille de l'EGF.  
(Plowman et al., 1969)

cellulaire. Une coopération de plusieurs facteurs est nécessaire, sauf pour les cellules transformées.

Pour agir, le facteur de croissance doit se lier à son récepteur membranaire spécifique et activer une cascade d'événements intracellulaires mettant en jeu des protéines kinases, le métabolisme de l'inositol-phosphate et les réserves de  $Ca^{2+}$ .

Deux classes de facteurs de croissance peuvent être définis : ceux à large spectre d'action comme l'Epidermal Growth Factor et ceux à spectre d'action très spécifique comme l'érythropoïétine qui n'agit que sur l'érythropoïèse.

### 2.1.1.1 Epidermal Growth Factor (EGF).

L'Epidermal Growth Factor (EGF) fut isolé par Stanley Cohen en 1960 à partir d'extrait de glandes sous-maxillaires. Cohen (1962) démontra que l'EGF injecté à des souriceaux accélérât l'ouverture des paupières et l'éruption des incisives. Ces observations démontrèrent l'importance de l'EGF dans la prolifération et la différenciation épidermique. Par la suite, d'autres rôles ont été attribués à l'EGF et notamment un rôle important dans la régulation de processus physiologiques (l'uurogastrone, un homologue humain de l'EGF isolé dans l'urine, inhibe la sécrétion gastrique acide). Ce facteur est un peptide synthétisé sous forme d'un précurseur transmembranaire de 128 kDa présentant 9 domaines EGF mais dont un seul est clivé par l'action d'une arginine estérase pour donner ensuite une forme active de 6 kDa (53 aa) (figure I.5) ayant une spectre d'action très large. Il joue le rôle d'un mitogène puissant (il aide la cellule à progresser vers la phase S du cycle cellulaire), en coopération avec d'autres facteurs, sur ses cellules cibles par action paracrine ou autocrine (les cellules épithéliales et mésenchymateuses) (Elder, 1994).

Vu la possibilité de l'épiderme d'hyperproliférer en réponse à des blessures ou dans le cas du psoriasis, il était prévisible de trouver une production d'EGF dans la peau. Cependant, les expériences de Byyny et al. (1972) n'ont pu montrer l'expression cutanée de ce facteur. Ce paradoxe fut éclairci par la découverte de l'expression du "Transforming Growth Factor-alpha" (TGF- $\alpha$ ) par les kératinocytes, un facteur très semblable à l'EGF par sa structure et sa fonction. Par la suite, d'autres facteurs appartenant à la famille de l'EGF furent découverts et continuent actuellement à être analysés (ex : amphiréguline, heparin-binding EGF,...).

Les facteurs appartenant à la famille de l'EGF présentent une structure commune. En effet, les différentes formes matures des facteurs de type EGF ont une longueur approximative de 50 à 60 acides aminés contenant 6 résidus cystéines très conservés ce qui permet la formation de ponts disulfures nécessaires à la bonne conformation du facteur. L'EGF et le TGF- $\alpha$  montrent deux feuillets  $\beta$  anti-parallèles : le plus grand localisé près de l'extrémité aminée et le plus petit



du côté carboxy-terminal. Cette ressemblance de structure (30%) permet d'expliquer que ces deux facteurs puissent se lier au même récepteur avec une affinité plus ou moins égale.

#### 2.1.1.2 Transforming Growth Factor alpha (TGF- $\alpha$ ).

Le TGF- $\alpha$  (figure I.5), synthétisé sous forme d'un précurseur transmembranaire de 160 kDa, est ensuite clivé, phosphorylé et glycosylé selon différents schémas, donnant naissance à des formes actives de 5 à 20 kDa de poids moléculaire. Le TGF- $\alpha$  joue un rôle autocrine ou juxtacrine majeur dans le signal mitogène fourni aux kératinocytes. L'expression de ce facteur augmente au niveau de blessures cutanées et dans des pathologies hyperprolifératives (Elder et al., 1989).

#### 2.1.1.3 Amphiréguline (AR).

L'amphiréguline, tout comme les autres membres de cette famille, est synthétisé sous forme d'un précurseur transmembranaire glycosylé subissant aussi un clivage protéolytique donnant un facteur soluble (figure I.5).

A partir d'une certaine densité de cellules en culture (plus de  $3 \times 10^3$  de cellules/cm<sup>2</sup>) (Cook et al., 1991), les kératinocytes sont alors capables de pousser dans un milieu sans facteur de croissance. De plus, le milieu récolté de ces cultures permet la croissance des kératinocytes à faible densité cellulaire, ce qui prouve la présence d'un facteur autocrine agissant sur la croissance dans ce milieu conditionné. Par des expériences ultérieures, il a été démontré que l'amphiréguline est ce facteur. Par hybridation de Northern blot, une grande quantité du mRNA codant ce facteur a été trouvé dans les kératinocytes. De plus, l'AR est surexprimé dans les kératinocytes provenant de prélèvements pathologiques de patients atteints de psoriasis. Comme ce facteur, produit par les kératinocytes, est très mitogène pour eux-mêmes mais ayant peu d'effet sur d'autres types cellulaires, l'amphiréguline est un candidat idéal pour être le régulateur autocrine de la prolifération des kératinocytes.

En corollaire, on peut penser que la prolifération épidermique des kératinocytes *in vivo* est associée à l'expression de facteurs appartenant à la famille de l'EGF.

#### 2.1.1.4 Heparin-Binding EGF (HB-EGF).

Ce facteur (figure I.5), de nouveau de structure très semblable aux autres membres de la famille, entre en compétition avec l'EGF pour la liaison avec son récepteur.

Par l'observation que l'HB-EGF, tout comme l'AR, est capable de se lier à l'héparine et que l'héparine peut moduler leurs effets sur des cellules cibles, il semble que ces facteurs, leurs récepteurs, ou les deux, puissent interagir avec des éléments de la matrice extracellulaire

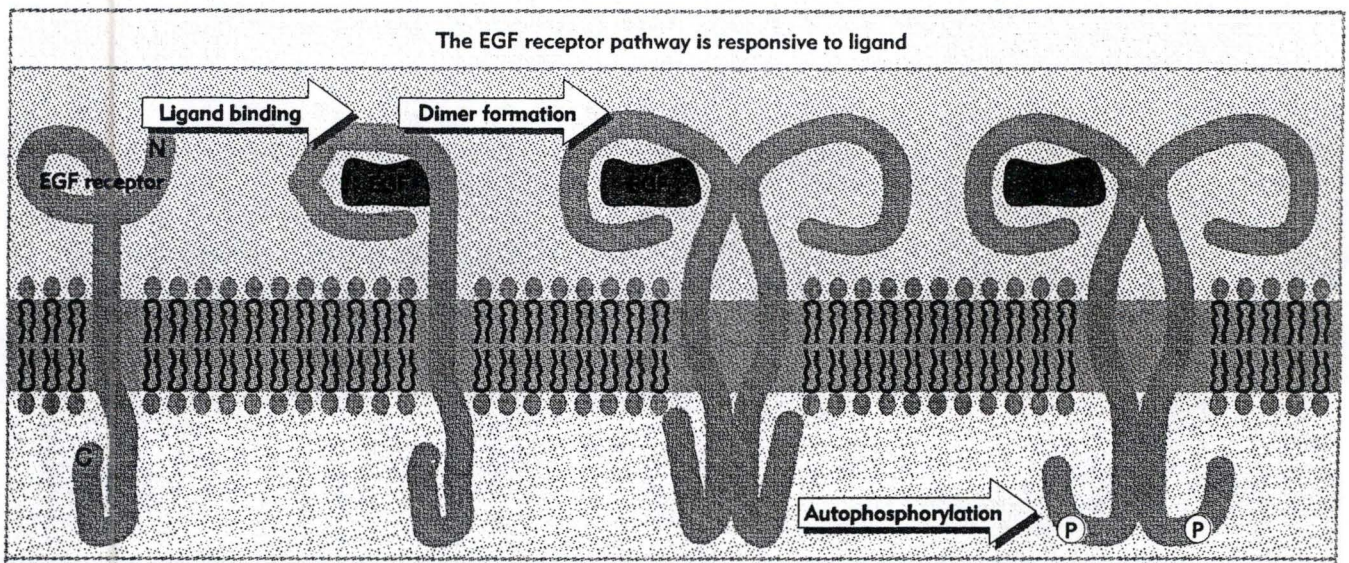


Figure I.6 : activation du récepteur de l'EGF. La liaison entre l'EGF et son récepteur mène à la dimérisation et à l'autophosphorylation de ce récepteur. (Genes V)

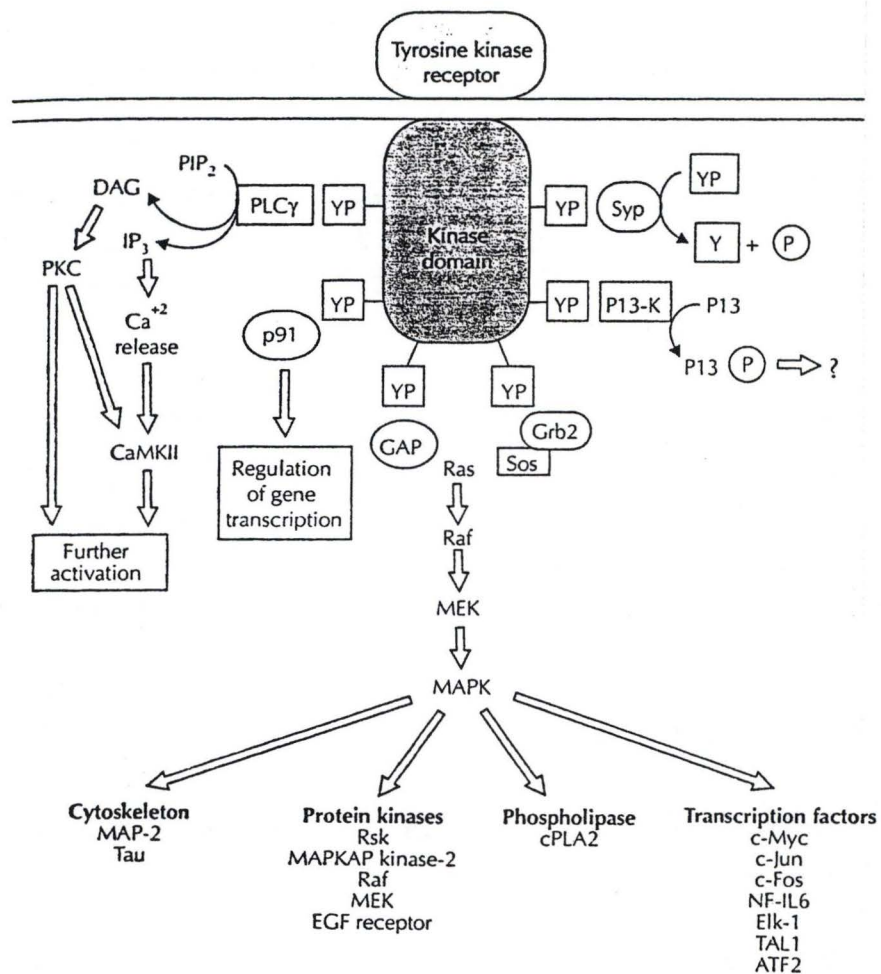


Figure I.7 : recrutement des molécules de la transduction du signal en réponse à l'activation d'un récepteur tyrosine kinase et à l'autophosphorylation qui en découle. (Johnson and Vaillancourt, 1994)

contenant des glycosaminoglycanes tels que l'acide hyaluronique, les protéoglycanes et les glycosphingolipides complexes à l'interface de la surface cellulaire et de la matrice extracellulaire *in vivo* (Luger and Schwarz, 1994).

### 2.1.2 Récepteurs tyrosine kinase.

Les récepteurs à activité tyrosine kinase, quelle que soit la famille à laquelle ils appartiennent, présentent en général une structure commune :

- un domaine extracytoplasmique se liant à la protéine signal,
- un domaine transmembranaire en hélice  $\alpha$  d'une longueur assez constante de 20 acides aminés,
- un ou plusieurs domaines cytoplasmiques permettant la transduction du signal par activité tyrosine kinase et par formation de domaines phosphorylés pouvant servir de sites d'ancrage pour d'autres molécules cytoplasmiques.

A côté de cette structure commune, les récepteurs partagent un mécanisme assez semblable. Suite à la liaison de la molécule signal, le récepteur se dimérise. Cet assemblage est permis par un mouvement dans le plan de la membrane plasmique. Il s'ensuit un changement de conformation, notamment par des mouvements de piston perpendiculaires à la membrane (Stock, 1996). C'est au niveau de cette variation de conformation qu'il faut rechercher la raison d'une transphosphorylation possible du dimère, alors que les sous-unités seules sont incapables de se phosphoryler. En effet, certains domaines cachés ou éloignés l'un de l'autre dans la molécule native sont mis en contact ou dégagés dans la formation du dimère ce qui permet une augmentation de l'affinité du récepteur pour son ligand, ainsi que la possibilité de se transphosphoryler au niveau de résidus tyrosines (figure I.6).

La phosphorylation du récepteur a deux effets. Tout d'abord, la transphosphorylation du récepteur active le domaine catalytique tyrosine kinase de ce récepteur permettant la phosphorylation sur des résidus tyrosines appartenant à d'autres molécules de la transduction du signal. Deuxièmement, les tyrosines phosphorylées serviront de sites d'ancrage par l'intermédiaire de sites SH2 (Src homology 2) présents sur des molécules intracytoplasmiques jouant un rôle dans la transduction du signal (Wang et Moran, 1996). Ces molécules possédant des domaines SH2 et se liant aux sites phosphotyrosines des récepteurs aux facteurs de croissance sont entre autres la phospholipase  $C\gamma$  (PLC $\gamma$ ), la sous-unité p85 de la phosphatidylinositol-3-kinase (PI-3K), Shc, Grb2, GTPase-activating protein (GAP), Syp et p91 (figure I.7). La spécificité des interactions des domaines SH2 dépend de la séquence entourant la phosphotyrosine et la séquence du domaine SH2 lui-même. Les protéines qui contiennent des domaines SH2 sont ensuite phosphorylées et activées par les récepteurs de facteurs de croissance. Le résultat de ces phosphorylations sur résidus tyrosines des protéines de la transduction du signal contenant de tels domaines SH2 est l'activation d'une série de seconds messagers et de protéines kinases. De plus, plusieurs de ces protéines de signal



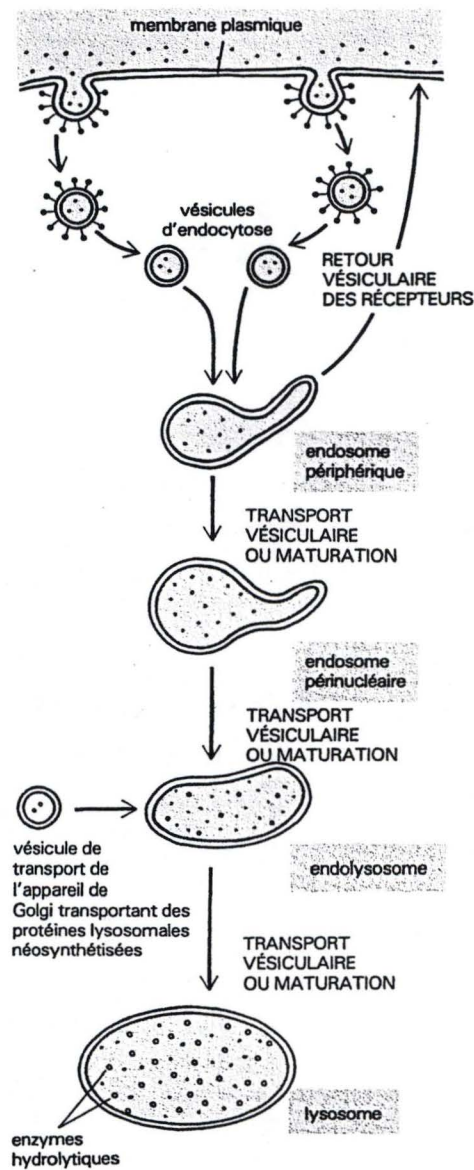


Figure I.8 : endocytose médiée par récepteur. Les endosomes sont dirigés vers des vésicules golgiennes contenant des hydrolases acides et fusionnent avec celles-ci pour donner des lysosomes dans lesquels s'effectue la dégradation.

possédant un domaine SH2, telles que la PLC $\gamma$ , la Grb2, la GAP et la p85 PI-3K, possèdent également des domaines SH3 impliqués dans les interactions spécifiques entre protéines au cours de la transduction du signal. Ce domaine SH3 contient un site de liaison pour des séquences riches en proline. Tout comme pour SH2, les interactions sont spécifiques. Le résultat final de cette cascade de transduction du signal dans des cellules non différenciées est une augmentation de la synthèse d'ADN suite à l'activation de certains facteurs de transcription tels que c-jun, c-fos, c-myc.

La liaison de l'EGF avec son récepteur induit rapidement l'agrégation de ce complexe ligand-récepteur au niveau de puits recouverts (coated-pits) suivie par l'internalisation et une dégradation lysosomale. Le mécanisme d'internalisation rapide des récepteurs aux facteurs de croissance n'a pas encore été établi. Cependant, certaines évidences suggèrent qu'il y a une interaction entre la partie C-terminale du récepteur et la clathrine, interaction rendue possible par l'intermédiaire de l' $\alpha$ -adaptine (Sorkin et Carpenter, 1993). La nature de l'interaction entre le récepteur et l' $\alpha$ -adaptine n'est pas claire. Cependant, il est actuellement certain que la molécule d' $\alpha$ -adaptine ne possède pas de site SH2 ou SH3 (Baulida et al., 1996).

Tout comme l' $\alpha$ -adaptine aide à la formation d'agrégats au niveau des coated-pits, GRB2 joue un rôle primordial dans la formation même de ces vésicules. En effet, Grb2 est une protéine comprenant un seul domaine SH2 mais deux domaines SH3 (NH<sub>2</sub>-SH3-SH2-SH3-COOH). Le domaine SH2 est essentiel pour la liaison de la protéine Grb2 avec une tyrosine phosphorylée présente sur la portion cytoplasmique du récepteur EGFR. Le domaine SH3 N-terminal participe à la liaison de Grb2 avec SOS et joue de ce fait un rôle important dans l'activation de Ras (figure I.7). Le domaine SH3 C-terminal intervient dans la liaison avec la dynamine guanosine triphosphatase (GTPase) (Wang et Moran, 1996) jouant un rôle essentiel dans la formation des vésicules coatées (Van der Blik et al., 1994). Il est intéressant de noter ici que Grb2 joue à la fois un rôle dans la transduction du signal par son interaction avec d'autres protéines et dans l'inhibition du signal par l'endocytose du récepteur (Wang et Moran, 1996).

Dans la famille des facteurs de croissance, ni le récepteur ni le ligand ne sont recyclés. Lorsque la vésicule recouverte est internalisée, elle perd sa couverture de clathrine et déverse son contenu dans un endosome. Cet endosome va mûrir par l'action de pompes à proton ATP-dépendante dont le rôle est d'acidifier progressivement le contenu de la vésicule. L'endosome mature va fusionner avec une vésicule golgienne contenant des hydrolases acides piégées par leur mannose-6 phosphate au niveau d'un récepteur spécifique. La vésicule devient alors un endolysosome dont le pH acide permet l'activation des hydrolases (figure I.8). Une régulation négative est alors observée par la différence entre la vitesse de synthèse du récepteur et la vitesse de dégradation du complexe ligand-récepteur.

Bien souvent, la découverte de nouveaux récepteurs est apparentée à l'analyse de cellules tumorales. Celles-ci présentent trois critères importants qui permettent de les différencier des cellules normales :

- immortalisation : les cellules montrent une croissance indéfinie (une cellule normale en culture montre un maximum de 50 divisions environ),
- transformation : la croissance devient anormale (ex : elle n'est plus contrôlée par des facteurs de croissance),
- métastase : les cellules tumorales sont plus ou moins capables de quitter le tissu auquel elles appartiennent, de passer au travers des lames basales pour se disséminer via le système circulatoire et coloniser d'autres tissus.

En culture, les cellules transformées montrent souvent moins d'exigences que les cellules normales. En effet, elles sont peu dépendantes de l'apport de facteurs de croissance, elles ne présentent pas d'inhibition à haute densité de cellules et elles sont moins dépendantes d'une adhésion au substrat.

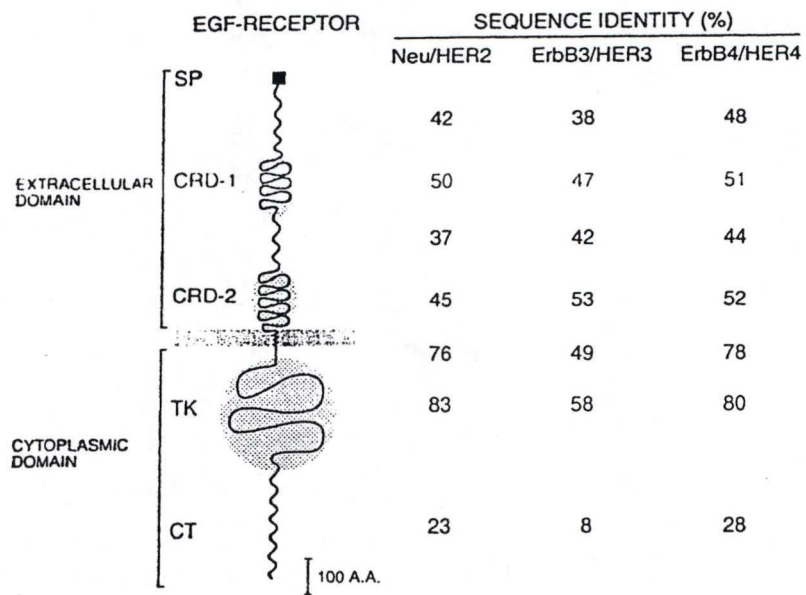
Il serait naïf de croire que l'apparition de cellules tumorales repose sur un seul processus. Deux classes de gènes peuvent induire des cellules tumorales lorsqu'ils subissent des mutations :

- les oncogènes ont d'abord été identifiés comme des gènes portés par des virus et causant la transformation des cellules infectées. Par la suite, on a pu se rendre compte que ces gènes viraux sont homologues de gènes cellulaires appelés proto-oncogènes. Les oncogènes sont classés en différents groupes intervenant à différents niveaux, allant des récepteurs membranaires aux facteurs de transcription nucléaire. Un oncogène présente toujours un gain de fonction par rapport au proto-oncogène (gène n'ayant pas subi de mutation) soit par activation constitutive d'une fonction normalement régulée, soit par expression d'un gène normalement muet dans la cellule concernée ou soit par sur-expression de ce gène dans le tissu normal,
- les suppresseurs de tumeurs : les mutations dans ces gènes impliquent une perte de fonction (ex : p53 muté n'est plus capable d'arrêter la division cellulaire lorsqu'il perçoit une erreur dans la réplication).

Un proto-oncogène devient cause de tumeur par apparition d'une mutation ou suite à un réarrangement du DNA qui conduit à un gène anormal ou amplifié ou encore suite à la position d'un promoteur fort qui ne permet plus à ce gène d'être régulé correctement.

Les oncogènes influencent les fonctions connectées à la croissance cellulaire et cela à différents niveaux :

- récepteurs des facteurs de croissance : protéines transmembranaires activées par la liaison de leurs ligands spécifiques. Ils deviennent oncogènes par activation constitutive de leur activité kinase par exemple,
- protéines liant le GTP,
- protéines intracellulaires à activité kinase,
- protéines nucléaires, dont les facteurs de transcription.



*Figure 1.9* : comparaison des séquences spécifiques des récepteurs aux facteurs de croissance appartenant à la famille des récepteurs de l'EGF. (Peles et Yarden, 1993)

Dans la cascade de réponse cellulaire, une protéine kinase phosphoryle une autre protéine qui possède aussi une activité kinase activée par cette phosphorylation. Une activation aberrante à n'importe quelle étape de la cascade peut mener à une dérégulation cellulaire qui résulte en la transformation cellulaire.

## **2.2 Récepteurs HER2-HER3-HER4.**

### **2.2.1. Récepteur HER2/c-erbB-2/neu.**

L'oncogène neu fut tout d'abord identifié dans un neuroblastome de rat induit par de l'éthyl nitrosurée administré à la mère au 15<sup>ème</sup> jour de gestation. Cet oncogène administré à des cellules NIH-3T3 (fibroblastes de souris) a pour effet d'induire la transformation maligne de ces cellules. Par utilisation d'anticorps, Shih et al. (1981) ont pu démontrer que la cause de cette transformation provenait d'une phosphoglycoprotéine de surface non présente chez les cellules non transformées ou transformées par un autre oncogène. Le produit du proto-oncogène neu (Schechter et al., 1984) est un récepteur phosphoglycoprotéique transmembranaire (p185) de 1260 acides aminés ayant une grande homologie (42%) avec le récepteur de l'EGF (EGFR ou HER1) (figure I.9).

Trois groupes ont identifié par la suite l'homologue humain appelé c-erbB-2 ou HER2 (Coussens et al., 1985; Semba et al., 1985; King et al., 1985). Ce gène, localisé sur le chromosome 17 au niveau de la bande p12-21.3 (alors que le gène de EGFR se trouve sur le chromosome 7), produit une glycoprotéine transmembranaire présentant 88% d'homologie avec neu (Stern et al., 1986; Bargman et al., 1986).

Plusieurs groupes ont montré une amplification ou surexpression du gène neu dans des tumeurs malignes (Slamon et al., 1989; Berger et al., 1988). Dans le cas de cancer du sein et du cancer ovarien, cette amplification ou surexpression est corrélée avec un mauvais pronostic (grand nombre de décès (Slamon et al., 1987) et de rechutes (Wright et al., 1989)) quand on observe une surexpression de l'ARNm de 4,5 kb codant pour ce récepteur ainsi qu'une surexpression de la protéine p185. Plusieurs expériences ont pu montrer que des altérations dans HER2/neu peuvent jouer un rôle important dans la pathogénicité de tumeurs animales (Press et al., 1990). Les cellules présentant une surexpression sont plus tumorigènes (Hudziak et al., 1987; diFiore et al., 1987) : cette protéine transmembranaire est une des cibles potentielles actuellement testées pour une immunothérapie anticancéreuse, mais pour cela il est préférable d'abord de comprendre le mécanisme d'action de ce récepteur, ainsi que sa distribution dans l'organisme (Press et al., 1990).

Dans la peau normale, la réactivité maximale des anticorps anti-neu se situe au niveau des couches épineuses supérieures et granuleuses de l'épiderme. Les cellules basales, quant à elles, sont peu ou pas marquées suggérant que l'expression de HER2 augmente avec la

différenciation. La large expression de la protéine HER2 dans des kératinocytes implique qu'elle doit jouer un rôle important dans la peau (Maguire et al., 1989). Les mélanocytes ne sont pas marqués et les structures annexes, surtout les follicules pileux, les glandes sudoripares et les glandes sébacées sont peu marqués (Press et al., 1990). La peau foetale exprime HER2. Les cellules endothéliales et mésothéliales n'expriment pas HER2 (Press et al., 1990). Dans des coupes de tissus inclus dans la paraffine, HER2 est localisé préférentiellement dans la membrane cellulaire.

### 2.2.2. Récepteur HER3/c-erbB-3.

HER3 ou c-erbB-3, un troisième membre de la famille de l'EGFR, fut découvert par Kraus et al. (1989). De l'ADN génomique humain fut clivé par des endonucléases. D'une part, le produit de cette restriction fut analysé en Southern par l'hybridation à basse stringence d'une sonde v-erbB et montre une bande spécifique non visible lors d'une hybridation à stringence normale. D'autre part, pour en savoir plus, une autre partie de l'ADN génomique humain clivé par endonucléases fut utilisée pour fabriquer une banque génomique. Une série de clones furent alors identifiés comme étant capables d'hybrider avec la sonde v-erbB à basse stringence mais incapable d'hybrider avec HER1 ou HER2 à haute stringence. Ces clones contenaient un fragment d'ADN présentant une grande homologie avec HER1 et HER2. Une autre équipe (Plowman et al., 1990) décrit aussi la découverte de ce nouveau récepteur de la famille de l'EGFR par l'utilisation de la PCR par des primers dégénérés ainsi que l'hybridation de ces amplicons par un oligonucléotide dégénéré du domaine tyrosine kinase du récepteur HER1.

Le gène codant pour HER3 isolé par Kraus et al. (1989) est situé sur le chromosome 12, bande q13. Il code pour une glycoprotéine transmembranaire de 160 kDa via un ARNm de 6,2 kb (Kraus et al., 1989; Plowman et al., 1990). Cette glycoprotéine présente une grande homologie (essentiellement au niveau du domaine tyrosine kinase) avec les autres membres de la famille de l'EGFR (81% pour HER1 et 83% pour HER2) (figure I.9). Tout comme HER1 et HER2, HER3 contient deux domaines riches en cystéine dans la région extracytoplasmique et un large domaine intracytoplasmique à activité tyrosine kinase.

Kraus et al. (1989) ont étudié l'expression du gène HER3. Celui-ci semble être exprimé préférentiellement par le tissu épithélial et le cerveau. On retrouve la présence de HER3 au niveau des kératinocytes et des mélanocytes mais pas dans les fibroblastes. Une confirmation immunohistochimique de l'expression cutanée de HER3 fut apportée par Prigent et al. (1992) sur des coupes en paraffine. Le marquage est essentiellement cytoplasmique sans accentuation membranaire, ce qui fait penser que la majorité des protéines se trouvent sous forme de réserve intracellulaire. HER3 fut détecté dans la plupart des tissus examinés, sauf dans les tissus hématopoïétiques

### 2.2.3 Récepteur HER4/c-erbB-4.

En raison de l'importance biologique de la famille de l'EGFR, Plowman et al. (1993) ont continué la recherche d'homologues supplémentaires. Une série d'oligonucléotides dégénérés ont été synthétisés sur base des séquences conservées des membres de la famille de l'EGFR. De l'ADN génomique total fut isolé de cellules de mélanomes murins K1735 et utilisé comme matrice pour une PCR utilisant comme primers les oligonucléotides dégénérés. Ces amplicons ont été utilisés pour sonder des banques de DNA génomique et détecter de nouveaux membres de la famille de l'EGFR.

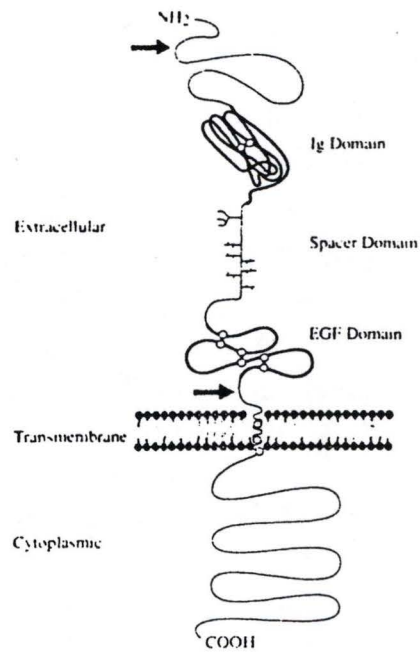
HER4 possède les mêmes caractéristiques que les autres membres de la famille de l'EGFR (figure I.9):

- une région extracytoplasmique comprenant deux domaines riches en cystéines définissant la spécificité au ligand, et présentant une grande homologie avec HER3,
- une région transmembranaire hydrophobe,
- un domaine cytoplasmique à activité tyrosine kinase présentant une grande homologie pour HER1 et HER2 (Plowman et al., 1993).

L'étude de l'expression des ARNm de HER4 est réalisée par hybridation de Northern avec comme sonde la partie 3' terminale de HER4. Un messager de 6 kb est abondant dans le tissu cardiaque et les muscles squelettiques tandis qu'un transcrit de plus de 15 kb est détecté dans le cerveau, le coeur, les muscles squelettiques, les reins et le pancréas. HER4 n'est pas détecté dans l'épiderme.

## 2.3 Neu Differentiation Factor (NDF)/Heréguline.

Peu après la découverte des récepteurs HER2 et HER3, aucun ligand connu ne semblait permettre une stimulation de leur activité tyrosine-kinase. Pourtant, puisqu'une surexpression de ces récepteurs peut mener à la cancérisation cellulaire, il était impossible de ne pas concevoir l'existence d'un facteur capable d'initier un signal par l'intermédiaire de ces récepteurs. Par étude de différentes lignées cellulaires, une souche de fibroblastes transformés (Rat1-EJ contenant l'oncogène Ras) s'est révélée capable de produire un facteur soluble se trouvant dans le milieu de culture (Peles et al., 1992). Les cellules produisant HER2 et mises en contact avec ce milieu montraient une activation de leur récepteur (augmentation de la phosphorylation des tyrosines) ainsi que des variations phénotypiques impliquant que ce facteur soluble pouvait jouer le rôle d'un facteur de différenciation (certaines cellules cancéreuses mammaires humaines, après mise en contact avec ce facteur, produisent des composants du lait tels que la caséine). Après purification, ce facteur fut identifié comme étant une protéine de 44 kd (Peles et al., 1992) nommée Neu Differentiation Factor/NDF (tire son nom de sa capacité d'induire une différenciation cellulaire via le récepteur HER2 codé par le proto-oncogène neu). A la même époque, une autre équipe (Holmes et al., 1992) isola la forme humaine de NDF, nommée



*Figure 10* : représentation schématique de la structure secondaire et de l'orientation en membrane du précurseur de NDF.  
(Wen et al., 1992)



Heréguline, à partir du milieu de culture de MDA-MB-231 (cellules de carcinome mammaire humain) comme étant une molécule capable de stimuler l'activité tyrosine kinase de HER2 dans des cellules tumorales mammaires MCF7.

Bien que NDF/Heréguline soit une protéine synthétisée sous forme d'un précurseur transmembranaire, le pro-NDF, elle ne présente pas de peptide signal hydrophobe permettant de suivre la voie classique de mise en membrane nécessitant une reconnaissance par une protéine SRP (Signal-recognition particle) (Wen et al., 1992). Cependant, actuellement on sait qu'il existe au moins une voie alternative permettant à des protéines de se retrouver en membrane sans la nécessité d'un peptide signal, ni l'interaction avec une protéine SRP (voie SRP-indépendante).

Par séquençage, Wen et al. (1992) ont décrit la structure complète de la protéine mettant en évidence ses différents domaines caractéristiques (figure I.10):

- le domaine extracytoplasmique le plus proche de la partie N-terminale est une unité homologue d'immunoglobuline contenant deux cystéines très conservées formant un pont disulfure entre deux feuillets  $\beta$  (typique de toutes les molécules ayant ou non des fonctions immunologiques mais partageant ce domaine Ig-like). La fonction de ce domaine est essentiellement un rôle de stabilisation des interactions homophiliques entre protéines. Ce domaine pourrait permettre la dimérisation de molécules de NDF soluble ou l'interaction de cellules produisant du pro-NDF en membrane,

- le domaine EGF-like du côté N-terminal de la région transmembranaire est un domaine partagé par beaucoup de protéines transmembranaires. Sa séquence contient six cystéines très conservées espacées de manière caractéristique par 35 à 40 acides aminés permettant la formation de ponts disulfures déterminant des boucles. En comparaison avec d'autres molécules présentant ce domaine EGF-like, on peut penser que ce dernier soit important pour les interactions entre protéines et donc pour la reconnaissance entre le ligand et son récepteur spécifique,

- un domaine "Spacer" reliant le domaine EGF-like et l'unité homologue d'Ig est constitué de 13 acides aminés dont 12 sont des sérines et thréonines. A ce niveau, on observe la présence de sucres O-liés représentant 8 kDa (Peles et al., 1992), deux ou trois sucres N-liés et un site d'attache pour l'héparane sulfate, un constituant de la matrice extracellulaire. Un des rôles possible de cet encombrement par des sucres pourrait être de maintenir le noyau peptidique sous une forme raide et étendue permettant le maintien de domaines fonctionnels adjacents dans une position accessible pour les interactions moléculaires,

- une région hydrophobe correspondant à la portion traversant la membrane flanquée de part et d'autre de résidus basiques jouant un rôle d'ancrage. La séquence de cette région transmembranaire possède trois cystéines de fonction inconnue.

- une queue cytoplasmique hydrophile relativement longue riche en résidus sérines et thréonines situés pour certains dans des sites potentiels de phosphorylation par la protéine kinase C et la caséine kinase II. On ne distingue cependant pas de domaine catalytique.

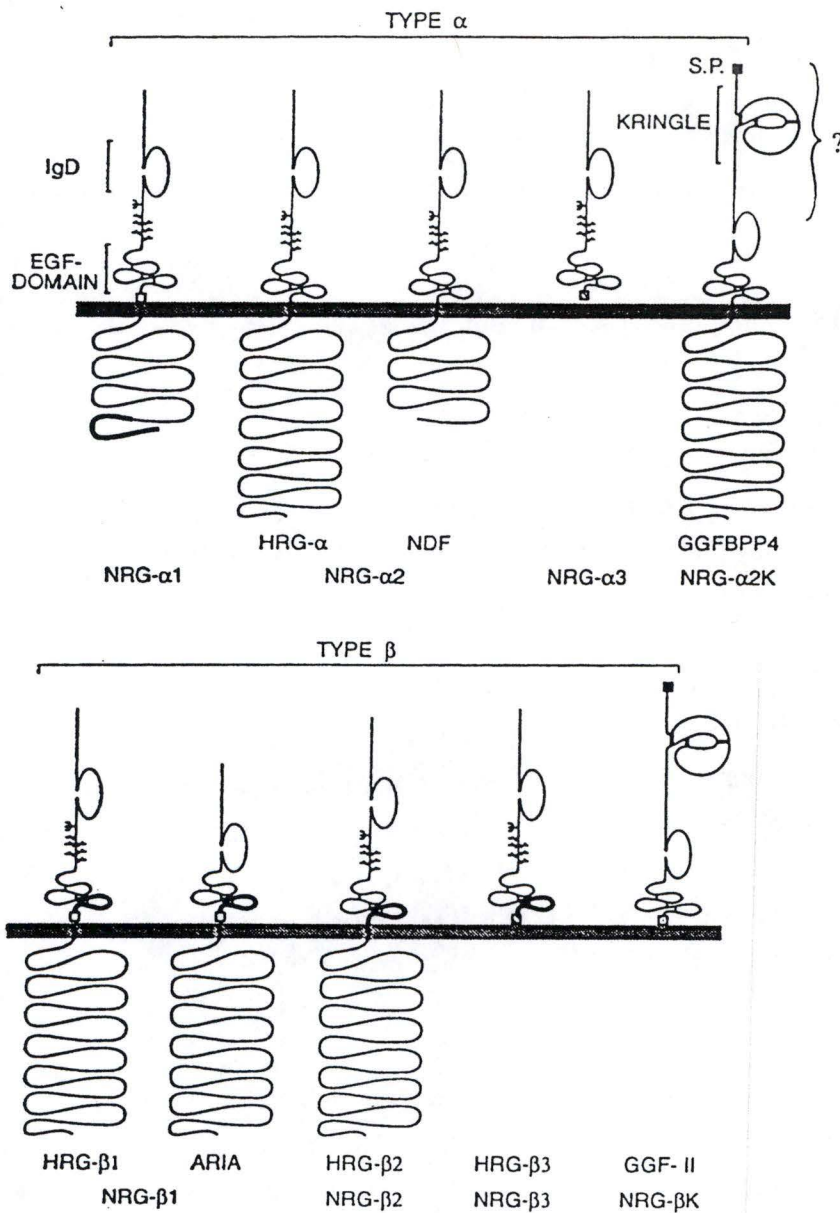


Figure I.11 : illustration schématique de différents isoformes appartenant à la famille des Neurégulines.  
(Peles et Yarden, 1993)

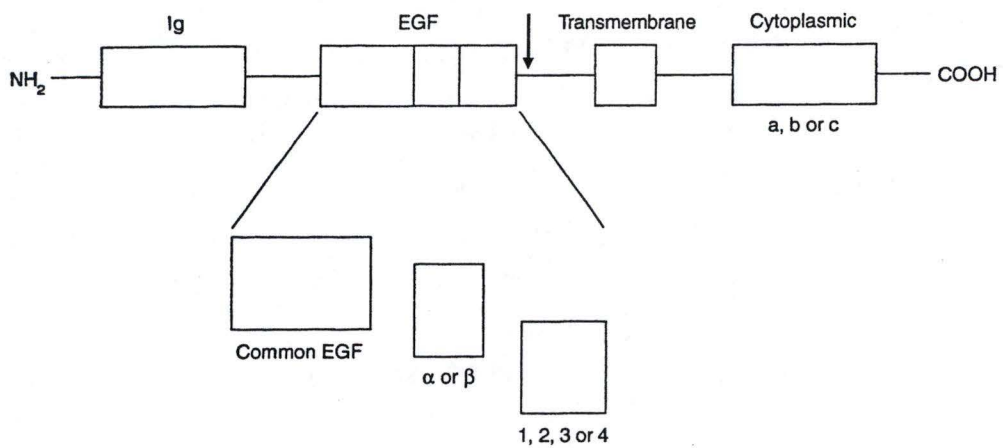


Figure I.12 : représentation schématique de la molécule de pro-NDF illustrant les trois domaines variables résultant d'un épissage alternatif. La flèche indique le site de clivage extramembranaire.  
(Danilenko et al., 1995)

En dehors de cette structure générale, le NDF peut se présenter sous différentes isoformes regroupées sous le terme de Neurégulines (figure I.11). Wen et al. (1994) ont précisé l'existence d'au moins 12 isoformes dont la distribution varie selon le tissu étudié. Cependant, malgré cette diversité d'isoformes, un seul gène a pu être localisé sur le petit bras du chromosome 8 (8p12-p21) (Orr-Urtreger et al., 1993). Les différentes isoformes sont donc le résultat de la combinaison par épissage alternatif d'exons ayant des origines évolutives différentes. Une première classification différencie les isoformes  $\alpha$  des isoformes  $\beta$ . La divergence commence à la position 212 pour les 18 acides aminés suivants (Holmes et al., 1992). Cette région correspond à la partie C-terminale du domaine EGF-like. Les isoformes  $\alpha$  et  $\beta$  ne montrent pas de variations dans la spécificité de liaison mais bien dans l'affinité (les isoformes  $\beta$  montrent 10 fois plus d'affinité que les isoformes  $\alpha$ ) (Wen et al., 1994). Les isoformes  $\alpha$  et  $\beta$  peuvent encore être divisés en quatre sous-classes (de 1 à 4 dans la nomenclature) selon la séquence de la région juxtamembranaire. Cependant, une exception existe pour les isoformes  $\alpha_3$  et  $\beta_3$  qui ne possèdent pas de domaine transmembranaires (ces formes pourraient constituer une réserve intracytoplasmique relarguée lorsque le tissu est blessé (Wen et al., 1994)). Il est encore possible de diviser les sous-classes en trois isoformes : a, b et c selon la taille de la queue cytoplasmique (figure I.12). Comme cette région peut se présenter sous différentes formes relativement conservées selon les espèces, il n'est pas impensable de considérer que la queue cytoplasmique du NDF membranaire puisse avoir un rôle tel que le contrôle du taux de turn-over de la molécule précurseur. En effet, on observe que selon la séquence de domaine intracytoplasmique, le taux de clivage varie. Une dernière variation est la présence ou non d'un domaine "kringle". Les isoformes possédant ce domaine sont répartis essentiellement dans les tissus neuronaux. Cette constatation peut faire penser que le NDF pourrait être sous l'influence de deux promoteurs : un pour les tissus neuronaux et un autre pour les tissus mésenchymateux et non neuronaux.

