

# **UNIVERSITE DE LIMOGES**

**ECOLE DOCTORALE n°258 : Science – Technologie – Santé**

**Faculté de PHARMACIE**

**Année : 2009**

**Thèse N°**

## **THESE**

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES**

**Discipline / Spécialité : Biologie Cellulaire et Biologie Moléculaire**

présentée et soutenue par

**Ludovic MICALLEF**

le 18 Mars 2009

**Effets du calcium extracellulaire sur la mise en place du processus de différenciation kératinocytaire. Etude comparative entre des kératinocytes normaux humains et la lignée cellulaire HaCaT.**

**Thèse dirigée en co-tutelle par : - Mme Christiane DELAGE, Professeur**

**- M. Alain SIMON, Maître de Conférences**

### **JURY :**

M. le Docteur Michel SIMON	Rapporteur
M. le Docteur Patrick BOGDANOWICZ	Rapporteur
Mme le Professeur Christiane DELAGE	Examineur
M. le Professeur Jean-Luc DUROUX	Président
M. le Docteur Serge BATTU	Membre invité
M. le Docteur Alain SIMON	Membre Invité

# UNIVERSITE DE LIMOGES

## Faculté de Pharmacie

DOYEN DE LA FACULTE : Monsieur COMBY Francis, Maître de Conférences  
ASSESSEURS : Madame FAGNERE Catherine, Maître de Conférences  
Monsieur le Professeur CARDOT Philippe

### PROFESSEURS :

BENEYTOUT Jean-Louis	BIOCHIMIE
BOTINEAU Michel	BOTANIQUE et CRYPTOLOGAMIE
BROSSARD Claude	PHARMACIE GALENIQUE
BUXERAUD Jacques	CHIMIE ORGANIQUE
	CHIMIE THERAPEUTIQUE
CARDOT Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE et BROMATOLOGIE
CHULIA Albert	PHARMACOGNOSIE
CHULIA Dominique	PHARMACIE GALENIQUE
DELAGE Christiane	CHIMIE GENERALE et MINERALE
DESMOULIERE Alexis	PHYSIOLOGIE
DREYFUSS Gilles	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE
DUROUX Jean-Luc	BIOPHYSIQUE et MATHEMATIQUES
LACHATRE Gérard	TOXICOLOGIE
MOESCH Christian	HYGIENE et SANTE PUBLIQUE
OUDART Nicole	PHARMACOLOGIE
ROGEZ Sylvie	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE

SECRETAIRE GENERAL DE LA FACULTE - CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS

Madame ROCHE Doriane

## **Remerciements**

### **A Madame le professeur Christiane DELAGE**

Chère Christiane,

Je vous remercie de m'avoir accueilli au sein de votre laboratoire et ainsi pu me permettre de réaliser cette thèse dans les meilleures conditions. Soyez assurée, Christiane, de toute mon estime et de mon profond respect.

### **A Monsieur Alain Simon**

Je tiens à te remercier pour ton implication dans ce travail de thèse, pour ton aide, ta disponibilité, tes nombreux conseils et ton soutien. Sois assuré, Alain, de tout mon respect, de ma profonde gratitude et de toute mon amitié.

### **A Monsieur le Professeur Jean-Luc DUROUX**

Je suis particulièrement honoré que « le chef » de l'équipe EA4021, biomolécules et thérapies anti-tumorales, ait accepté sans réserve d'être le président de mon jury de thèse. Sois assuré de ma gratitude et de toute mon estime.

### **A Monsieur Michel SIMON**

Je suis très touché de l'honneur que vous me faites en acceptant de juger ce travail et d'en être le rapporteur. Veuillez recevoir mes plus sincères remerciements pour votre présence dans ce jury.

### **A Monsieur Patrick BOGDANOWICZ**

Je suis très heureux que vous ayez accepté d'être le rapporteur de ce mémoire. Veuillez trouver ici l'expression de ma plus profonde reconnaissance.