D'autres formes de NDF existent :

- ARIA pour Acétylcholine-Receptor Inducing Activity augmentant la synthèse de récepteurs à l'acétylcholine au niveau des jonctions neuromusculaires (Falls et al., 1993),
- GGF pour Glial Growth Factor ayant une action mitogène sur les cellules de Schwann (Marchionni et al., 1993).

Les différentes formes de NDF montrent un pattern d'expression histo-spécifique : NDF $\alpha_2$  et NDF $\beta_2$  sont prédominants dans les cellules mésenchymateuses et organes non neuronaux, tandis que NDF $\beta_1$  est peu représenté dans ces tissus.

En résumé, il semble que les variations dans le domaine EGF-like confèrent des différences dans l'affinité de liaison tandis que les différences de structure des domaines cytoplasmiques et juxtamembranaires affectent apparemment le taux de clivage du précurseur membranaire en une forme soluble. On peut essayer de spéculer que les Neurégulines jouent des rôles biologiques multiples ayant des spécificités spatiales et temporelles lesquelles sont définies par le choix de la combinaison de la structure en mosaïque de NDF (Wen et al., 1994).

Comme déjà vu au début de ce point, NDF a été isolé par sa capacité d'augmenter la phosphorylation de HER2/neu et d'induire des variations phénotypiques dans certaines lignées cellulaires (Peles et al., 1992; Wen et al., 1992). De plus, des études de cross-linking chimiques (Holmes et al., 1992; Peles et al., 1992) ont fait la preuve d'une liaison entre NDF et HER2. Cependant, certaines lignées cellulaires possédant HER2 ne sont pas reconnues par NDF. Comme cette non-reconnaissance n'est pas due à une différence au niveau du récepteur (une transfection par un HER2 normal dans des lignées cellulaires ne produisant pas ce récepteur ne permet pas une reconnaissance avec son ligand, Peles et al., 1993), cette observation suggère l'existence d'un autre composant cellulaire impliqué dans la reconnaissance des cellules cibles par NDF (Peles et al., 1993). Des preuves d'une interaction indirecte entre NDF et neu/HER2 existent. Tout d'abord, les interactions entre NDF et neu sont dépendantes du type cellulaire. Deuxièmement, aucun des anticorps monoclonaux utilisés pour identifier HER2 ne sont capables d'inhiber les effets de NDF sur HER2. Finalement, l'utilisation d'un récepteur soluble ne permet pas la liaison avec son ligand NDF (Peles et al., 1993). Cependant, Peles et al. (1993) n'ont pu trouver de lignées cellulaires n'exprimant pas HER2 mais pouvant répondre à NDF. Il faut donc penser que HER2 agit comme un co-récepteur essentiel mais pas suffisant. L'idée de la formation d'un hétérodimère n'est pas nouvelle puisqu'elle est assez courante pour les récepteurs de la famille de l'EGFR. Dans le but de déterminer le second composant de cet hétérodimère, deux équipes ont entrepris une série de transfusions. Tout d'abord, Plowman et al. (1993) ont étudié l'implication possible de HER4 dans la formation du récepteur par des transfusions simples (HER2 ou HER4 seuls) ou doubles (HER2 et HER4). Leurs résultats montrent que la coexpression de HER4 avec HER2 est nécessaire pour la formation d'un récepteur à haute affinité. Cependant, HER4 seul est aussi capable de répondre à la stimulation de NDF en augmentant son activité tyrosine kinase et en phosphorylant ses résidus tyrosines. Plus récemment, Sliwkowski et al. (1994) ont réalisé des expériences similaires dans le but de déterminer si HER3 pouvait également interagir avec HER2. Dans ce cas, HER3 seul forme un récepteur à faible affinité incapable d'une autophosphorylation. En effet, HER3 possède un site catalytique ne fonctionnant pas. HER3 est donc capable de se lier à son ligand mais ne peut transmettre le signal. Suite à la liaison entre HER3 et NDF, un hétérodimère à haute affinité de liaison se forme avec HER2 qui lui est toujours capable de s'autophosphoryler et de transphosphoryler HER3. Une série de tyrosines phosphorylées vont alors être accessibles pour la reconnaissance par des sites SH2 d'autres molécules faisant partie de la cascade kinasique. La suite de la réponse cellulaire au facteur qu'est le NDF suit une voie classique d'activation de la voie des MAP-kinase et de la Phospholipase C $\gamma$  ainsi qu'une internalisation par des vésicules coatées et une dégradation du récepteur et du ligand dans des endolysosomes.

### 3. Théorie sur la RT-PCR in situ.

Le NDF et ses récepteurs (HER2 et HER3) sont des protéines relativement peu exprimées dans les kératinocytes épidermiques (les cellules contiennent peu de messagers codant pour ces protéines). Pour cette raison, il est fort probable que les résultats obtenus en hybridation in situ soient insuffisants pour en tirer des conclusions au niveau de la variation d'expression. Une technique permettant la mise en oeuvre d'une amplification au niveau du tissu lui-même pourrait s'avérer très intéressante pour augmenter l'intensité de ces résultats et affiner les conclusions que l'on peut en tirer.

La Polymerase Chain Reaction ou PCR est une méthode mise au point par Mullis et al. en 1986 permettant de détecter une séquence d'ADN présente en très peu d'exemplaires. Le principe général de cette méthode est d'amplifier une portion d'ADN de séquence connue par un procédé d'extension d'amorces. Ces amorces sont des oligonucléotides complémentaires d'une séquence de 20 à 25 nucléotides situés de part et d'autre de la séquence à amplifier (en 3' de chaque brin). En faisant agir une DNA polymérase, chaque amorce hybridée (après séparation des deux brins d'ADN) au niveau de sa séquence complémentaire est allongée dans le sens 5'-3'. Il en résulte un doublement de la séquence souhaitée.

La réaction d'amplification commence par une incubation à haute température (94°C) durant une période suffisamment longue (5 minutes) pour désapparier les deux brins de l'ADN génomique. Il s'ensuit une série de cycles permettant l'amplification. Chaque cycle comporte 3 étapes :

- une étape à haute température (94°C) permettant le désappariement entre le brin néoformé et le brin matrice,
- la température est ensuite abaissée à une température inférieure (55°C) à la température de melting des amorces. La température de melting ou  $T_m$  est la température pour laquelle la moitié des amorces sont désappariées,
- une augmentation de la température (72°C) pour atteindre la température optimale d'activité de l'enzyme. La DNA polymérase peut alors répliquer le fragment de DNA choisi.

Puisque chaque cycle permet un doublement du matériel, après 30 cycles, on devrait obtenir théoriquement  $2^{30}$  exemplaires. Cependant, on n'observe "seulement" une amplification d'un million de fois. Cette différence dans la quantité du matériel final est due à une saturation pour différentes raisons telles que l'épuisement des composants nécessaires à la PCR. En effet, les premiers cycles montrent une croissance exponentielle qui aboutit à un plateau.

Pour terminer l'amplification, une incubation de 7 minutes à 72°C est nécessaire pour permettre d'achever tous les brins incomplets. Les échantillons résultants de l'amplification sont ensuite stockés à 4°C.

Cette technique très simple présentait cependant un inconvénient majeur. Le passage par une haute température détruisait l'enzyme et il fallait en ajouter à chaque cycle. Une avancée considérable a été réalisée lorsqu'il fut possible d'utiliser une enzyme thermostable isolée à partir de *Thermus aquaticus* YT1 (une bactérie vivant dans les sources d'eau chaude), la Taq polymérase, évitant de devoir renouveler celle-ci à chaque cycle. Cette enzyme a une durée de demi-vie d'environ 40 minutes à 95°C. Une variante de cette méthode, la Reverse Transcription-PCR permet quant à elle de détecter de l'ARNm en passant par une étape préalable de transcription réverse de ce messager en ADN complémentaire ou cDNA.

Le nombre croissant de publications à ce sujet (de 3 publications en 1986 à 1700 en 1990) nous montre à quel point cette méthode est utilisée dans le cadre de diverses recherches. Mullis reçut un Prix Nobel en 1993 pour cette découverte. Cependant, cette méthode, bien que très puissante, ne nous donne pas d'indication sur la distribution cellulaire des transcrits au niveau du tissu étudié.

Pour avoir des informations morphologiques précises sur la localisation tissulaire des acides nucléiques, il faut avoir recours à une autre méthode, l'hybridation in situ. Cette méthode consiste à reconnaître sur du matériel histologique, une séquence d'ADN ou d'ARN, en utilisant comme sonde une séquence de bases complémentaires dans laquelle a été incorporé un marqueur identifiable (B. Bloch, 1991). Les premières tentatives de cette technique remontent à la fin des années 60. Cependant, en raison du peu de connaissance de la biologie moléculaire à cette époque, uniquement quelques laboratoires spécialisés utilisaient cette méthode. C'est au début des années 1980 que l'hybridation in situ a connu un essor important. Actuellement, elle est devenue une approche histologique à part entière. Étant donné les conditions expérimentales drastiques (perméabilisation des membranes, de nombreux lavages,...) appliquées au tissu, cette méthode détecte difficilement des transcrits présents en faible quantité (seulement 10% des ARNm sont conservés). Pour pouvoir être détectés, il faut au moins 20 copies du transcrit disponible pour l'hybridation.

C'est en raison de ce désavantage majeur qu'est née l'idée d'associer PCR et HIS. La PCR permettant d'amplifier des transcrits directement sur le lieu de leur production et l'hybridation in situ permettant de visualiser cette amplification.

La transcription in situ ou IST fut un premier pas vers la réalisation de cette technique. L'IST fut d'abord décrite et appliquée sur des coupes de tissu par Tecott et al., en 1988 et confirmée par l'application sur des cellules in vitro par Longley et al. en 1989. Le principe est simple : elle est basée sur l'hybridation d'amorces sur un mRNA dans une coupe tissulaire ou sur culture de cellules tout comme pour l'hybridation in situ. La transcription peut alors avoir

lieu par ajout de Reverse Transcriptase et de nucléotides marqués. Un brin complémentaire de cDNA est synthétisé et reste apparié à son brin matrice permettant une localisation du transcrite par autoradiographie dans le cas de nucléotides radioactifs. Les avantages de cette technique par rapport à l'HIS est que les primers ne sont pas marqués contrairement à la sonde ce qui permet de diminuer considérablement le bruit de fond. D'autre part, il est possible par cette technique de détecter des variations mineures dans la séquence de l'ARNm par l'utilisation de primers adéquats (en effet, les derniers nucléotides sont essentiels pour une bonne élongation). Les variations de températures et les différentes étapes sont bien moins drastiques que celles effectuées en HIS ce qui permet de conserver une meilleure morphologie. Cependant, le problème lié au nombre minimum de copies nécessaires reste toujours présent même si cette technique augmente la sensibilité.

En raison de ces différents résultats et des avancées techniques réalisées dans différents laboratoires, il était alors concevable de passer à la réalisation de cette technique si prometteuse, la PCR in situ (ISPCR). Une première application fructueuse fut réalisée en 1990 par le Dr Ashley T. Haase et al. détectant la présence du gène *gag* du virus HIV. Du point de vue théorique, plusieurs impératifs doivent être respectés :

1°) Une fixation suffisante du tissu doit pouvoir conserver le matériel génétique (ADN ou ARNm). Une fixation dans l'éthanol permet une meilleure conservation du noyau mais l'absence de liaison entre les molécules empêche la rétention des séquences amplifiées ou amplicons. La meilleure solution reste probablement la fixation dans de la paraformaldéhyde à 10% ne conservant qu'une petite partie du matériel mais permettant une bien meilleure rétention des amplicons par formation de cross-linking entre les protéines.

2°) Les différents constituants de la PCR doivent pouvoir accéder au matériel génétique. Pour cela, une digestion du tissu (en général, avec de la protéinase K) est indispensable. Celle-ci doit être suffisante pour permettre aux différents constituants de pénétrer dans la cellule mais pas trop importante au risque de voir une dégradation de la morphologie et l'apparition de faux positifs par diffusion des amplicons.

3°) Les amplicons doivent rester sur le lieu de leur amplification. Une diffusion trop importante provoque l'apparition de faux positifs (dans un tissu, des cellules normalement négatives donnent un signal par le dépôt aspécifique d'amplicons provenant d'autres types cellulaires). Comme vu précédemment, la méthode de fixation joue un rôle dans la rétention de ces amplicons. Cependant, il semble que la cause principale soit la formation de "long products" (environ 60 durant les 30 cycles d'une PCR normale, synthèse "arithmétique"). Dans une PCR en phase aqueuse, ces long products sont également synthétisés mais vu leur taille disparate, ils ne sont pas visibles sur un gel. Dans la ISPCR, ces brins de taille anormalement élevée provenant d'une extension au-delà des primers sont incapables de diffuser. Non seulement ces brins restent sur place mais la présence de petites parties complémentaires permet la formation d'un filet emprisonnant dans ses mailles une partie des amplicons. Bien que, de par le fait d'une augmentation de la concentration locale, la ISPCR atteint déjà son plateau aux

General Controls		
Control		Purpose
- Use of known positive and negative control samples		Control of specificity and sensitivity of method used
- Solution-phase PCR on extracted DNA/RNA of actual test samples		Detection of false negatives, control of sensitivity
- Amplification of endogenous control DNA sequences		Detection of false negatives, control of DNA/RNA quality
- Omission of primary antibody in immunohistochemical detection		Detection of endogenous enzyme activity
Additional controls		
Method	Control(s)	Purpose
Cells in suspension	- Lysis of cells after <i>in situ</i> PCR and analysis of PCR products by gel electrophoresis, Southern blot hybridization (and sequencing)	Specificity control of PCR products
Indirect <i>in situ</i> PCR	- Omission of DNA polymerase	Detection of nonspecific probe and antibody sticking
	- Use of irrelevant probes for <i>in situ</i> hybridization	Control of <i>in situ</i> hybridization specificity
Direct <i>in situ</i> PCR	- Omission of primers	Detection of artifacts related to DNA repair and endogenous priming
	- Omission of DNA polymerase	Detection of nonspecific probe and antibody sticking
<i>In situ</i> RT-PCR	- Omission of reverse transcriptase step - RNase pretreatment of samples	Detection of mis-priming and amplification of endogenous DNA
Quantitative <i>in situ</i> PCR	- <i>In situ</i> PCR in mixtures of known positive and negative cells of different proportions - Identification of different cell types by immunohistochemistry	Control of specificity and sensitivity of method used

Tableau I.I : contrôles nécessaires dans la technique de RT-PCR *in situ*.  
(*In situ* polymerase chain reaction and related technology)



environs des 20 cycles, il est préférable de travailler avec 35 cycles pour augmenter la quantité de 'long products'.

4°) Pour éviter une amplification aspécifique, il est préférable de passer par une étape de "Hot Start". En effet, lorsque la température est inférieure à la  $T_m$  des amorces, celles-ci peuvent s'apparier avec des séquences non entièrement complémentaires. Lorsque la température augmente au début de la PCR, la Taq polymérase peut déjà agir et allonger les amorces mal appariées pouvant aboutir à une amplification aspécifique. La technique du "Hot Start" consiste à chauffer la mixture contenant tous les éléments nécessaires pour effectuer la PCR (nucléotides, sels, enzymes et amorces) et à la déposer sur le tissu lui aussi chauffé.

5°) Après l'amplification, des lavages à différentes stringences vont permettre d'enlever un maximum de bruit de fond. A ce niveau aussi, il faut être très attentif aux différentes étapes car un lavage trop important diminue le signal tandis qu'un lavage trop faible donne un bruit de fond beaucoup trop important avec un risque de faux positifs par dépôt des amplicons en dehors du lieu de leur amplification.

Dans cette technique qui multiplie les étapes, il est nécessaire d'avoir de bons contrôles (tableau I.I) pour pouvoir être certain que le résultat obtenu n'est pas le fruit d'une réaction aspécifique.

Après avoir amplifié, il faut pouvoir détecter cette amplification. Dans ce but, différentes méthodes sont proposées en faisant la distinction entre 2 classes :

- ISPCR directe
- ISPCR indirecte.

**La ISPCR directe** semble être la technique la plus rapide. En effet, elle consiste en l'utilisation de nucléotides marqués (par isotope radioactif ou par une molécule antigène) permettant une détection immédiate après l'amplification. Cependant, on observe un grand nombre de faux positifs avec cette technique et ce pour la raison suivante : les méthodes de conservation des tissus et les différentes techniques précédant la ISPCR entraînent des dégradations plus ou moins importantes au niveau de l'ADN. Durant l'amplification, un processus de réparation de l'ADN peut se dérouler en incorporant de ce fait des nucléotides marqués. Malgré cet inconvénient majeur pour la mise en place d'un diagnostic, cette méthode peut avoir son intérêt dans les diverses expériences de mise au point du protocole de la ISPCR car elle élimine tout le traitement de détection post-amplification pouvant lui aussi être la cause de réponses inappropriées.

**La ISPCR indirecte**, quant à elle, utilise un mode de détection par hybridation de sondes marquées permettant d'augmenter encore la spécificité puisque seuls les amplicons reconnus par la sonde seront visualisables. Différentes possibilités de marquage de la sonde existent; il peut s'agir d'un marquage par incorporation de nucléotides couplés à un isotope radioactif avec une détection par autoradiographie avec toutes les précautions que cela implique. Une méthode plus simple mais cependant moins sensible est l'utilisation de sondes marquées par couplage de nucléotides avec des sites antigéniques (digoxigénine, biotine,...) reconnus par des anticorps ou



la streptavidine et pouvant être révélés par une action enzymatique au niveau d'un substrat (peroxydase, phosphatase alcaline,...).

Les applications majeures de l'ISPCR se situent à deux niveaux :

- l'étude au niveau du génome (ADN)
- l'étude de l'expression de gènes (ARN)

#### 1) Etude de l'ADN

A ce niveau, il faut encore subdiviser les possibilités en deux catégories :

- l'étude de gènes étrangers particulièrement intéressants dans le cas d'infection par des virus (HIV, Herpès,...) ou autres agents infectieux ou encore pour le contrôle d'une bonne incorporation d'un gène dans le cadre de la thérapie génique.
- l'étude de gènes normaux ou mutés.

Actuellement, la plus grande application de la ISPCR est la possibilité de poser un diagnostic d'infection par un agent étranger (pouvoir déterminer dès la naissance si le bébé né d'une mère porteuse du virus HIV est lui aussi atteint de cette infection ou s'il ne fait que porter les Ac maternels).

#### 2) Etude de l'ARN.

L'application essentielle du point de vue de l'ARN de cette technique relativement lourde consiste en la détection de transcrits présents en faible quantité ce qui était jusqu'à présent impossible avec les méthodes classiques d'HIS.

Actuellement, cette technique très prometteuse du point de vue de l'étude moléculaire associée à la morphologie n'en est encore qu'à ses premiers pas. Cela signifie du point de vue pratique qu'il est à l'heure actuelle impossible de donner un protocole applicable à tout type d'échantillon et que chacun doit essayer de trouver la méthode lui donnant les meilleurs résultats selon le matériel sur lequel il travaille.

## 4. Objectifs du travail.

Le kératinocyte est le type cellulaire responsable de l'homéostasie de l'épiderme. Une première phase de prolifération permettant de renouveler constamment le stock cellulaire est suivie par une phase de différenciation conduisant à la desquamation. C'est au cours de cette différenciation que les cellules acquièrent les caractères propres aux cellules cornées, véritables cellules fonctionnelles de la peau. Durant cette maturation cellulaire, la physiologie de la cellule est régulée par des facteurs extérieurs (tels que les facteurs de croissance ou les composants de la matrice extracellulaire) ou des facteurs internes.

Dans certains tissus, telle la glande mammaire dont les cellules glandulaires sont apparentées aux cellules épithéliales, un dérèglement dans le contrôle de la prolifération cellulaire menant à une tumorigénèse est associée à une surexpression de récepteurs aux facteurs de croissance appartenant à la famille de l'EGFR (HER2 et HER3).

En raison de ces observations, notre travail va s'intéresser à deux questions majeures :

1°) Puisqu'on observe une corrélation entre une surexpression de récepteurs de facteurs de croissance et une cancérisation, on peut penser que ces récepteurs et leurs ligands jouent un rôle dans le contrôle cellulaire. Pour répondre à cette question, nous allons étudier la variation de l'expression de HER1, HER2 et HER3 ainsi que celle de NDF et de ses différentes isoformes dans des cultures de kératinocytes *in vitro*. Cette variation d'expression peut être observée à deux niveaux. Soit au niveau de la transcription avec l'étude des ARN messagers par PCR et Northern blot, soit au niveau de la protéine elle-même par des immunomarquages.

2°) La deuxième question à se poser est de savoir si les résultats obtenus *in vitro* sont applicables à ce que l'on observe *in vivo* c'est-à-dire sur des coupes de peau. Ici aussi, on peut étudier les variations d'expression des différents HER et de NDF à deux niveaux. Une étude des messagers est possible par l'hybridation *in situ*, tandis que l'étude des protéines nécessite un immunomarquage. Des études préliminaires nous ont montré que le NDF ainsi que HER2 et HER3 sont en général peu exprimés dans les kératinocytes. Il semble donc qu'il faudra s'orienter vers la technique de PCR *in situ* permettant d'effectuer une hybridation *in situ* sur un matériel amplifié.

# **MATERIEL & METHODES**

# 1. Culture des kératinocytes épidermiques.

## 1.1 Matériel.

### Solution A :

- glucose 10,0 mM
- KCl 3,0 mM
- NaCl 130,0 mM
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,0 mM
- rouge phénol 0,0033 mM
- Hepes 30,0 mM
- pH 7,4, solution stérilisée par filtration sur Stérivex-GV 0,22 µm

### Trypsine T17 :

- Solution A
- 0,17% de trypsine

### Milieu complet :

- Kératinocyte-SFM de Gibco-Brl
- EGF recombinant à 5 ng/ml
- BPE (Bovine Pituitary Extract) à 50 µg/ml, centrifugé à 4000 RPM, 10 min. à 4°C et le surnageant est filtré sur filtre Stérivex-GV 0,22 µm.
- insuline 5 µg/ml
- éthanolamine 10<sup>-4</sup> M
- phosphoéthanolamine 10<sup>-4</sup> M
- hydrocortisone 5 x 10<sup>-7</sup> M
- 50 unités/ml de pénicilline G
- 50 µg/ml de streptomycine

- Lorsque la culture atteint 50% de confluence, il faut ajouter des acides aminés : L-histidine 8x10<sup>-5</sup> M, L-isoleucine 1.2x10<sup>-5</sup> M, L-méthionine 3x10<sup>-5</sup> M, L-phénylalanine 3x10<sup>-5</sup> M, L-tryptophane 1.5x10<sup>-5</sup> M et L-tyrosine 1.5x10<sup>-5</sup> M.

### Milieu GFØ :

- Kératinocyte-SFM de Gibco-Brl
- éthanolamine 10<sup>-4</sup> M
- phosphoéthanolamine 10<sup>-4</sup> M
- hydrocortisone 5 x 10<sup>-7</sup> M
- 50 unités/ml de pénicilline G
- 50 µg/ml de streptomycine

### Milieu GFØ + EGF :

- Kératinocyte-SFM de Gibco-Brl
- éthanolamine 10<sup>-4</sup> M
- phosphoéthanolamine 10<sup>-4</sup> M
- hydrocortisone 5 x 10<sup>-7</sup> M
- 50 unités/ml de pénicilline G
- 50 µg/ml de streptomycine
- EGF recombinant à 5 ng/ml

### Trypsine T25 :

- solution A
- 0,025% de trypsine
- EDTA 0,01M

## 1.2 Méthode.

### 1.2.1 Etablissement des cultures primaires et secondaires de kératinocytes à partir des prélèvements cutanés.

Les cellules sont isolées à partir de prépuces obtenus auprès des Docteur Jaucot et Lefèbre, clinique Saint-Luc à Bouge et auprès du Docteur Richir, hôpital Saint-Joseph à Montignies-sur-Sambre. Les prélèvements sont récoltés immédiatement après l'intervention et conditionnés dans de la solution A. Les échantillons sont stockés à 4°C. Toutes les opérations ultérieures seront effectuées de manière stérile sous hotte à flux vertical.

Le derme des prélèvements est ensuite éliminé autant que possible. Ensuite, chaque échantillon est coupé en petits carrés d'environ 3 mm de côtés. Ces petits morceaux sont incubés une nuit à 4°C, flottant sur la solution de trypsine T17 (sans EDTA) avec l'épiderme vers le haut (cette température est nécessaire pour une action ralentie de la trypsine). Le lendemain, le feuillet supérieur (épiderme) est détaché du derme par traction à l'aide de pinces et les cellules sont détachées les unes des autres par plusieurs aspirations brusques en pipette et passages sur treillis (Cell Strainer 70 µm Nylon stérile) pour éliminer les agrégats et les cellules mortes cornées. La suspension cellulaire est centrifugée à 1000 RPM, 10 minutes à 4°C. Le surnageant est éliminé et les cellules sont resuspendues dans 5 ml de milieu complet.

Les cultures primaires sontensemencées dans des boîtes de 175 cm<sup>2</sup> en présence de milieu complet (ce milieu permet d'initialiser la prolifération des kératinocytes en culture en leur fournissant tous les facteurs de croissance et hormones nécessaires) et 0,1 % de Fetal Calf Serum dialysé ou dFCS (pour favoriser l'adhésion cellulaire) dans une étuve humide à 37°C sous une atmosphère contenant 5 % de CO<sub>2</sub> (le FCS est dialysé contre un tampon pauvre en Ca<sup>++</sup>). Le milieu est renouvelé tous les deux jours.

A environ 80% de confluence, les kératinocytes sont détachés de leur support par action de trypsine T25 additionnée d'EDTA. Après détachement des cellules, l'action de la trypsine est inhibée par du sérum de veau foetal dialysé à 2% dans de la solution A. L'ensemencement secondaire s'effectue dans des boîtes de 175 cm<sup>2</sup> et la culture est menée à une densité proche de la confluence (environ 80 % de confluence).

A la fin de la culture secondaire, les cellules sont généralement congelées pour stockage. Dans ce but elles sont détachées comme précédemment décrit, comptées et resuspendues à raison de 1 million de cellules par ml de milieu de congélation (milieu complet contenant 10 % de DMSO-cryoprotecteur et 10 % de sérum de veau foetal dialysé). Les cellules seront stockées dans des cryotubes (NUNC 1 ml), congelées lentement à -70°C puis transférées dans de l'azote liquide.

## **1.2.2 Etablissement de cultures tertiaires.**

### **1.2.2.1 Culture en milieu GF $\theta$ et GF $\theta$ + EGF.**

Les kératinocytes provenant de culture secondaire et congelés dans de l'azote liquide à -180°C sont utilisés après décongélation pour la culture tertiaire. L'ensemencement se fait dans du milieu complet défini plus haut à une densité de 5000 cellules par cm<sup>2</sup>. Le lendemain de la mise en culture, le milieu est changé car celui-ci contient encore du DMSO qui est toxique pour la poursuite de la croissance. Le milieu sera ensuite changé tous les deux jours jusqu'à atteindre environ 50% de confluence. A ce moment on peut cultiver les cellules dans un milieu parfaitement défini. Cette étape consiste à remplacer le milieu complet après trois lavages avec

de la solution A par un milieu (GF $\theta$ ) sans aucun facteur peptidique exogène. Dans certaines expériences, l'Epidermal Growth Factor est ajouté à raison de 5 ng/ml. Des acides aminés sont également ajoutés à ce milieu. Celui-ci est renouvelé tous les deux jours jusqu'à atteindre le niveau de confluence voulu dans l'expérience.

#### 1.2.2.2 Culture en milieu complet.

Dans ce mode de culture, les kératinocytes provenant de culture secondaire et stockés à -180°C sont ensemencés dans un milieu complet comme pour la méthode précédente mais ils seront maintenus dans ce milieu avec apport d'acides aminés à 50% de confluence jusqu'à atteindre le niveau de confluence voulu dans l'expérience.

Rem : pour notre étude, nous avons également travaillé avec des cellules cancéreuses mammaires et des fibroblastes. Ces cellules sont cultivées dans du DMEM contenant 10% de Fetal Calf Serum.

## 2. Extraction d'ARN total.

### 2.1 Matériel.

La manipulation d'ARN messagers nécessite l'utilisation d'un matériel traité au diéthyl pyrocarbonate (DEPC) et autoclavé afin d'éliminer toute trace d'ARNase ainsi que l'utilisation de gants pour éviter toute contamination par des ARNases de la peau.

### 2.2 Méthode.

Le TRIzol Reagent, solution monophasique de phénol et de guanidine isothiocyanate, est un réactif prêt à l'emploi permettant l'isolement d'ARN total de cellules et tissus. Le tissu utilisé comme source d'ARN est homogénéisé à l'ultraturax en présence de TRIzol (1ml pour 50-100 mg de tissu). Ce réactif a la particularité de maintenir l'intégrité des ARN tout en détruisant et dissolvant les constituants cellulaires durant cette étape d'homogénéisation. Une incubation à la température ambiante pendant 5 minutes permet la dissociation complète des complexes nucléoprotéiniques. Ensuite, une incubation de 2-3 minutes dans du chloroforme (0,2 ml par ml de TRIzol) suivie par une centrifugation (6000 RPM pendant 15 minutes à 4°C) permet la séparation entre une phase organique phénol-chloroforme (inférieure) contenant les impuretés et une phase aqueuse (supérieure) contenant les ARN. La phase aqueuse est récoltée



et les ARN sont précipités par l'ajout d'alcool isopropylique (0,5 ml par ml de TRIzol). Une incubation à température ambiante pendant 10 minutes suivie d'une centrifugation (6000 RPM pendant 10 minutes à 4°C) permet la formation d'un culot. Ce culot est lavé avec de l'éthanol à 75% (au moins 1ml par ml de TRIzol) centrifugé (6000 RPM pendant 5 minutes à 4°C). Le culot est resuspendu dans de l'H<sub>2</sub>O traitée DEPC. La mesure de la concentration en ARNm se fait sur un échantillon dilué 35 fois (2 µl d'échantillon dans 68 µl de TE) par mesure de la densité optique effectuée à 260 nm (permet de déceler les contaminations protéiques) et 280 nm grâce à un spectrophotomètre Genequant (Pharmacia).

### 3. Extraction d'ARN(polyA).

#### 3.1 Matériel.

##### H<sub>2</sub>O traitée DEPC :

- 500 ml d'H<sub>2</sub>O
- traitée avec 0,1% de DEPC et autoclavée.

##### Tampon riche en sels :

- Tris-HCl 0,01 M
- NaCl 0,5 M
- EDTA 0,001 M
- SDS 0,2%
- traité avec 0,1 % de DEPC et autoclavé.

##### Tampon pauvre en sels :

- Tris-HCl 0,01 M
- NaCl 0,1 M
- EDTA 0,001 M
- SDS 0,2%
- traité avec 0,1% de DEPC et autoclavé.

##### Tampon sans sel :

- Tris-HCl 0,005 M
- EDTA 0,001 M
- SDS 0,2%
- traité avec 0,1% de DEPC et autoclavé.

##### Tampon de lyse :

- Tris-HCl 0,01 M
- NaCl 0,1 M
- EDTA 0,002 M
- SDS 1%
- traité avec 0,1% de DEPC et autoclavé.

##### Tampon TE :

- Tris base 9 mM
- EDTA-2H<sub>2</sub>O 0,9 mM
- pH 8

#### 3.2 Méthode.

Le matériel utilisé pour cette extraction provient de culture de cellules.

La première étape consiste à préparer des oligo-dT qui serviront à capter les ARNm. Ce sont des chaînes de 30 nucléotides formés uniquement de bases thymidines (poly-T). Ces chaînes sont attachées de manière covalente à de la cellulose par leur extrémité 5'-phosphate. Sous les conditions ioniques adéquates (forte concentration en sels), la thymidine forme des ponts d'hydrogène avec l'adénosine ce qui provoque leur appariement. Or la majorité des ARNm possède une queue de poly-A (particularité qui les différencie des autres ARN : ARN ribosomal et ARN de transfert). C'est cette particularité qui permet de les séparer : seuls les ARNm

restent accrochés aux billes de cellulose. Les oligo-dT sont stockés à  $-20^{\circ}\text{C}$  sous forme de poudre et doivent être traités avant leur utilisation. Une quantité équivalente à 0.025 g pour une boîte de  $75\text{ cm}^2$  à 0.050 g pour une boîte de  $175\text{ cm}^2$  est lavée deux fois dans du NaOH 0.1 M puis rincée une fois avec de l'eau distillée. Les oligo-dT-cellulose sont ensuite incubés 30 minutes en présence de DEPC 0.1%. Ils sont lavés à nouveau trois fois avec de l'eau DEPC traitée, puis une fois avec un tampon riche en sels. Les oligo-dT-cellulose sont ensuite stockés dans ce même tampon à raison de 2 ml par boîte à  $4^{\circ}\text{C}$  pendant deux semaines maximum.

### 3.2.1 Extraction proprement dite.

Pour extraire les ARNpoly(A), le milieu de chaque boîte est ôté et les cellules sont rapidement lysées avec du tampon de lyse contenant 25  $\mu\text{g/ml}$  de protéinase K (sérine protéase non spécifique résistante au SDS et servant à inactiver les nucléases endogènes comme les ARNases ou les ADNases). Lorsque le milieu de culture contient du sérum, il est nécessaire de procéder à 2 lavages avec de la solution A (pour éliminer un maximum de protéines) avant de mettre le tampon de lyse. Lorsque le lysat devient très visqueux, il est ôté et passé 6 à 8 fois au travers d'une aiguille 21G pour casser l'ADN. La concentration en protéinase K est alors ajustée de manière à avoir une concentration finale de 75  $\mu\text{g/ml}$  et le lysat est incubé pendant 30 minutes dans un bain à  $37^{\circ}\text{C}$ . La concentration en sels de départ (0.1 M) est également ajustée après cette incubation de manière à avoir une concentration finale de 0.5 M par ajout de NaCl 5 M (une forte concentration en sels est nécessaire à la fixation des ARNpoly(A) sur les oligo-dT-cellulose). Les oligo-dT traités sont ensuite ajoutés au lysat et mis à incuber pendant minimum deux heures avec agitation. Après cette incubation, les oligo-dT-cellulose-ARNpoly(A) sont lavés par centrifugation avec le tampon riche en sels déjà utilisé auparavant, puis resuspendus dans ce même tampon et déposés sur une colonne (Poly-prep chromatography column, Bio-Rad) également traitée DEPC et munie d'un filtre en polymère poreux retenant les oligo-dT-cellulose-ARNpoly(A). Ceux-ci sont tout d'abord lavés avec le tampon à forte concentration en sels, ensuite avec un tampon à faible concentration en sels pour permettre aux hybridations non spécifiques éventuelles (autre chose que des ARNpoly(A)) de se décrocher. L'élution des ARNpoly(A) se fait alors par une solution sans sels à  $55^{\circ}\text{C}$  ce qui ne permet plus de maintenir les ponts d'hydrogène entre les bases. La concentration finale en sels de l'éluat est réajustée à 0.5 M et un volume d'éthanol à 95% stocké à  $-20^{\circ}\text{C}$  correspondant à deux fois le volume de l'éluat est ajouté pour précipiter les ARN. La précipitation se fait durant une nuit à  $-20^{\circ}\text{C}$  (à ce niveau, les échantillons peuvent être stockés durant plusieurs semaines). Le lendemain, les échantillons sont centrifugés à 12000 RPM, 15 minutes à  $4^{\circ}\text{C}$  et les culots d'ARN sont séchés puis resuspendus dans 25  $\mu\text{l}$  de tampon TE contenant 1  $\mu\text{l/ml}$  de protéinase K. La mesure de la concentration en ARNm se fait sur un échantillon dilué 35 fois (2  $\mu\text{l}$  d'échantillon dans 68  $\mu\text{l}$  de TE) par mesure de la densité optique effectuée à 260 nm (permet de déceler les contaminations protéiques) et 280 nm grâce à un spectrophotomètre Genequant (Pharma cia). Les échantillons sont alors stockés à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## 4. Northern blot.

### 4.1 Matériel.

#### MOPS 10X :

- 0,2 M de MOPS (3-(N-morpholino)-propane sulfonic acid)
- 50 mM d'acétate de sodium
- 10 mM d'EDTA.

#### Sample buffer :

- 50 % de formamide désionisée
- 6,5 % de formaldéhyde
- MOPS 1X (3-N-morpholino-propane sulfonic acid).

#### Tampon d'électrophorèse :

- MOPS 1X
- 3,3 % de formaldéhyde.

#### 20X SSC :

- 2,9 M de NaCl
- 0,29 M de citrate de sodium

#### Gel d'électrophorèse :

- 1,2 % d'agarose ultraPure (ultraPure agarose GibcoBRL, 15510-027)
- Solution tamponnée : - 0,2 M de MOPS
  - 50 mM d'acétate de sodium tri-hydraté
  - 10 mM EDTA
  - pH 7

- 6,5 % de formaldéhyde.

### 4.2 Méthode.

La quantité d'échantillon que l'on désire déposer sur le gel est déshydratée au Speedvac. Le culot est resuspendu dans du "sample buffer". Les échantillons sont incubés 35 minutes à 65°C (pour permettre la dénaturation de l'ARN au niveau des structures secondaires) puis placés immédiatement sur glace.

Avant de déposer les échantillons sur le gel, celui-ci doit être polarisé durant 10 minutes à 75 volts. La séparation des ARN se réalise à 75 volts pendant 3 heures.

Après migration, le gel est lavé 4 fois pendant 10 minutes avec de l'eau distillée (pour ôter un maximum de formaldéhyde). Pendant le dernier lavage, la membrane de nylon (Bio Rad, Zeta Probe GT) est mouillée de manière uniforme avec de l'eau distillée, puis avec du 20X SSC.

Le transfert est réalisé à l'aide du "Turbo Blotter" de Schleicher & Schuell (appareillage et filtre). Le transfert s'effectue durant une nuit dans du 20X SSC. Le lendemain, les ARN sont fixés par formation de liens covalents avec la membrane grâce à une exposition aux UV 150 millijoules/cm<sup>2</sup>. Les membranes peuvent être alors emballées dans du papier filtre pour leur permettre de sécher et d'être conservées ou sont hybridées

Sondes cDNA	Taille	Plasmide	Source	Sites de restriction
NDF $\alpha_2$	891 bp	pSPORT	Dr. Wen/Amgen YP	Sal I - Not I
HER1	887 bp	pGem7	Dr. Coffey YP	Eco RI
HER2	2900 bp	pCHC6	Dr. Kern Georgetown U. YP	Xba I - Kpn I
HER3	1376 bp	pTZ18/19 U/R	Dr. Coffey YP	Eco RI - Hind III
K10	2039 bp	pGem 3 $\oplus$	D. Roop YP	Pst I
K14	* 250 bp	pGem 3 $\oplus$	D. Roop YP	Bst XI - Eco RI
1B15 (cyclophylin)	743 bp	pSP65	Dr. Coffey YP	Xba I - Pst I

*Tableau M.I.* sondes utilisées pour l'hybridation des membranes de Northern Blot.

\* : la restriction du plasmide contenant le fragment de K14 par les enzymes décrites dans le tableau nous donne deux fragments. Le plus petit (250 bp) correspond à une région non codante de l'ADN.

## 5. Hybridation des Northern blots par sondes ADN marquées au $^{32}\text{P}$ .

### **5.1 Matériel.**

#### Tampon d'hybridation :

- 0,12 M de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
- 0,25 M de NaCl
- 4 mM de Sodium Dodécyl Sulfate (7%)
- 50% de formamide désionisée
- pH 7,2

#### 20X SSC :

- 2,9 M de NaCl
- 0,29 M de citrate de sodium
- pH 7.

### **5.2 Méthode.**

Les membranes (Northern blots) sont hybridées avec des sondes d'ADN complémentaires marquées au phosphore 32 sur tous leurs nucléotides dCTP.

#### **5.2.1 Préhybridation des membranes.**

La première étape consiste à superposer les membranes avec un treillis en nylon entre chacune pour permettre le passage des différentes solutions utilisées par la suite. Ce montage se fait dans du 2X SSC pour bien mouiller les membranes et les treillis. Le tout est ensuite roulé en cigare et introduit dans une bouteille à hybridation Hybaid contenant un peu de 2X SSC en veillant à bien étaler le montage sur les parois de la bouteille. Cette solution est ensuite remplacée par un volume de solution d'hybridation (10 ml pour les small bottles et 13 ml pour les medium bottles) chauffée à 43°C. Après quelques minutes, la solution est renouvelée (ceci permet d'ôter un maximum de 2X SSC). La bouteille est alors placée sur la rotisserie du four à hybridation (Micro-4 Hybaid) à 43°C pendant 1 heure (cette étape de préhybridation est indispensable pour masquer les sites non spécifiques sur lesquels la sonde pourrait venir s'accrocher et donc éviter un bruit de fond trop important).

#### **5.2.2 Préparation des sondes marquées au $^{32}\text{P}$ et hybridation.**

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

Les sondes sont préparées par "random priming" à partir de fragments de restriction (il faut une quantité de 20 ng) utilisés comme brin modèle. Une étape de dénaturation (5 min dans un bain d'eau bouillante) sépare les brins appariés. La polymérisation peut alors avoir lieu en

utilisant des Random Primers (hexamères synthétisés de manière aléatoire qui pourront s'hybrider à différents endroits du produit de restriction), des nucléotides non marqués (dATP, dGTP, dTTP), une DNAPolymérase (le grand fragment de la DNA polymérase I ou Klenow fragment) et le marquage est possible grâce à l'incorporation de ( $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ )dCTP (50  $\mu\text{Ci}$ , "Isoblu", ICN). Après une incubation de 1 heure 30 minutes à température ambiante, la sonde est séparée de la radioactivité non incorporée par passage sur une colonne de chromatographie Bio-Spin 30 (Bio-Rad) centrifugée à 2500 RPM. Un  $\mu\text{l}$  de sonde est prélevé pour permettre d'estimer l'activité incorporée grâce à un compteur à scintillation BECKMAN LS 6000 IC. Une bonne incorporation varie entre  $10^5$  et  $5 \times 10^5$  cpm (peut aller jusqu'à plus de  $1 \times 10^6$  cpm pour 1  $\mu\text{l}$ ).

Avant l'hybridation, la sonde est à nouveau plongée dans un bain d'eau bouillante pendant 5 minutes pour dénaturer les brins et immédiatement déposée sur glace pour éviter le réappariement. La sonde est ajoutée à la solution d'hybridation et l'ensemble remplace la solution d'hybridation utilisée pour la préhybridation. L'hybridation se déroule pendant une nuit à  $43^\circ\text{C}$ .

### **5.2.3 Post hybridation.**

Après hybridation, les membranes sont soumises à trois lavages de 15 minutes chacun avec de la solution 2X SSC/0,1% SDS à  $25^\circ\text{C}$ , suivis de 2 lavages de 15 minutes avec de la solution 0,5X SSC/0,1% SDS à  $43^\circ\text{C}$  et enfin de 2 lavages de 15 minutes avec de la solution 0,5X SSC/0,1% SDS à  $65^\circ\text{C}$ . Ces différentes étapes de lavage permettent de décrocher les sondes s'étant hybridées de manière non spécifique. Pour les hybridations des kératines, trois lavages supplémentaires sont nécessaires avec de la solution 0,1X SSC/0,1% SDS à  $65^\circ\text{C}$  pour éviter les hybridations non spécifiques.

### **5.2.4 Révélation.**

Chaque membrane est emballée séparément dans un cellophane et exposée avec un film Kodak (X-Omat AR) à  $-70^\circ\text{C}$  pendant des temps variables.

Pour analyse, les films sont scannés sur un scanner couleur A4 (HP Scan Jet 4C). Des analyses densitométriques ont été réalisées sur Power Macintosh (7100/80 AV) 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](ftp://zippy.nimh.nih.gov)).

Lors des hybridations suivantes, les sondes doivent être décrochées avant d'hybrider à nouveau. La bouteille contenant les membranes et du 2X SSC est placée dans le four à  $80^\circ\text{C}$  pendant quelques minutes (le temps de réchauffer l'ensemble). Renouveler cette étape en remplaçant le 2X SSC par du 0,1X SSC/0,5% SDS (solution de "décochage") chauffé à  $65^\circ\text{C}$ .

La solution est ensuite renouvelée en veillant cette fois à remplir la bouteille. Celle-ci est placée dans un bain en ébullition. Cette étape est répétée une seconde fois avant de remplacer la solution par du 2X SSC à 43°C, puis par de la solution de préhybridation.

## 6. Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR).

### 6.1 Matériel.

Cette technique a été réalisée à l'aide des réactifs fournis par Perkin Elmer.

Description :

- MuLV Reverse Transcriptase (recombinant Moloney Murine Leukemia Virus), 50U/μl.
- AmpliTaq DNA Polymerase, 5 U/μl.
- RNase inhibitor, 20 U/μl.
- dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 10mM.
- GeneAmp 10X PCR Buffer (500mM KCl, 100mM Tris-HCl, pH 8,3).
- MgCl<sub>2</sub> solution, 25 mM.
- Random Hexamer Primers, 50μM.

RT Master Mix (pour 20 μl):

- 0,1 μg d'ARN-polyA
- 5 mM de MgCl<sub>2</sub>
- buffer 1X
- 1 mM de chaque dNTP
- 2 unités de RNase inhibitor
- 2,5 μM de Random Hexamer Primers
- 50 unités de MuLV Reverse Transcriptase (recombinant Moloney Murine Leukemia Virus).

PCR Master Mix (pour 80 μl):

- 1,25 mM de MgCl<sub>2</sub>
- buffer 1X
- 0,2 μM de chaque primer
- 2,5 unités d'AmpliTaqDNA Polymerase.

### 6.2 Méthode.

La première étape, la transcription reverse consiste à transformer les ARNm-PolyA servant de matériel de base en cDNA. Celui-ci se présente sous forme d'un simple brin d'ADN (formé des bases A, C, T et G) qui servira de matrice pour l'amplification future. La particularité de cet ADN est qu'il ne contient que les parties codantes du gène puisque toutes les parties non codantes ont été épissées.

Les ARNmPoly(A), à raison de 0,1 μg par échantillon testé, serviront de matériel de base pour l'amplification. D'autres constituants sont indispensables tels que les dNTP (1mM chacun), des Random Hexamer (2,5 μM) jouant le rôle d'amorces, de la RNase Inhibitor (20 unités) empêchant l'action des enzymes détruisant les RNA, ainsi que des concentrations en

sels optimales pour le bon fonctionnement de l'enzyme ( Buffer 1X et 5 mM de  $MgCl_2$ ). Il faut environ 50 unités d'enzyme MuLV Reverse Transcriptase par échantillon traité. Les échantillons sont alors incubés dans une machine pour PCR (Perkin Elmer2400). La transcription reverse se compose de 3 températures :

- 15 minutes à 42°C, température optimale de transcription de l'enzyme,
- 5 minutes à 99°C pour inhiber la RTase,
- 5 minutes à 5°C pour refroidir les échantillons.

Ensuite, commence l'amplification permettant d'obtenir environ 1 million de doubles brins d'ADN par copie d'ARN de départ. Pour ce faire, certaines modifications dans les concentrations des sels sont à effectuer de même que l'ajout de la Taq Polymerase et des primers spécifiques au fragment à amplifier. Les concentrations en sels optimales pour le bon fonctionnement de la Taq sont de 2 mM de  $MgCl_2$  et d'un buffer 1X concentré. Il faut 0,4  $\mu M$  du primer sens et du primer antisens ainsi que 2,5 Unités d'enzyme (pour une quantité de matériel de départ de 0,1  $\mu g$ ).

Une première incubation de 5 minutes à 94°C permet un désappariement total des hybrides ARN-cDNA les rendant disponibles pour les primers. Ensuite, une série de cycles seront effectués (de 25 à 35 cycles selon l'intensité de réponse voulue et selon le but recherché). Un cycle se compose de 3 températures:

- 1 minute à 94°C pour permettre le désappariement des doubles brins formés,
- 1 minute à 55°C permettant la reconnaissance spécifique entre les primers et leur séquence cible (température d'annealing),
- 1 minute à 72°C, température idéale d'élongation par la Taq Polymerase.

A la suite de ces cycles, une étape de 7 minutes à 72°C est ajoutée permettant l'achèvement des brins éventuellement incomplets.

Les échantillons peuvent ensuite être stockés à 4°C pour une période relativement longue (plusieurs mois).

La visualisation des résultats est possible par la migration des échantillons sur un gel d'agarose à 2% contenant 0,5  $\mu g/\mu l$  de bromure d'éthidium.



Sonde attendue	Plasmide utilisé	Site de linéarisation	Promoteur
NDF Anti-sens	phNDF (hNDF $\alpha$ 2 dans pSPORT)	XbaI	T7
NDF sens	phNDF	SalI	SP6
K10 Anti-sens	pK10 dans pGem3	HindIII	T7
K10 sens	pK10 dans pGem3	SalI	SP6
HER3 Anti-sens	pTZ19U/erbB3 (HER3 dans pSPORT)	EcoRI	T7
HER3 sens	pHE4 (HER3 dans pSPORT)	HindIII	T7

Tableau M.II : plasmides linéarisés utilisés pour la synthèse des sondes ARN.

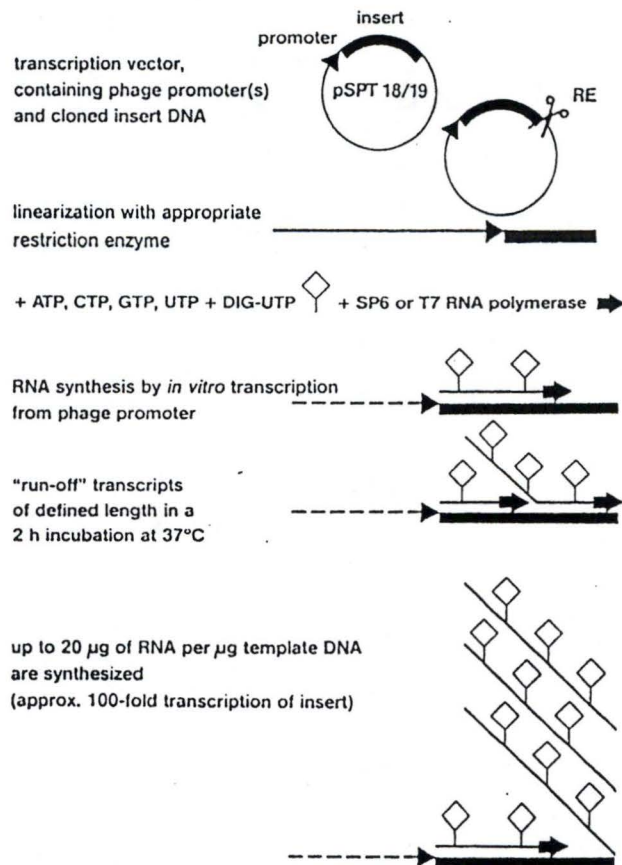


Figure M.1 : fabrication de sondes marquées par incorporation de nucléotides couplés à la digoxigénine.

## 7. Fabrication de sondes ARN marquées par la Digoxigénine.

### 7.1 Matériel.

Voir le tableau M.II des plasmides utilisés.

#### Kit de transcription :

- NTP labeling mixture 10X contenant :
  - 10 mM d'ATP
  - 10 mM de CTP
  - 10 mM de GTP
  - 6,5 mM d'UTP
  - 3,5 mM de DIG-UTP
  - pH 7,5
- buffer 10X :
  - 0,4 M de Tris-HCl
  - 60 mM de MgCl<sub>2</sub>
  - 50 mM de 1,2 dithioérytritol (DTE)
  - 40 mM de Spermidine
  - pH 7,2
- DNase I, RNase free : 10 unités/μl
- RNase inhibitor : 20 unités/μl
- SP6 RNA Polymerase : 20 unités/μl
- T7 RNA Polymerase : 20 unités/μl.

#### Mix pour la transcription :

- 1 μg de plasmide linéarisé
- NTP labeling mixture 1X
- buffer 1X
- RNase inhibitor : 20 unités
- enzyme : 40 unités.

### 7.2 Méthode.

Le fragment de DNA que l'on désire utiliser comme matrice de la sonde est cloné dans le site multiple de clonage d'un plasmide contenant un promoteur T7 et/ou un promoteur SP6 adjacents à ce site multiple de clonage. Une étape de linéarisation est nécessaire pour servir de site d'arrêt de la transcription (tableau M.II). Le site de restriction choisit pour cette linéarisation doit être à la fin de l'insert du côté opposé au promoteur utilisé.

La sonde ARN est ensuite transcrite au moyen d'une T7 polymérase ou d'une SP6 polymérase (le choix de l'une ou l'autre enzyme dépend du sens de la sonde que l'on veut obtenir). Pour marquer la sonde, la polymérase incorpore de l'uridine-triphosphate couplée à la digoxigénine (environ un DIG-UTP tous les 25 nucléotides incorporés) (figure M.1). Pour 1 μg d'ADN au départ, environ 10 μg de sondes sont synthétisés. Par cette méthode, il est possible de synthétiser des sondes sens et des sondes anti-sens de manière indépendante. Les sondes anti-sens permettent l'hybridation aux transcrits (ARNm) et la visualisation du marquage tandis que les sondes sens servent de témoins négatifs.

## 8. Hybridation in situ (HIS).

### 8.1 Matériel.

#### Tampon PBS (Phosphate Buffer Saline):

- 0,14 M de NaCl
- 27 mM de KCl
- 10 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- 1,8 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- pH 7,4

#### Tampon de préhybridation :

- SSC 2X
- 50 % de formamide désionisée.

#### Buffer 1 :

- 100 mM de Tris-HCl
- 150mM de NaCl
- pH 7,5

#### Buffer 3 :

- 100 mM de Tris
- 100 mM de NaCl
- 50 mM de MgCl<sub>2</sub>
- pH 9,5

#### Solution d'hybridation :

- 0,01 M de Tris HCl
- 12,5 % de Denhardtts 100X :
  - Ficoll 1 %
  - PVP 1 %
  - BSA 1 %
- SSC 2X
- 50 % de formamide désionisée
- 0,5 % de SDS
- 0,25 mg/ml de DNA SS de sperme de poisson
- 10 % de Dextran Sulfate

#### Dye solution :

- buffer 3
- 165 µg/ml (de Buffer 3) de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate
- 440 µg/ml (de Buffer 3) de sel de nitrobleu tétrazolium
- 240 µg/ml (de Buffer 3) de levamisol

### 8.2 Méthode.

L'HIS est appliquée sur des coupes de tissus cryofixés. Dans ce but, les échantillons de peau de prépuce sont dès le prélèvement cryofixés dans un cryoprotecteur (Tissue Tec) et sont conservés à - 70°C. Des coupes d'une épaisseur de 10 µm sont effectuées au cryostat tout en respectant les conditions RNase free (couteau traité) et recueillies sur lames Superfrost traitées à l'aminosilane puis fixées dans de la paraformaldéhyde 4% pendant 30 minutes afin de conserver le maximum d'ARN. Afin de rendre ces ARN accessibles à la sonde, les coupes subissent une série de traitement à l'HCl 0,2 N et au triton-X-100 0,3%/PBS suivie d'une post fixation à la paraformaldéhyde 4% pour maintenir les structures en place. Tous les lavages entre ces étapes se font dans du PBS. Pour terminer la préparation du tissu, il faut passer par une étape de préhybridation dans le tampon de préhybridation dans une chambre humide à 37°C.

L'hybridation peut alors avoir lieu en utilisant les sondes adéquates (ARN-Dig) diluées dans le tampon d'hybridation à raison de 1/50. Avant de déposer la sonde sur les échantillons, il faut passer par une étape de dénaturation à 80°C pour éliminer les structures secondaires éventuelles. L'hybridation se fait pendant 1 nuit à 42°C (température choisie selon la température de Melting des sondes utilisées) en chambre humide.

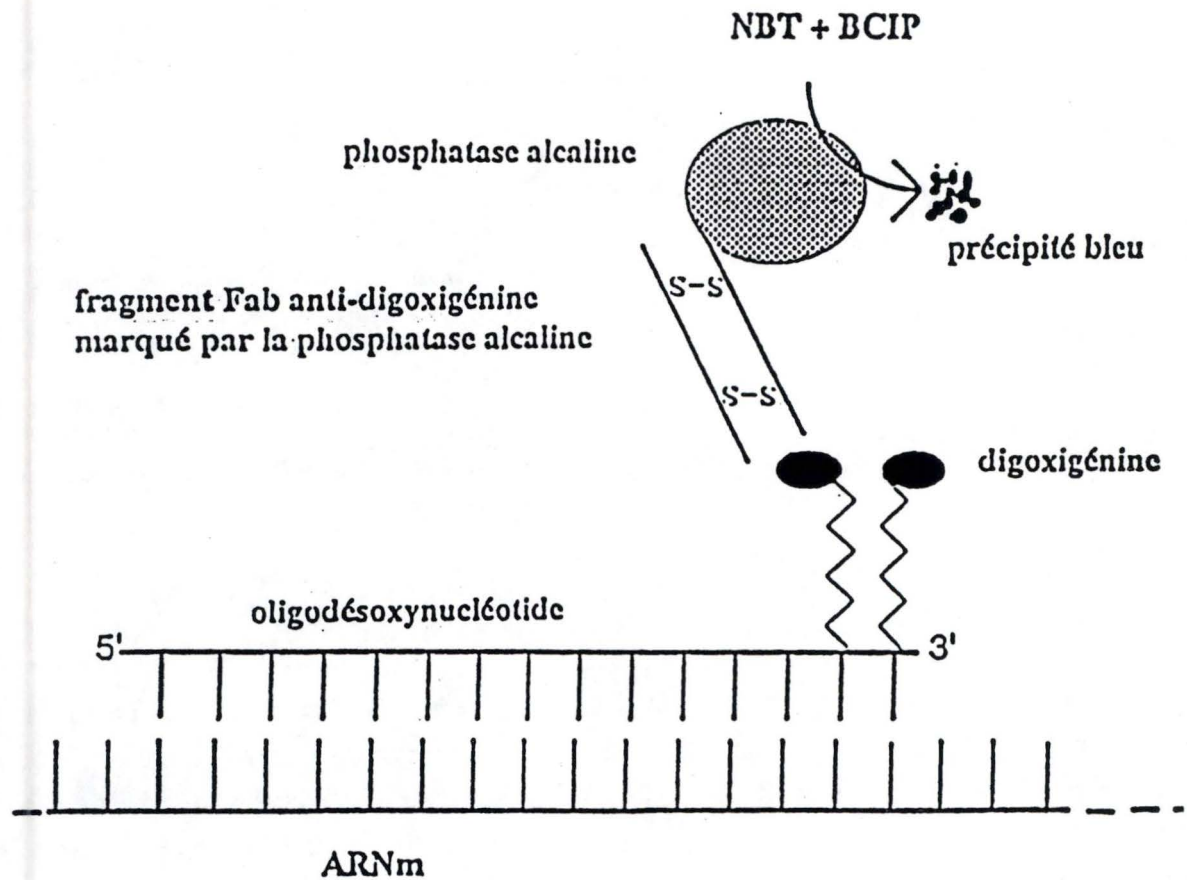


Figure M.2 : technique de révélation : une phosphatase alcaline couplée à un anticorps anti-digoxigénine réagit avec le "NBT+BCIP" pour former un précipité bleu.

(température ambiante, 37°C, 42°C) tout en agitant. Durant ces rinçages, on passe par un bain de SSC 2X contenant 20 µg de RNase/ml (cette étape élimine les ARN non appariés).

L'étape de révélation est un marquage immunohistochimique qui commence par une saturation des sites avec du sérum de mouton puis par une incubation de l'Ac anti digoxigénine (fabriqué chez le mouton) couplé à une phosphatase alcaline. Pour optimiser l'activité de cette enzyme, les coupes sont rincées dans le buffer 1 puis le buffer 3 (alcalinisation). La révélation s'effectue par l'ajout à l'abri de la lumière de la solution dye durant une nuit ce qui permet la formation d'un précipité bleu (figure M.2).

L'hybridation in situ sur des cellules mises en culture (et fixées à la paraformaldéhyde 4 % pendant 30 minutes) suit le même protocole.

## 9. Marquage immunohistochimique (IHC).

### 9.1 Matériel.

#### PBS/ABC :

- 0,9 mM de CaCl<sub>2</sub> anhydre
- 2,7 mM de KCl
- 15 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- 0,49 mM de MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O
- 140 mM de NaCl
- 8,1 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O
- pH 7,2.

#### PBS/BSA :

- PBS/ABC
- BSA (fraction V) : 0,1%
- Triton-X-100 : 0,02%

#### Solution d'AEC :

- 15 µg de 3-Amino-9-ethylcarbazole
- 0,64 M de NN-diméthylformamide
- 94 µM de Tampon acétate, pH 5,2
- 0,03 % de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

### 9.2 Méthode.

Technique utilisée : marquage "LSAB +" (labelled streptavidine biotine + peroxydase).

Cette technique est appliquée sur des coupes cryofixées. Dans ce but, les tissus sont congelés comme pour l'HIS. Des coupes d'une épaisseur de 6 µm sont effectuées au cryostat, recueillies sur lames Superfrost traitées à l'aminosilane, et fixées dans de l'acétone à -20°C pendant 10 minutes. Pour préparer le tissu, il faut passer par une étape de lavage dans du peroxyde d'hydrogène à 3% durant 10 minutes pour inhiber les peroxydases endogènes. Les lavages sont effectués dans du PBS/ABC (3x5 min). Une étape de saturation des sites par du PBS/BSA durant 30 minutes est indispensable pour éviter les cross-réactions. Ensuite, les coupes vont être mises à incuber pendant 2 heures à température ambiante en chambre humide

Anticorps	Dilution	isotype/source	spécificité
NCL-R1 (Novo Castra)	1 : 40	IgG2b monoclonal de souris	domaine externe de la molécule EGFR.
NCL-CB11 (Novo Castra)	1 : 40	IgG1 monoclonal de souris	domaine interne de l'oncoprotéine c-erbB-2
C-17 (Santa Cruz Biotechnology)	1 : 50	IgG polyclonal de lapin	domaine C-terminal de la protéine c-erbB-3
F-20 (Santa Cruz Biotechnology)	1 : 50	IgG polyclonal de lapin	domaine C-terminal de la protéine HRG- $\alpha$ , HRG- $\beta$ 1 et HRG- $\beta$ 2 mais pas HRG- $\beta$ 3.
DE-K10 (Organon teknika)	1 : 10	IgG1 monoclonal de souris	cytokératine 10 de 56,6 kD.

Tableau M.III : anticorps utilisés pour les marquages immunohistochimiques.

avec l'Ac adéquat (tableau M.III) dilué dans du PBS/BSA. Un anticorps secondaire couplé à la biotine permet d'amplifier le signal fourni par l'Ac primaire (15 min en chambre humide à température ambiante). En effet, cet Ac reconnaît la queue Fc de l'Ac primaire et est couplé à plusieurs biotines. Une troisième étape consiste à incuber les coupes toujours à température ambiante (15 min en chambre humide) avec de la streptavidine couplée à des peroxydases (la streptavidine peut se lier spécifiquement à la biotine). La présence de ces enzymes est révélée par l'AEC (entre 4 et 6 min). Les coupes sont montées au glycergel (milieu aqueux).

Rem : il est possible de faire de l'immunomarquage sur des cellules en culture en utilisant le même protocole si ce n'est la technique de fixation qui varie (30 minutes dans de la paraformaldéhyde 4%).

## **RESULTATS & DISCUSSION**



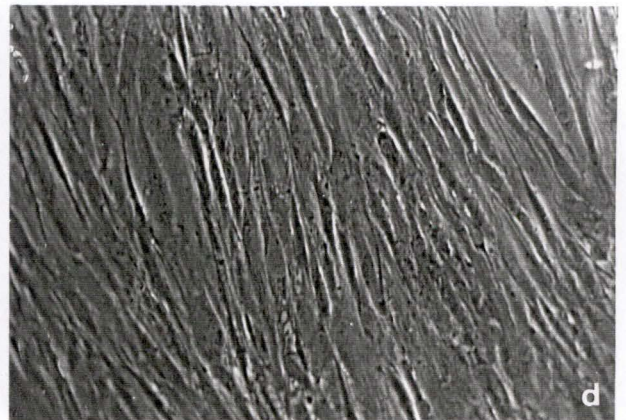
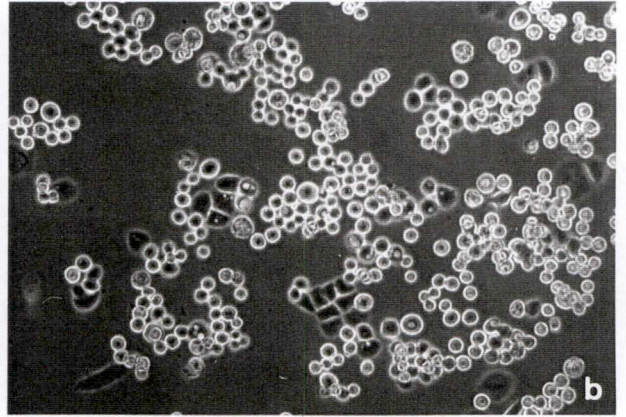
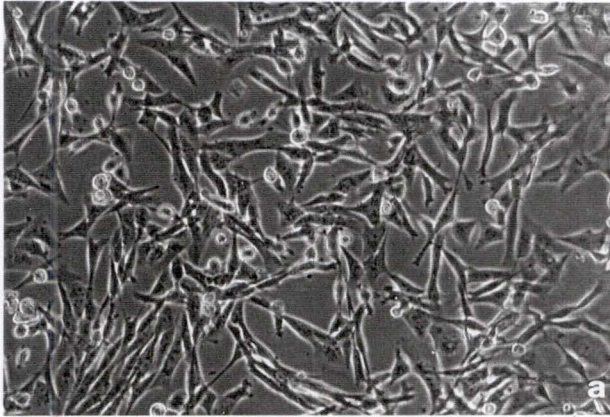


Figure R.1 : Aspect en microscopie à contraste de phase des cultures de cellules MDA-MB-231 à sous-confluence (a), MDA-MB-453 à sous-confluence (b) et de fibroblastes à sous-confluence (c) et à confluence (d). Grossissements: 105X.

# 1. Analyse morphologique des cultures de cellules en microscopie à contraste de phase.

## **1.1 Cellules cancéreuses mammaires et fibroblastes.**

Les MDA-MB-231 et les MDA-MB-453 (M. D. Anderson Hospital) sont des cellules provenant de cancers mammaires humains (Cailleau et al., 1978).

Les MDA-MB-231 présentent une morphologie de type fibroblastique (cellules allongées) (figure R.1a). Ces cellules expriment le NDF (Holmes et al., 1992) et serviront de contrôle positif permettant de s'assurer que l'expérience de détection a bien fonctionné. Cependant, ces cellules n'expriment ni le HER3, ni les kératines, ni l'involucrine.

Les MDA-MB-453 sont des cellules arrondies formant des colonies en grappe (figure R.1b). Elles ont la particularité de ne pas exprimer NDF et serviront de contrôle négatif pour s'assurer de la détection correcte de NDF. Leur génome contient plusieurs copies du gène codant pour HER2. Ces cellules n'expriment pas non plus les kératines épidermiques ni l'involucrine.

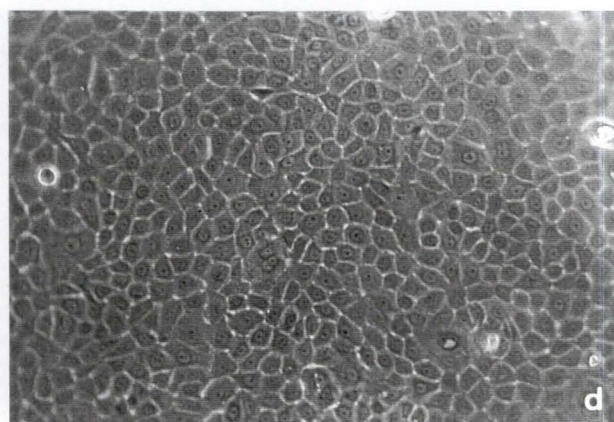
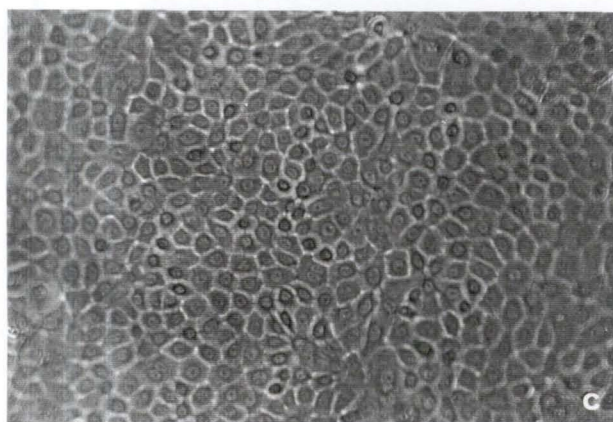
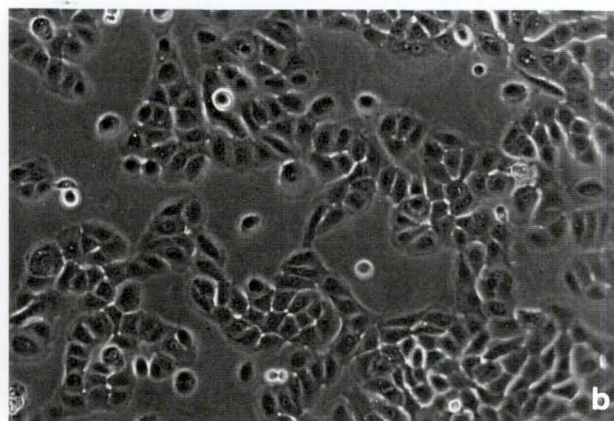
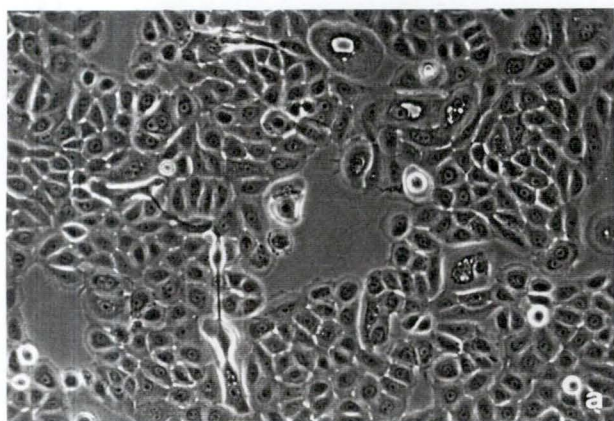
## **1.2 Fibroblastes.**

Les fibroblastes sont des cellules provenant d'explants dermiques, cultivées dans du DMEM contenant 10 % de FCS (figures R.1c et R.1d).

## **1.3 Kératinocytes.**

### **1.3.1 Culture en milieu sans ou avec EGF à sous-confluence ou à confluence.**

Les kératinocytes épidermiques sontensemencés à raison de 5000 cellules par cm<sup>2</sup> dans le milieu complet. Lorsque les cellules recouvrent environ 50% de la superficie disponible pour leur croissance, le milieu complet est remplacé par ce même milieu ne contenant plus aucun facteur peptidique exogène (GF $\Theta$ ), ou contenant 5 ng/ml d'EGF (GF $\Theta$  + EGF). Les cellules sont étudiées à deux stades distincts : la sous-confluence et la confluence. Les cultures de cellules à sous-confluence occupent 60 à 80% de la superficie disponible. Ces cellules se caractérisent par de nombreuses divisions mitotiques (les cellules sont en phase de prolifération). Lorsque toute la superficie de la boîte de culture est recouverte et que les cellules ne montrent plus de division, la culture a atteint la confluence (les cellules sont en phase de différenciation). A ce moment, les cellules montrent un début de stratification.



*Figure R.2* : Aspect en microscopie à contraste de phase des cultures de kératinocytes à sous-confluence (**a** et **b**) et à confluence (**c** et **d**) en milieu sans facteur de croissance (**a** et **c**) ou contenant 5 ng/ml d'EGF (**b** et **d**). Grossissements : 105X.

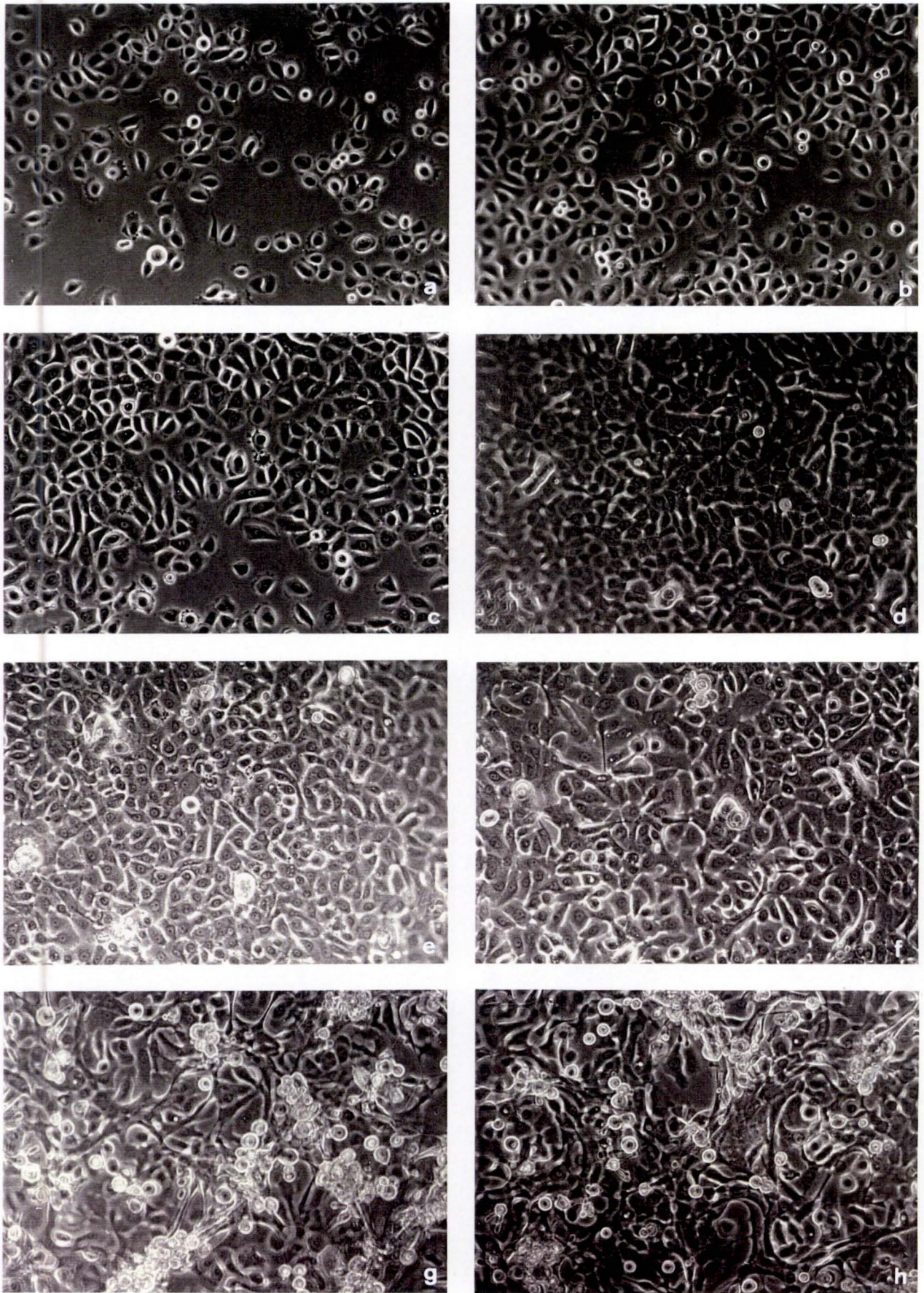


Figure R.3 : Aspect en microscopie à contraste de phase des cultures de kératinocytes de prépuce en milieu complet à 50% (a), 90% (b) et 98% de confluence (c), 1 jour (d), 3 jours (e), 5 jours (f), 7 jours (g) et 9 jours après la confluence (h).  
Grossissements : 105X.

En culture autonome, c'est-à-dire dans le milieu GF $\Theta$ , les kératinocytes présentent une forme oblongue aux pourtours réfringents. De nombreuses mitoses sont visibles. Ils ont cependant tendance à rester proches les uns des autres en colonies (figure R.2a). A confluence, les kératinocytes épidermiques deviennent plus petits et prennent une forme polyédrique. Les cellules perdent leur réfringence et se serrent les unes contre les autres. A ce stade, les mitoses deviennent rares (figure R.2b).

Lorsque l'EGF est ajouté au milieu, les cultures à sous-confluence montrent peu de différences avec celles maintenues en milieu sans EGF. Cependant, elles semblent plus dispersées. Dans ces conditions, les cultures à confluence se caractérisent par des cellules plus petites et moins allongées (figure R.2c). Par contre, les cellules confluentes maintenues dans un milieu contenant de l'EGF gardent un halo périphérique et apparaissent moins jointives (figure R.2d).

### 1.3.2 Culture en milieu complet à différents moments de confluence.

Les kératinocytes sontensemencés à raison de 5000 cellules par cm<sup>2</sup> dans le milieu complet et analysés jusqu'au neuvième jour après la confluence. Les cellules à sous-confluence sont très semblables à celles cultivées en milieu contenant seulement de l'EGF. Elles ont une forme oblongue, aux bords réfringents et elles se dispersent sur tout le substrat (figures R.3a, b et c). A confluence (figure R.3d), les kératinocytes présentent toujours un halo brillant. Les espaces intercellulaires restent bien marqués. Trois jours après la confluence, les cellules commencent à se stratifier (figures R.3e et f) et prennent une forme étoilée. Entre 6 et 9 jours après la confluence, certaines cellules superficielles desquament (elles s'arrondissent et se détachent) (figures R.3g et h).

## 2. Détection de NDF et de HER4 dans l'épiderme humain.

Pour confirmer in vivo, sur un prélèvement épidermique obtenu par biopsie, la détection de NDF dans les kératinocytes épidermiques en culture (Poumay et Pittelkow, sous presse) et la non-expression de HER4 dans ces mêmes cellules (Plowman et al., 1992), nous avons choisi d'utiliser la technique de RT-PCR. Les échantillons utilisés sont des ARNpolyA provenant de cultures de kératinocytes épidermiques sous-confluents ou confluent, de cellules MDA-MB-231 et 453, et d'ARN totaux provenant d'un tissu cutané normal, essentiellement épidermique, obtenu au dermatome lors d'une intervention de chirurgie plastique (abdominoplastie).

proNDF- $\alpha$ 2a	MSERKEGRGKGKGGKKGKESGKPKESAAGSQSPALPPRLK <b>EMKSQESA</b> AGSKLVLRCEISSEYSSSLRFKWFKNGNELNRKNKPENIKIQKKPGKSELRIN	100
proNDF- $\alpha$ 2a	KASLADSGEYMCKVISKLGNDASANITIVESNEFITGMPASTET <b><u>AYVSSES</u></b> PIRISVSTEGANTSSSTSTSTTGTSHLIKCAEKEKTF <sup>•</sup> C <sup>•</sup> VNGGEC <sup>•</sup> FTVK	200
proNDF- $\alpha$ 1	HLGIEFIE	
proNDF- $\alpha$ 2a	DLSNPSRYLCKC <b><u>QPGFTGAR</u></b> CTENVPMKVQTQEK-----AEELYQKRVLTTITGICIALLVVGIMCVVAYCKTKKQRQKLHDR	277
proNDF- $\alpha$ 3	SAQMSLLVIAAKTT*	248
proNDF- $\beta$ 1	<b><i>PNEFTGDR</i></b> CQNYVMASFYK <b><u>HLGIEFME</u></b> -----	
proNDF- $\beta$ 2a	<b><i>PNEFTGDR</i></b> CQNYVMASFYK-----	
proNDF- $\beta$ 3	<b><i>PNEFTGDR</i></b> CQNYVMASFY <b><u>STSTPFL</u></b> SLPE*	241
proNDF- $\beta$ 4a	<b><i>PNEFTGDR</i></b> CQNYVMASFYMTSRRKRQETEKPLERKLDHSLVKESK	
proNDF- $\alpha$ 2a	LRQSLRSERSNLVNIANGPHHPNPPPENVLVNQYVSKNVISSHIVEREVETSFSSTSHYTSTAHHSTTVTQTPSHSWSNGHTESVISESNSVIMSSVE	377
proNDF- $\alpha$ 2a	NSRHSSPAGGPRGRLHGLGGPRDNSFLRHARETPDSYRDSPHSERYVSAMTTPARMSPVDFHTPSSPKSPPEMSPPVSSMTVSMPSVAVSPFVEEERPL	477
proNDF- $\alpha$ 2b	HNLIAELRRNKAYRSKCMQIQLSATHLRPSSITHLGFIL*	461
proNDF- $\alpha$ 2c	*	422
proNDF- $\alpha$ 2a	LLVTPPRLREKKYDHHPPQQLNSFHHPAHQSTSLPPSPLRIVEDEEYETTQEYESVQEPVKKVTNSRRAKRTPNGHIANRLEMSNTSSVSSNSESETE	577
proNDF- $\alpha$ 2a	DERVGEDTPFLGIQNPLAASLEVAPAFRLAESRTNPAGRFSTQEELQARLSSVIANQDPIAV*	639

Figure R.4a : localisation des régions en acides aminés correspondant à l'amorce sens (hNDF-257/217S) (gras) et aux amorces anti-sens spécifiques de NDF total (hNDF-590/550A) (gras et souligné), de NDF $\alpha$  et  $\beta$  (hNDFalpha-790A et hNDFbeta-751A) (gras et italique) et de NDF $\beta$ 1 et  $\beta$ 3 (hNDFbeta1-809A et hNDFbeta3-1207A) (italique et souligné). Les points noirs marquent les 6 cystéines hautement conservées.