### **A Monsieur Serge BATTU**

Je tiens à te témoigner toute ma reconnaissance pour le travail que nous avons réalisé en commun. Je te remercie également pour tous ces bons moments passés en dehors de la faculté, pour ton enthousiasme et ta bonne humeur. Je suis très heureux que tu fasses partie de ce jury de thèse. Sois assuré de mon profond respect et de mon amitié sincère.

### **A l'équipe de Biologie Cellulaire Cutanée - PFDC**

Je tiens tout d'abord à remercier **Mme Marie Charveron** pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et ainsi permettre la mise en place de notre collaboration.

Mes remerciements vont tout particulièrement à **Mme Françoise Belaubre**, qui est à l'origine de la mise en place de mon travail de thèse. Chère Françoise, tes conseils m'auront été d'une aide très précieuse. Ce fut un plaisir pour moi de travailler avec toi.

Bien évidemment, je n'oublie pas les très bons moments passés avec le reste de l'équipe. Un très grand merci à mes deux acolytes thésards de l'époque, **Bruno et Alexis** (un jour viendra ou les 3T se reformeront), ainsi qu'à **Séverine, Marie-Jo, Clémence, Caroline, Marie-Françoise, Nathalie**, sans oublier « les » **Isa** et « les » **Hélène**. Merci à tous pour l'année passée à vos côtés !!!

### **A Mademoiselle Aline PINON**

Merci pour tous les services que tu m'as rendu durant ma thèse. Ton aide m'aura été très précieuse. Et merci d'avoir supporté, sans jamais crier, mes sautes d'humeur.

### **A Madame Jeanne COOK-MOREAU**

Je tiens à t'exprimer ma reconnaissance pour ta disponibilité à corriger et re-corriger mon anglais. Sois assurée, chère Jenny, de toute ma gratitude, de mon profond respect et de ma sympathie.

### **A Madame Chantal JAYAT-VIGNOLES**

Je t'adresse mes plus sincères remerciements pour ta bonne humeur, ton dévouement, tes conseils et tes compétences en cytométrie de flux.

- Ces travaux de recherche ont été réalisés grâce à l'obtention d'une bourse FSE attribuée par le conseil général du Limousin.

### **A mes amis et proches**

Tout d'abord, un grand merci à **Yves**, alias le grand Molnes, pour ta sympathie à mon égard et tes encouragements quotidiens. Un grand merci également à **Bertrand**, l'homme qui a su rester enfant, et à son jeune padawan **David**, dit Flave Flege. N'oublie pas de passer dans le bureau de Bertand ! En tout cas, ne vous inquiétez pas les gars : un jour Lyon Monaco et Bordeaux évolueront en L2 !

Mes remerciements vont également à tous mes camarades dont j'ai fait la connaissance au laboratoire : **Patrice, Laurent** ( à quand Smackdown à Limoges ?) **Carine, Aurélie, les Clems, Youness**.

Une spéciale dédicace à tous les potos du Bled : **Max, Audrey et Tote ; Jacks et Mel ; Francis et Vir ; Guyr, Karini, Maelle et Pladipe ; Régis et Marie ; Smith et Sandy ; Gus et Joëlle ; Molly et Sophie ; La Chane et Alex ; Fred et Pascale, Steff et Caro ; Rono et Vir ; Nico et enfin Patrick**. Une pensée particulière pour **Vince** : tu nous manques à tous. Repose en paix.

### **A ma Famille**

Un très grand merci à **mes parents** qui ont toujours cru en moi et qui ont toujours été présents dans les meilleurs moments, comme dans les plus difficiles. Je remercie également **Gilles et Ghislaine** pour le bonheur quotidien que vous leur apportez.

Enfin, je remercie **Lynda**, ma chérie à moi, pour son amour, son soutien, sa générosité et sa présence au quotidien à mes cotés.