2461 gagcacaagg ataacattgg atcacaactg ctgcttaact ggtgtgtcca gatagctaag  
 2521 ggaatgatgt acctggaaga aagacgactc gttcatcggg atttggcagc ccgtaatgtc  
 2581 ttagtgaaat ctccaaacca tgtgaaaatc acagattttg ggctagccag actcttggaa  
 2641 ggagatgaaa aagagtacaa tgctgatgga ggaaagatgc caattaaatg gatggctctg  
 2701 gagtgtatac attacaggaa attcacccat cagagtgacg tttggagcta tggagtact  
 2761 atatgggaac tgatgacctt tggaggaaaa ccctatgatg gaattccaac gcgagaaaac  
 2821 cctgatttat tagagaaagg agaacgtttg cctcagcctc ccatctgcac tattgacgtt  
 2881 tacatggtea tgggtcaaag ttggatgatt gatgctgaca gtagacctaa atttaaggaa  
 2941 ctggctgctg agttttcaag gatggctcga gaccctcaa gatacctagt tattcagggt  
 3001 gatgatcgta tgaagcttcc cagtccaaat gacagcaagt tctttcagaa tctcttggat  
 3061 gaagaggatt tggaagatat gatggatgct gaggagtact tggccctca ggctttcaac  
 3121 atcccacctc ccatctatac ttccagagca agaattgact cgaataggag tgaattgga  
 3181 cacagccctc ctctgccta ccccccatg tcaggaaacc agtttgata ccgagatgga  
 3241 ggttttgctg ctgaacaagg agtgtctgtg ccctacagag cccaactag cacaattcca  
 3301 gaagctcctg tggcacaggg tgctactgct gagatttttg atgactcctg ctgtaatggc  
 3361 accctacgca agccagtggc accccatgtc caagaggaca gtagcaccca gaggtacagt  
 3421 gctgaccca ccgtgtttgc cccagaacgg **agcccacgag gagagctgga** tgaggaaggt  
 3481 tacatgactc ctatgcgaga caaacccaaa caagaatacc tgaatccagt ggaggagaac  
 3541 ccttttgttt ctcgagaaaa aatggagac cttcaagcat tggataatcc cgaatatcac  
 3601 aatgcatcca atgggtccacc caaggccgag gatgagtatg tgaatgagcc actgtacctc  
 3661 aacacctttg ccaacacctt gggaaaagct gactacctga agaacaacat actgtcaatg  
 3721 ccagagaagg ccaagaaagc gtttgacaac cctgactact ggaaccacag cctgccacct  
 3781 cggagcacc ctcagcacc agactacctg caggagtaca gcacaaaata tttttataaa  
 3841 cagaatgggc ggatccggcc tattgtggca gagaatcctg aatacctctc tgagttctcc  
 3901 ctgaagccag gcaactgtgt gccgcctcca ccttac**agac accggaatac tgtggt**gtaa  
 3961 gctcagttgt ggttttttag gtggagagac acacctgctc caatttcccc acccccctct  
 4021 ctttctctgg tggctctcct tctaccccaa ggccagtagt tttgacactt cccagtggaa  
 4081 gatacagaga tgcaatgata gttatgtgct tacctaactt gaacattaga gggaaagact  
 4141 gaaagagaaa gataggagga accacaatgt ttcttcattt ctctgcatgg gttggtcagg  
 4201 agaatgaaac agctagagaa ggaccagaaa atgtaaggca atgctgccta ctatcaaact  
 4261 agctgtcact ttttttcttt ttctttttct ttctttgttt ctttcttctt cttctttttt  
 4321 tttttttttt taaagcagat ggttgaaca ccatgctat ctgttcctat ctgcaggaac  
 4381 tgatgtgtgc atatttagca tcctggaaa tcataataaa gtttccatta gaacaaaaga  
 4441 ataacatttt ctataacata tgatagtgtc tgaattgag aatccagttt ctttccccag  
 4501 cagtttctgt cctagcaagt aagaatggcc aactcaactt tcataattta aaaatctcca

*Figure R.4b* : localisation des amorces sens (H4-XbaI-3451S) et anti-sens (H4-KpnI-3955A) sur la séquence partielle du gène codant pour HER4/c-erbB-4. (GeneBank Accession Nr : L07868).

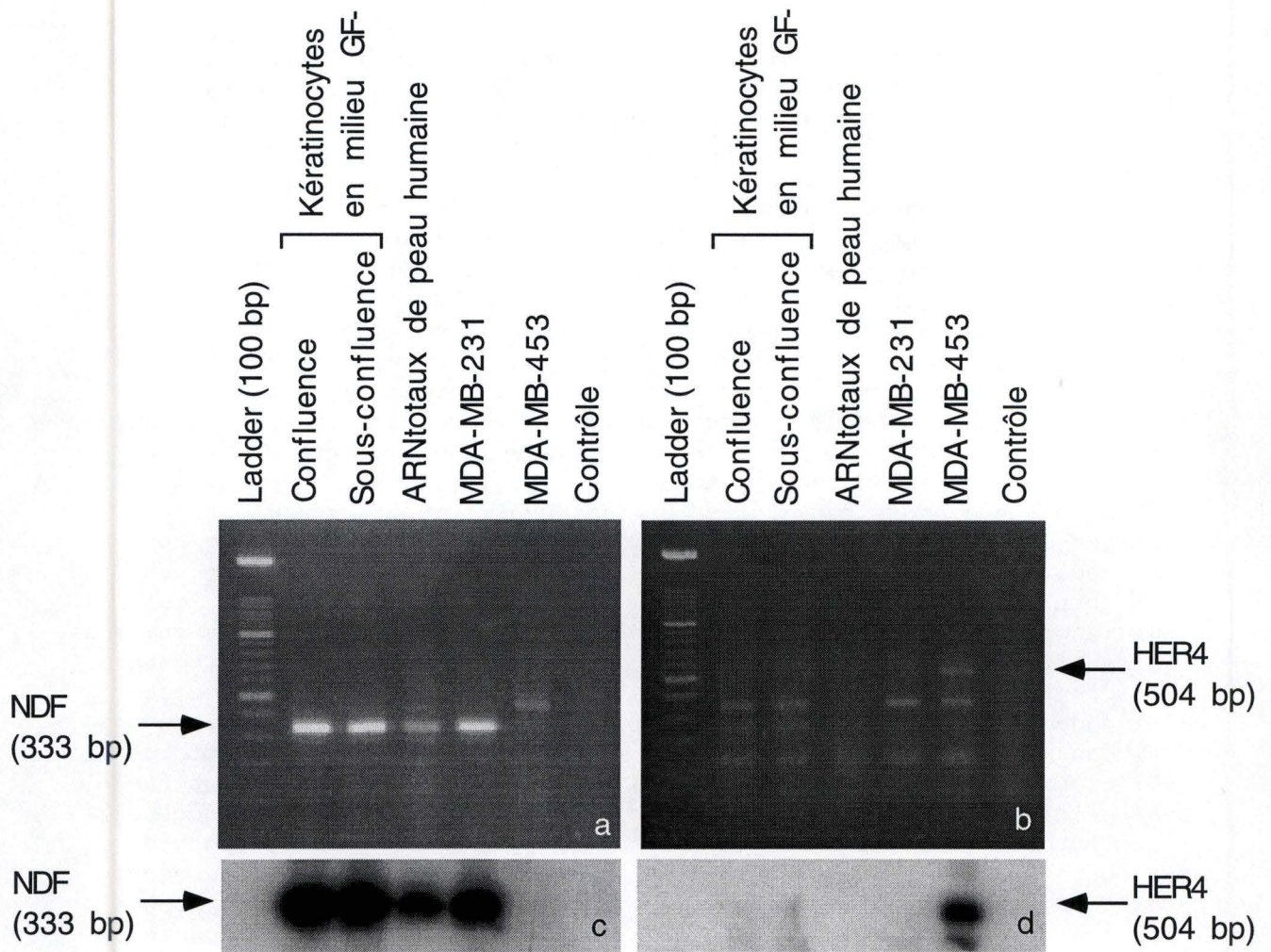


Figure R.5 : détection par RT-PCR (a et b) et par hybridation de Southern blots (c et d) de NDF (a et c) et de HER4 (b et d).



## **2.1 Etude de l'expression de NDF par RT-PCR.**

Les amorces ou "primers" utilisés pour l'amplification d'un fragment spécifique de NDF sont choisis au niveau de la séquence codant pour le domaine extracellulaire commun des isoformes de NDF (figure R.4a).

Les amplicons sont analysés par coloration du gel avec du bromure d'éthydiuim (figure R.5), nous observons une bande dont la taille correspond à celle attendue. En effet, la localisation des amorces sur la séquence totale de NDF nous prédit l'amplification d'un fragment de 333 bp.

## **2.2 Etude de l'expression de HER4 par RT-PCR.**

Les primers utilisés pour l'amplification spécifique de HER4 sont également représentés et localisés sur la séquence de cDNA codant pour ce récepteur (figure R.4b).

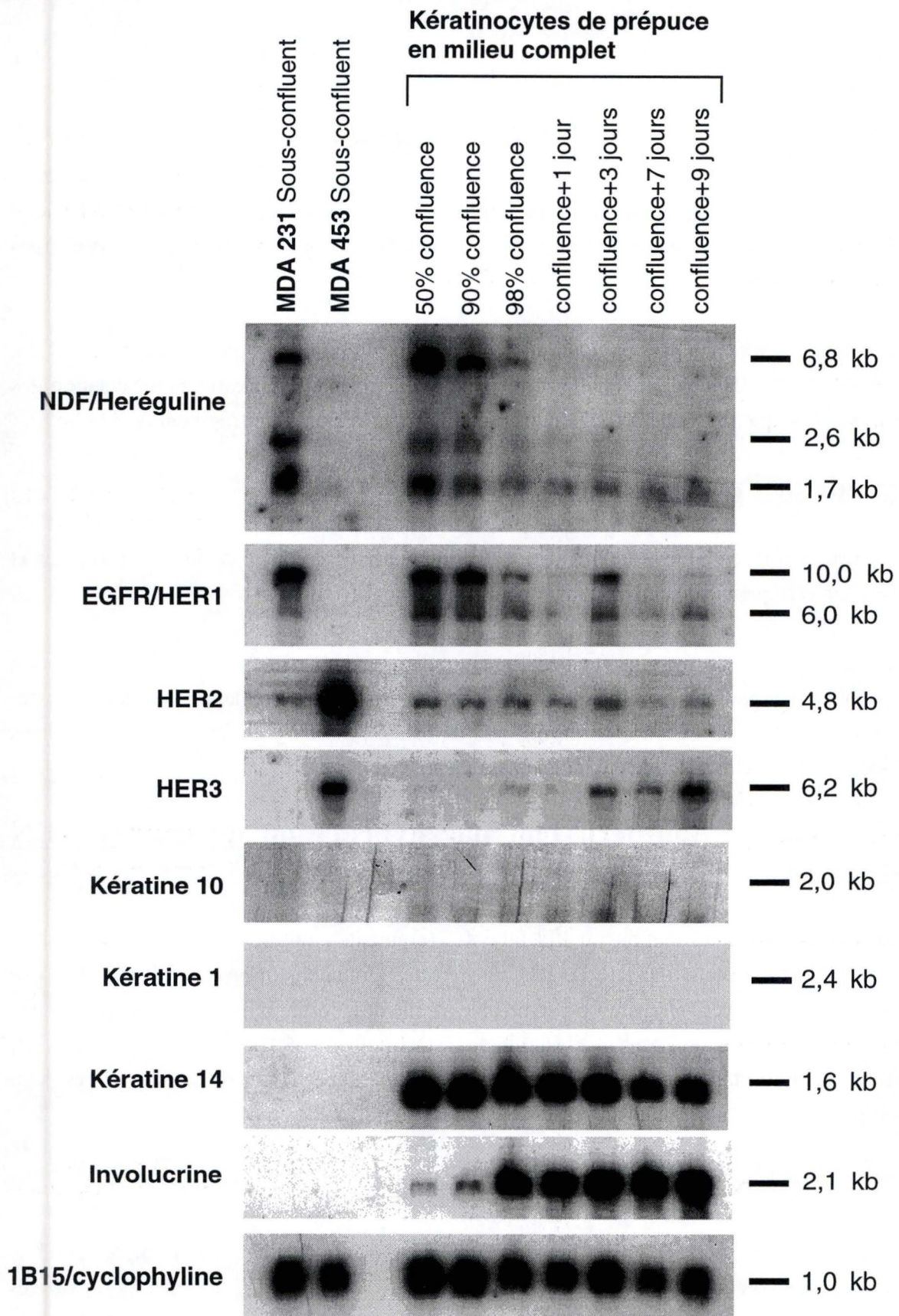
Dans les échantillons d'origine cutanée, l'analyse du gel ne nous montre qu'une amplification faible représentée par plusieurs bandes aspécifiques. En effet, la taille prévue du fragment amplifié est de 504 bp. Nous n'observons pas de bande de cette taille sauf pour les cellules MDA-MB-453 où ce récepteur a été initialement identifié.

## **2.3 Analyse du Southern blot par hybridation de sondes ADN marquées au $^{32}\text{P}$ .**

Pour obtenir une confirmation sur l'identité des fragments amplifiés, nous avons choisi de réaliser un Southern blot (figure R.5). Le transfert des amplicons du gel est effectué sur une membrane (la technique de transfert est semblable à celle des Northern blots, mais nécessite une étape préalable d'incubation dans une solution de NaOH pour séparer les doubles brins d'ADN et permettre l'hybridation ultérieure avec une sonde marquée). Les sondes utilisées sont produites par "random priming" en présence de dCTP- $\alpha^{32}\text{P}$ .

L'hybridation avec la sonde de NDF confirme l'identité du fragment amplifié

L'hybridation par sonde de HER4 nous confirme également que l'amplification par RT-PCR avec les primers spécifiques de HER4 est le résultat d'une hybridation aspécifique de ces primers. En effet, aucune bande n'est allumée en Southern (sauf pour les MDA-MB-453 dans lesquels HER4 est exprimé (Plowman et al., 1993)). HER4 n'est donc pas exprimé par les tissus cutanés.



*Figure R.6* : Northern blot d'ARNm-poly(A) (2,7 µg/puits) de kératinocytes cultivés dans un milieu complet. Les ARNm sont extraits à différents moments de confluence. Le blot est hybridé avec les sondes marquées au <sup>32</sup>P et indiquées à gauche pour détecter les ARNm correspondants dont les tailles sont indiquées à droite des blots.

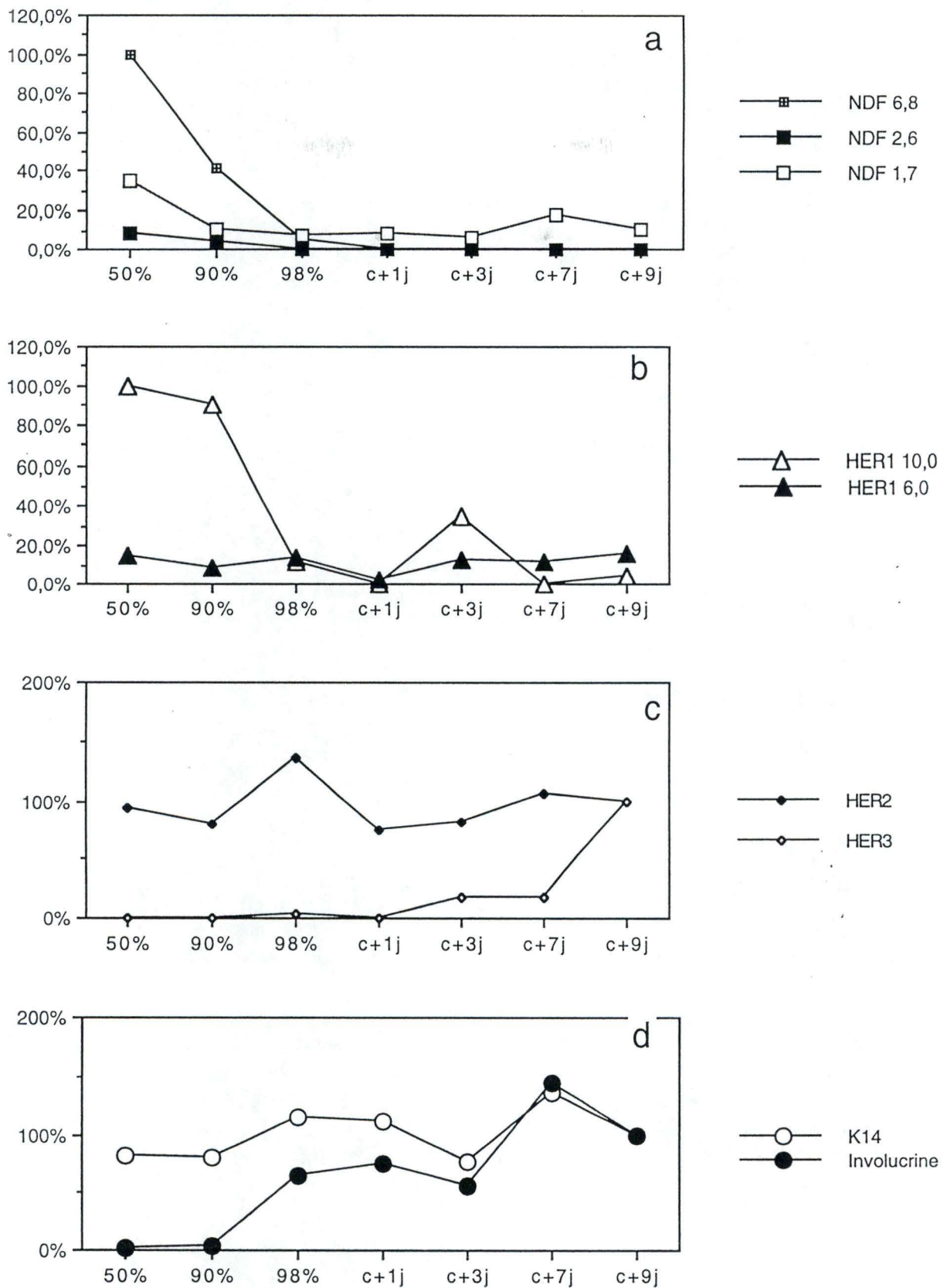


Figure R.7 : analyse densitométrique de Northern Blot. Les échantillons analysés sont des ARNm-poly(A) extraits de cultures de kératinocytes en milieu complet à différents moments de confluence. Toutes les valeurs sont rapportées à la valeur du 1B15 correspondant et sont données en % par rapport à une valeur de référence : la valeur du transcrite de 6,8 kb à 50% de confluence pour l'analyse de NDF (a), la valeur du transcrite de 10,0 kb pour l'analyse de HER1 (b), la valeur de l'échantillon à 9 jours après la confluence pour HER2 et HER3 (c) et pour K14 et l'involucrine (d).

### 3. Etude par Northern blots de l'expression de NDF et des récepteurs appartenant à la famille de l'EGFR (HER1, HER2 et HER3).

#### **3.1 Etude des kératinocytes.**

##### **3.1.1 Analyse des cultures en milieu complet.**

###### **3.1.1.1 Analyse de l'expression de marqueurs de prolifération et de différenciation au cours d'une culture de kératinocytes.**

La kératine basale K14 est exprimée de manière équivalente à tous les stades de la culture (figures R.6 et R.7c) témoignant de la présence continue de cellules au phénotype basal. Si on observe la figure R.6, nous remarquons que dans des cultures de kératinocytes en milieu complet, les kératines suprabasales K1 et K10 ne sont pas exprimées. Il est difficile de déterminer quels facteurs sont responsables de cette inhibition d'expression puisque par définition, le milieu complet est un milieu complexe (il contient de l'insuline, de l'EGF, et surtout du BPE contenant tout une série de facteurs de croissance).

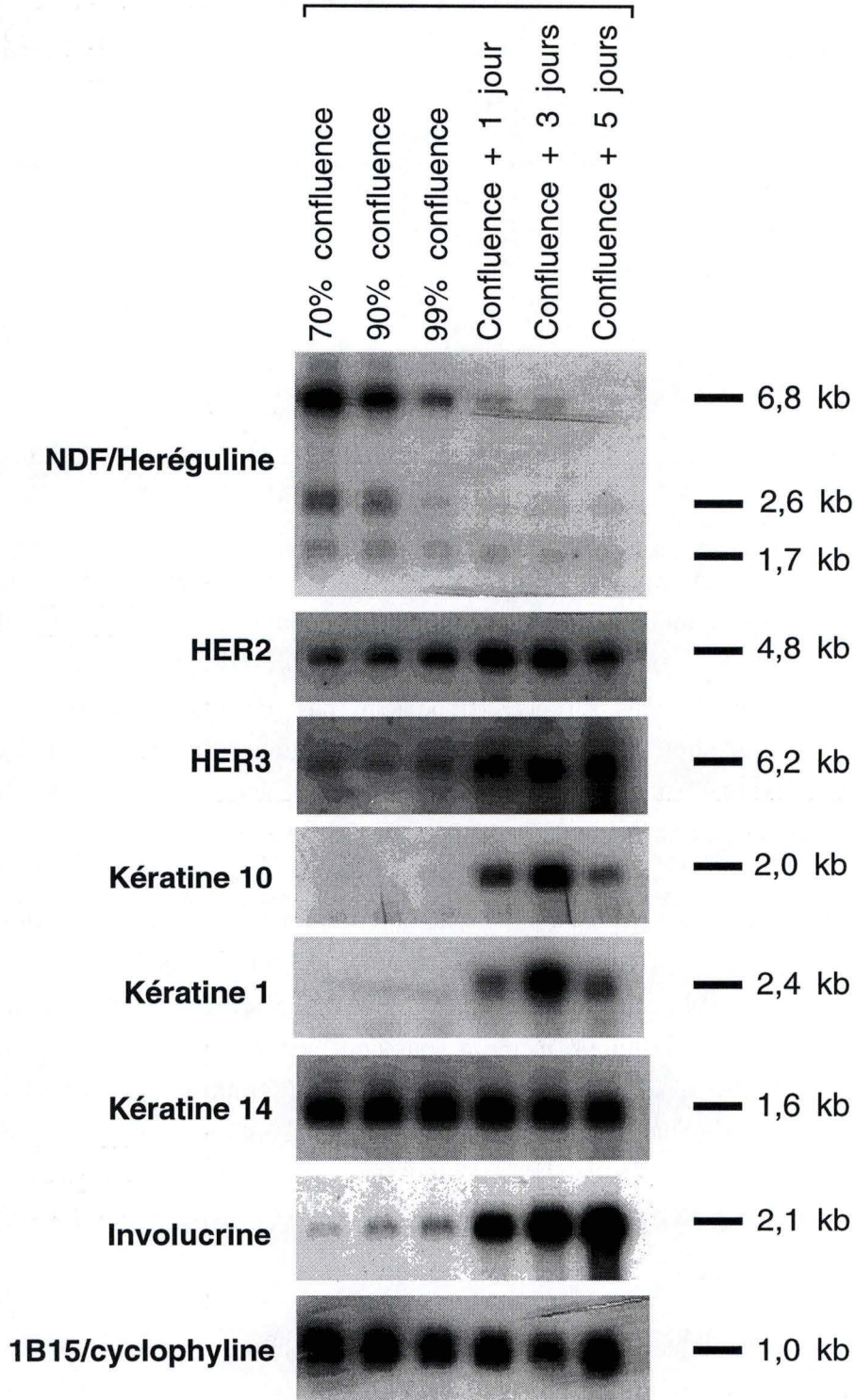
Cependant, nous observons l'expression de l'involucrine à partir de 98% de confluence ce qui montre une induction de la différenciation. Il faut remarquer ici que les ARNm analysés sur Northern blots nous informent sur une moyenne des ARNm présents dans les différentes cellules de la culture. Or les cultures, même à sous-confluence, forment des colonies non homogènes dont les cellules en périphérie sont en phase de prolifération, tandis que les cellules au centre se trouvent dans une phase de latence et peuvent même commencer à se différencier.

###### **3.1.1.2 Analyse de l'expression de NDF/Heréguline et des récepteurs HERs au cours d'une culture de kératinocytes.**

L'expression de NDF indique l'existence de 3 transcrits différents sur lesquels s'hybride la sonde : un ARNm de 6,8 kb, un autre de 2,6 kb et un troisième de 1,7 kb (figure R.6). Probablement, ces différents transcrits correspondent à des isoformes différentes de NDF (Holmes et al., 1992).

Les cellules MDA-MB-231 nous servent de contrôle positif (Holmes et al., 1992) et les cellules MDA-MB-453 n'expriment pas NDF. L'ARNm de 6,8 kb est prédominant à sous-confluence (figures R.6 et 7a), cependant son expression diminue rapidement dès 90% de

**Kératinocytes de prépuce  
en milieu sans facteur de  
croissance (GF-).**



*Figure R.8* : Northern blot d'ARNm-poly(A) (3 µg/puits) de kératinocytes cultivés en milieu GFØ. Les ARNm sont extraits à différents moments de confluence. Le blot est hybridé avec les sondes marquées au <sup>32</sup>P et indiquées à gauche pour détecter les ARNm correspondants dont les tailles sont indiquées à droite des blots.

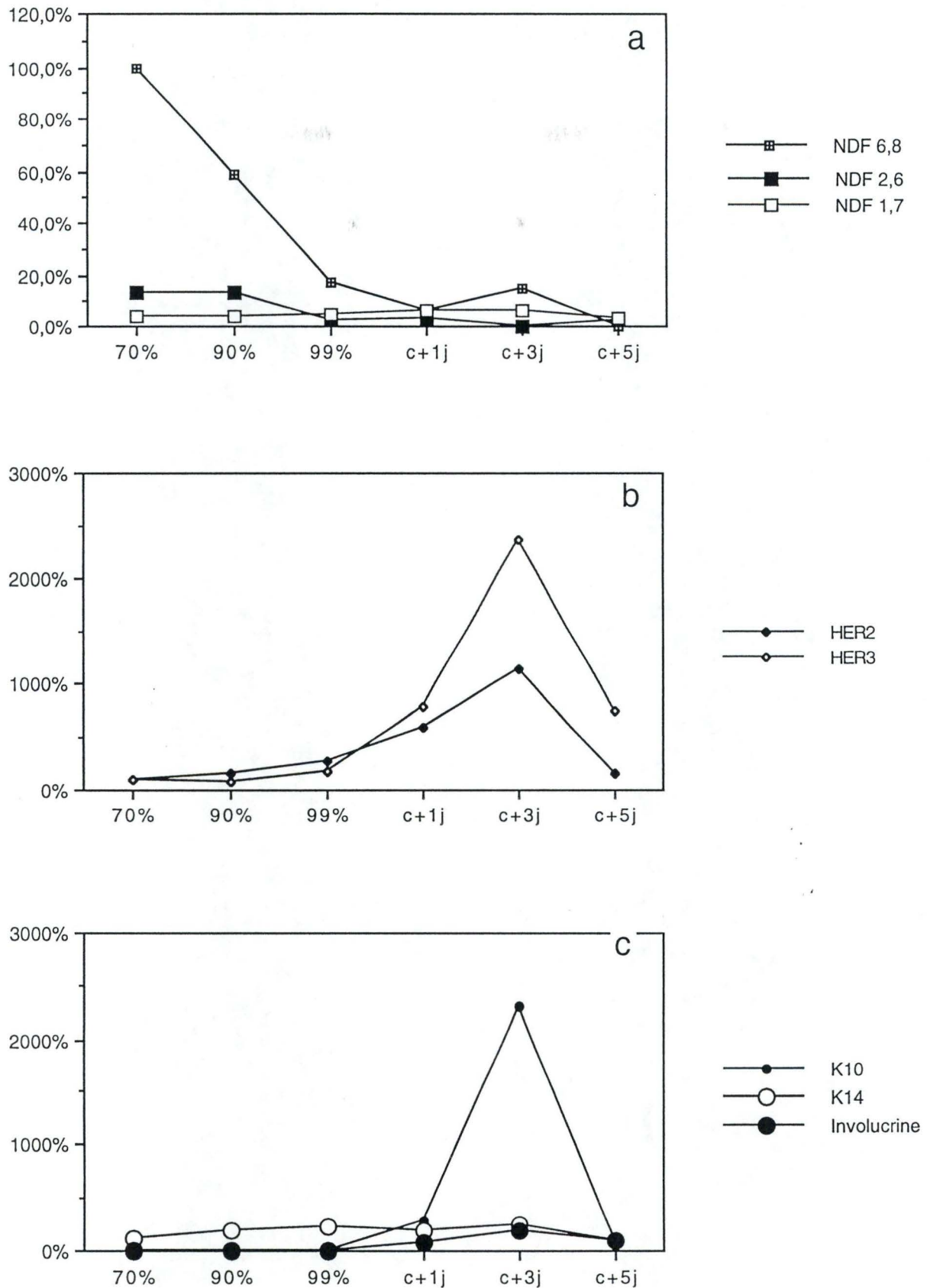


Figure R.9: analyse densitométrique de Northern blot. Les échantillons analysés sont des ARNm-poly(A) extraits de cultures de kératinocytes en milieu GF $\theta$  à différents moments de confluence. Toutes les valeurs sont rapportées à la valeur du 1B15 correspondant et sont données en % par rapport à une valeur de référence : la valeur du transcrit de 6,8 kb à 50% de confluence pour l'analyse de NDF (a), la valeur de l'échantillon à 70% de confluence pour HER2 et HER3 (b) et la valeur de l'échantillon à 5 jours après la confluence pour les kératines et l'involucrine (c).

confluence. Dès un jour après la confluence, nous ne pouvons plus le détecter. L'expression de l'ARNm de 2,6 kb diminue elle aussi rapidement dès 98 % de confluence, alors que le plus petit ARNm (1,7 kb) est régulé négativement dès 90% de confluence mais reste bien visible et exprimé de façon assez constante au cours de la culture cellulaire. A partir du premier jour après la confluence, il reste le seul ARNm codant pour NDF à être exprimé de manière significative. L'étude du Northern nous indique la présence des deux ARNm codant pour le récepteur de l'EGF : 6,0 kb et 10,0 kb. Des observations réalisées par Poumay et Pittelkow (sous presse) montrent que l'expression de HER1 augmente avec la confluence. Nos résultats semblent à ce niveau en désaccord puisque nous observons une diminution de l'expression de HER1 en fonction de la confluence. Nous nous sommes demandés si les variations observées pour les ARNm de l'EGFR/HER1 pouvaient s'observer également pour les autres membres de la famille de l'EGFR.

Tout au long de cette culture, l'expression de HER2 (détectée par son ARNm de 4,8 kb) reste assez constante pour toutes les étapes sauf à 98 % de confluence où il s'agit probablement d'une variation expérimentale.

L'expression de HER3 (détectée par son ARNm de 6,2 kb) est faible à sous-confluence mais elle augmente après la confluence et continue d'augmenter jusque 9 jours après la confluence (figures R.6 et R.7b).

### 3.1.2 Analyse des cultures autonomes (sans EGF ni facteurs peptidiques exogènes).

Vu que des facteurs peptidiques exogènes tels que l'EGF, ajoutés au milieu, peuvent inhiber l'expression des kératines suprabasales 1 et 10 (Poumay et Pittelkow, 1995), nous avons mesuré l'expression de NDF et de ses récepteurs (HER2 et HER3) en culture autonome (à partir de 50% de confluence).

#### 3.1.2.1 Analyse de l'expression de marqueurs de prolifération et de différenciation au cours d'une culture autonome.

Contrairement à l'expérience précédente, la culture autonome permet l'expression des kératines suprabasales 1 et 10 et l'expression de ces deux kératines y est contrôlée de la même façon (figures R.8 et R.9c). Effectivement, K1 et K10 ne sont pas exprimées à sous-confluence. Leur expression commence dès un jour après la confluence, atteint un sommet à trois jours après confluence et régresse à nouveau à 5 jours après confluence. La corrélation entre les variations d'expression de ces deux kératines peut s'expliquer par le fait qu'elles sont associées pour former les tonofilaments des couches suprabasales.

La kératine K14 présente peu de variations de son expression au cours de la différenciation cellulaire (figures R.8 et R.9c).

L'involucrine est faiblement exprimée à sous-confluence, en accord avec les résultats de Eckert (1989), mais nous observons une augmentation nette de son expression avec la confluence cellulaire.

### 3.1.2.2 Analyse de l'expression de NDF/Heréguline et des récepteurs HERs au cours d'une culture autonome.

Dans cette expérience, les différents transcrits de NDF varient de façon similaire à la culture effectuée en milieu complet (figures R.8 et R.9a) : nous observons une diminution générale des trois transcrits. Mais, l'ARNm de 6.8 kb (transcrit prédominant à sous-confluence) reste exprimé faiblement après la confluence (5 jours). L'ARNm de 2,6 kb disparaît le premier. L'expression de l'ARNm de 1,7 kb est plus faible dans ces conditions de culture, mais elle présente le même type de variation globale : elle diminue faiblement à confluence puis reste constante.

HER2 et HER3 sont déjà exprimés à sous-confluence et le début de la confluence est marqué par une augmentation de leur expression, surtout pour HER3. Cependant, nous observons également une diminution de l'expression de HER2 et HER3 en fin d'expérience.

En comparant les deux expériences précédentes, il est clair que la confluence ou différenciation cellulaire exerce un contrôle négatif sur l'expression de NDF et positif sur l'expression de ses récepteurs HER2 et HER3. Pour confirmer ces résultats et analyser l'effet de l'EGF, nous avons réalisé d'autres expériences où les échantillons d'ARNm sont prélevés uniquement à deux périodes précises : la sous-confluence et la confluence. Nous avons introduit une variation supplémentaire dans les conditions de culture par l'ajout ou non d'EGF dans le milieu. En effet, en parallèle, nous avons mené une culture autonome sans EGF et une culture avec EGF. L'extraction des ARNm de ces deux cultures menées en parallèle ont lieu le même jour. De ce fait, nous pouvons déterminer l'effet de l'EGF à sous-confluence et à confluence sur les différentes expressions étudiées. Nous présentons deux expériences similaires effectuées sur des échantillons différents.

### 3.1.3 Analyse de l'effet de l'EGF sur les expressions des kératinocytes.

#### 3.1.3.1 Expression des marqueurs de prolifération et de différenciation.

Nous avons montré précédemment que l'expression de K1 varie de la même façon que celle de K10. Par la suite, nous n'avons recherché que l'expression de K10.



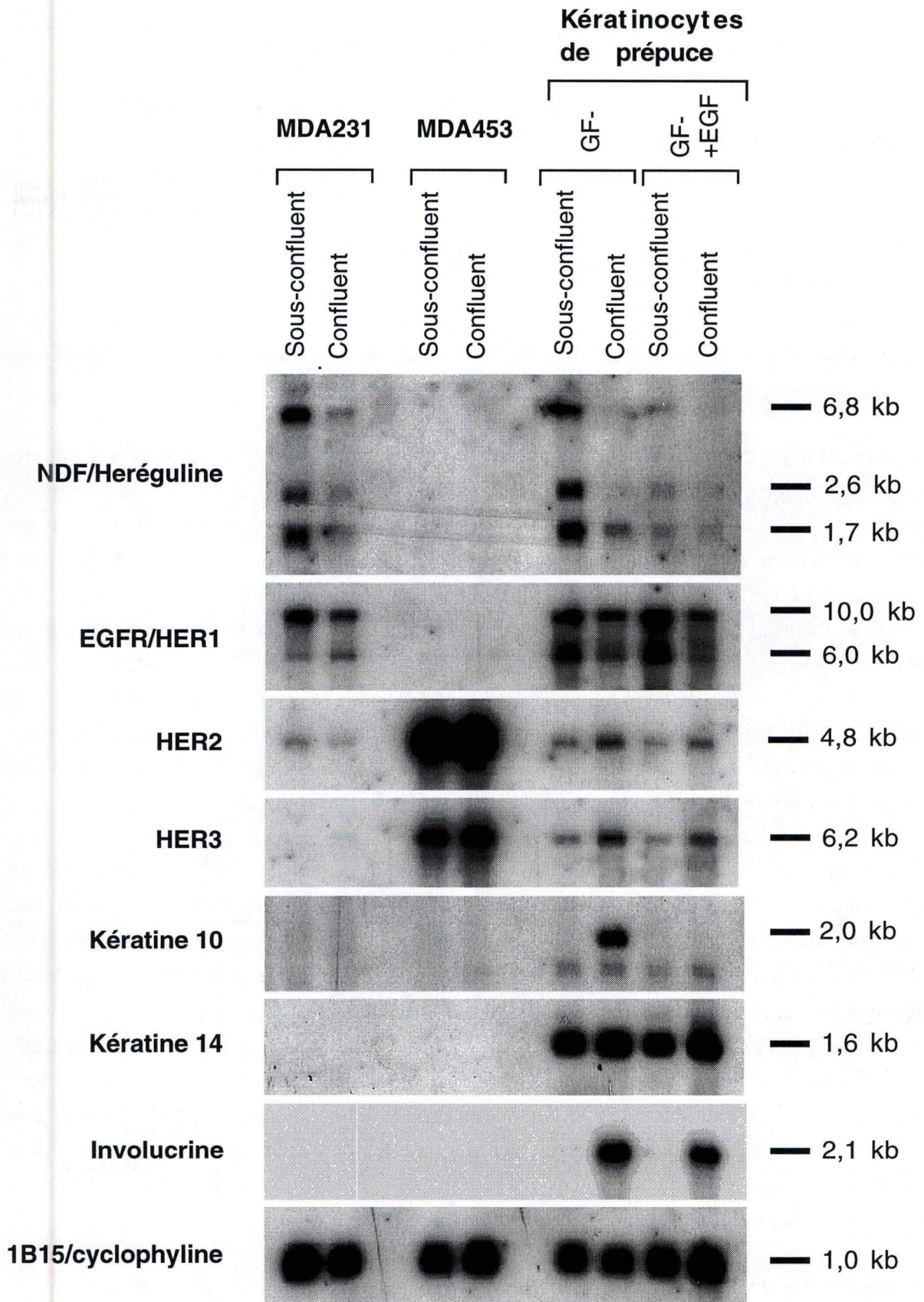


Figure R.10 : Northern blot d'ARNm-poly(A) (3 µg/puits) de kératinocytes cultivés en milieu GF $\emptyset$  et GF $\emptyset$ +EGF à confluence et à sous-confluence. Le blot est hybridé avec les sondes marquées au  $^{32}$ P et indiquées à gauche pour détecter les ARNm correspondants dont les tailles sont indiquées à droite des blots.

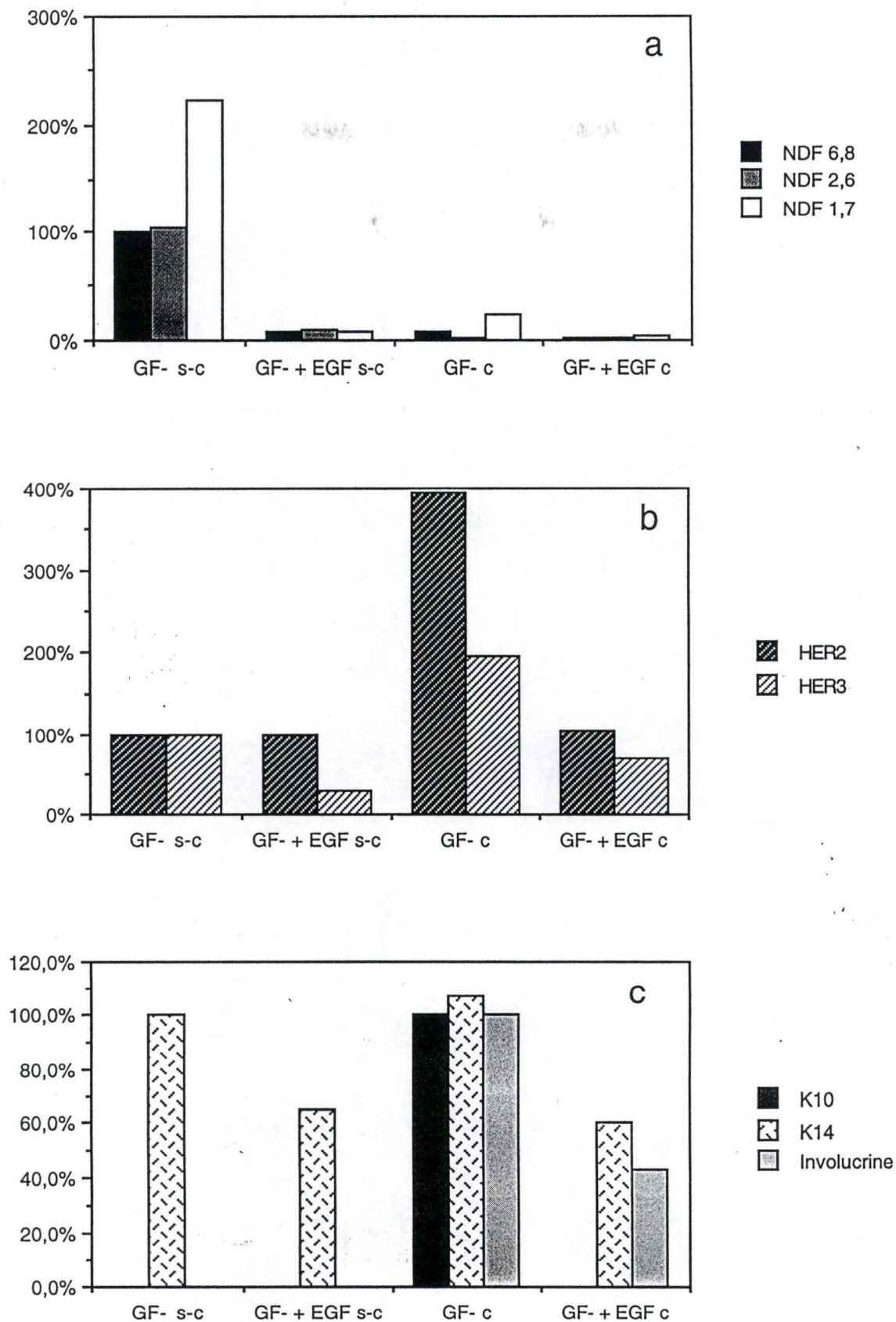


Figure R.11 : analyse densitométrique de Northern blot. Les échantillons analysés sont des ARNm-poly(A) extraits de cultures de kératinocytes en milieu GF $\emptyset$  et GF $\emptyset$ +EGF sous-confluence et à confluence. Toutes les valeurs sont rapportées à la valeur du 1B15 correspondant et sont données en % par rapport à une valeur de référence : la valeur du transcrit de 6,8 kb à 50% de confluence pour l'analyse de NDF (a), de HER2 et HER3 (b), la valeur de l'échantillon GF $\emptyset$  à sous-confluence pour K14 (c) et la valeur de l'échantillon GF $\emptyset$  à confluence pour K10 et l'involucrine (c).