# Sommaire

<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>8</b>
<b>ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>10</b>
<b>La peau.....</b>	<b>10</b>
<b>I. L'hypoderme.....</b>	<b>11</b>
<b>II. Le derme .....</b>	<b>12</b>
II.1. Les cellules du derme.....	13
II.2. La matrice extracellulaire.....	13
II.2.1. Les protéoglycannes .....	13
II.2.2. Les composants fibreux .....	14
II.2.3. Les glycoprotéines de structure .....	14
<b>III. La jonction dermo-épidermique.....</b>	<b>14</b>
<b>IV. L'épiderme .....</b>	<b>17</b>
IV.1. Les kératinocytes et la synthèse de kératine .....	17
IV.1.1. La synthèse de la kératine .....	18
IV.2 Les mélanocytes .....	20
IV.3. Les cellules de Langerhans.....	21
IV.4. Les cellules de Merkel.....	22
<b>V. Caractéristiques des couches épidermiques.....</b>	<b>22</b>
V.1. Les jonctions cellule/cellule dans l'épiderme .....	22
V.1.1. Les jonctions imperméables .....	23
V.1.2. Les jonctions communicantes.....	24
V.1.3. Les jonctions d'adhésion .....	25
V.1.3.1. Le desmosome.....	25
V.1.3.2. Les jonctions <i>adherens</i> .....	26
V.2. La couche basale .....	28
V.2.1. De la cellule souche à la cellule amplificatrice transitoire .....	28
V.2.2 Caractéristiques protéiques des cellules de la couche basale .....	29
V.2.2.1. Les kératines.....	29
V.2.2.2. Les intégrines .....	30
V.3. La couche épineuse.....	31
V.4. La couche granuleuse.....	32
V.4.1. Les grains de kératohyaline et les corps lamellaires.....	32
V.5. La couche cornée .....	33
<b>La différenciation épidermique .....</b>	<b>36</b>
<b>I. La régulation génique.....</b>	<b>36</b>
<b>II. L'involucrine .....</b>	<b>38</b>

<b>III. La lorricrine.....</b>	<b>41</b>
<b>IV. Les small proline rich proteins .....</b>	<b>43</b>
<b>V. La filaggrine.....</b>	<b>46</b>
<b>VI. La trichohyaline .....</b>	<b>49</b>
<b>VII. Les protéines S100.....</b>	<b>51</b>
<b>VIII. Les transglutaminases .....</b>	<b>56</b>
<b>IX. Le métabolisme lipidique dans la différenciation kératinocytaire .....</b>	<b>61</b>
IX.1. Les constituants lipidiques de la couche cornée .....	62
IX.1.1. Les céramides.....	62
IX.1.2. Le cholestérol et le sulfate de cholestérol .....	63
IX.1.3. Les acides gras .....	64
<b>Cycle cellulaire, apoptose et différenciation épidermique .....</b>	<b>65</b>
<b>I. La régulation du cycle cellulaire .....</b>	<b>65</b>
I.1. Les complexes Cdk / cycline.....	66
I.2. Les inhibiteurs physiologiques des Cdks : les CKIs.....	68
I.2.1. La famille des Cip/Kip.....	68
I.2.2. La famille des INK4.....	69
I.3. Le point de restriction et la transition G1→S.....	69
I.4. Régulation moléculaire des points de surveillance du cycle cellulaire .....	70
I.4.1. Les kinases phosphatidylinositols-dépendantes .....	70
I.4.2. Les protéines kinases Chk1 et Chk2 .....	71
I.4.3. La phosphatase Cdc25A et la voie p53-p21 dans le point de surveillance G1-S.....	72
I.4.4. La phosphatase Cdc25C et la protéine p53 dans le point de surveillance G2-M.....	72
I.5. La complexité du cycle cellulaire.....	73
<b>II. L'apoptose.....</b>	<b>74</b>
II.1. Voies et mécanismes généraux du processus apoptotique .....	75
II.2. Stimulation du programme apoptotique kératinocytaire.....	76
II.3. Les voies de survie (antiapoptotique).....	78
II.4. L'apoptose, l'homéostasie épidermique et la formation de la couche cornée.....	79
II.5. L'apoptose en tant que mécanisme de défense contre le cancer : rôle de p53 .....	81
II.6. Rôle de p21 dans le processus apoptotique.....	81
II.7. Apoptose et différenciation kératinocytaire : deux processus distincts.....	82
II.8. Apoptose ou différenciation : rôle de p63.....	84
<b>Les agents inducteurs de la différenciation kératinocytaire .....</b>	<b>88</b>
<b>I. Le calcium .....</b>	<b>88</b>
I.1. Effets du calcium extracellulaire sur la culture de kératinocytes .....	88
I.2. Effets du calcium sur la différenciation épidermique <i>in vivo</i> .....	89
I.3. La signalisation calcique dans le kératinocyte .....	90
I.3.1. Rôle du récepteur au calcium.....	90
I.3.2. Les canaux calciques.....	93
<b>II. La vitamine D<sub>3</sub>.....</b>	<b>94</b>
II.1. Production épidermique de la vitamine D <sub>3</sub> .....	94
II.2. Interactions de 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> et du Ca <sup>2+</sup> .....	95
II.3. Le récepteur à la vitamine D et ses coactivateurs .....	96

<b>III. Les rétinoïdes .....</b>	<b>98</b>
<b>IV. Les facteurs de croissance .....</b>	<b>100</b>
IV.1. Le récepteur à l'EGF : EGFR .....	101
IV.1.1. L'activation d'EGFR s'effectue <i>via</i> divers mécanismes .....	101
IV.1.2. Evènements moléculaires et fonctions cellulaires qui impliquent EGFR .....	103
IV.1.2.1. Survie cellulaire et protection de l'apoptose .....	104
IV.1.2.2. EGFR est responsable de la stimulation mitogénique.....	104
IV.1.2.3. Rôle de EGFR dans l'adhésion et la migration cellulaire .....	105
IV.2. Signalisation induite par TGF- $\beta$ .....	106
<b>V. Les PPARs.....</b>	<b>107</b>
<b>La différenciation kératinocytaire <i>in vitro</i> .....</b>	<b>110</b>
<b>I. Les modèles de culture primaire de kératinocytes .....</b>	<b>110</b>
I.1. Le modèle de culture de Rheinwald et Green.....	110
I.2. Le modèle de culture de Boyce et Ham.....	111
I.3. Le modèle de culture en condition autocrine.....	111
I.4. Le modèle de culture avec une interface air-liquide.....	112
<b>II. La lignée cellulaire HaCaT.....</b>	<b>112</b>
II.1. Processus d'immortalisation conduisant à l'établissement de la lignée HaCaT .....	113
II.2. Les causes de l'immortalisation spontanée .....	114
<b>MATERIELS ET METHODES.....</b>	<b>116</b>
<b>I. Culture cellulaire.....</b>	<b>116</b>
I.1. Milieu de culture et solutions utilisés .....	116
I.2. Les kératinocytes normaux humains .....	117
I.3. La lignée cellulaire HaCaT .....	118
I.4. Entretien cellulaire et ensemencement .....	118
<b>II. Techniques pour l'étude de la prolifération cellulaire .....</b>	<b>119</b>
II.1. Comptage cellulaire par la technique du bleu trypan .....	119
II.2. Technique du MTT .....	119
<b>III. Analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux (CMF).....</b>	<b>120</b>
<b>IV. Etude de l'expression génique par la technique de Rétrotranscription - Réaction de Polymérisation en Chaîne semi-quantitative en temps réel (RT-PCR) .....</b>	<b>121</b>
IV.1. Extraction des ARN totaux .....	122
IV.2. Analyse et dosage des ARN totaux .....	122
IV.3. Rétro-transcription des ARNm .....	123
IV.4. PCR semi-quantitative en temps réel.....	123