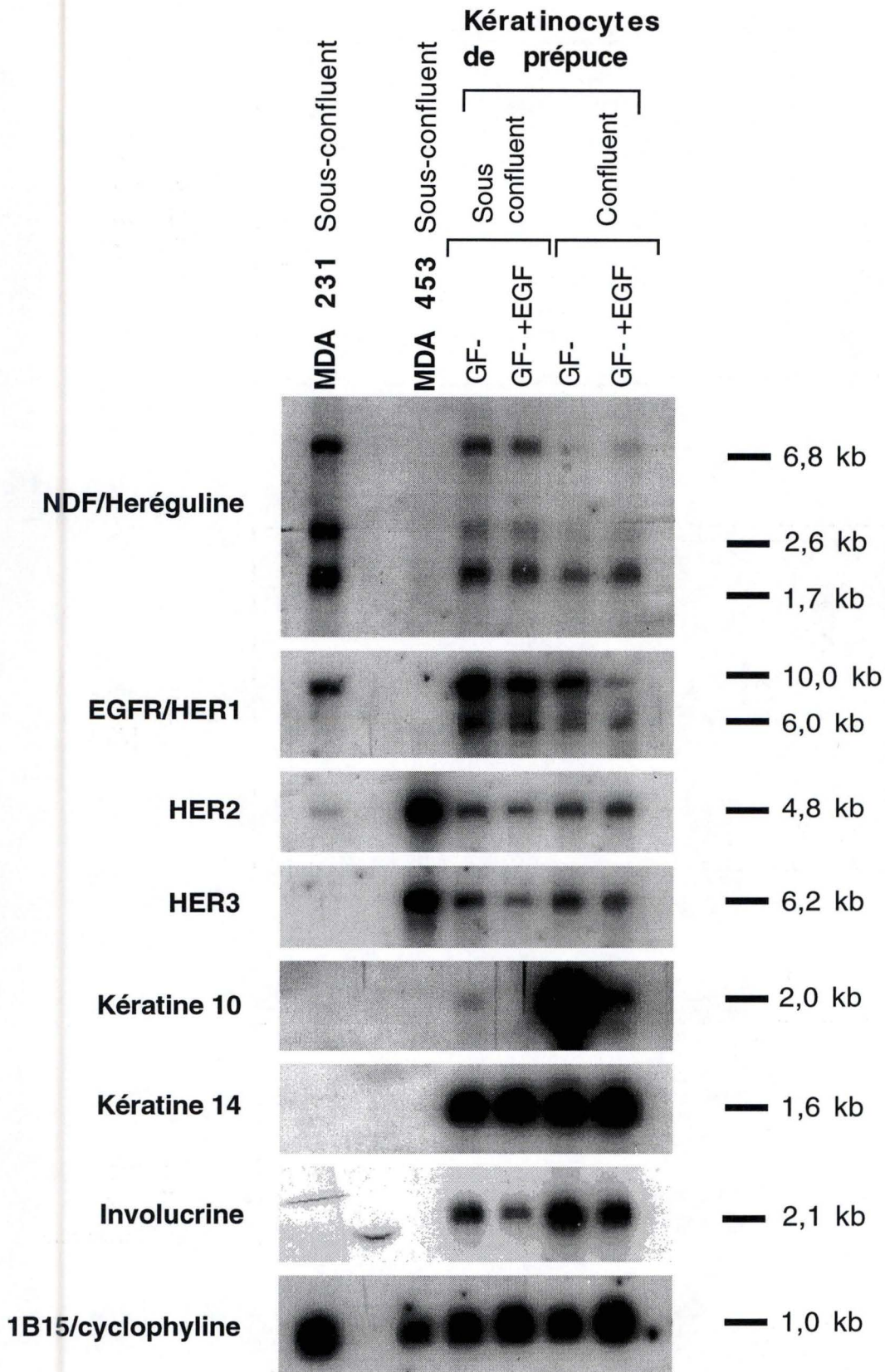


Figure R.12 : Northern blot d'ARNm-poly(A) (3 µg/puits) de kératinocytes cultivés en GFØ et en GFØ+EGF à sous-confluence et à confluence. Le blot est hybridé avec les sondes marquées au <sup>32</sup>P et indiquées à gauche pour détecter les ARNm correspondants dont les tailles sont indiquées à droite des blots.

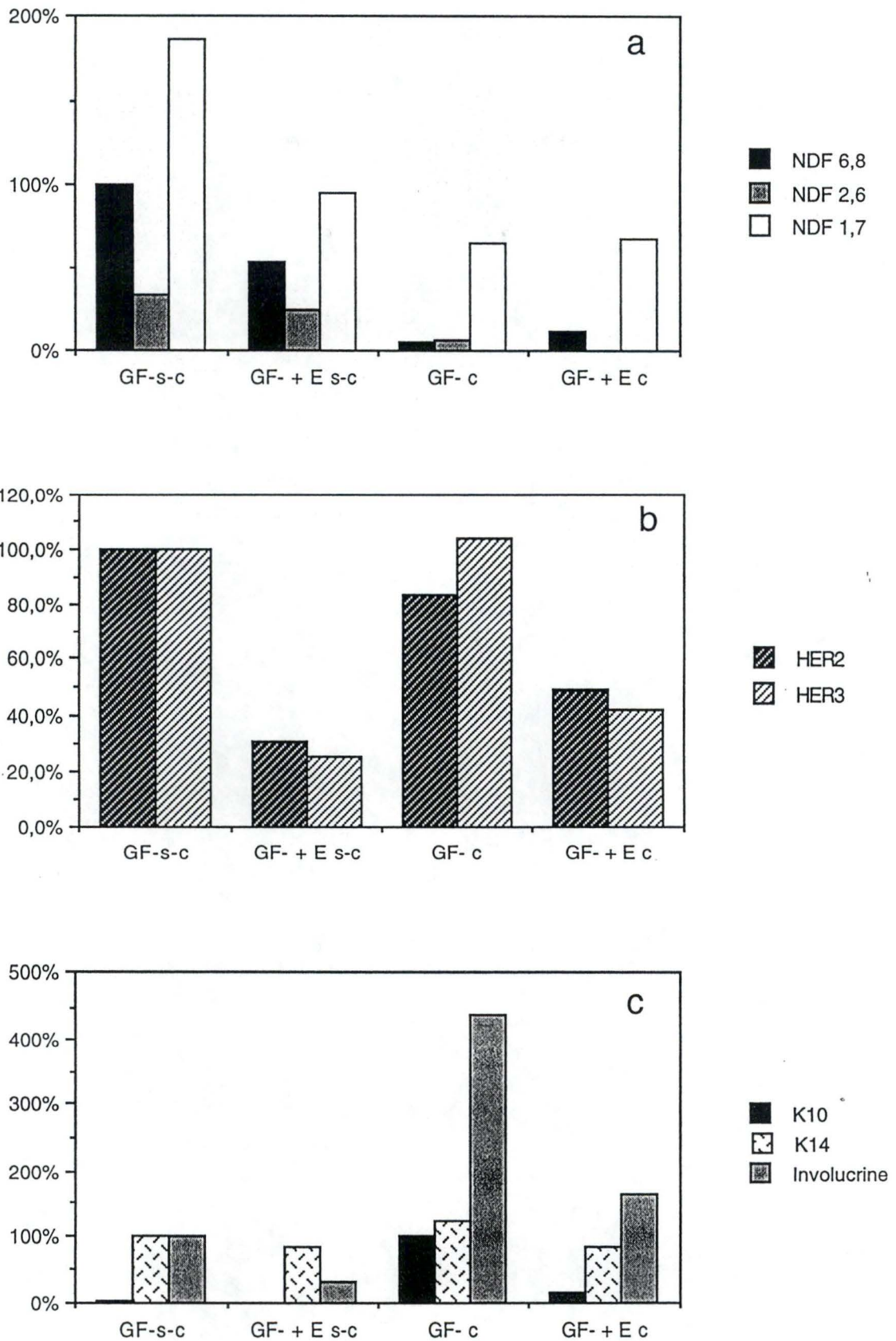


Figure R.13 : analyse densitométrique de Northern blot. Les échantillons analysés sont des ARNm-poly(A) extraits de cultures de kératinocytes en milieu GF $\ominus$  et GF $\ominus$ +EGF sous-confluence et à confluence. Toutes les valeurs sont rapportées à la valeur du 1B15 correspondant et sont données en % par rapport à une valeur de référence : la valeur du transcrite de 6,8 kb à 50% de confluence pour l'analyse de NDF (a), des HERs (b), de K14 et de l'involucrine (c) et de la valeur de l'échantillon GF $\ominus$  à confluence pour K10 (c).

Une première expérience (figure R.10) nous montre les résultats de différentes hybridations effectuées sur des ARNm de cellules MDA-MB-231 et 453 et des kératinocytes à sous-confluence et à confluence, en présence ou non d'EGF. L'étude par analyse densitométrique (figure R.11c) nous renseigne sur l'expression de K14 qui varie peu en fonction de la confluence. La présence d'EGF dans le milieu de culture inhibe l'expression de cette kératine d'environ 30%. La kératine 10 n'est exprimée que par les cellules confluentes sans EGF, en accord avec la littérature (Poumay et Pittelkow, 1995) et nos observations précédentes. Par contre, l'expression de l'involucrine apparaît dans les cultures à confluence. Ces résultats nous permettent donc de déterminer le phénotype des kératinocytes épidermiques dans ces conditions de culture.

En observant une deuxième expérience (figure R.12) et en analysant les données densitométriques correspondantes (figure R.13c), nous observons des variations. Dans ces échantillons, la K10 et l'involucrine sont déjà faiblement exprimées dans les cultures à sous-confluence, mais seulement en absence d'EGF pour K10. Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que dans le cadre de la deuxième expérience nous avons attendu plus tard dans la culture avant d'extraire les ARNm à sous-confluence. Cette observation qui au départ peut sembler dérangeante pour l'analyse des résultats va, en fait, s'avérer très intéressante.

### 3.1.3.2 Expression de NDF/Heréguline et des récepteurs HERs.

De nouveau, nous allons analyser la première expérience (figure R.10), puis la comparer à la deuxième (figure R.12).

Dans ces expériences, nous observons que le petit transcrite de 1,7 kb hybridé par la sonde NDF est fortement exprimé. Les ARNm de 2,6 kb et de 6,8 kb sont exprimés en quantité semblable. Globalement, la variation des transcrits de NDF correspond aux observations précédentes. En effet, les mesures densitométriques (figure R.11a) nous montrent que la confluence (ou l'arrêt de la prolifération) est étroitement liée avec une forte diminution de l'expression des 3 transcrits, mais nous n'observons pas de disparition totale de l'un ou l'autre d'entre eux. Cela peut s'expliquer par le fait que les ARNm sont extraits de cultures confluentes depuis moins de 5 jours et ne présentent pas encore de signes de différenciation terminale et de stratification.

Lorsque la culture est réalisée en milieu contenant de l'EGF, nous observons une diminution d'expression moins marquée du transcrite de 6,8 kb. Une explication possible de cette variation plus faible est que dans les cultures réalisées en présence d'EGF, l'expression des marqueurs de différenciation est faible (involucrine) ou même absente (K10). Vu que l'EGF retarde les variations d'expression résultant de la confluence des cultures de kératinocytes, il retarde également les variations de l'expression de NDF.

Pour confirmer ces résultats, nous avons analysé la deuxième expérience concernant des échantillons à sous-confluence exprimant déjà des marqueurs de différenciation (figures R.12 et R.13a). Nous observons les mêmes variations de l'expression de NDF (diminution avec la confluence et avec la présence d'EGF) mais dans une moindre mesure. Les variations sont probablement moins importantes parce que la valeur de référence utilisée (la valeur densitométrique de l'ARNm de 6,8 kb de l'échantillon à sous-confluence en milieu sans EGF) est déjà une valeur proche de celle que l'on observe à confluence, puisque la différenciation cellulaire a commencé dans ces cultures.

L'analyse des kératinocytes épidermiques à sous-confluence (figures R.10 et R.11b) nous indique une variation très faible de l'expression relative de HER2 en présence ou non d'EGF. Cependant, lorsque la culture atteint la confluence, l'expression de HER2 augmente nettement. Lorsque la culture est à confluence dans un milieu contenant de l'EGF, l'expression de HER2 reste équivalente à celle observée à sous-confluence. On peut penser que l'EGF influence l'expression de HER2 via le rôle inhibiteur qu'il exerce sur la différenciation cellulaire. Ces résultats sont en accord avec ceux que l'on a observés dans les deux expériences précédentes. L'EGF inhibe la différenciation cellulaire et de ce fait empêche l'augmentation de l'expression de HER2 après la confluence des cellules. En culture autonome, la confluence augmente l'expression de HER2.

L'expression de HER3 (figures R.10 et R.11b) dans ces mêmes cultures augmente également lorsque la culture atteint la confluence. Dans ce cas, la présence d'EGF a une action négative sur l'expression relative de HER3, aussi bien à sous-confluence qu'à confluence. De nouveau, ces résultats concordent avec les résultats précédents où l'expression de HER3 n'augmente que 3 jours après la confluence dans les cultures en présence d'EGF.

En raison de ces observations, nous pouvons analyser la deuxième expérience menée avec ou sans EGF à sous-confluence et à confluence (figure R.12), et prévoir que puisque la différenciation augmente l'expression de HER2 nous pouvons nous attendre à ne pas voir de grandes différences entre la sous-confluence et la confluence et observer une diminution de l'expression de HER2 en présence d'EGF (puisque l'EGF retarde le phénotype de différenciation). Les résultats obtenus correspondent aux résultats attendus (figure R.13b). De même, l'expression de HER3 varie peu entre la sous-confluence et la confluence (avec toujours une diminution due à la présence d'EGF) comme on pouvait s'y attendre.

### **3.2 Etude des fibroblastes.**

Nous avons voulu savoir si les variations observées dans les kératinocytes épidermiques étaient semblables à celles observées dans des fibroblastes dermiques. Dans ce type de cellules, les kératines ainsi que l'involucrine ne sont pas exprimées. De même, nous ne détectons pas la présence de HER3.

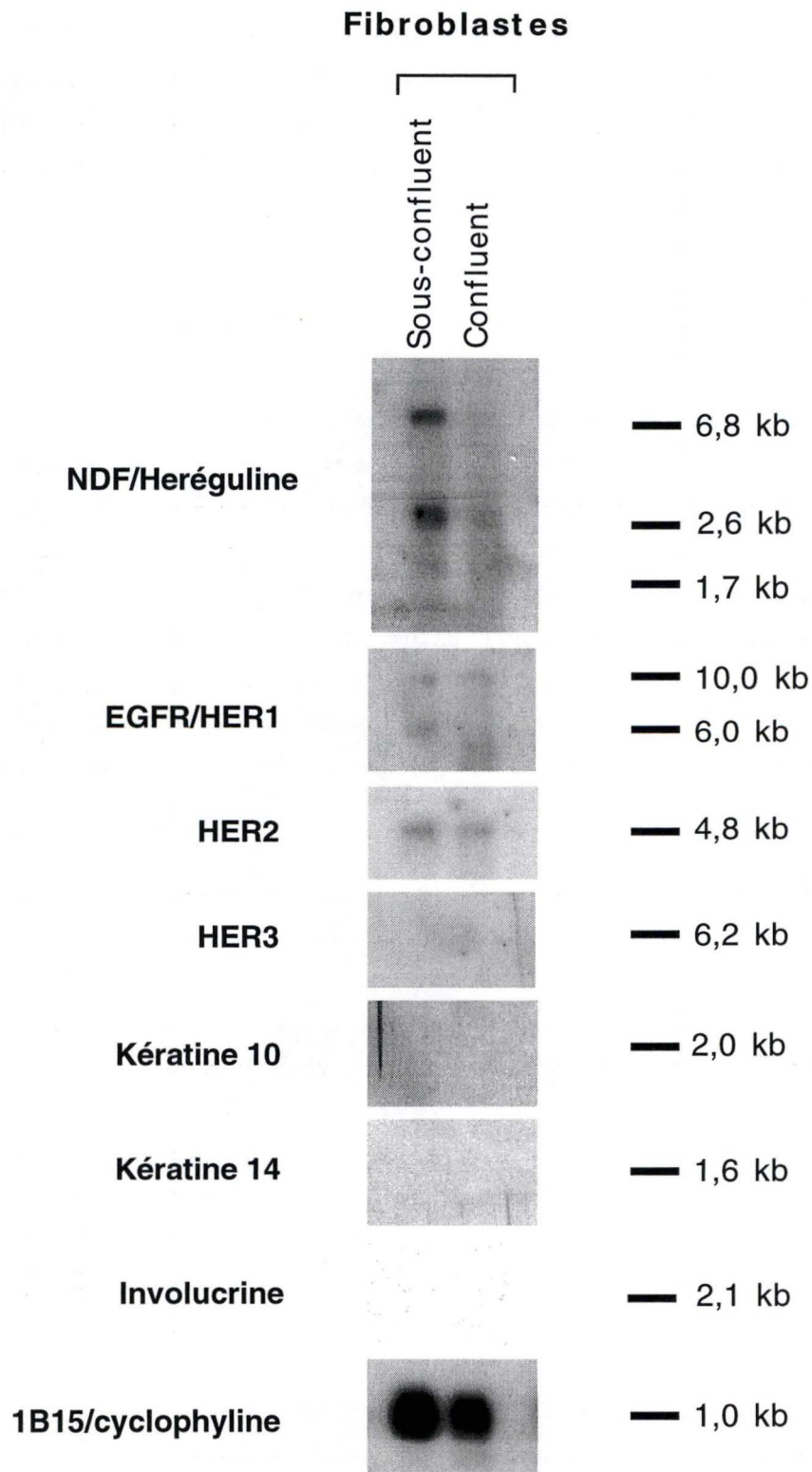


Figure R.14 : Northern blot d'ARNm-poly(A) (3µg/puits) de fibroblastes à sous-confluence et à confluence. Le blot est hybridé avec les sondes marquées au 32P et indiquées à gauche pour détecter les ARNm correspondants dont les tailles sont indiquées à droite des blots.

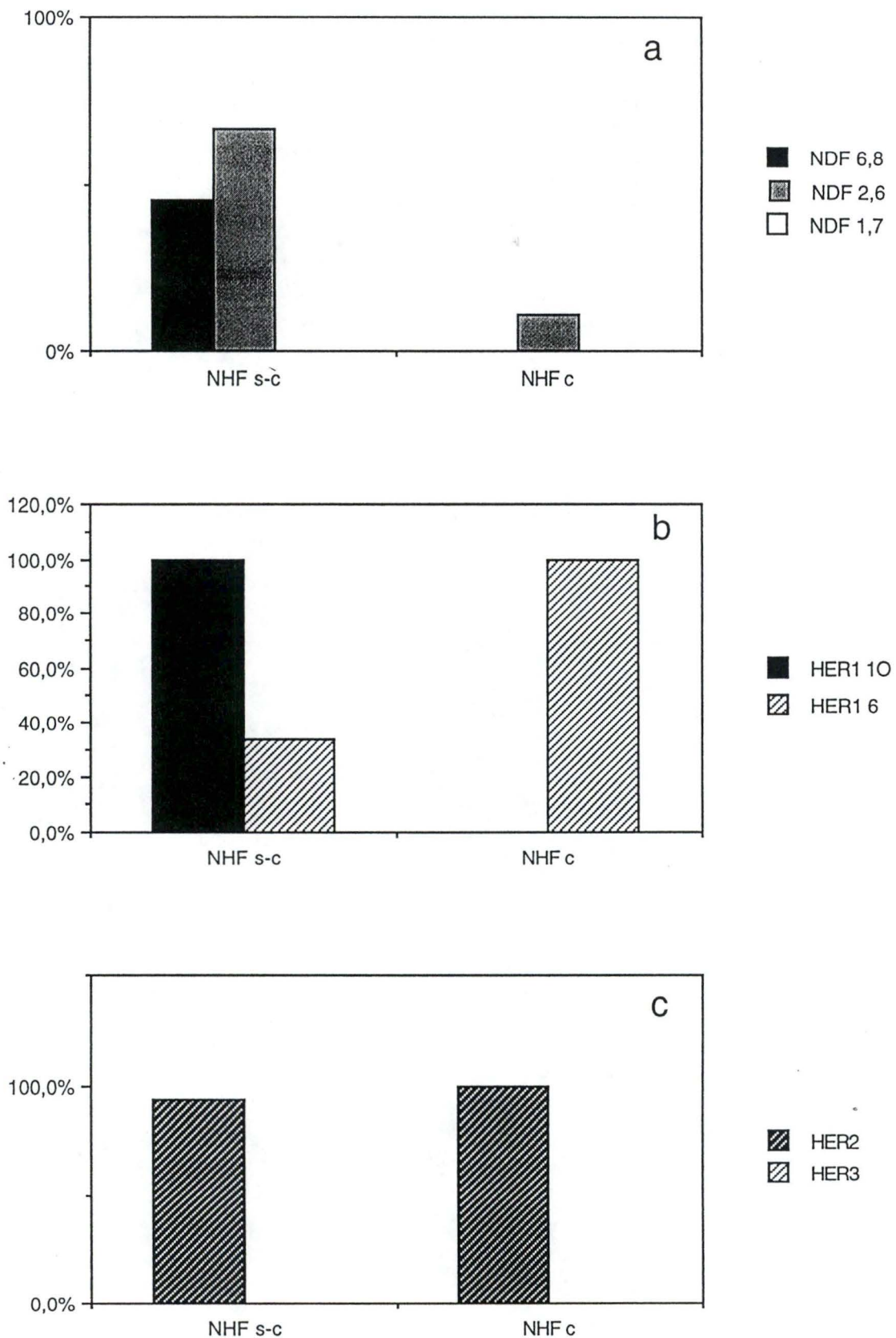


Figure R.15 : analyse densitométrique de Northern blot. Les échantillons analysés sont des ARNm-poly(A) extraits de cultures de fibroblastes à sous-confluence et à confluence. Toutes les valeurs sont rapportées à la valeur du 1B15 correspondant et sont données en % par rapport à une valeur de référence : la valeur du transcrit de 6,8 kb à sous-confluence pour l'analyse de NDF (a), la valeur du transcrit de 10 kb à sous-confluence pour HER1 (b) et la valeur de l'échantillon à sous-confluence pour HER2 et HER3 (c).



Dans les fibroblastes, nous pouvons également observer la présence des trois transcrits à sous-confluence bien que le petit transcrit de 1,7 kb ne soit que très faiblement exprimé et que le transcrit de 2,6 kb soit plus fortement exprimé (figures R.14 et R.15). A la confluence, l'expression de NDF disparaît presque totalement (seul le transcrit de 2,6 kb est encore perceptible). Par l'étude de ces deux types cellulaires (kératinocytes et fibroblastes), ainsi qu'en observant les MDA-MB-231 (figure R.10), nous pouvons nous rendre compte en accord avec Wen et al. (1994) que l'expression des différents transcrits dépend du type cellulaire étudié et que la densité cellulaire régule fortement l'expression totale de NDF.

Dans les fibroblastes, le récepteur de l'EGF n'est que très faiblement exprimé et ne semble pas subir de variation en fonction de la confluence. De même, HER2 est très peu exprimé et contrairement aux kératinocytes, son expression semble diminuer avec la confluence de la culture (figures R.14 et R.15).

#### 4. Analyse par RT-PCR des variations existant dans l'expression des différentes isoformes de NDF dans des cultures de kératinocytes épidermiques.

NDF, exprimé sous forme de trois transcrits, correspond à une famille d'isoformes (Holmes et al., 1992) produites par épissage alternatif. Ces isoformes ayant des affinités et, à concentrations égales, des activités différentes (Wen et al., 1994; Poumay et Pittelkow, sous presse), nous avons utilisé la technique de RT-PCR sur les différents échantillons analysés par Northern blots pour étudier les expressions relatives des principales isoformes. La RT-PCR nous permet, par le choix d'amorces spécifiques, de distinguer certaines isoformes et donc les étudier individuellement.

#### **4.1 Choix des amorces.**

Le choix des amorces doit répondre à des critères théoriques tels que la taille (entre 20 et 30 bp), le choix de séquence (les nucléotides de l'amorce doivent être en proportions équivalentes de A-T et C-G et ne pas présenter de séquence permettant la formation de structure secondaire ou l'hybridation des amorces sens et anti-sens). D'après Holmes et al. (1992), nous savons que les isoformes de NDF présentent des séquences communes et des séquences variables (propres à chaque sous-groupe d'isoformes ou à chaque isoforme). Selon les amorces choisies et leur localisation, nous pouvons donc amplifier certaines isoformes.

1 gcgcgagcgc ctcagcggc cgcctcgcct tccccctcga gggacaaact tttcccaaac  
61 ccgatccgag cccttggacc aaactcgcct ggcgagag cgcgccgct agagcgcctc  
121 gtctccggcg agatgtccga gcgcaaagaa ggcagaggca aagggaaggg caagaagaag  
181 gagcgaggct cgggcaagaa gccggagtc gccggggca gccagagccc agccttgct  
241 ccccgattga aagagatgaa **aagccaggaa** **tcggctgcag** gttccaaact agtccttcgg  
301 tgtgaaacca gttctgaata ctcctctc agattcaagt ggttcaagaa tgggaatgaa  
361 ttgaatcgaa aaaacaaacc acaaaatc aagatacaaa aaaagccagg gaagtcagaa  
  
421 cttcgcatta acaagcctc actggctgat tctggagagt atatgtgcaa **agtgatcagc**  
481 aaattaggaa atgacagtgc ctctgccaat atcaccatcg tggaatcaaa cgagatcctc  
541 actggtatgc cagcctcaac tgaaggagca **tatgtctctt** **cagagctctcc** cattagaata  
601 tcagtatcca cagaaggagc aaatacttct tcatctacat ctacatccac cactgggaca  
661 agccatcttg taaaatgtgc ggagaaggag aaaactttct gtgtgaatgg aggggagtg  
721 ttcattggtga aagaccttc aaaccctc agatacttgt gcaagtgcc **acctggattc**  
781 **actggagcaa** gatgtactga gaatgtgccc atgaaagtcc aaaaccaaga aaaggcggag  
841 gagctgtacc agaagagagt gctgaccata accggcatct gcctgcctc ccttgtggtc  
901 ggcacatgt gtgtgggtgc ctactgcaaa accaagaac agcggaaaaa gctgcatgac  
961 cgtcttcggc agagccttcg gtctgaacga aacaatatga tgaacattgc caatgggctc  
1021 caccatccta acccaccctc cgagaatgct cagctggtga atcaatacgt atctaaaaac  
1081 gtcactccta gtgagcatat tgttgagaga gaagcagaga catccttttc caccagtcac  
1141 tatacttcca cagccatca ctccactact gtcaccaga ctctagcca cagctggagc  
1201 aacggacaca ctgaaagcat cctttccgaa agccactctg taatcgtgat gtcacccgta  
1261 gaaaacagta ggcacagcag cccaactggg ggcccaagag gacgtcttaa tggcacagga  
1321 ggccctcgtg aatgtaacag ctctctcagg catgccagag aaaccctga ttcctaccga  
1381 gactctcctc atagtgaag gtatgtgtca gccatgacca ccccggtcgt tatgtcacct  
1441 gtagatttcc acagccaag ctccccaaa tcgccccctt cggaatgct tccaccgtg  
1501 tccagcatga cgggtccat gccttccatg gcggtcagcc ccttcatgga agaagagaga  
1561 cctctacttc tcgtgacacc accaaggctg cgggagaaga agtttgacca tcaccctcag  
1621 cagttcagct ccttccacca caaccctcgg catgacagta acagcctccc tgtagcccc  
1681 ttgaggatag tggaggatga ggagatgaa acgaccaag agtacgagcc agccaagag  
1741 cctgtaaga aactcgccaa tagccggcgg gccaaaagaa ccaagccaa tggccacatt  
1801 gctaacagat tggagtgga cagcaacaca agctcccaga gcagtaactc agagagtga  
1861 acagaagatg aaagagttag tgaagatag cctttcctgg gcatacagaa cccctggca  
1921 gccagcttg aggcaacacc tgccttccgc ctggctgaca gcaggactaa cccagcaggc  
1981 cgcttctcga cacaggaaga aatccaggcc aggctgtcta gtgtaattgc taaccaagac  
2041 cctattgctg tataaacct aaataaacac atagattcac ctgtaaaact ttattttata  
2101 taataaagta ttccacctta aattaacaa tttattttat tttagcagtt ctgcaaatag  
2161 aaaacaggaa aaaactttt ataattaaa tatatgtatg taaaatgaa aaaaaaaaaa  
2221 aaaa

Figure R.16a : séquence spécifique de HRG alpha.  
(GeneBank Accession, Nr M94165).

Le primer sens est en gras, le primer anti-sens et en italique gras. Le primer anti-sens pour HRG total est en gras souligné. Le site de restriction par BclI est marqué d'une flèche.

1 gggacaaact ttcccacaac cggatccgag cccttggacc aaactgcct ggcgagag  
61 ccgtccgct agagcgctcc gtctccggcg agatgtccga ggcgaaagaa ggcagaggca  
121 aagggaaagg caagaagaag gagcgaggct ccggcaagaa gccggagtcc gcgccgggca  
181 gccagagccc agccttgct ccccaattga aagagatgaa **aagccaggaa tgggctgcag**  
241 gttccaaact agtccttcgg tgtgaaacca gttctgaata ctctctctc agattcaagt  
301 ggttcaagaa tgggaatgaa ttgaatcgaa aaaacaaacc acaaaatatac aagatacaaa  
361 aaaagccagg gaagtcaaaa cttcgcatta acaaaagcctc actggctgat tctggagagt

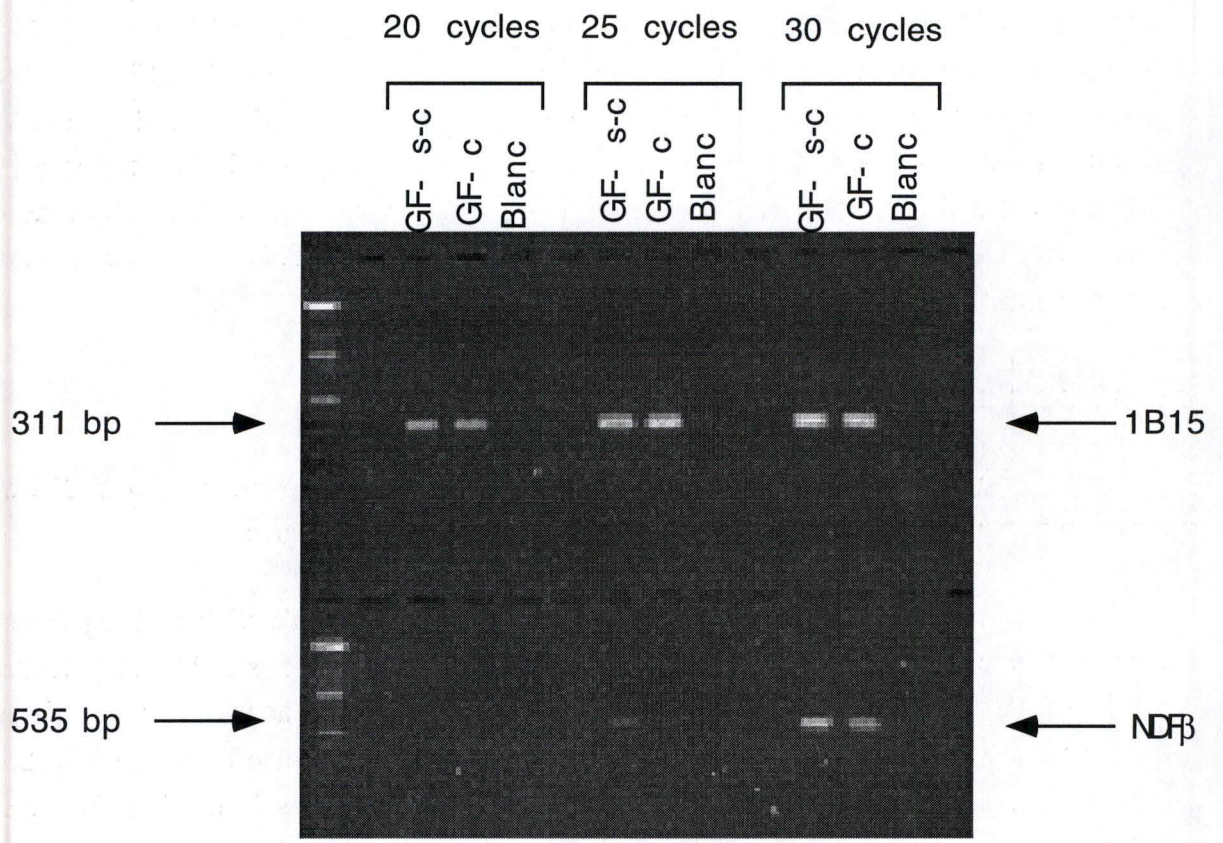
421 atatgtgcaa **agtgatcagc** aaattaggaa atgacagtgc ctctgccaat atcaccatcg  
481 tggaaatcaaa cgagatcctc actggtatgc cagcctcaac tgaaggagca **tatgtgtctt**  
541 **cagagtctcc** cattagaata tcagtatcca cagaaggagc aaatacttct tcatctacat  
601 ctacatccac cactgggaca agccatcttg taaaatgtgc ggagaaggag aaaactttct  
661 gtgtgaatgg aggggagtg ttcattggtga aagacctttc aaaccctcag agatacttgt  
721 gcaagtgcc **aaatgagttt actggtgatac** gctgcaaaaa ctacgtaatg gccagctctc  
781 acaagcatct **tgggattgaa ttatggagg** cggaggagct gtaccagaag agagtgtgta  
841 ccataaccgg catctgcctc gccctccttg tggtcggcat catgtgtgtg gtggcctact  
901 gcaaaaccaa gaaacagcgg aaaaagctgc atgaccgtct tcggcagagc cttcggctctg  
961 aacgaaacaa tatgatgaa attgccaatg ggctcaccac tcccaacca cccccgaga  
1021 atgtccagct ggtgaaatcaa tacgtatcta aaaacgtcat ctccagtga catattgtg  
1081 agagagaagc agagacatcc tttccacca gtcactatac ttccacagcc catcactcca  
1141 ctactgtcac ccagactcct agccacagct ggagaacagg acacactgaa agcatcctt  
1201 ccgaaagcca ctctgtaatc gtgatgtcat ccgtagaaaa cagtaggcac agcagcccaa  
1261 ctggggggccc aagaggagct cttaatggca caggaggccc tcgtgaatgt aacagcttcc  
1321 tcaggcatgc cagagaaacc cctgattcct accgagactc tccatagatg gaaaggtatg  
1381 tgtcagccat gaccaccccg gctcgtatgt cacctgtaga tttccacacg ccaagctccc  
1441 ccaaatcgcc cccttcggaa atgtctccac ccgtgtccag catgacggtg tccatgcctt  
1501 ccattggcgt cagccccttc atggaagaag agagacctct acttctcgtg acaccacaa  
1561 ggctcggga gaagaagttt gaccatcacc ctcagcagtt cagctccttc caccacaacc  
1621 ccgcatgca cagtaaacagc ctccctgcta gcccttgag gatagtggag gatgaggagt  
1681 atgaaacgac ccaagagtac gagccagccc aagagcctgt taagaaactc gccaatagcc  
1741 ggcgggccc aagaaccaag ccaatggcc acattgctaa cagattggaa gtggacagca  
1801 acacaagctc ccagagcagt aactcagaga gtgaaacaga agatgaaaga gtaggtgag  
1861 atacgccttt cctgggcata cagaaccccc tggcagccag tcttgaggca acacctgct  
1921 tccgcctggc tgacagcagg actaaccag caggccgctt ctgcacacag gaagaaatcc  
1981 aggccaggct gtctagtgtg attgctaacc aagaccctat tgctgtataa aacctaaata  
2041 aacacataga ttcactgta aaactttatt ttatataata agtattcca ccttaaata  
2101 acaatattt tttattttag cagttctgca aatagaaaa aggaaaaaaa cttttataaa  
2161 ttaaatatat gtatgtaaaa atgaaaaaaa aaaaaaaa

Figure R.16b : séquence spécifique de HRG Beta 1 (GeneBank Accession Nr : M94166). Le primer sens est en gras, le primer anti-sens est en gras italique, le primer spécifique de HRG total est en gras souligné et le primer spécifique de HRG beta est en italique souligné. Le site de restriction par BclI est marqué par une flèche.

1 ggcctgcct ccaactgag ggcgggaggt ggtggtctgc ggggcaattg aaaaagagcc  
61 ggcgaggagt tcccgaaac ttgttggaa tccgggctcg cgcggaggcc aggagctgag  
121 cggcgggggc tgccggacga tgggagcgtg agcaggacgg tgataacctc tccccgatcg  
181 ggttgcgagg ggcgggggca gaggccagga cgcgagccgc cagcggcggg acccatcgac  
241 gacttcccgg ggcgacagga gcagcccga gagccaggc gagcggcctt tccaggtggc  
301 cggaccgccc gccgcgtccg gcggcgctc cctgcaggca acgggagacg cccccgca  
361 ggcgagcgc ctacgcggc cgcctcgtc tccccatcga gggacaaact tttccaaaac  
421 ccgatccgag cccttggacc aaactgcct ggcgagagag ccgtccgct agagcgtcc  
481 gtctccggcg agatgtccga ggcgaaagaa ggcagaggca aagggaaagg caagaagaag  
541 gagcaggct ccggcaagaa gccggagtcc ggcgggggca gccagagccc agccttgct  
601 cccaattga aagagatgaa **aagccaggaa tgggctgcag** gttccaaact agtctctcg  
661 tgtgaaacca gttctgaata ctctctctc agattcaagt gttcaagaa tgggaatgaa  
721 ttgaatcgaa aaaacaaacc acaaaatatac aagatacaaa aaaagccagg gaagtcaaaa

781 cttcgcatta acaagcctc actggctgat tctggagagt atatgtgcaa **agtgatcagc**  
841 aaattaggaa atgacagtgc ctctgccaat atcaccatcg tggaaatcaaa cgagatcctc  
901 actggtatgc cagcctcaac tgaaggagca **tatgtgtctt cagagtctcc** cattagaata  
961 tcagtatcca cagaaggagc aaatacttct tcatctacat ctacatccac cactgggaca  
1021 agccatcttg taaaatgtgc ggagaaggag aaaactttct gtgtgaatgg aggggagtg  
1081 ttcattggtg aagaccttcc aaaccctcag agatacttgt gcaagtgcc **aaatgagttt**  
1141 **actggtgatac** gctgcaaaa ctacgtaatg gccagcttct acagtcagtc **cactccctt**  
1201 **ctgtctatgc** ctgaaatgga gcatgctcag ttggtgctgc tttctgttg ctgcatctcc  
1261 cctcagattc cacctagagc tagatgtgtc ttaccagatc taatattgac tgcctctgcc  
1321 tgtcgcata gaacattaac aaaagcaatt gtattacttc ctctgttcgc gactagttgg  
1381 ctctgagata ctaatagtg tgtgaggctc cggatgttcc tggaaatgat attgaaatg  
1441 gtgatacaaa ttgatagca atatcaagca gtgaaatag ataataaagg catttcaag  
1501 tctactttt attgataaaa taaaatcat tctactgaac agtccatctt ctttataca  
1561 tgaccacatc ctgaaaagg tgttgctaag ctgtaaccga tatgacttg aatgatgg  
1621 aagttaattt tgattcagaa tgtgttattt gtcacaata aacataataa aaggagtca  
1681 gatgtttttc ttcattaacc aaaaaaaaa aaaaa

Figure R.16c : séquence spécifique de HRG beta 3 (GeneBank Accession Nr : M94168). Le primer sens est en gras, le primer anti-sens est en gras italique, le primer anti-sens de HRG total est en gras souligné et le primer anti-sens de HRG beta est en italique souligné. Le site de restriction BclI est marqué par un triangle.



*Figure R.17* : mise au point du nombre de cycles. Chaque échantillon est amplifié pendant 20, 25 et 30 cycles soit par les amorces de 1B15 (H1B15-15S et H1B15-326A), soit par les amorces de NDFβ (hNDF-257/217S et hNDFbeta751A).

Pour amplifier indifféremment toutes les isoformes de NDF, nous allons choisir des amorces situées dans la région commune (figures R.4a et R.16a,b et c). Les amorces sens (hNDF-257/217S) (tga aaa gcc agg aat cgg ctg) et anti-sens (hNDF-590/550A) (gga gac tct gaa gac aca tat g) encadrent une région de 335 bp.

Pour différencier les deux grandes sous-familles d'isoformes de NDF, les isoformes  $\alpha$  et  $\beta$ , nous allons conserver l'amorce sens, tandis que l'amorce anti-sens sera choisie dans une région codant pour les régions propres aux isoformes  $\alpha$  et  $\beta$  (figure R.16a, b et c). L'amorce spécifique de NDF $\alpha$  (hNDFalpha-790A) (ttg ctc cag tga atc cag gtt) encadre avec le primer sens (hNDF-257/217S) une région de 534 bp tandis que l'amorce anti-sens spécifique de NDF $\beta$  (hNDFbeta-751A) (cga tca cca gta aac tca ttt g) encadre avec l'amorce sens (hNDF-257/217S) une région de 535 bp. En utilisant le même principe, il est encore possible de distinguer les constituants des sous-familles  $\beta$ 1 et  $\beta$ 3 grâce aux amorces spécifiques soit de l'isoforme  $\beta$ 1 (hNDFbeta1-809A) (ctc cat aaa ttc aat ccc aag atg) qui délimite une région de 591 bp avec le primer sens (hNDF-257/217S), soit de l'isoforme  $\beta$ 3 (hNDFbeta3-1207A) (gag aca gaa agg gag tgg acg ta) qui délimite une région de 593 bp.

## 4.2 Mise au point du nombre de cycles.

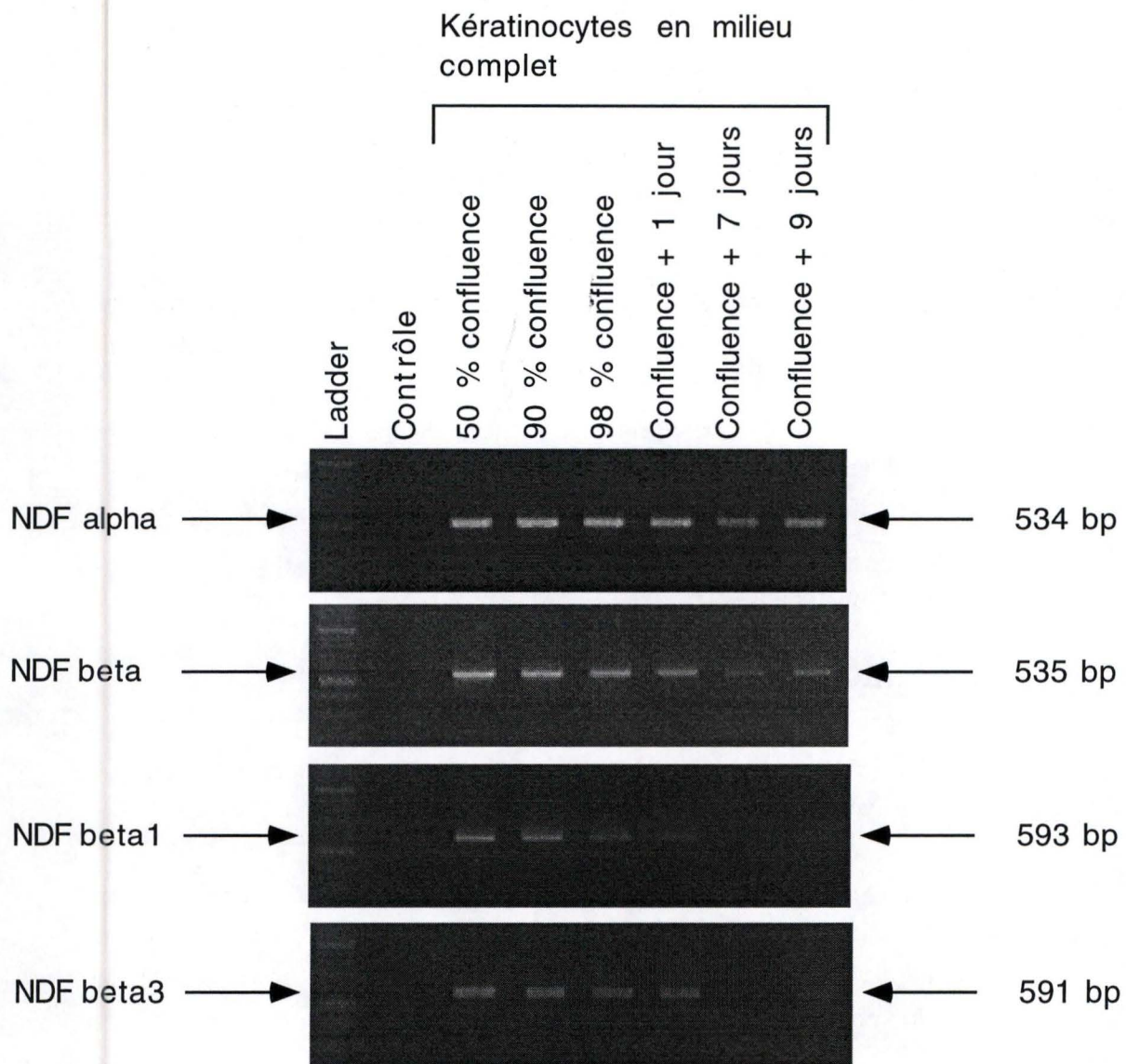
Lorsque le but de la PCR est simplement de détecter la présence d'une séquence d'ADN, on peut utiliser un nombre de cycles élevé sans se soucier si on atteint un plateau.

Dans nos expériences, nous voulons pouvoir détecter les séquences de NDF, mais également évaluer des variations dans les quantités du matériel de départ (les copies d'ARNm présentes dans la cellule à un moment précis de la culture). Dans ce but, nous avons réalisé des amplifications avec un nombre variable de cycles pour se trouver au niveau de l'amplification exponentielle. De cette façon, nous espérons qu'une différence dans le nombre de copies d'ARNm au départ sera détectable par une intensité variable de la bande obtenue sur gel d'agarose 2% coloré par le bromure d'éthidium.

Des échantillons d'ARN sont amplifiés d'une part avec les amorces du NDF total (hNDF-257/217S et hNDF-590/550A) et d'autre part avec les amorces de 1B15 (le "house-keeping gene" de la cyclophylline : une protéine chaperone du réticulum endoplasmique). Les amorces sens (H1B15-15S) et anti-sens (H1B15-326A) de 1B15 encadrent une région de 311 bp.

Nous allons choisir le nombre de cycles qui nous permet de visualiser une différence d'expression de NDF par les cellules à sous-confluence et les cellules à confluence, mais qui nous montre également une amplification de 1B15 qui reste homogène (figure R.17).

Les résultats de cette expérience révèlent que 15 (résultats non montrés), 20 ou 25 cycles sont insuffisants pour permettre une amplification détectable tandis que 35 cycles ne nous



*Figure R.18* : détection des isoformes  $\alpha$  (a),  $\beta$  (b),  $\beta 1$  (c) et  $\beta 3$  (d) de NDF par RT-PCR. Les échantillons testés sont des ARNm-poly(A) extraits de culture de kératinocytes en milieu complet à différents moments de confluence.

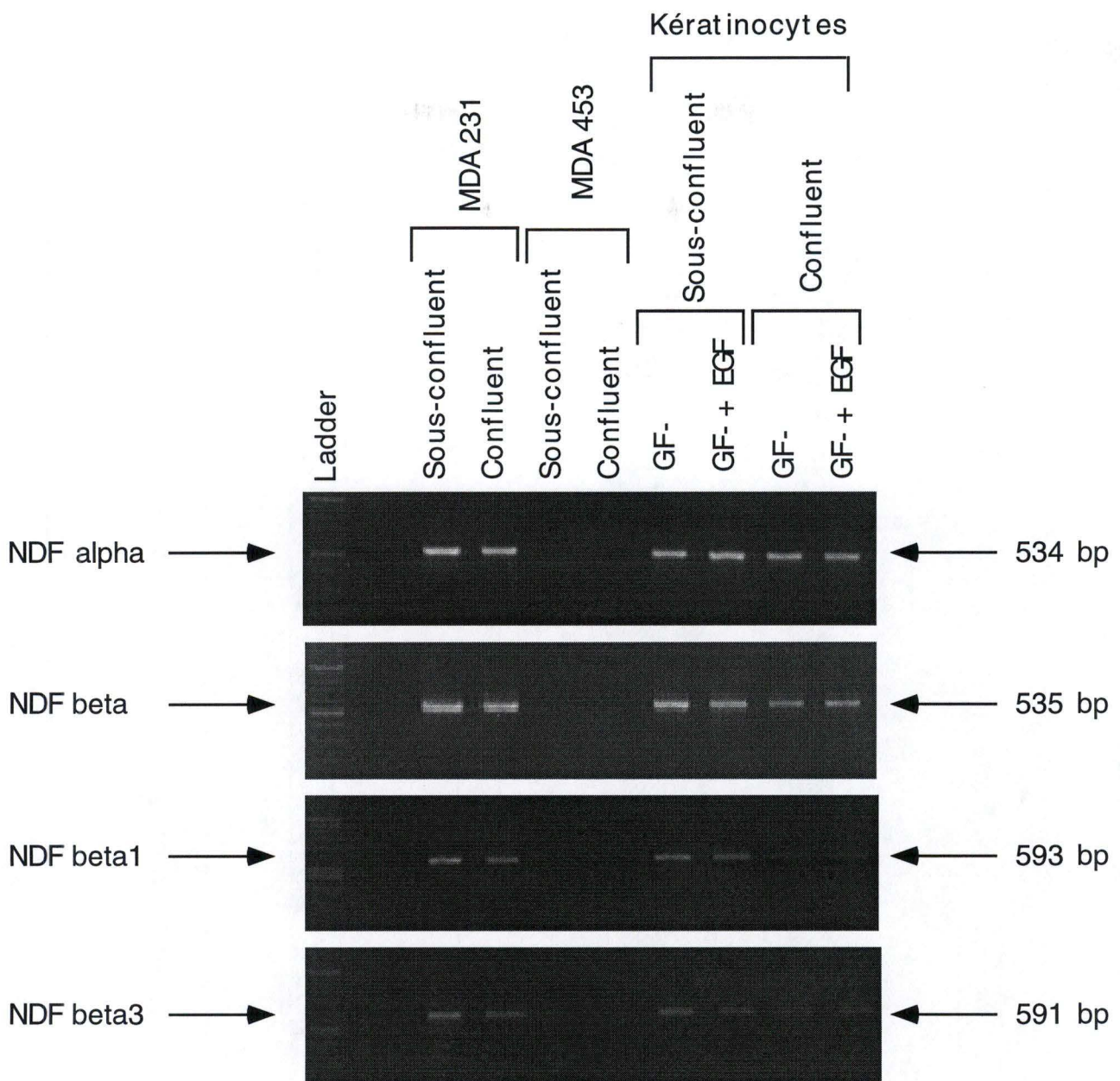


Figure R.19 : détection des isoformes  $\alpha$  (a),  $\beta$  (b),  $\beta$ 1 (c) et  $\beta$ 3 (d) de NDF par RT-PCR. Les échantillons testés sont des ARNm-poly(A) extraits de cultures de cellules cancéreuses mammaires (MDA-MB-231 et MDA-MB-453) à sous-confluence et à confluence et de kératinocytes en milieu GF $\ominus$  et GF $\ominus$ +EGF à sous-confluence et à confluence.

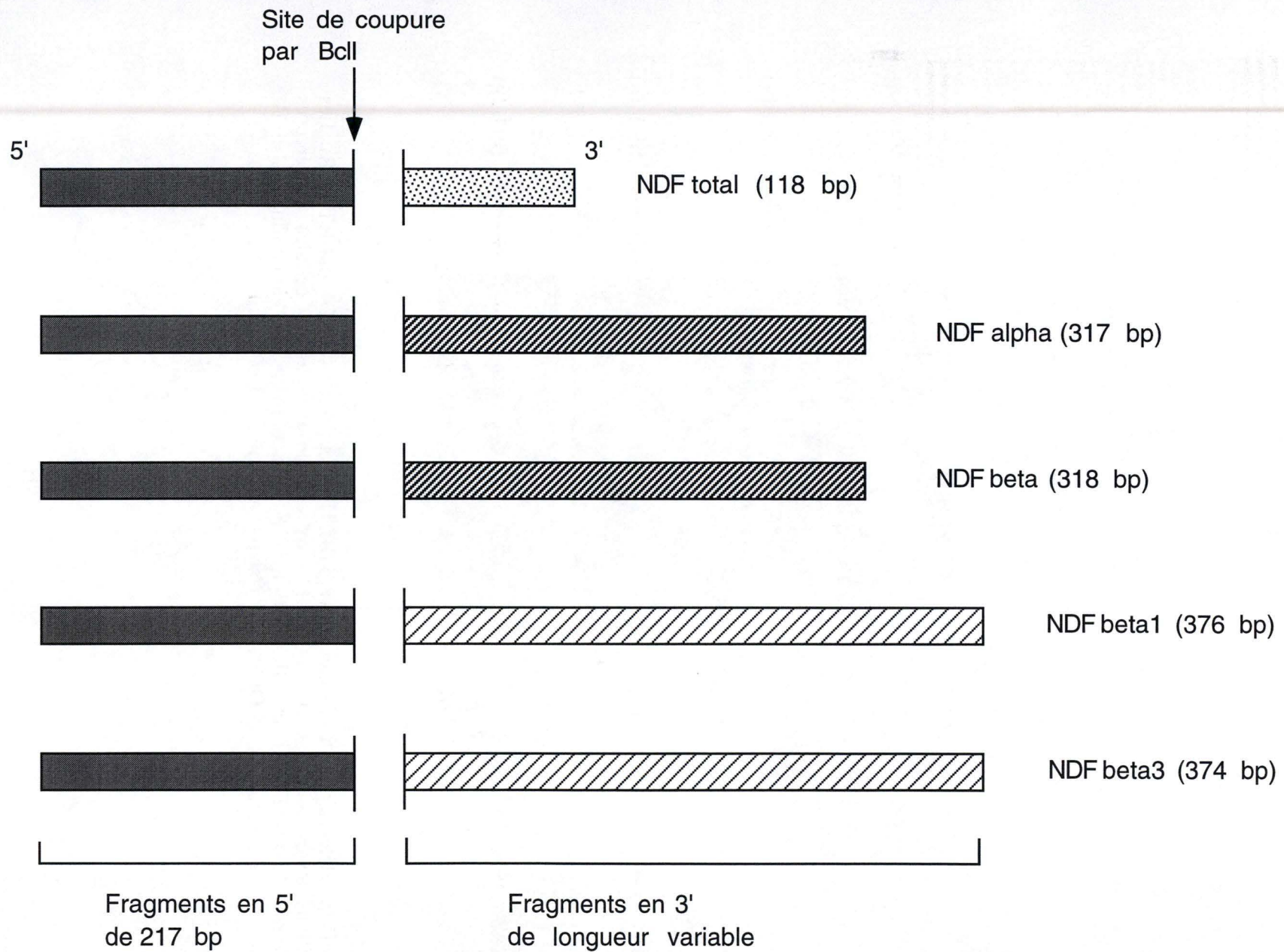
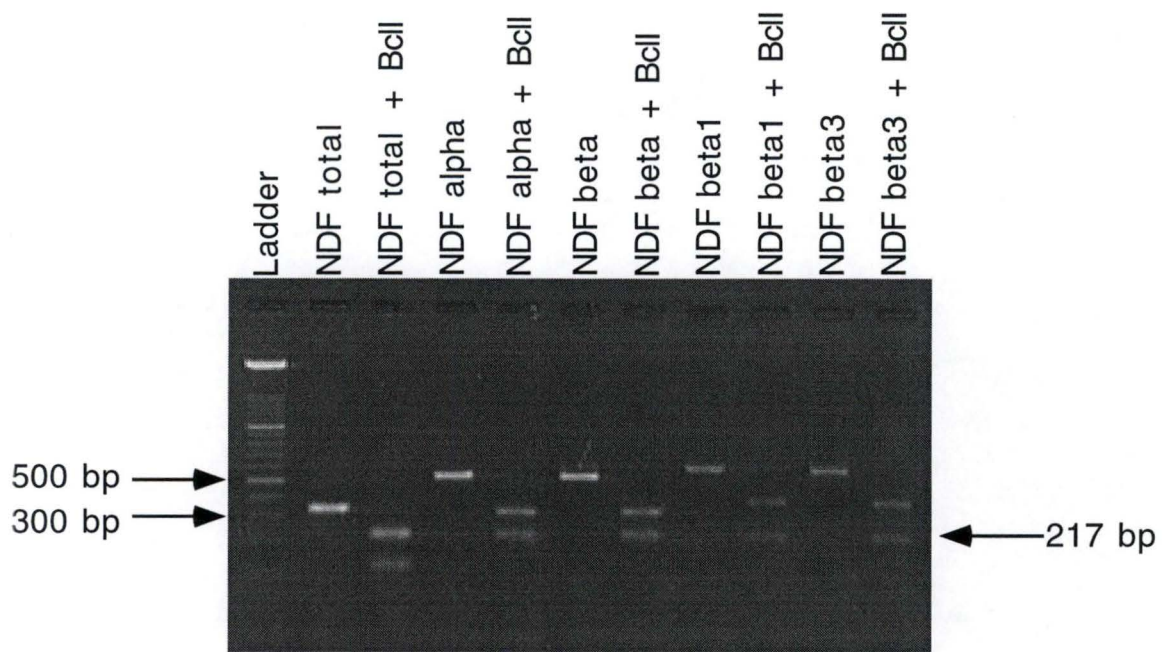


Figure R.20 : schéma représentant les fragments attendus après restriction par l'enzyme BclI des fragments amplifiés par RT-PCR. Les tailles variables des fragments en 3' sont indiquées entre parenthèses à côté du nom de l'amplicon.





*Figure R.21* : fragments obtenus après restriction par BclI des fragments de NDF total, NDF $\alpha$ , NDF $\beta$ , NDF $\beta$ 1 et NDF $\beta$ 3 amplifiés par RT-PCR.

permettent plus de voir cette différence (résultats non montrés). Pour la suite, nous avons choisi d'utiliser 30 cycles.

### **4.3 Détection des différentes isoformes.**

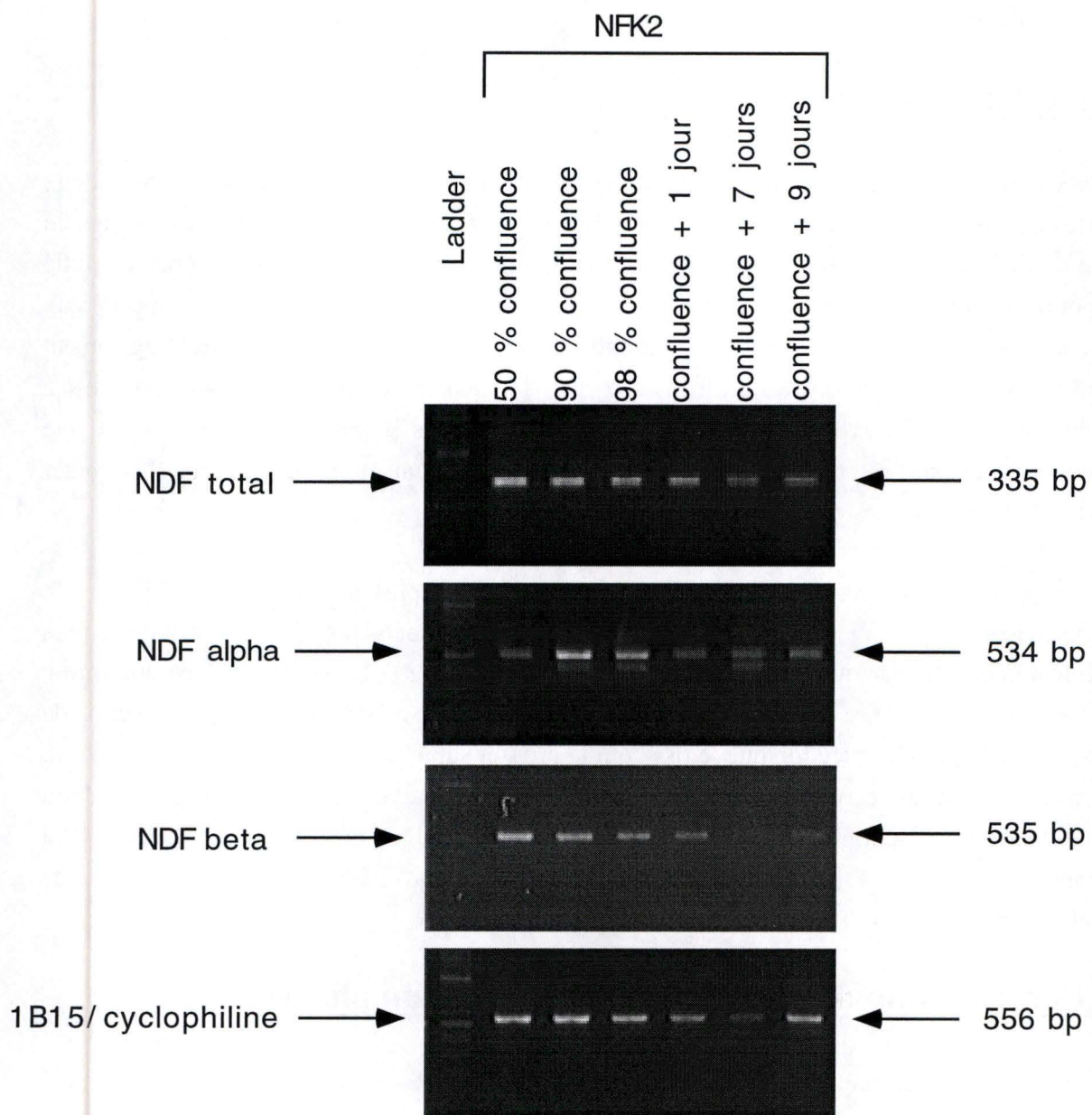
Avec cette technique, nous pouvons observer que NDF $\alpha$  et NDF $\beta$  sont exprimés tous deux dans les différents échantillons testés. Nous observons (figure R.18) que les kératinocytes en phase de différenciation terminale montrent une diminution de la quantité de matériel amplifié qui pourrait correspondre à une diminution du nombre de copies d'ARNm par rapport aux cellules sous-confluentes. De même, les échantillons testés à la figure R.19 montrent également une diminution d'expression des isoformes  $\alpha$  et  $\beta$  lorsque la culture des kératinocytes est à confluence. Dans ces expériences, l'expression des isoformes  $\beta$  diminue plus fortement que l'expression des isoformes  $\alpha$  (figures R.18 et R.19). Cependant, nous ne pouvons déterminer un effet de l'EGF sur ces expressions.

Au sein de la même sous-famille  $\beta$ , nous avons analysé l'expression des isoformes  $\beta 1$  et  $\beta 3$ . Ces deux isoformes sont exprimées par les kératinocytes, cependant, l'isoforme  $\beta 1$  est plus sensible à la confluence que l'isoforme  $\beta 3$  (figures R.18 et R.19). L'isoforme  $\beta 3$  est une forme de NDF non membranaire (elle ne possède pas de domaine transmembranaire) qui peut servir de forme de stockage relarguée lorsque le tissu qui la produit subit une blessure (Wen et al., 1994). Ces résultats sont en accord avec ce que l'on observe par analyses de Northern blots car on constate une diminution générale de l'expression de NDF avec la confluence. La correspondance entre les trois transcrits de NDF et les différentes isoformes exprimées n'est que partiellement établie (Holmes et al., 1992).

### **4.4 Confirmation de l'identité des séquences amplifiées.**

Pour vérifier la validité des détections de NDF par RT-PCR, nous avons confirmé l'identité exacte des séquences amplifiées. D'abord, la taille de la séquence amplifiée doit correspondre à celle attendue. Sans recourir au séquençage, la séquence peut être partiellement vérifiée par hybridation d'un Southern blot (déjà utilisé pour confirmer l'expression cutanée de NDF et la non-expression de HER4) ou par démonstration d'un site de restriction en un endroit bien précis de la séquence.

Nous avons choisi un site unique situé de manière asymétrique dans l'amplicon pour obtenir, après clivage, deux bandes de tailles différentes. Le site choisi est un site BclII (figure R.16a, b et c) situé à la position 217. La figure R.20 nous montre les fragments attendus après clivage. La figure R.21 nous montre le résultat de cette restriction. Pour chaque restriction, nous obtenons un fragment de 217 nucléotides correspondant à la partie 5' de l'amplicon. La longueur du fragment 3' dépend des amorces utilisées (figure R.20). Les fragments obtenus (118, 217, 318, 335 et 376 bp) correspondent aux tailles prédites.



*Figure R.22* : détection par RT-PCR de NDF (a), des isoformes  $\alpha$  (b) et  $\beta$  (c) et de 1B15 (d) dans des kératinocytes cultivés en milieu complet et dont les ARNm-poly(A) ont été extraits à différents moments de confluence.

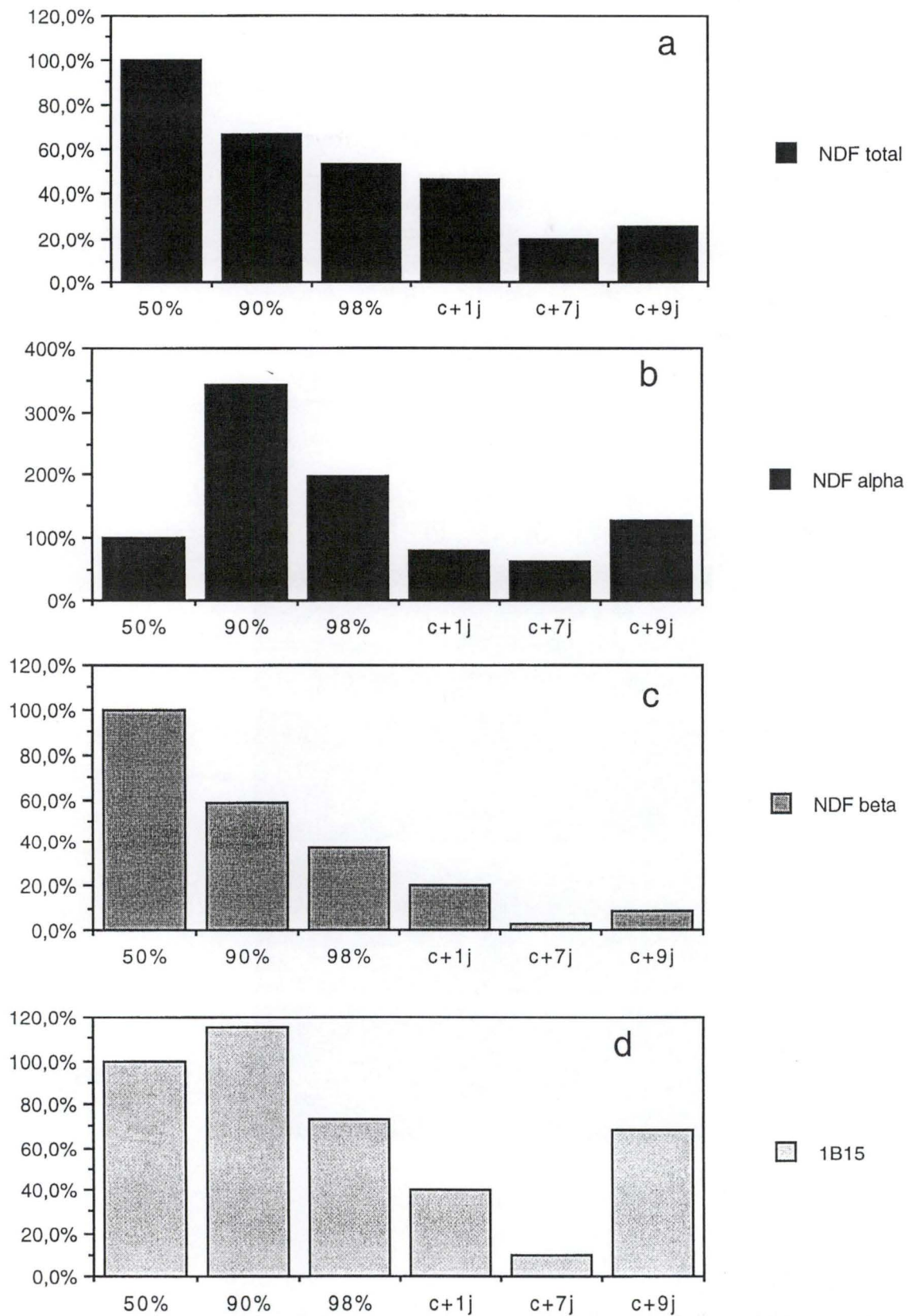


Figure R.23 : analyse densitométrique de RT-PCR. Les échantillons analysés sont des ARNm-poly(A) extraits de cultures de kératinocytes en milieu complet à différents moments de confluence. La valeur du 1B15 correspondant nous renseigne sur la quantité de matériel au départ. Les valeurs sont données en % par rapport à la valeur de l'échantillon à 50% de confluence.

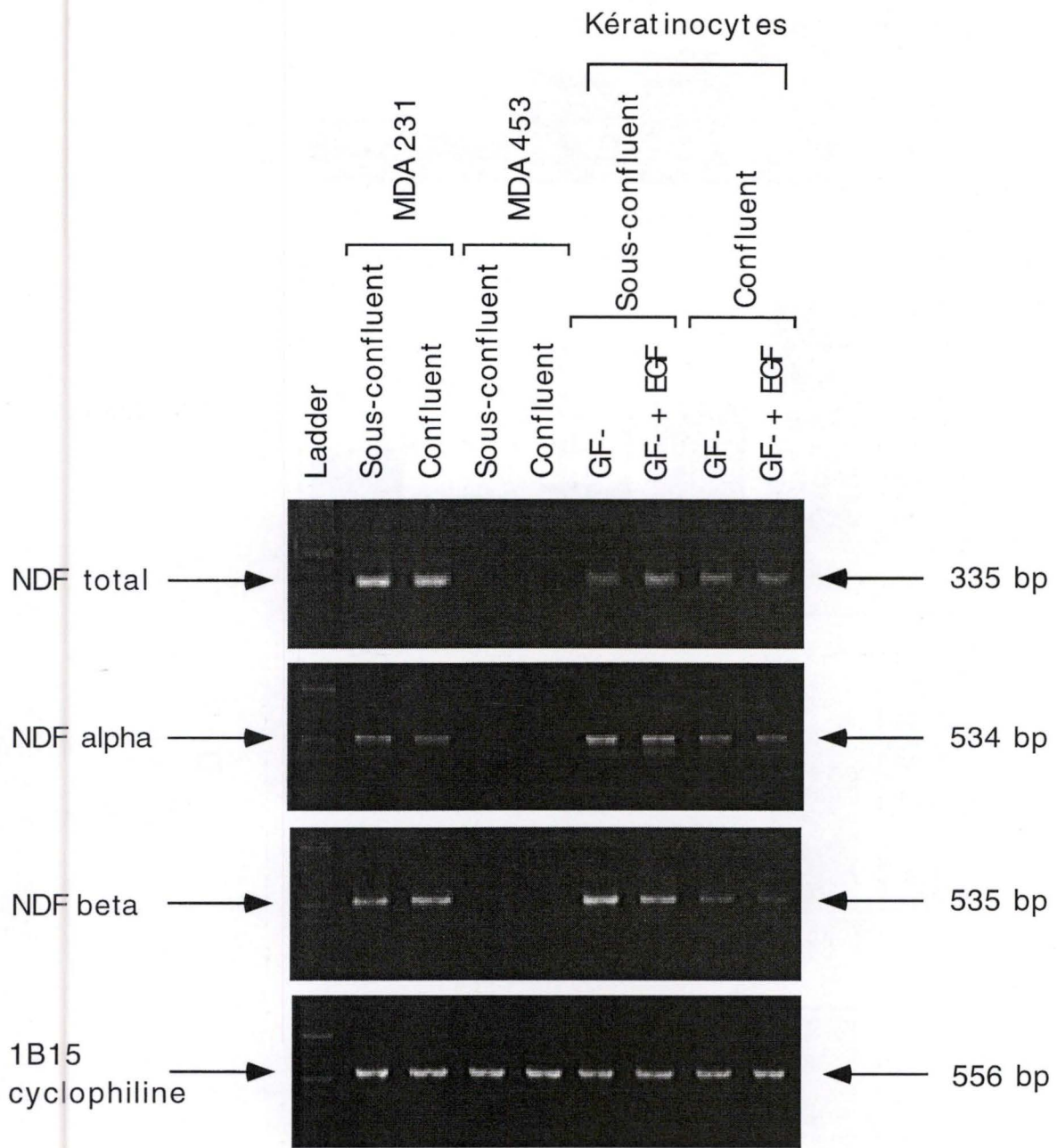


Figure R.24 : détection par RT-PCR de NDF total (a), des isoformes  $\alpha$  (b) et  $\beta$  (c) et de 1B15 (d) dans des kératinocytes cultivés en milieu GF $\ominus$  et GF $\ominus$ +EGF à sous-confluence et à confluence

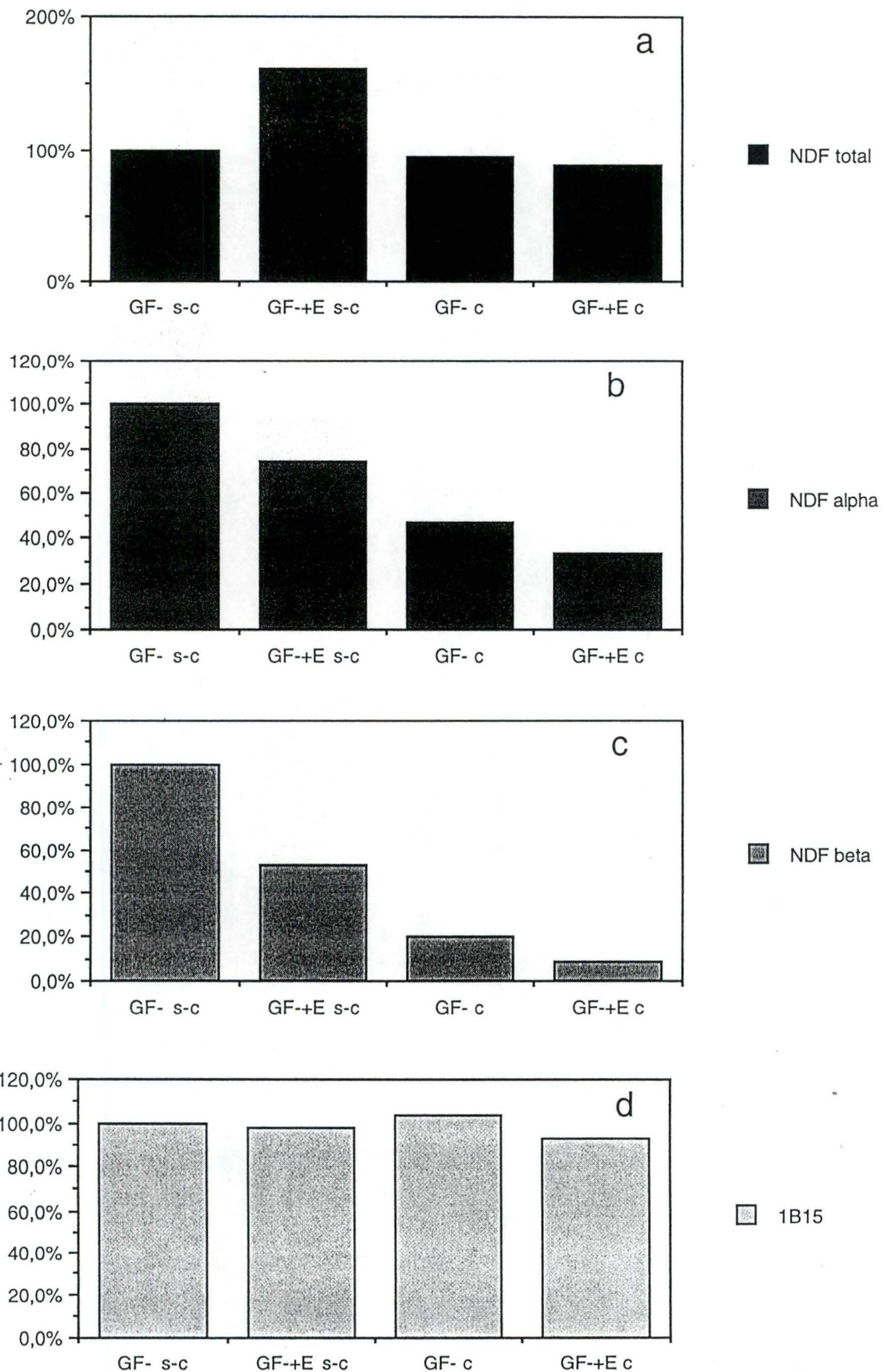


Figure R.25 : analyse densitométrique de RT-PCR. Les échantillons analysés sont des ARNm-poly(A) extraits de cultures de kératinocytes en milieu GF $\ominus$  et GF $\ominus$ +EGF à sous-confluence et à confluence. La valeur de 1B15 (d) nous renseigne sur la quantité de matériel au départ. Les valeurs sont données en % par rapport à la valeur de l'échantillon en GF $\ominus$  à sous-confluence.

#### **4.5 PCR "Semi quantitative".**

Dans nos expériences, nous avons noté une diminution de l'expression des isoformes de NDF en fonction de la différenciation cellulaire. Cherchant à quantifier cette diminution, d'autres expériences de RT-PCR dont les résultats ne sont pas montrés dans ce travail nous ont fait comprendre l'importance de normaliser au maximum les échantillons que nous voulons comparer. Pour cela, une quantité d'ARNm de chaque échantillon que nous voulons tester a subi la transcription réverse et servira pour toutes les PCR ultérieures. De cette façon, les différentes PCR seront toutes effectuées avec la même quantité de matériel de départ. L'intérêt de cette normalisation est de pouvoir ensuite comparer les résultats des amplifications des isoformes de NDF avec l'amplification de 1B15 qui nous servira de valeur de référence.

Si nous analysons l'expérience représentée à la figure R.22 et dont les résultats densitométriques sont montrés à la figure R.23 (culture de kératinocytes épidermiques en milieu complet à différents moments de confluence), nous pouvons toujours observer une diminution assez nette de l'expression de NDF total. Cette même tendance est observée pour les isoformes  $\alpha$  et  $\beta$ . Cependant, on observe pour l'échantillon à 50% de confluence une valeur de NDF $\alpha$  assez faible. Nous pouvons nous demander si cette constatation est réelle ou est due à une erreur de manipulation. De nouveau, nous constatons également que l'expression des isoformes  $\beta$  est modulée plus fortement que les isoformes  $\alpha$ , ce qui confirme les résultats précédents. Il faut également noter que les valeurs de 1B15 ne sont pas tout à fait homogènes et qu'il faut en tenir compte pour pondérer nos résultats. Dans l'expérience représentée à la figure R.24 et dont les graphiques sont représentés à la figure R.25, nous observons des résultats équivalents avec cette fois des valeurs de 1B15 bien homogènes. En effet, par mesures densitométriques, il devient évident que la confluence diminue l'expression des isoformes  $\alpha$  et  $\beta$ . Cependant, nous ne pouvons pas montrer une diminution de l'expression de NDF total. Nous ne pouvons pas non plus détecter d'effet de l'EGF sur l'expression des isoformes de NDF.

### **5 . Détection des messagers codant pour NDF dans des kératinocytes en culture par la technique d'hybridation in situ.**

Jusqu'à présent, notre étude sur les variations de l'expression de NDF dans des kératinocytes épidermiques in vitro s'est limitée à des analyses d'échantillons d'ARNm provenant d'extraits de cultures cellulaires. Nous n'avons donc reçu que des informations sur une moyenne des variations cellulaires au sein de la culture. Nous avons émis l'hypothèse que

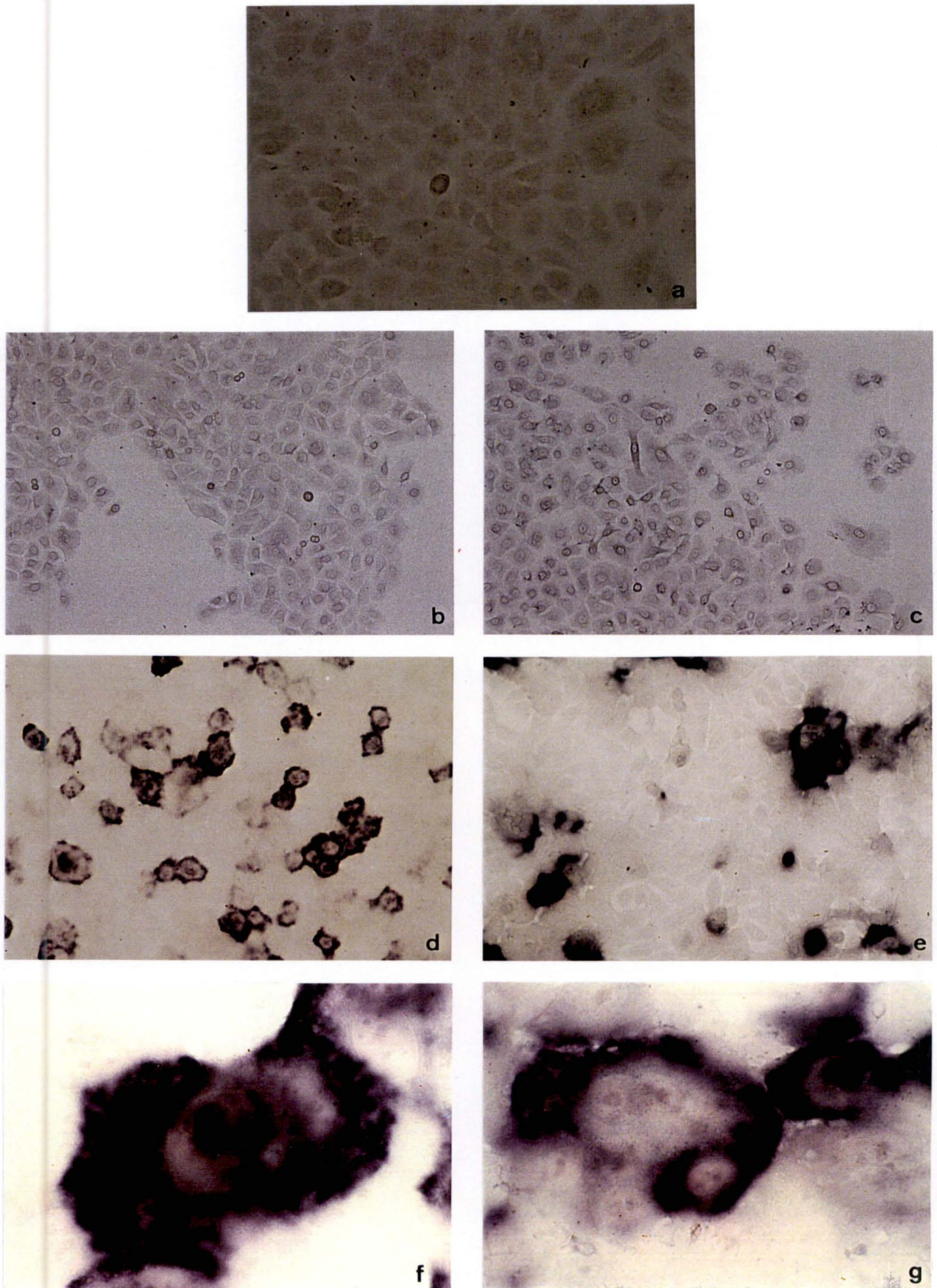


Figure R.26 : détection par HIS de l'expression de K10 dans des kératinocytes cultivés en milieu GF0 (a, b, d et f) et GF0+EGF (c, e et g) à sous-confluence (b et c) et à confluence (d, e, f et g). Le témoin (a) est incubé avec la sonde sens.  
 Grossissements : a, d et e : 134 X, b et c : 105 X, d et e : 537 X.