IV.5. Quantification relative des gènes d'intérêts .....	127
IV.6. Analyse statistique .....	127
<b>V. Etude de l'expression protéique par la technique du Western Blot.....</b>	<b>128</b>
V.1. Préparation des échantillons protéiques .....	128
V.2. Dosage protéique des extraits cellulaires.....	129
V.3. Préparation et dénaturation des échantillons protéiques .....	129
V.4. Migration par électrophorèse des protéines sur gel de polyacrylamide.....	129
V.5. Transfert des protéines sur membrane de PVDF.....	129
V.6. Marquage de la membrane avec les anticorps primaires et secondaires .....	130
V.7. Révélation par réaction de chimiluminescence.....	130
<b>VI. Fractionnement par couplage flux-force de sédimentation (SdFFF) de la lignée HaCaT</b>	<b>131</b>
VI.1. Principe de la SdFFF .....	131
VI.2. Tri de populations cellulaires différenciées par SdFFF .....	134
<b>RESULTATS .....</b>	<b>136</b>
<b>Rappel des objectifs .....</b>	<b>136</b>
<b>I. Effets du Ca<sup>2+</sup> sur les cellules KNHs et HaCaT : Etude comparative .....</b>	<b>136</b>
<b>I.1. Prolifération cellulaire et changements morphologiques.....</b>	<b>136</b>
I.1.1. Prolifération cellulaire .....	137
I.1.2. Changements morphologiques .....	138
<b>I.2. Répartition des cellules dans le cycle cellulaire.....</b>	<b>140</b>
<b>I.3. Analyse de l'expression génique .....</b>	<b>142</b>
I.3.1 Expression de marqueurs de la différenciation kératinocytaire.....	142
I.3.1.1. Kératines K1, K10 et involucrine.....	142
I.3.1.2. Filaggrine et transglutaminase-1 .....	146
I.3.2. Expression de la Kératine 5 .....	149
I.3.3. Expression de p21.....	150
I.3.4. Expression des isoformes PPARs.....	151
I.3.4.1. PPAR $\alpha$ .....	152
I.3.4.2. PPAR $\beta/\delta$ .....	152
I.3.4.3. PPAR $\gamma$ .....	153
I.3.5. Expression de gènes impliqués dans le métabolisme lipidique .....	155
I.3.5.1. DEGS2 .....	155
I.3.5.2. ABCG1.....	157
I.3.5.3. FATP4, ABCD1 et ADRP .....	158
I.3.5.4. FIAF .....	162
<b>I.4. Expression protéique de marqueurs de différenciation .....</b>	<b>164</b>
I.4.1. Kératines K1 et K10 .....	164

I.4.2. Involucrine.....	166
<b>II. Fractionnement par SdFFF de la lignée HaCaT.....</b>	<b>168</b>
<b>II.1. Profil d'élution et fractionnement des cellules HaCaT .....</b>	<b>168</b>
<b>II.2. Activité proliférative après fractionnement par SdFFF .....</b>	<b>170</b>
<b>II.3. Expression génique de marqueurs de différenciation (K1, K10, involucrine et TG-1) après fractionnement par SdFFF .....</b>	<b>171</b>
II.3.1. Expression des kératines K1 et K10.....	172
II.3.2. Expression de l'involucrine et de la transglutaminase-1 .....	172
<b>II.4. Répartition des cellules dans le cycle cellulaire après SdFFF .....</b>	<b>173</b>
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>175</b>
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>190</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>193</b>
<b>ABREVIATIONS .....</b>	<b>221</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>226</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>	<b>228</b>

# INTRODUCTION

Ce travail de thèse a été effectué à la Faculté de Pharmacie de Limoges, au sein de l'équipe de recherche EA 4021 « Biomolécules et thérapies anti-tumorales ». Une partie de ce travail a également été réalisée en collaboration avec le laboratoire de biologie cellulaire cutanée de l'Institut de Recherche Pierre Fabre, situé à Toulouse. Dans le cadre de nos travaux, nous avons étudié les effets du calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) sur la mise en place du processus de différenciation kératinocytaire *in vitro*, en utilisant d'une part, des kératinocytes normaux humains (KNHs), et d'autre part, la lignée cellulaire HaCaT, issue de kératinocytes humains spontanément immortalisés.

L'épiderme est la couche superficielle de la peau. Il se compose majoritairement de kératinocytes. L'épiderme s'organise en plusieurs couches cellulaires ayant des caractéristiques différentes en fonction de l'état d'avancement de la différenciation cellulaire. *In vitro*, les kératinocytes normaux humains prolifèrent et se différencient : une concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire supérieure à 0,1 mM va initier une cascade d'évènements dans laquelle les kératinocytes en culture vont progresser d'un état prolifératif vers un état différencié. Ce dernier se caractérise, entre autre, par l'apparition de changements morphologiques tels que la formation de desmosomes et de jonctions adhérentes, la stratification ou encore l'apparition de squames cellulaires. Cette transformation entraîne la mise en place d'un épithélium squameux, organisé et stratifié. Ces changements structuraux s'accompagnent, de manière concomitante, d'une diminution de la prolifération cellulaire, d'un arrêt progressif du cycle cellulaire en phase G0-G1, et de l'induction de l'expression de marqueurs de différenciation, telles que les kératines 1 et 10, l'involucrine, la transglutaminase-1 ou encore la filaggrine. Certaines maladies de peau, dont le psoriasis, l'ichtyose vulgaire mais aussi certains cancers et le vieillissement cutané, sont étroitement liés aux dérèglements des processus de prolifération et de différenciation épidermique.

Afin d'élucider ces évènements impliqués dans le contrôle de la prolifération et de la différenciation épidermique, les kératinocytes primaires humains, cultivés dans un milieu approprié, constituent un modèle expérimental idéal. Cependant leur utilisation est limitée par la complexité de leur mise en culture, tel que l'obtention difficile de résectats de peau humaine, un temps de croissance lent et la présence en co-culture de fibroblastes. Pour palier à ces inconvénients, la lignée cellulaire HaCaT, issue de kératinocytes humains spontanément immortalisés, est quelquefois utilisée comme modèle d'étude des fonctions kératinocytaires *in vitro*. En effet, cette lignée est capable de se différencier et de mettre en place une organisation épidermique *in vitro*. Elle exprime également les marqueurs majeurs de la différenciation et possède des activités fonctionnelles caractéristiques de

kératinocytes isolés. En revanche, à cause de son immortalisation, nous avons cherché à savoir si la lignée HaCaT pouvait être réellement considérée comme un modèle de kératinocytes, et ceci afin d'étudier *in vitro* les événements impliqués dans la prolifération et la différenciation kératinocytaire.

Pour cela, nous avons effectué une étude comparative entre des KNHs et la lignée cellulaire HaCaT visant à caractériser le passage d'un état prolifératif vers un état différencié. Afin d'induire la différenciation, du calcium est ajouté dans le milieu de culture à une concentration finale de 1,2 mM. Dans cette étude, pour les deux types cellulaires, nous avons comparé, en utilisant des conditions de culture strictement identiques, la prolifération, la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire, ainsi que l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la mise en place du processus de différenciation. Les résultats obtenus avec la lignée HaCaT nous ont entraîné à utiliser une technique apparentée à la chromatographie liquide, la SdFFF (*Sedimentation Field Flow Fractionation*). Cette technique nous a permis de fractionner un « pool total » de cellules HaCaT cultivées en présence de  $\text{Ca}^{2+}$  et d'analyser dans les différentes fractions obtenues, la prolifération, le cycle cellulaire et l'expression de marqueurs de différenciation.