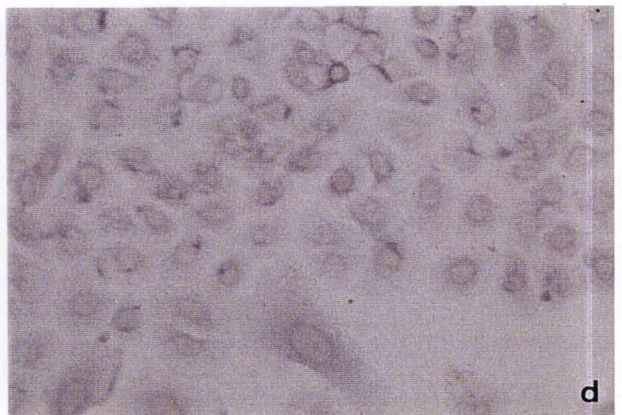
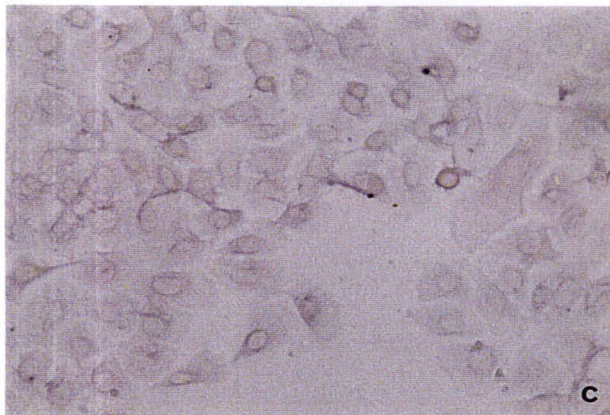
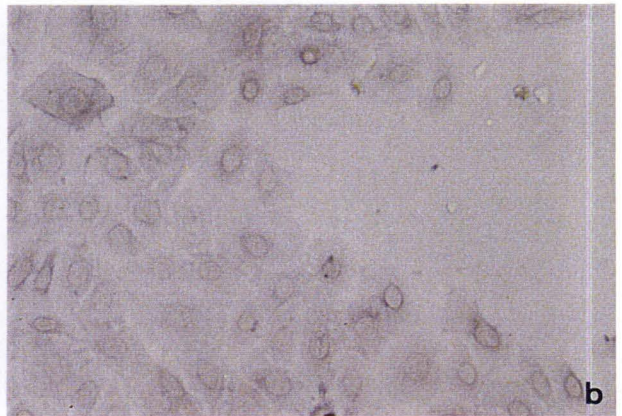
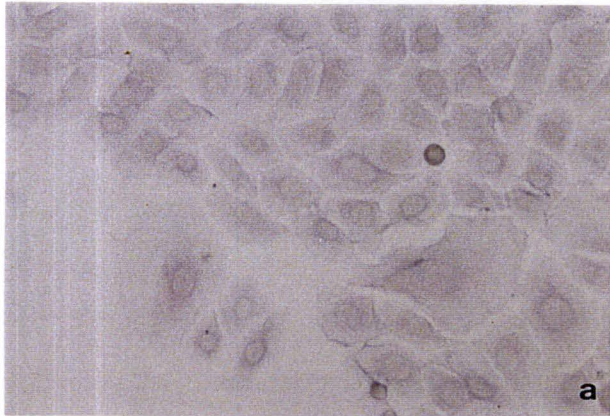


Figure R.27 : détection par HIS de l'expression de NDF dans des kératinocytes cultivés en milieu GF0 (a, b et c) et GF0+EGF (d) à sous-confluence. Les témoins sont réalisés sans sondes (a) ou avec la sonde sens (b).  
Grossissements : 105 X.

la différenciation cellulaire influence l'expression de certains facteurs. Par hybridation in situ, nous sommes capable d'analyser les variations des messagers directement sur le lieu de leur production.

### **5.1 Détection de K10 dans des kératinocytes.**

Les résultats que nous observons en hybridation in situ (HIS) sont en accord avec ceux que l'on observe par l'étude quantitative de Northern. En effet, à sous-confluence, que ce soit en milieu sans EGF ou avec EGF, nous n'observons pas de cellules exprimant la kératine suprabasale K10. Cependant, lorsque les cellules atteignent la confluence et que l'on observe un début de stratification, un grand nombre de cellules produisent cette kératine. La localisation du marquage est cytoplasmique. La présence d'EGF dans le milieu de culture diminue le nombre de cellules produisant de la kératine 10 mais ne semble pas diminuer la quantité de kératine par cellule positive (figure R.26). Ceci suggère que l'EGF bloque l'entrée en différenciation de certaines cellules, mais ne bloque pas l'expression de ce marqueur de différenciation une fois celle-ci entamée.

### **5.2 Détection de NDF dans des kératinocytes.**

Lorsque nous avons testé la présence d'ARNm codant pour la kératine K10, nous savions que les transcrits susceptibles d'être détectés seraient présents en grande quantité, puisque les kératines sont exprimées fortement dans les kératinocytes. Pour étudier l'expression de NDF, le problème est différent. Nous savons que pour être détectés par HIS, il faut au moins 20 exemplaires par cellule d'ARNm codant pour la protéine étudiée (Nuovo, 1992), car une grande quantité de matériel est détruite ou perdue durant les diverses étapes nécessaires (traitement à l'HCl et au Triton-X-100). Par hybridation sur Northern blots, nous avons vu que ce gène est assez faiblement exprimé et donc difficile à détecter par HIS. Effectivement, dans les cultures de cellules analysées par HIS avec une sonde ARN anti-sens de NDF marquée par la digoxigénine, nous n'observons pas de cellules marquées : la faible coloration bleue cytoplasmique obtenue est visible aussi bien après l'hybridation avec la sonde anti-sens qu'après l'hybridation avec la sonde sens (figure R.27).

Plusieurs expériences similaires ont été réalisées, mais toutes donnent ce même résultat négatif, même en modifiant les conditions de préhybridation, hybridation et/ou lavage pour tenter de détecter NDF (résultats non montrés).

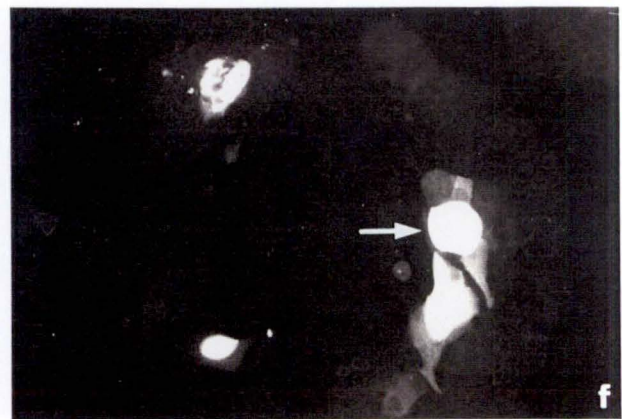
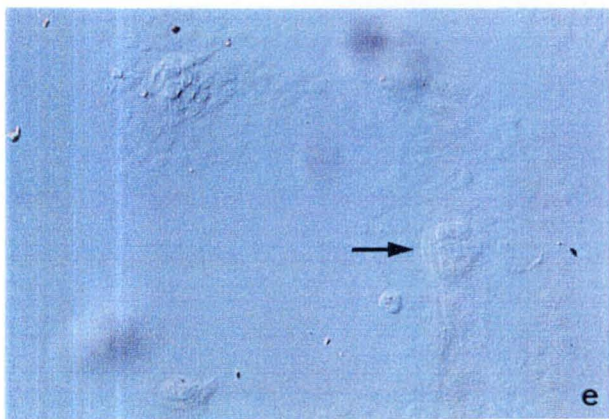
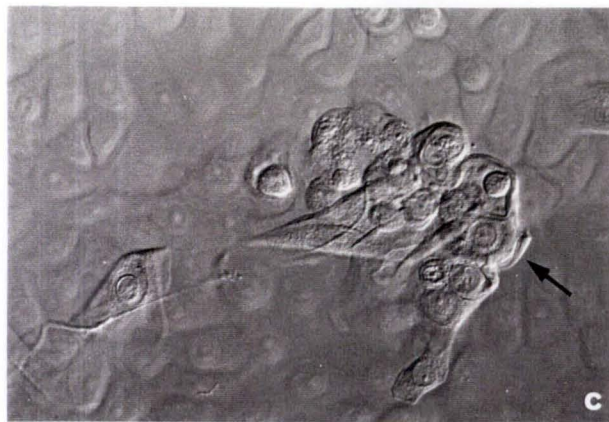
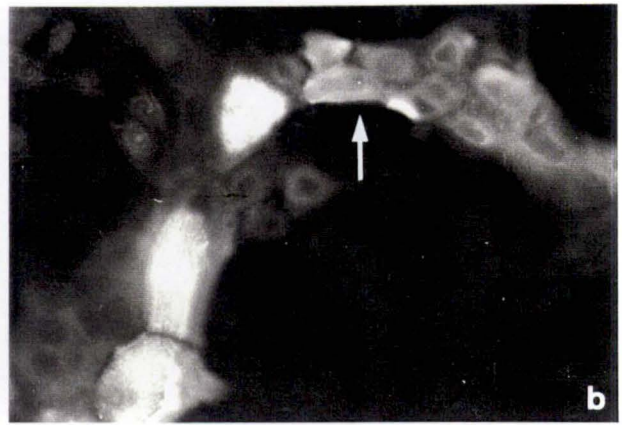
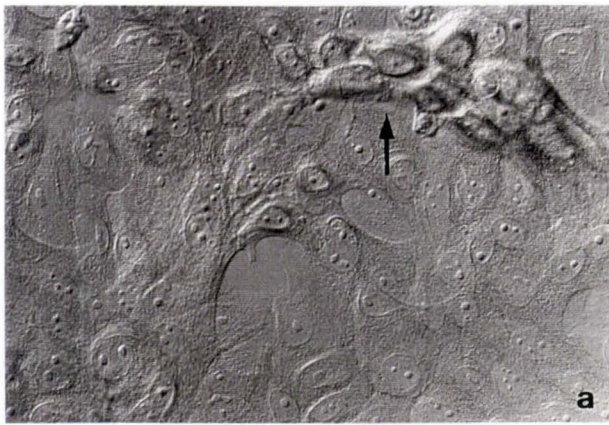


Figure R.28 : détection de kératinocytes en différenciation (marquées par une flèche) en microscopie différentielle interférentielle (DIC) (a, c et e) et par marquage IHC de la protéine K10 (b, d et f) dans des cultures à confluence en milieu GF0 (a et b) et en milieu GF0+EGF (c et d) et dans une culture en milieu KGM-2 sans facteur de croissance à sous-confluence (e et f).

Grossissements : a, b, c et d : 325 X, e et f : 420 X.

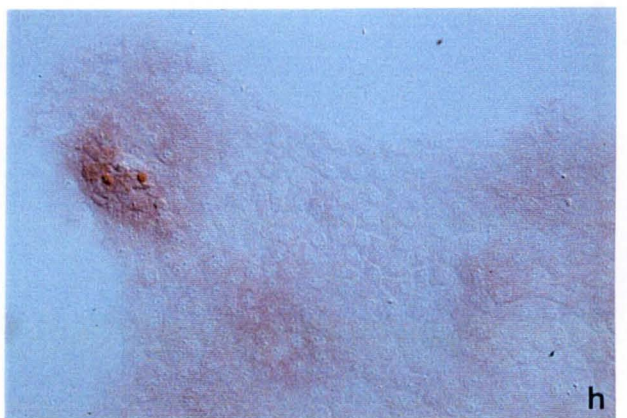
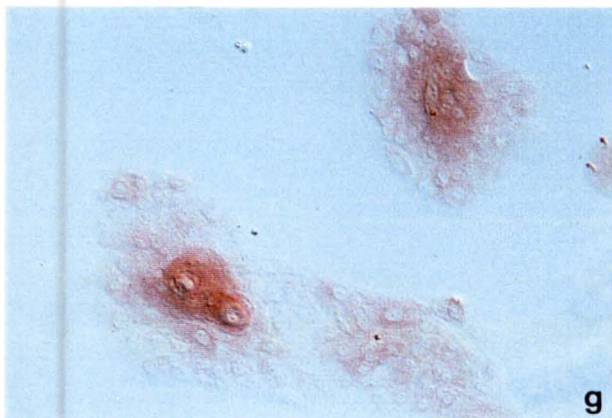
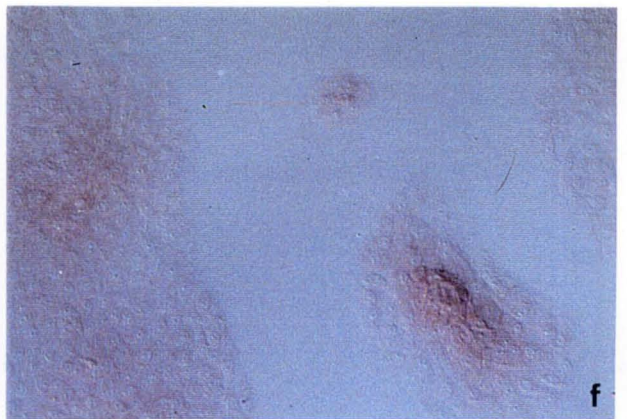
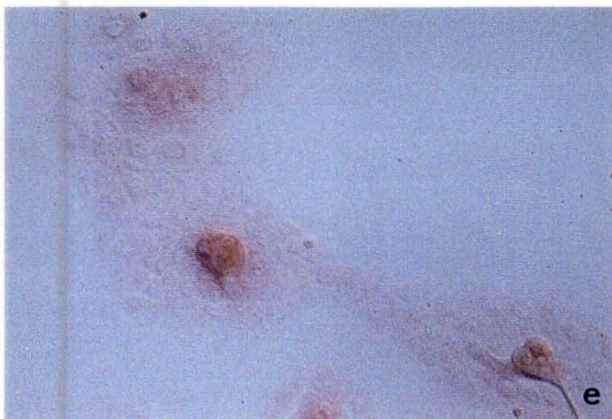
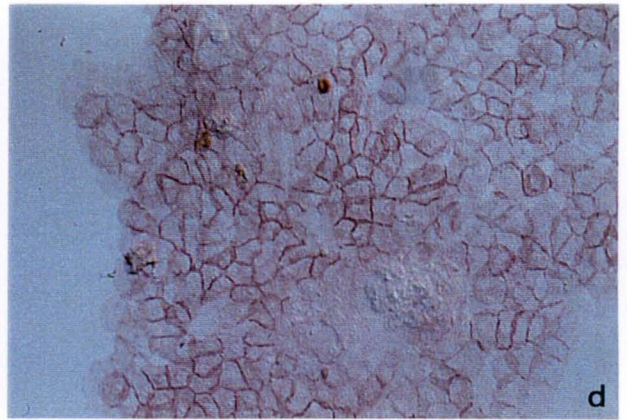
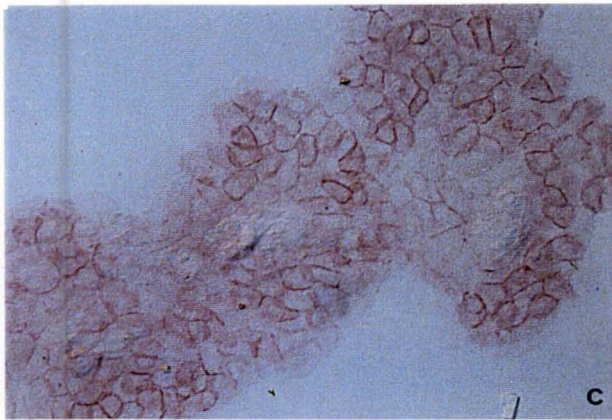
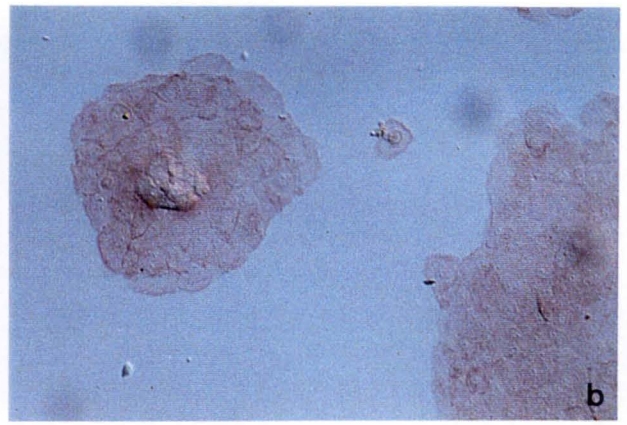
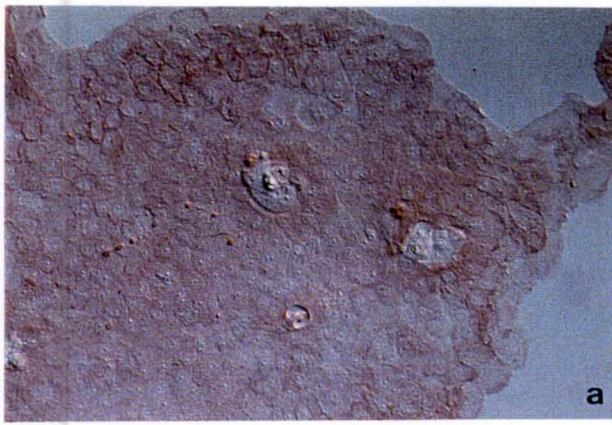


Figure R.29 : détection par marquage IHC de NDF (**a** et **b**), HER1 (**c** et **d**), HER2 (**e** et **f**) et HER3 (**g** et **h**) dans des cultures de kératinocytes en milieu KGM-2 GF0 (**a**, **c**, **e** et **g**) et KGM-2 GF0+EGF (**b**, **d**, **f** et **h**) à sous-confluence.

Grossissements : 105 X.

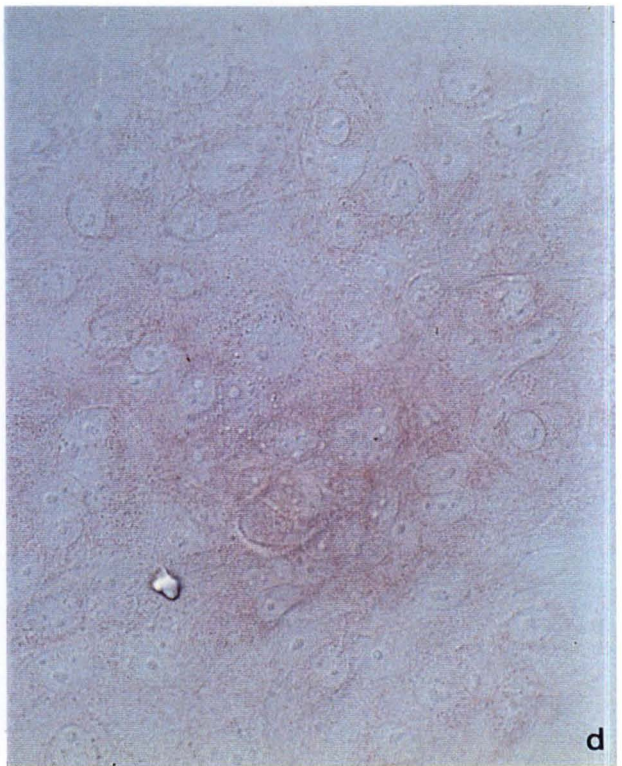
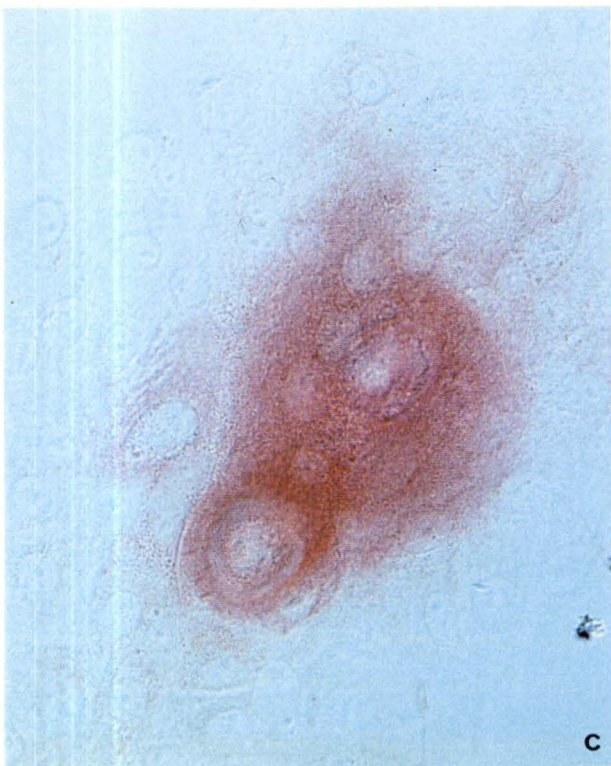
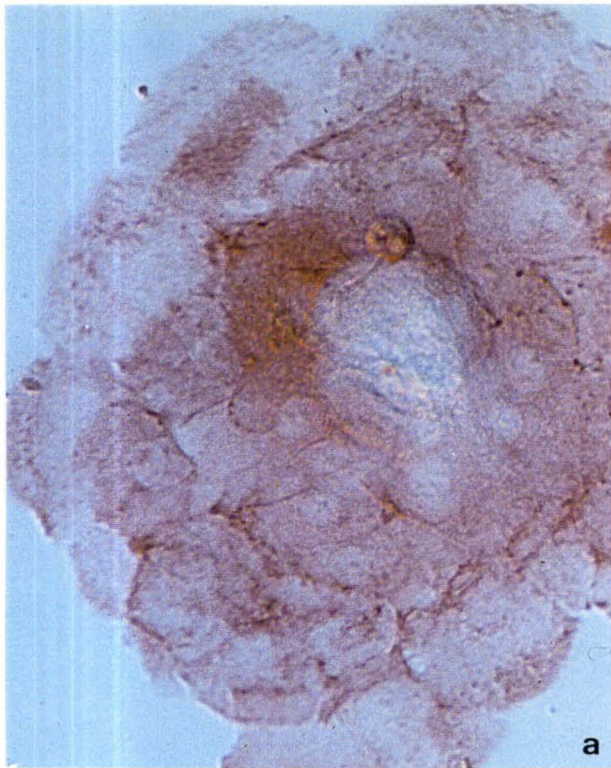
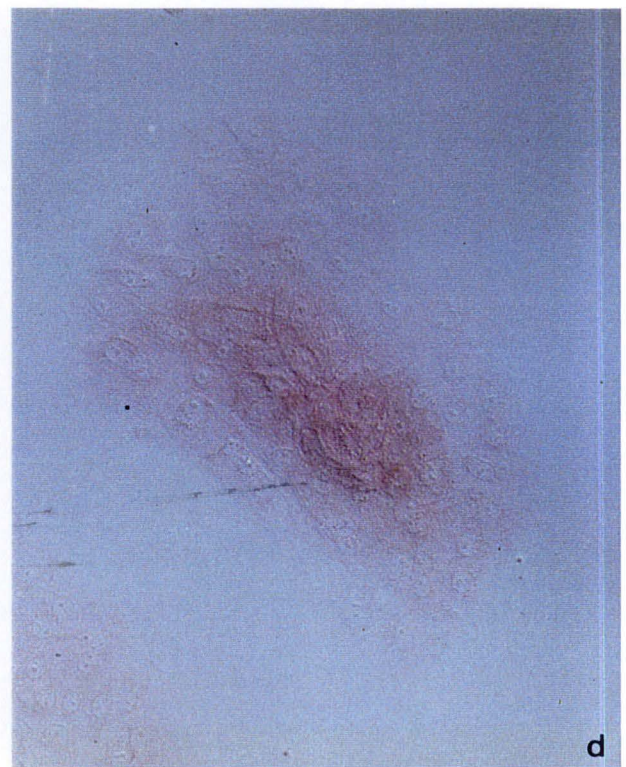
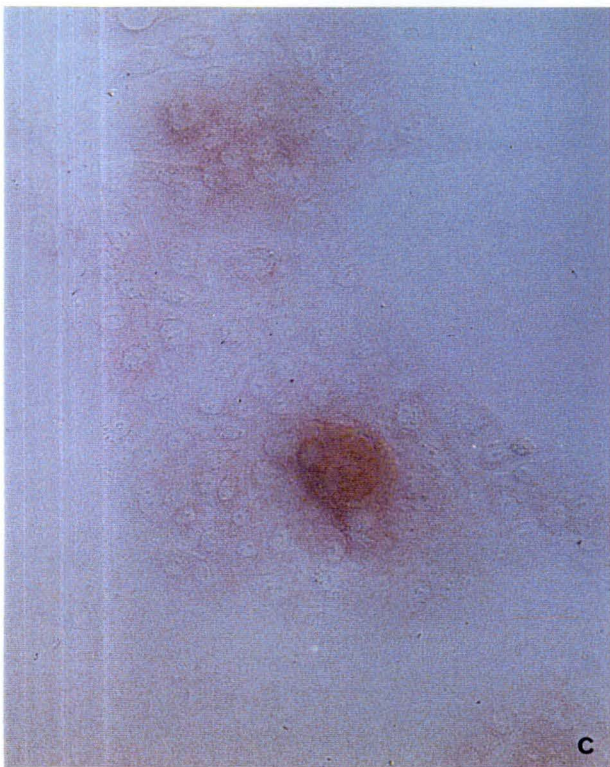
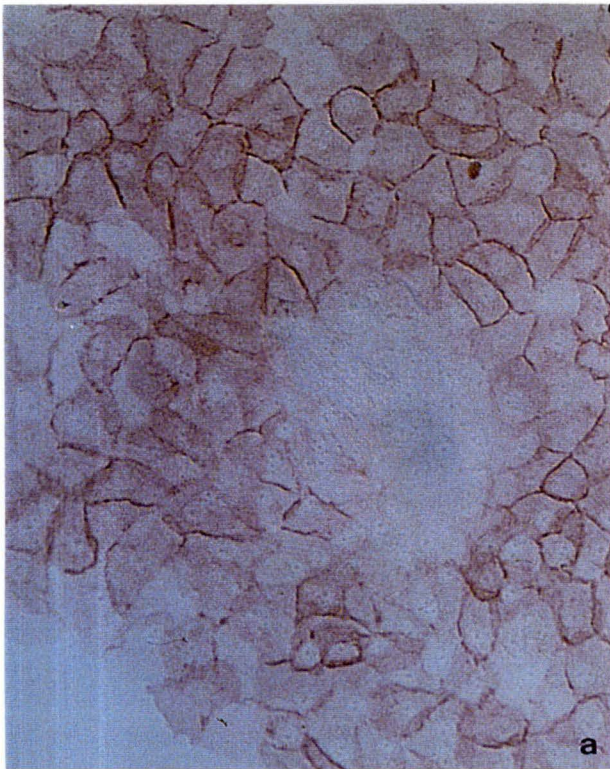


Figure R.30a : détection par marquage IHC de NDF (**a** et **b**) et HER3 (**c** et **d**) dans des cultures de kératinocytes en milieu KGM-2 GF0 (**a** et **c**) et KGM-2 GF0+EGF (**b** et **d**) à sous-confluence.  
Grossissements : **a**, **b**, **c** et **d** : 420 X.



*Figure R.30b* : détection par marquage IHC de HER1 (**a** et **b**) et HER2 (**c** et **d**) dans des cultures de kératinocytes en milieu KGM-2 GF0 (**a** et **c**) et KGM-2 GF0+EGF (**b** et **d**) à sous-confluence.

Grossissements : **a**, **b**, **c** et **d** : 210 X.

## 6. Détection de K10, NDF et HERs par marquage immunohistochimique de kératinocytes épidermiques en culture.

Deux méthodes de marquage seront utilisées : un marquage immunohistochimique en fluorescence (FITC) pour la kératine suprabasale K10 et un marquage par action enzymatique pour NDF et les HERs.

Pour ces marquages, nous avons utilisé un milieu de culture (KGM-2) qui permet d'obtenir en même temps des cellules en prolifération ou en latence et des cellules en différenciation (cellules qui se stratifient). Sur une même culture à sous-confluence, nous pouvons observer le phénotype des cellules en prolifération ou en latence (en périphérie des îlots de cellules) et des cellules en différenciation.

Par la détection de K10, nous pouvons obtenir des informations sur le degré de différenciation de la culture en fonction de la quantité de cellules marquées. Par les techniques de marquage IHC, nous pouvons connaître exactement quelles cellules expriment K10.

Nous observons que les cultures à faible densité cellulaire ne présentent pas de cellules marquées (résultats non montrés). Cependant, lorsque la culture atteint une densité cellulaire élevée, le nombre de cellules exprimant K10 augmente. Pour préciser quelles cellules expriment K10, nous avons photographié les mêmes champs en microscopie à fluorescence et en microscopie à contraste différentiel interférentiel (DIC) (figure R.28). Ces résultats nous montrent que les cellules exprimant K10 sont des cellules présentant une morphologie particulière : elles quittent la couche basale adhérant au substrat de culture et forment une stratification typique de la différenciation épidermique.

En utilisant un anticorps anti NDF (figures R.29 et R.30), nous pouvons observer un marquage cytoplasmique sous forme de points diffus. Les cellules aux pourtours des colonies présentent un marquage intense et membranaire, alors que les cellules qui présentent un phénotype de cellule en différenciation ne sont plus marquées. En présence d'EGF dans le milieu de culture, les cellules montrent un marquage plus faible (figures R.29 et R.30a et b).

La mise en évidence du récepteur de l'EGF (HER1/EGFR) par un anticorps spécifique (figures R.29 et R.30a et b) indique une présence membranaire de ce récepteur essentiellement au niveau des contacts entre deux cellules. Nous constatons aussi que la différenciation cellulaire et la stratification diminue la détection de la protéine HER1. Les récepteurs HER2 et

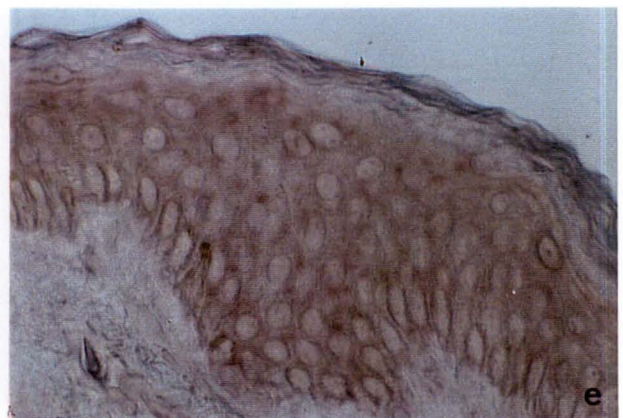
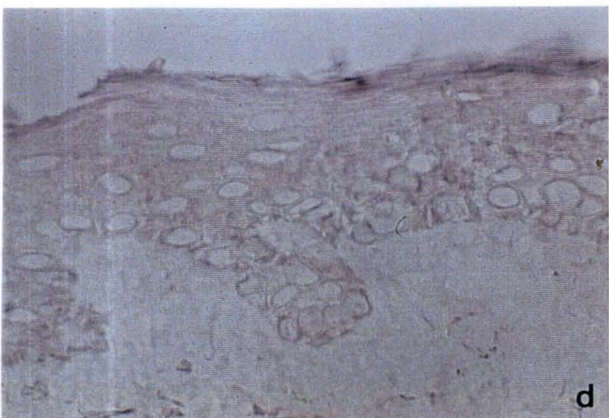
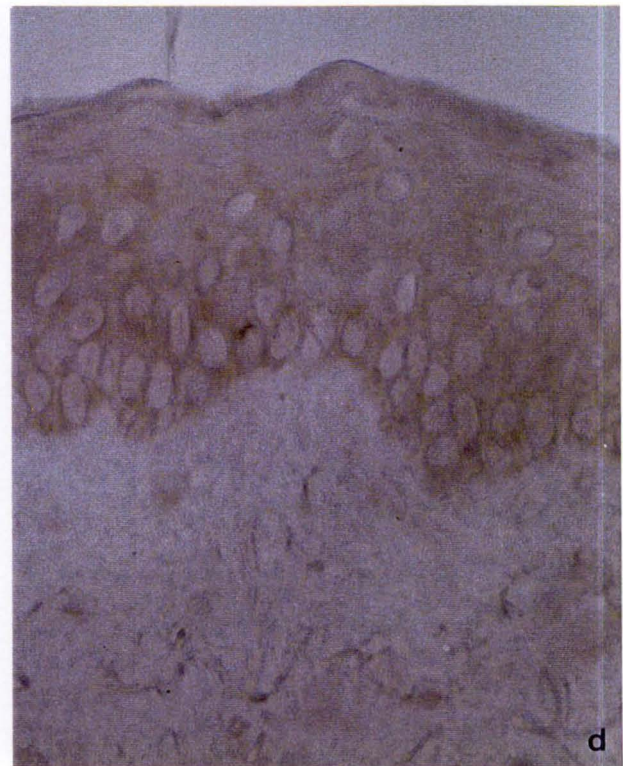
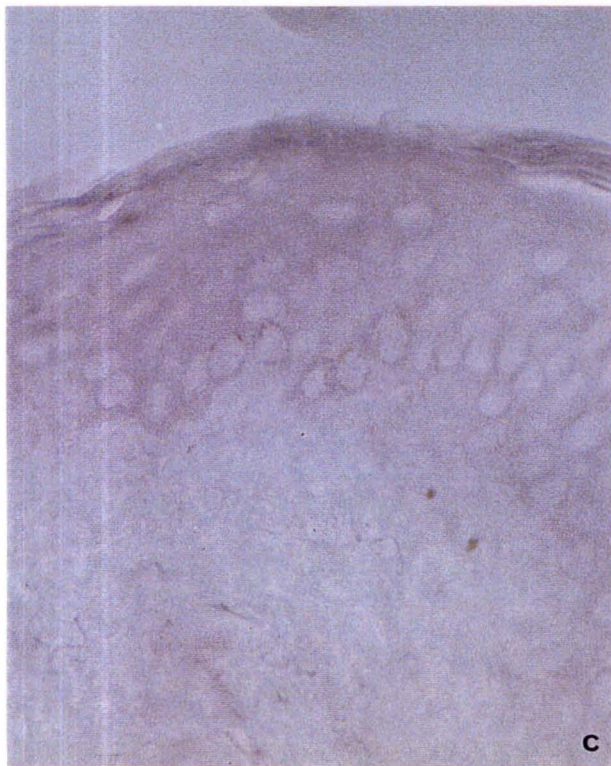
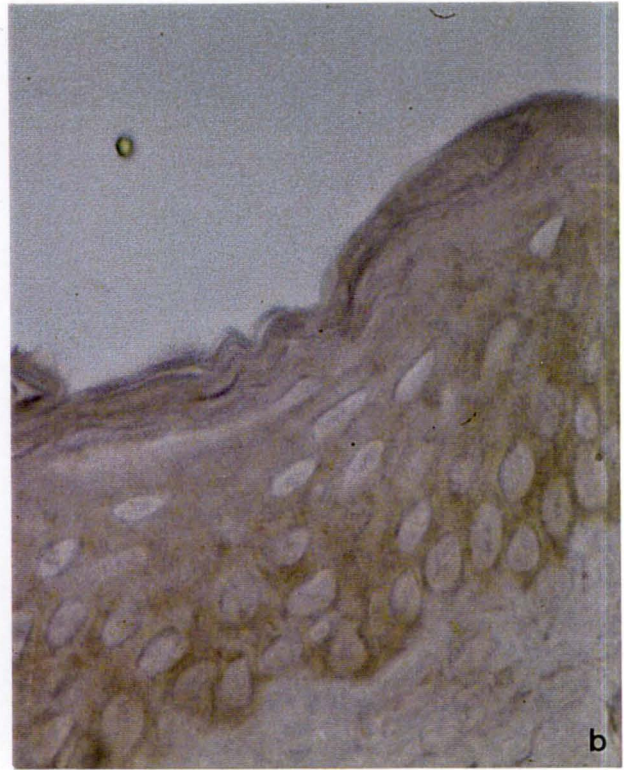
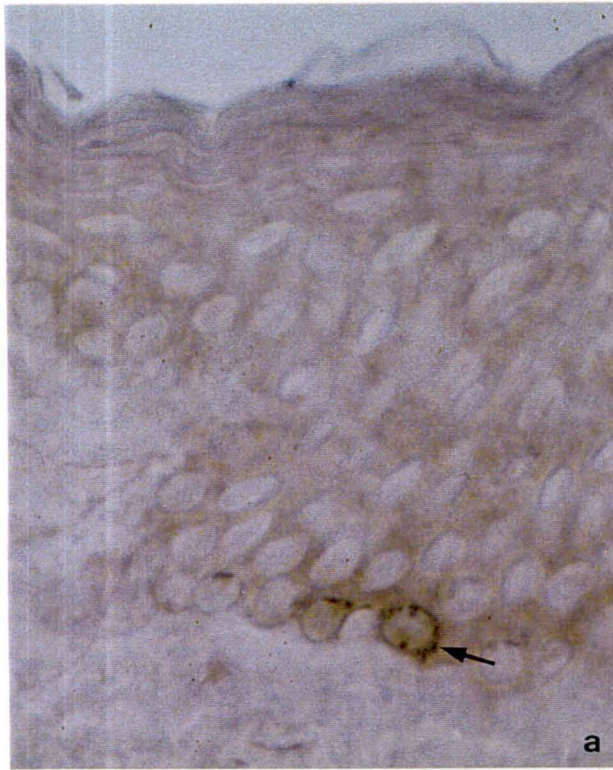


Figure R.31 : détection par HIS de l'expression de K10 (**b** et **c**) et de HER2 (**d** et **e**) dans des coupes de peau normale. Les témoins sont incubés sans sonde (**a**) ou avec la sonde sens correspondante (**b** et **d**).  
Grossissements : **b**, **c**, **d** et **e** : 336 X, **a** : 630X.





*Figure R.32* : détection par HIS de l'expression de NDF (**a** et **b**) et de HER3 (**c** et **d**) dans des coupes de peau normale. Les témoins sont incubés avec la sonde sens correspondante (**a** et **c**). La flèche indique la présence de mélanine.  
Grossissements : **a** et **b** : 840 X, **c** et **d** : 630 X.

HER3 voient leurs synthèses augmenter lorsque les cellules se différencient (figures R.29 et R.30) : en effet, nous pouvons voir que les cellules en périphérie des colonies sont faiblement marquées, tandis que les cellules qui se stratifient sont marquées de façon intense. Cette augmentation du nombre de récepteurs est moins importante pour HER2 que pour HER3. La présence d'EGF dans le milieu inhibe l'effet de la différenciation aussi bien sur HER2 que sur HER3 (figures R.29 et R.30a et b).

## 7. Etude in vivo de l'expression de NDF/heréguline et des récepteurs HERs.

Grâce aux études in vitro, nous savons que la différenciation épidermique s'accompagne d'un effet négatif sur l'expression de NDF et d'un effet positif sur l'expression de ses récepteurs HER2 et HER3. Ces effets s'appliquent aussi bien au niveau des ARNm qu'au niveau des protéines

Ces observations correspondent-elles à la situation in vivo? Pour répondre à cette question, nous avons étudié l'expression de NDF et de ses récepteurs dans des coupes de peau normale par hybridation in situ et immunohistochimie.

### **7.1 Etude par HIS de l'expression de K10, NDF et HERs dans l'épiderme in vivo.**

Tout comme l'étude in vitro, l'analyse in vivo de l'expression des messagers codant pour la kératine suprabasale K10 est facilitée par l'abondance de ce transcrit. K10 se retrouve exprimé uniquement dans les couches suprabasales (une coloration jaunâtre de la couche basale correspond à la présence de mélanine) (figure R.31).

Contrairement à l'HIS sur culture de cellules, l'hybridation sur coupe de peau avec la sonde anti-sens de NDF nous a donné quelques résultats. En effet, on observe un marquage faible des couches basales et épineuses de l'épiderme, alors que les couches granuleuses et cornées ne sont pas ou peu marquées (figure R.32).

In vivo, d'autres facteurs que la différenciation cellulaire pourraient avoir un effet régulateur sur l'expression de NDF qui dans la limite de sa détection ne varie pas avec l'expression des kératines suprabasales

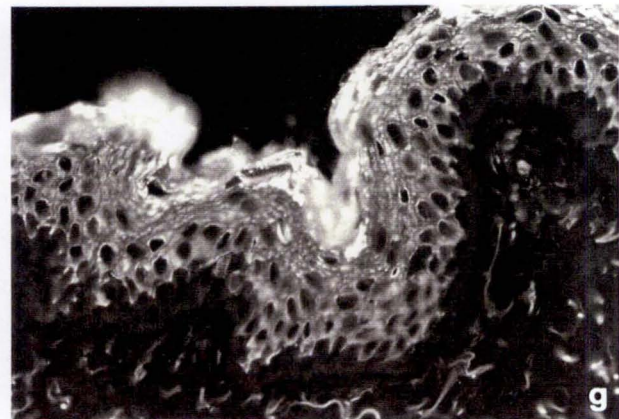
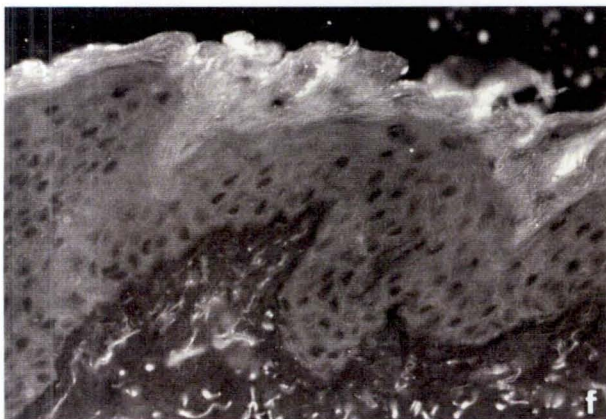
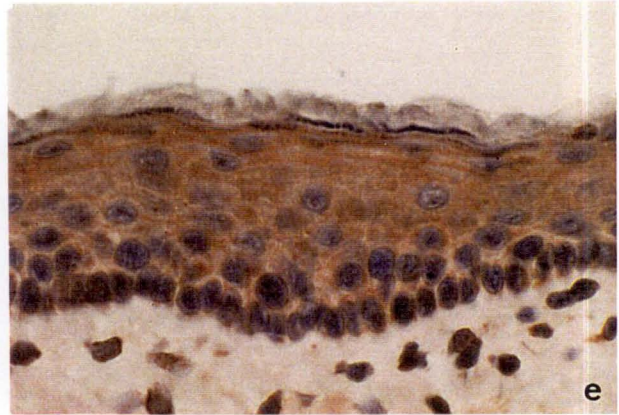
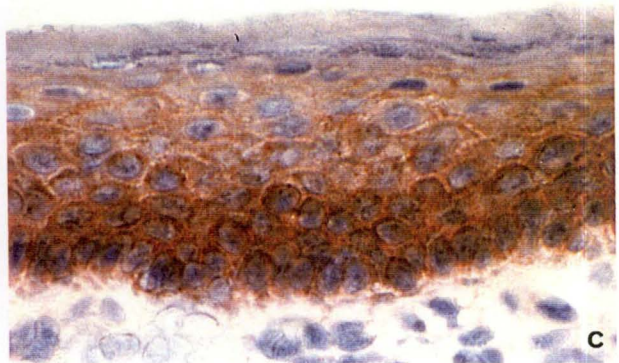
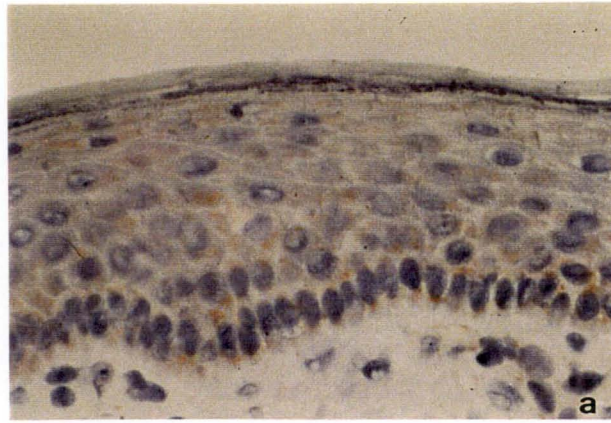


Figure R.33 : détection par HIC de NDF (b), HER1 (c), HER2 (d), HER3 (e) et K10 (g) sur des coupes de peau normale. Les témoins sont incubés sans anticorps primaire (a et f).  
Grossissements : a, b, c, d et e : 336X, f et g : 210 X.