Préalablement à la partie expérimentale, l'étude bibliographique que nous avons effectuée se divise en cinq grandes parties. Après avoir présenté des généralités sur la peau et plus particulièrement sur l'épiderme, nous avons caractérisé le « complexe de différenciation épidermique ». Nous avons ensuite abordé la différenciation kératinocytaire *in vitro*, puis le cycle cellulaire et l'apoptose. Enfin, nous avons décrit certains facteurs primordiaux dans le mécanisme de différenciation épidermique.

# ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

## La peau

La peau, appelée aussi tégument (du latin *tegumentum*, couverture), constitue le revêtement du corps humain. C'est l'organe le plus lourd et le plus étendu, pesant 4 kg pour une surface de 2 m<sup>2</sup>. Son épaisseur, de 2 mm en moyenne, varie en fonction de la région corporelle. Elle est de 1 mm au niveau des paupières et peut atteindre 3 à 4 mm au niveau de la paume des mains et de la plante des pieds.

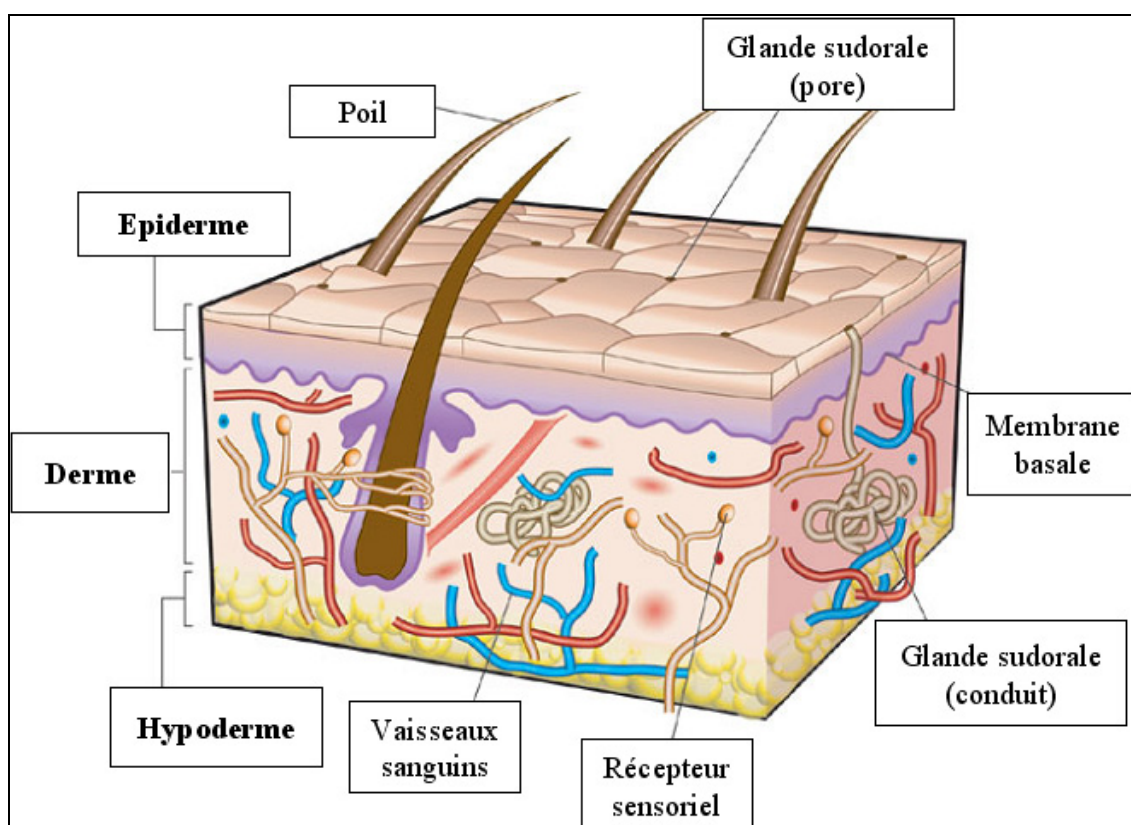
La peau provient de 2 feuillets embryonnaires différents :

- Le mésoderme, de nature conjonctive, à l'origine du derme et de l'hypoderme.
- L'ectoderme, à l'origine de l'épiderme et des annexes cutanées (ongles, poils, glandes sébacées et sudoripares).