De même que pour NDF, l'expression de type HER est difficile à déceler et donc à analyser. Nous ne voyons que peu de variation au niveau des différentes couches vivantes de l'épiderme et il est très difficile de pouvoir tirer des conclusions avec cette technique (figures R.31 et R.32).

## **7.2 Etude par immunohistochimie (IHC) de l'expression de K10, NDF et HERs dans l'épiderme in vivo.**

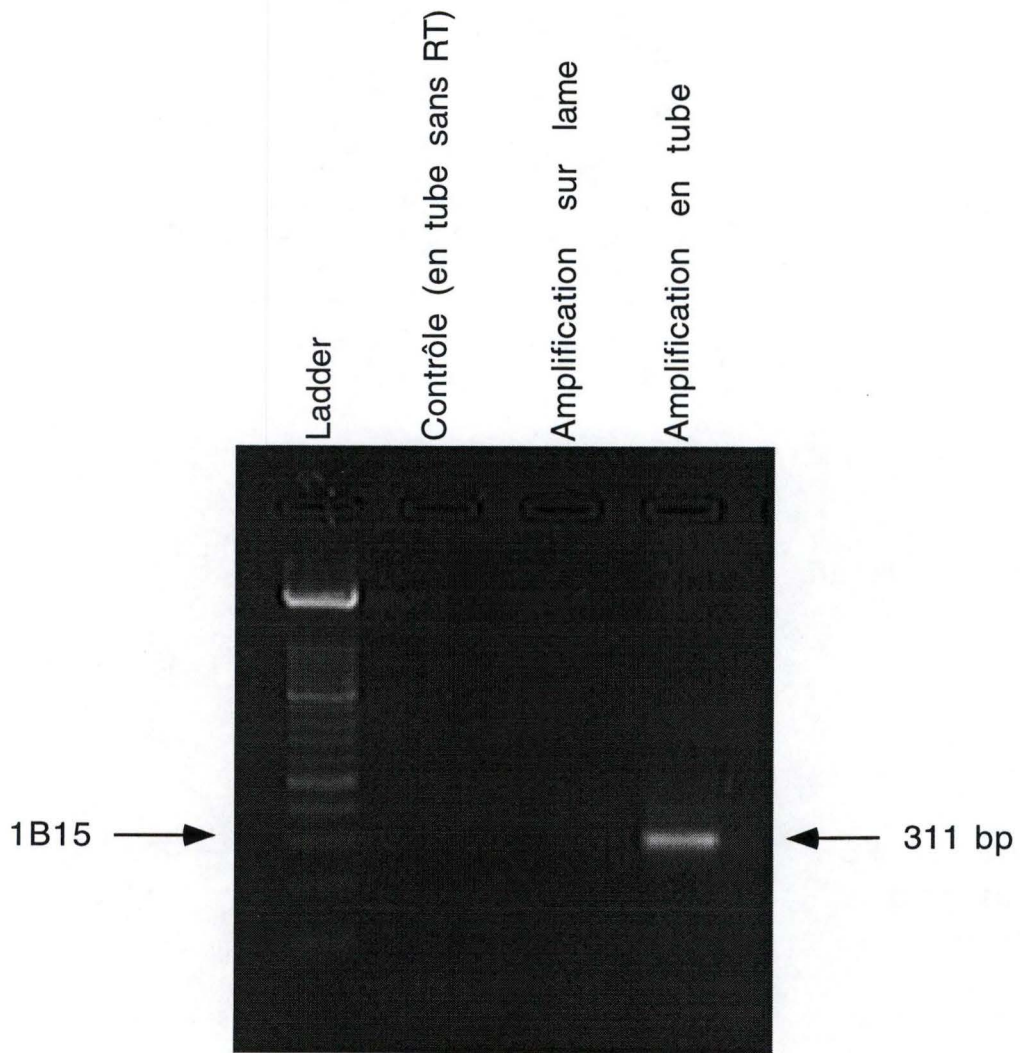
Puisque l'étude des messagers par HIS in vivo ne nous a donné que peu d'information sur l'expression de NDF et ses récepteurs, nous avons analysés les protéines correspondantes par IHC.

Pour l'étude de la kératine suprabasale K10, nous avons utilisé l'immunofluorescence (FITC). La figure R.33 (photo g) nous montre que la kératine 10 apparaît dès les premières couches suprabasales qui marquent le début de la couche épineuse. La couche cornée montre un peu de marquage aspécifique (figure R.33, photo f). L'autofluorescence des fibres élastiques du derme s'observe sur ces préparations.

En utilisant un anticorps reconnaissant spécifiquement la protéine NDF sur les coupes de peau normale et un système de détection sensible LSAB utilisant le système avidine-biotine et la peroxidase, nous pouvons observer que cette protéine est présente dès la couche basale. Sa localisation à ce niveau semble cytoplasmique et périnucléaire. Au fur et à mesure que les cellules montent dans les couches différenciées, il semble que la protéine soit moins présente et que sa localisation devienne plutôt membranaire (figure R.33).

Grâce à la même technique, nous pouvons observer que le récepteur de l'EGF (figure R.33) est présent dans toutes les couches vivantes de l'épiderme avec une prédominance dans les couches basales et épineuses. Sa localisation semble membranaire mais devient plutôt cytoplasmique au niveau des couches granuleuses.

L'étude des récepteurs de NDF (HER2 et HER3) sont également en accord avec les résultats récoltés tout au long de ce travail (figure R.33). Tout deux sont faiblement représentés au niveau des couches basale et épineuse avec une localisation qui semble cytoplasmique. Lorsque les cellules sont en différenciation terminale au niveau des couches granuleuses, nous pouvons observer une augmentation de la quantité de ces protéines et une variation dans la localisation de ces récepteurs : en effet, ces protéines se retrouvent plutôt au niveau de la membrane des cellules granuleuses. Contrairement aux analyses par Northern blot in vitro, l'augmentation d'expression est moins nette pour HER3 que pour HER2 lorsque les cellules se différencient in vivo.



*Figure R.34* : test d'amplification d'un fragment de 1B15 sur lame. Les échantillons utilisés sont des ARNm-poly(A) extraits de cultures de cellules MDA-MB-231 à sous-confluence.

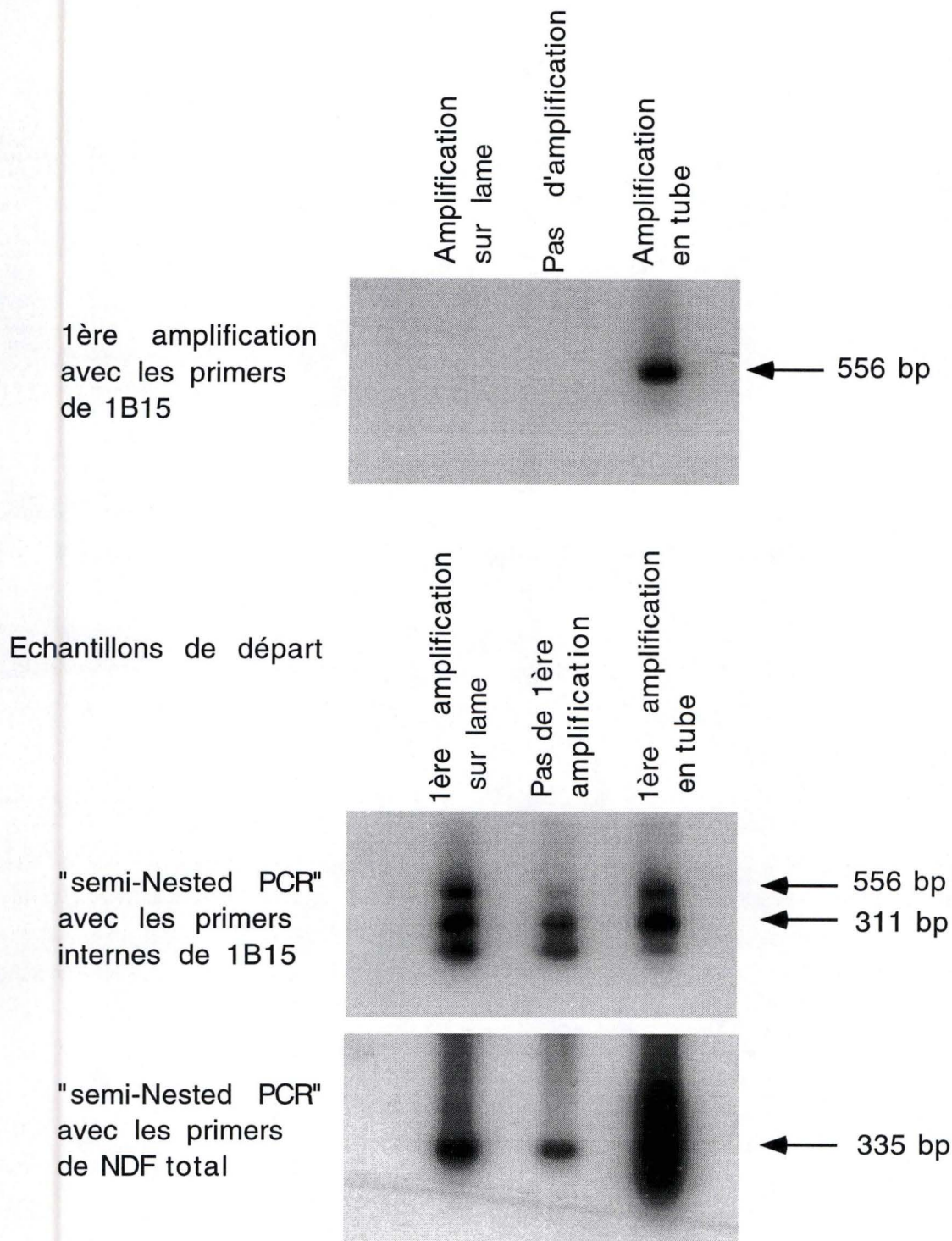


Figure R.35 : tests de détection d'une amplification sur lame par hybridation de Southern blots. Les échantillons utilisés sont des ARNm-poly(A) extraits de culture de cellules MDA-MB-231 à sous-confluence.

**a** : première amplification d'un fragment de 1B15.

**b** : seconde amplification avec les primers internes de 1B15 sur les échantillons décrits en **a**.

**c** : seconde amplification avec les primers de NDF total sur les échantillons décrits en **a**.

## 8. Détection des messagers sur des kératinocytes in vivo par la technique de RT-PCR in situ.

Nous pouvons conclure des hybridations in situ avec les sondes pour NDF et pour les HERs (aussi bien in vitro qu'in vivo) que le degré de sensibilité de cette technique est trop faible pour nous donner des informations claires et précises sur les variations d'expression de messagers peu synthétisés. C'est pour cette raison que nous avons tenté dans la dernière partie de notre travail, de mettre au point la technique de RT-PCR in situ. Avant d'aborder cette technique, nous avons établis différents tests pour s'assurer du fonctionnement de la technique et du matériel.

L'appareil utilisé est "In situ 1000 de Perkin-Elmer". Pour commencer, nous allons essayer de montrer qu'une amplification est possible dans cet environnement, sur une lame porte-objet, sous le clips et sa membrane de silicone. Pour cela, nous avons effectué l'étape de transcription réverse dans un tube, de la même façon que celle décrite dans le matériel et méthode pour la RT-PCR classique. La quantité de cDNA produite à ce niveau est divisée en deux. La moitié du matériel est ensuite amplifiée de manière classique dans un tube, tandis que l'autre moitié sera déposée sur une lame et amplifiée avec un programme identique. Les amorces utilisées sont spécifiques de 1B15 (h1B15-15S et h1B15-326A) et donnent après amplification un fragment de 311 bp. Le matériel résultant de cette amplification est testé par un gel d'agarose coloré au bromure d'éthidium. Aucune bande n'est visible au niveau de l'échantillon amplifié sur lame (figure R.34). Pour écarter l'hypothèse que la sensibilité limitée de la détection au bromure d'éthidium nous empêche de voir une amplification, même minime (en effet, pour la RT-PCR in situ, il n'est pas nécessaire de produire une amplification d'un million de fois du produit de départ, puisque la méthode de révélation devient sensible à partir 20 copies), nous avons réalisé une expérience semblable avec les primers spécifiques de 1B15 délimitant un fragment de 556 bp (h1B15-15S et h1B15-571A) suivie par une détection utilisant l'hybridation du Southern blot. Pour ce faire, nous avons amplifié en tube, et sur lame, tandis qu'une troisième partie du cDNA résultant de la transcription réverse est placée sur lame et conservée au frigo (nous conservons une partie du matériel au frigo dans le même environnement, pour obtenir un contrôle contenant le cDNA résultant de la transcription réverse et disponible pour amplification). Une partie des deux échantillons ayant subi l'amplification et de l'échantillon non amplifié est analysée sur un gel d'agarose 2%, puis transférée sur une membrane de nylon, comme décrit précédemment pour la détection par Southern blot. De cette façon, nous espérons détecter une amplification dans les échantillons amplifiés sur lame, la lame restée au frigo nous servant de témoin négatif (figure R.35a). Une autre partie des échantillons sera utilisée pour

servir de matériel de base pour une "semi-Nested PCR" réalisée en tube en présence de l'amorce sens (h1B15-15S) et d'une amorce anti-sens interne (h1B15-326A) nous donnant après amplification un fragment de 311 bp. En analysant les résultats, nous observons que la première amplification sur lame ne nous permet pas de détecter le moindre amplicon, même lorsque le temps d'exposition du film est allongé (résultats non montrés). Pour la "semi-Nested PCR", nous observons une amplification pour les trois échantillons nous donnant trois amplicons : un de 311 bp correspondant à l'amplification à partir des primers internes, un de 556 bp résultant d'une amplification parasite par une faible quantité de primers résiduelle de la première amplification et un amplicon plus petit que nous ne savons pas expliquer (figure R.35b). Pour l'échantillon n'ayant subi aucune amplification durant la première étape, nous observons un signal plus faible que celui obtenu pour l'échantillon amplifié une première fois sur lame. Selon ces résultats, nous pensons que les amplicons résultants de la seconde amplification proviennent en partie de l'élongation des amorces s'hybridant avec la petite quantité de cDNA du départ. Si à ce stade il est encore possible que le cDNA en faible quantité puisse servir de matrice pour la seconde amplification, nous devons observer une amplification sur les échantillons ayant subi la première PCR avec la amorces de 1B15 et en utilisant d'autres amorces pour la "semi-Nested PCR". Nous avons choisit de tester les amorces de NDF total (hNDF-257/217S et hNDF-590/550A) sur ces échantillons (figure R.35c). Comme attendu, cette expérience supplémentaire nous conforte dans l'idée qu'il n'y a pas d'amplification lorsque les échantillons sont déposés sur une lame puisque effectivement, la PCR effectuée avec les amorces de NDF total nous fourni un fragment attendu de 335 bp avec la même différence d'intensité du signal pour l'échantillon resté au frigo.

A ce stade, nous n'expliquons pas l'absence d'amplification observée quand les échantillons sont incubés sur lames. Cette question devra être résolue en préalable au développement de cette technique.



# **DISCUSSION GENERALE**

Dans ce travail, l'expression des isoformes de NDF et de ses récepteurs épidermiques par des kératinocytes a été analysée dans différentes conditions de culture et *in vivo*. L'analyse de l'expression de NDF *in vitro* via hybridation de Northern blots et marquage IHC révèle une diminution de cette expression parallèlement à une augmentation de l'expression de marqueurs de différenciation tels K1, K10 et l'involucrine. Cependant, nous ne pouvons pas déduire que la diminution d'expression de NDF est le résultat direct de la différenciation cellulaire puisqu'elle survient en l'absence d'expression des marqueurs K1 et K10. D'autres facteurs comme la densité cellulaire peuvent donc jouer dans cette régulation. L'étude des messagers par hybridation de Northern blots nous renseigne sur une moyenne des variations au sein de la population cellulaire en culture. Dans ce contexte, on observe que l'expression de la kératine basale 14 varie peu, même lorsque la culture commence à exprimer des marqueurs de différenciation. Deux hypothèses peuvent être posées pour expliquer ces résultats. Dans un premier cas, peu de cellules au sein de la culture confluente seraient en différenciation et la forte diminution de NDF qui accompagne l'augmentation d'expression de K10 concerne les cellules qui expriment K14 et dépend de facteurs tels que la densité cellulaire. La différenciation cellulaire et la régulation de l'expression de NDF seraient alors simplement deux phénomènes parallèles mais indépendants. Dans un second cas, les kératinocytes *in vitro* seraient capables de continuer à exprimer la kératine basale 14 tout en exprimant déjà les kératines suprabasales, contrairement à ce que l'on observe généralement *in vivo*. Dans ce cas, la différenciation cellulaire pourrait être le facteur régulant l'expression de NDF. Toutefois, les analyses morphologiques (IHC et HIS) de l'expression de K10 montrent une minorité de cellules impliquées dans cette expression, ce qui plaide contre cette deuxième hypothèse. L'effet de l'EGF sur l'expression de NDF pourrait jouer à deux niveaux. En effet, l'ajout d'EGF dans le milieu de culture retarde, d'une part l'apparition de marqueurs de différenciation, mais d'autre part l'EGF inhibe partiellement l'expression de NDF. Ces effets ne concordent pas avec une relation directe entre différenciation cellulaire et diminution de l'expression de NDF. De plus, l'augmentation des contacts cellulaires n'est probablement pas le seul facteur intervenant dans cette régulation puisque les cellules cultivées en présence d'EGF montrent des contacts moins étroits.

Cette régulation complexe de l'expression de NDF peut aussi expliquer les observations *in vivo* puisque, même au niveau de la couche basale l'IHC nous apprend que le NDF reste une protéine peu exprimée. Pour pouvoir tirer des conclusions sur la distribution de NDF dans l'épiderme *in vivo*, il serait intéressant de pouvoir analyser l'expression des messagers directement sur le lieu de leur production. Deux techniques sont alors à notre disposition : l'HIS et la ISRT-PCR. Cependant, la première technique ne semble pas suffisamment sensible pour pouvoir nous informer sur ce facteur peu exprimé, tandis que la méthode de PCR *in situ* n'est pas encore suffisamment mise au point pour nous renseigner.

Un autre point reste à discuter et concerne les variations des isoformes de NDF. En effet, Wen et al. (1994) ont précisé que les différentes isoformes ont une spécificité tissulaire. Dans

les kératinocytes *in vitro*, les deux grandes classes d'isoformes (NDF $\alpha$  et NDF $\beta$ ) sont exprimées de façon similaire lorsque les cellules sont en prolifération. Cependant, lorsque les cellules atteignent la confluence, les isoformes  $\alpha$  et  $\beta$  se comportent différemment. L'expression des isoformes  $\alpha$  reste assez constante, tandis que celle des isoformes  $\beta$ , et plus particulièrement  $\beta$ 1, diminue dans les cultures à confluence. L'isoforme  $\beta$ 3, une forme non membranaire de NDF, subit moins de variations. Cette dernière isoforme pourrait être une forme de stockage cellulaire du facteur (Wen et al., 1994) relarguée uniquement lors de blessures cutanées. En sachant que les isoformes  $\beta$  ont 10 fois plus d'affinité pour leur récepteur que les isoformes  $\alpha$  (Wen et al., 1994), nous pouvons proposer un modèle d'action. En effet, les isoformes  $\beta$  pourraient activer massivement les récepteurs tandis que les isoformes  $\alpha$  pourraient jouer un rôle d'activateurs légers, puisqu'ils ne sont capables pour une concentration identique que d'activer faiblement leurs récepteurs pendant une durée courte.

Parallèlement à l'étude de NDF, nous avons également analysé les variations concernant les deux unités (HER2/HER3) formant un récepteur à haute affinité pour NDF dans les kératinocytes (Sliwkowski et al., 1994). L'apparition de marqueurs de différenciation s'accompagne d'une augmentation d'expression de HER2 et HER3 aussi bien au niveau des messagers qu'au niveau des protéines. Cette augmentation est cependant moins importante pour HER2 qui est déjà exprimé dans les cellules en prolifération. De plus, l'ajout d'EGF dans le milieu de culture inhibe l'expression de HER3 aussi bien dans les cellules en prolifération que dans les cellules en différenciation, ce qui nous suggère que la différenciation cellulaire n'est pas le seul facteur influençant l'expression de HER3. Un autre facteur pouvant être candidat dans ce système de régulation est la densité cellulaire. Dans les cultures autonomes où les contacts cellulaires semblent favorisés, HER3 est bien exprimé. En présence d'EGF, les cellules montrent moins de contacts et le récepteur HER3 est peu exprimé. Ces observations pourraient expliquer que HER3 se trouve déjà exprimé dans la couche basale *in vivo*. L'EGF par ailleurs ne semble avoir un effet inhibiteur sur l'expression de HER2 que via l'inhibition de la différenciation cellulaire, puisqu'il ne montre pas de tel effet sur les cellules en prolifération. *In vivo*, l'augmentation d'expression des récepteurs HER2 s'accompagne essentiellement d'une redistribution de la protéine de la région cytoplasmique au niveau de la couche basale, vers une région plutôt membranaire dans la couche granuleuse. En comparant les observations réalisées *in vitro* et *in vivo*, nous pouvons émettre l'hypothèse que la régulation de l'expression de ces récepteurs est complexe et nécessite l'interaction de plusieurs facteurs. De plus, HER2 semble être exprimé de manière plus constante, tandis que HER3 pourrait être sous l'influence de différents facteurs permettant l'expression de ce récepteur uniquement lorsqu'il est nécessaire. Ce serait alors via cette sous-unité que la formation du dimère HER2/HER3 serait régulée.

En regroupant les informations obtenues sur NDF et sur ses récepteurs, nous pouvons envisager d'en tirer des explications sur le rôle de NDF au niveau cutané. Puisque les récepteurs HER2 et HER3 ne semblent exprimés simultanément qu'au niveau des couches épineuse supérieure et granuleuse, le NDF, peut-être produit au niveau de la couche basale, n'a

dès lors aucun effet sur les kératinocytes. Il peut toutefois agir de deux façons : soit par action paracrine (clivage de la protéine et diffusion de celle-ci jusqu'à son site cible situé dans les couches supérieures), soit par action juxtacrine (si le NDF reste membranaire jusqu'au niveau de la couche granuleuse). Il faut cependant envisager cette deuxième hypothèse avec prudence car le site de liaison de NDF au récepteur se trouve proche de son domaine transmembranaire et est donc difficilement accessible pour servir de ligand. Donc, l'hypothèse d'une action paracrine, déjà décrite pour d'autres ligands de récepteurs tyrosine kinases semble plus plausible.

Bien sûr, si NDF semble surtout avoir un effet sur les cellules des couches granuleuses, nous pouvons proposer que ce facteur joue un rôle dans la différenciation cellulaire *in vivo*. Cette hypothèse a déjà été posée par Danilenko et al. (1995) dans le cadre de leur travail sur la cicatrisation cellulaire. En effet, selon ces auteurs, le traitement d'une blessure cutanée avec le NDF active la migration des kératinocytes provenant des bords de cette blessure, permettant une réépithélialisation de la plaie par des kératinocytes ayant pourtant déjà entamé un processus de kératinisation. De plus, dans ces conditions, le NDF permet une kératinisation normale contrairement à l'EGF. Baudoux et al. (1996) ont montré que la présence de NDF dans le milieu de culture induit une augmentation de l'expression des intégrines, expliquant probablement l'augmentation de mobilité cellulaire. Mais Poumay et Pittelkow (sous presse) ont également montré que le NDF, tout comme l'EGF, avait un effet inhibiteur sur l'expression des kératines suprabasales. Ceci est à comparer avec les études menées par Marikovsky et al. (1995) qui définissent plutôt le NDF comme un facteur de prolifération clonogénique agissant en synergie avec d'autres facteurs tels que l'IGF-1 (Insulin-like Growth Factor-1) sur des kératinocytes de souris en culture. Poumay et Pittelkow (sous presse) n'ont pu montrer un effet semblable de NDF sur des kératinocytes humains en culture. Peut-être est-ce dû à une différence d'espèce puisque les kératinocytes de souris semblent déjà capables à sous-confluence de synthétiser les récepteurs permettant une action de NDF ?

Récemment, trois groupes (Meyer et Birchmeier, 1995; Gassman et al., 1995; Lee et al., 1995) ont mené des études sur des souris "knock-out" pour respectivement NDF, HER4 et HER2. Ces trois types de souris présentent des phénotypes embryonnaires semblables : des déficiences neurologiques et une malformation cardiaque. Cependant, aucune observation n'a pu être réalisée au niveau épidermique puisque ces souris "knock-out" ne dépassent pas le 11<sup>ème</sup> jour de gestation. Il serait intéressant de pouvoir obtenir des souris exprimant NDF de façon conditionnelle tout au long du développement embryonnaire (où ce facteur est essentiel pour le développement neural et cardiaque). Le gène pourrait alors être surexprimé ou sous-exprimé dans l'épiderme.

Selon nos expériences et la littérature, il est donc difficile de pouvoir tirer une conclusion sur l'effet cutané de NDF. Nous savons que l'EGF, malgré qu'il soit surtout décrit dans la littérature comme facteur de prolifération, peut également être un facteur de différenciation. En

effet, Cohen (1962) a décrit une accélération de l'ouverture des paupières et de l'éruption des incisives chez des souriceaux traités avec de l'EGF. Or, ces phénomènes nécessitent une différenciation cellulaire suffisante pour permettre à ces cellules d'être fonctionnelles. Par analogie, il n'est donc pas impossible de considérer NDF comme un facteur de prolifération et/ou de différenciation (double fonction déjà décrite par Wen et al., 1992) dont les modalités de fonction restent à préciser.

L'ensemble de ces résultats nous laisse encore beaucoup de questions en suspens. En effet, l'étude de l'expression de NDF *in vivo* nous fournit peu de renseignements puisque la technique d'HIS est trop peu sensible pour pouvoir détecter des variations de ce facteur au sein de l'épiderme. Pour pouvoir confirmer les résultats obtenus *in vitro*, il est indispensable de mettre au point la ISRT-PCR qui en augmentant la quantité de matériel disponible pour la reconnaissance par la sonde, pourrait augmenter la sensibilité de la méthode de détection. Cependant, il est peu probable que cette technique puisse mettre en évidence des régulations mineures de l'expression de NDF. En effet, de nombreux paramètres présents dans la technique peuvent influencer la quantité finale de NDF. De ce fait, la ISRT-PCR augmentera la sensibilité de l'HIS mais ne permettra probablement pas d'analyser une variation d'expression au sein de l'épiderme.

Une autre question qui reste posée est de pouvoir déterminer quelles sont les isoformes codées par les trois ARNm détectés par l'hybridation de Northern blots. En utilisant des sondes spécifiques des isoformes pour hybrider les Northern blots, il est alors possible de les distinguer.

Finalement, nous espérons pouvoir définir les rôles de NDF dans l'épiderme. Pour cela, deux pistes sont ouvertes. La première fait référence au rôle éventuel de NDF dans la prolifération cellulaire (Marikovsky et al., 1995). Cette étude pourrait être menée par l'analyse de l'expression de NDF dans des pathologies hyperprolifératives comme le psoriasis. Deuxièmement, le rôle de NDF dans la différenciation cellulaire (Danilenko et al., 1994) pourrait être étudié par l'analyse de l'expression de NDF au niveau de blessures et cicatrisations cutanées.

# **BIBLIOGRAPHIE**

- Banks-Schlegel, S., Green, H. Involucrin synthesis and tissue assembly by keratinocytes in natural and cultured human epithelia. *J. Cell. Biol.* **90** 732-737; 1981.
- Bargman, C. I., Hung, M-C., Weinberg, R. A. The neu oncogene encodes an epidermal growth factor receptor-related protein. *Nature* **319** 226-230; 1986.
- Baudoux, B., Pittelkow, M.R., Poumay, Y. Integrin expression in proliferating and differentiating epidermal keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **106** 872; 1996
- Baulida, J., Kraus, M.H., Alimandi, M., DiFiore, P. P. All erbB receptors other than the epidermal growth factor receptor are endocytosis impaired. *J. Biol. Chem.* **271** 5251-5257; 1996.
- Berger, M. S., Locher, G.N., Saurer, S., Gullick, W.J., Warrerfield, M.D., Groner, B., Hynes, N. E. Correlation of c-erbB-2 gene amplification and protein expression in human breast carcinoma with nodal status and nuclear grading. *Cancer Res.* **48** 1238; 1988.
- Block, B. L'hybridation in situ appliquée à la détection des ARN messagers. Situation actuelle en 1991 et perspectives. *Hybridation in situ*; Ed. Soc. Française de Microscopie Electronique 1-13; 1992.
- Boyce, S. T., Ham, R. G. Calcium-regulated differentiation of normal human epidermal keratinocytes in chemically defined clonal culture and serum-free serial culture. *J. Invest. Dermatol.* **81** 33s-40s; 1983.
- Byyny, R. L., Orth, D.N., Cohen, S. Radioimmunoassay of epidermal growth factor. *Endocrinology* **90** 1261; 1972.
- Cailleau, R., Olivé, M., and Criciger, Q. V. J. Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin : preliminary characterization. *In Vitro.* **14**, 1978.
- Cohen, S. Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *J. Biol. Chem.* **237** 1555; 1962.
- Cohen, S. Purification of the nerve-growth promoting protein from mouse salivary gland and its neurocytotoxic antiserum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **46** 302-311; 1960.
- Cook, P. W., Mattox, P.A., Keeble, W.W., Pittelkow, M.R., Plowman, G.D., Shoyab, M., Adelman, J.P., Shipley, G. D. A heparin sulfate-regulated human keratinocyte autocrine factor is similar or identical to amphiregulin. *Mol. Cell. Biol.* **11** 2547-2557; 1991.
- Coussens, L. Yang-Feng, T.L., Liao, Y-C, Chen, E., Gray, A., McGrath, J., Seeburg, P.H., Libermann T.A., Schlessinger, J., Francke, U., Levinson A., Ulrich A. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF Receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science* **230** 1132-1139; 1985.
- Danilenko, D.M., Ring, B.D., Lu, J.Z., Tarpley, J.E., Chang, D., Liu, N., Wen, D., Pierce, G.F. Neu differentiation factor upregulates epidermal migration and integrin expression in excisional wounds. *J. Clin. Invest.* **95** 842-851. 1995.
- Di Fiore, P. P., Pierce, J.H., Kraus, M.H., Segatto, O., King, C.R., Aaronson S.A. ERBB-2 is a potent oncogene when overexpressed NIH/3T3 cells. *Science* **237** 178-182; 1987.
- Eckert, Richard L. Structure, fonction and differentiation of the keratinocyte. *Physiol. Rev.* **69** 1316-1346; 1989.

- Elder, J. T. Transforming growth factor- $\alpha$  and related growth factors. Epidermal growth factors and cytokines. Ed. Marcel Dekker, Inc. 205-240; 1994.
- Elder, J. T., Fisher, G.J., Lindquist, P.B., Bennett, G.L., Pittelkow, M.R., Coffrey, R.J. Jr, Ellingsworth, L., Derynck, R.; Voorhees, J. J. Overexpression of transforming growth factor  $\alpha$  in psoriatic epidermis. *Science* **24** 3811-814; 1989.
- Falls, D. L., Rosen, K.M., Corfas, G., Lane, W.S. Fischbach G.D. ARIA a protein that stimulates acetylcholine receptor synthesis, is a member of neu ligand family. *Cell* **72** 801-815; 1993.
- Fuchs E, Chan Y., Paller, A, Yu, Q. Cracks in the foundation : keratin filaments and genetic disease. *Trends Cell Biol.* 4321-326; 1994.
- Garrod, D. R. Cell to cell and cell to matrix adhesion. *Br. Med. J.* **306** 703-705; 1993.
- Gassmann, M., Casagrande, F., Orioli, D., Simon, H., Lai, C., Klein, R., Lemke, G. Aberrant neural and cardiac development in mice lacking the ErbB4 neuregulin receptor. *Nature* **378** 390-394;1995.
- Haase, A. T., Retzel, E.F., Staskus, K. A. Amplification and detection of lentiviral DNA inside cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87** 4971-4975; 1990.
- Holbrook, K.A. Ultrastructure of the epidermis. *The keratinocyte handbook* Ed. Cambridge University Press 3-39; 1994.
- Holmes, W. E., Sliwkowski, M.X., Akita, R.W., Henzel, W.J., Lee, J., Park, J.W., Yansura, D., Abadi, N., Raab, H., Lewis, G.D., Shepard, H.M., Kuang, W.J., Wood, W.I., Goeddel, D.V., Vandlen, R. L. Identification of heregulin a specific activator of p185 erbB2. *Science* **256** 1205-1210; 1992.
- Hudziak, R. M. , Schlessing, J., Ullrich, A. Increased expression of the putative growth receptor p185/HER2 causes transformation and tumorigenesis of NIH 3T3 cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84** 7159-7163; 1987.
- King, L. E. Jr. What does epidermal growth factor do and how does it do it ? *J. Invest. Dermatol.* **84** 165-167; 1985.
- Kraus, M. K., Issing, W., Miki, T., Popescu, N.C. Aaronson, S. A. Isolation and characterization of erbB3, a third member of the erbB/epidermal growth factor family : evidence for overexpression in a subset of human mammary tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86** 9193-9197; 1989.
- Lee, K-F., Simon, H., Chen, H., Bates, B., Hung, M-C., Hauser, C. Requirement for neuregulin receptor erbB2 in neural and cardiac development. *Nature* **378** 394-398;1995.
- Longley, J., Merchant, M.A., Kacinski, B. M. In situ transcription and detection of CD1a mRNA in epidermal cells : an alternative to standard in situ hybridation techniques. *J. Invest Dermatol.* **93** 432-435; 1989.
- Luger, T. A., Schwarz, T. *Epidermal Growth factor and cytokines* Ed. Marcel Dekker, Inc. 1994.
- Maguire, H. C., Jaworsky, C, Cohen, J.A., Hellman, M., Weiner D.B., Greene, M. I. Distribution of neu(c-erbB-2) protein in human skin. *J. Invest. Dermatol.* **92** 786-790; 1989.



- Marchionni, M. A., Goodearl, D.J., Chen, M.S., Bermingham-McDonogh, O., Kirk, C., Hendricks, M., Danehy F., Misumi, D., Sudhalter, J., Kobayashi, K., Wroblewski, D., Lynch, C., Baldasse, M., Hiles, I., Davis, J.B., Hsuan, J.J., Totty, N.F., Otsu, M., McB, Gwynne D. Glial growth factor are alternatively spliced erbB2 ligands expressed in the nervous system. *Nature* **362** 312-318; 1993.
- Marikovsky, M., Lavi, S., Pinkas-Kramarshki, R., Karunagaran, D., Liu, N., Wen, D., Yarden, Y. ErbB-3 mediates differential mitogenic effects or NDF/hereregulin isoforms on mouse keratinocytes. *Oncogene* **10** 1403-1411; 1995.
- Moll, R., Franke, W.W., Schiller, D. L. The catalog of human cytokeratins : patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* **31** 11-24; 1982.
- Meyer, D., Birchmeier, C. Multiple essential functions of neuregulin in development. *Nature* **378** 386-390; 1995.
- Orr-Urtreger, A. Trakhtenbrot, L., Ben-Levy, R., Wen, D., Rechavi, G., Lonai, P., Yarden, Y. Neural expression and chromosomal mapping of neu differentiation factor to 8p12-p21. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90** 1867-1871; 1993.
- Peles, E. Ben-Levy, R., Tzahar, E., Liu, N., Wen, D.; Yarden, Y. Cell-type specific interaction of neu differentiation factor (NDF/hereregulin) with neu/HER-2 suggests complex ligand-receptor relationships. *EMBO J.* **12** 961-971; 1993.
- Peles, E., Bacus, S.S., Koski, R.A., Lu, H.S., Wen, D., Ogden, S.G., Levy, R.B., Yarden, Y. Isolation of the neu/HER-2 stimulatory ligand : a 44 kd glycoprotein that induces differentiation of mammary tumor cells. *Cell* **69** 205-216; 1992.
- Pittelkow, M. R. Growth factors and intracellular control mechanisms of keratinocytes and differentiation. *The biology of the epidermis.* 109-122; 1992.
- Pittelkow, M. R., Cook, P.W., Shipley, G.D., Derynck R., Coffey, R. J. Jr. Autonomous growth of human keratinocytes requires epidermal growth factor receptor occupancy. *Cell Growth & differentiation* **4** 513-521; 1993.
- Pledger, W. J., Stiles, CD, Antoniades H.N., Scher C.D. Induction of DNA synthesis in BALB/c 3T3 cells by serum components: reevaluation of the commitment process. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74** 4481-4485; 1977.
- Plowman, G. D., Green, J.M., Culouscou, J-M., Carlton, G.W., Rothwell, V.M., Buckley, S. Heregulin induces tyrosine phosphorylation of HER4/p180 erbB4. *Nature* **366** 473-475; 1993.
- Plowman, G. D., Whitney, G.S., Neubauer, M.G., Green, J.M., McDonald, V.L., Todaro, G.J., Shoyab, M. Molecular cloning and expression of an additional epidermal growth factor receptor-related gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87** 4905-4909; 1990.
- Poumay, Y., Pittelkow, M. R. Cell density and culture factors regulate keratinocyte commitment to differentiation and expression of suprabasal K1/K10 keratins. *J. Invest. Dermatol.* **104** 271-276; 1995.
- Press, M. Cordon-Cardo, C., Slamon, D. J. Expression of the HER-2/neu proto-oncogene in normal human adult and fetal tissues. *Oncogene* **5** 953-962; 1990.
- Pringent, S. A., Lemoine, N. R. The type 1 (EGFR-related) family of growth factor receptors and their ligands. *Progr. Growth Factor Res.* **41** 24; 1992.

- Rheinwald, J. G.; Green, H. Formation of a keratinizing epithelium in culture by a cloned cell line derived from a teratoma. *Cell* **6** 317-330; 1975.
- Salmon, D. J., Godolphin, W., Jones, L.A., Holt, J.A., Wong, S.G., Keith, D.E., Levin, W.J., Stuart, G.S., Udove, J., Ullrich, A., Press, M. F. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* **244** 707-712; 1989.
- Schechter, A. L., Stern, D.F., Vaidyathan, L., Decker, S.J., Drebin, J.A., Greene, M.I., Weinberg, R. A. The neu oncogene and erbB-2 related gene encoding a 185,000 Mr tumor antigen. *Nature* **312** 513-516; 1984.
- Semba, K. Kamata, N., Toyoshuma, K., Yamamoto, T. A v-erbB-related protooncogene c-erbB-2, is distinct from c-erbB-1/epidermal growth factor-receptor gene and is amplified in a human salivary gland adenocarcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82** 6497-6501; 1985.
- Shih, C., Padhy, L.C., Murray, M., Weinberg, R. A. Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts. *Nature* **290** 261-264; 1981.
- Slamon, D. J., Wong, G.M., Levib, W.J., Ullrich, A., McGuire, W. L. Human breast cancer : correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* **235** 177-182; 1987.
- Sliwowski, M. X., Schaefer G., Akita, R.W., Lofgrent, J.A., Fitzpatrick, V.D., Nuijens, A., Fendly, B.M., Cerionet, R.A., Vandlen, R.L., Carraway III, K. L. Coexpression of erbB2 and erbB3 proteins reconstitutes a high affinity receptor for heregulin. *J. Biol. Chem.* **269** 14661-14665; 1994.
- Sorkin, A., Carpenter, G. Interaction of activated EGF receptor with coated pit adaptins. *Science* **261** 612-615; 1993.
- Stern, D. F., Hefferman, P.A., Weinberg, R. A. p185, a product of the new proto-oncogene, is a receptorlike protein associated with tyrosine kinase activity. *Mol. Cell. Biol.* **61** 729-1740; 1986.
- Stock, J. Receptor signaling: dimerization and beyond. *Curr. Biol.* **6** 825-827; 1996.
- Tecott, LH Barchas, J.D., Eberwine, J. H. In situ transcription : specific synthesis of complementary DNA in fixed tissue sections. *Science* **240** 1661-1664; 1988.
- Todaro, G. J., Green, H. Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J. Cell Biol.* **17** 299-313; 1963.
- van der Blik, A. M., Redelmeier, T.E., Damke, H., Tisdale, E.J., Meyerowitz, E.M., Schmid, S. L. Mutations in human dynamin block an intermediate stage in coated vesicle formation. *J. Cell Biol.* **122** 553-563; 1993.
- Wang, Z., Moran M.F. Requirement for the adapter protein GRB2 in EGF receptor endocytosis. *Science* **272** 1935-1939; 1996.
- Wen, D. Peles, E., Cupples, C., Suggs, S.V., Bacus, S.S., Luo, Y., Trail, G., Hu, S., Silbiger, S.M., Levy, R.B., Koski, R.A., Lu, H.S., Yarden, Y. Neu differentiation factor : a transmembrane glycoprotein containing an EGF domain and an immunoglobulin homology unit. *Cell* **69** 559-572; 1992.

Wen, D. Suggs S.V., Karunakaran, 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., Koski, R.A., Yarden, Y. Structural and functional aspects of the multiplicity of neu differentiation factors. *Mol. Cell. Biol.* **14** 1909-1919; 1994.

Wright, C. Angus, B., Nicholson, S., Sainsbury, R.C., Cairns, J., Gullick, W.J., Harris, A.L., Horne, C. H. W. Expression of c-erbB-2 oncoprotein : a prognostic indicator in human breast cancer. *Cancer Res.* **49** 2087-2090; 1989.