La peau est donc un organe complexe et loin d'être une enveloppe inerte. Ses fonctions sont multiples :

- Elle constitue une **barrière de protection** pour les tissus et organes sous-jacents contre les agressions extérieures, empêchant la pénétration de micro-organismes et freinant l'entrée de produits toxiques. Sa capacité à absorber les radiations lui permet aussi de protéger l'organisme des rayons du soleil. Elle évite également les pertes de fluides corporels.
- Elle intervient dans la **perception**. La peau possède toute une panoplie de récepteurs sensoriels qui répondent à différents stimuli comme le toucher, le contact, les variations de température ou la douleur.
- Elle a un rôle dans la **thermorégulation** en protégeant l'organisme de la chaleur et du froid.
- Elle est dotée d'une **fonction immunologique**, assurée en premier lieu par les cellules de Langerhans.
- Elle possède une **fonction métabolique**, notamment par la synthèse de vitamine D et de la mélanine, ou encore par le stockage de triglycérides.

La peau se compose de trois tissus superposés. On retrouve, en partant de la couche la plus profonde et en remontant vers la surface : l'hypoderme, le derme et enfin l'épiderme (Figure 1).



**Figure 1** : Représentation schématique de la peau normale humaine.

*Repris et modifié d'après (MacNeil, 2007).*

## I. L'hypoderme

L'hypoderme est le compartiment le plus profond de la peau. Bien qu'il ne fasse pas véritablement partie de la peau, l'hypoderme est en interaction fonctionnelle avec la peau et il lui permet ainsi d'assurer certaines de ses fonctions de protection.

Il est essentiellement constitué d'adipocytes, cellules riches en acides gras et triglycérides. Les adipocytes sont spécialisés dans l'accumulation et le stockage des graisses, assurant une fonction de thermorégulation de l'hypoderme. Les adipocytes s'organisent en lobules primaires et secondaires et leur morphologie varie en fonction de la région du corps. Ils forment ainsi le tissu adipeux qui protège mécaniquement les os et les muscles sous-jacents en jouant un rôle d'amortisseur. Les graisses contenues dans les adipocytes peuvent être remises en circulation, *via* la voie veineuse. Lors d'une déficience en apport énergétique ou d'un effort intense, les graisses vont être transformées en énergie.

On retrouve dans l'hypoderme la présence de fibroblastes, de macrophages, de vaisseaux sanguins et de terminaisons nerveuses. Ces dernières sont aussi appelées corpuscules de Pacini ou corpuscules lamellaires et sont sensibles à la pression.

L'hypoderme contient également des glandes sudoripares impliquées dans la fabrication de la sueur, dont la sécrétion s'effectue par les canaux sudorifères.

Enfin, ce compartiment s'invagine dans le derme auquel il est rattaché par des fibres de collagène et d'élastine.

## **II. Le derme**

Le derme se définit comme un tissu conjonctif dense, compressible et élastique, constituant le support solide de la peau. Son épaisseur est variable selon les régions corporelles et varie entre 1 et 4 mm. Comme pour tout tissu conjonctif, ses fonctions métaboliques sont importantes. Outre son rôle nutritif pour l'épiderme, le derme est également impliqué dans la cicatrisation, ainsi que dans l'élimination de produits toxiques. Il renferme le système vasculaire de la peau et joue également un rôle important dans la thermorégulation. On y trouve également des fibres nerveuses et des récepteurs sensoriels. Le derme est constitué de structures fibreuses ainsi que d'une sorte de « gel », la substance fondamentale, le tout contribuant à la formation de la matrice extracellulaire. Il se divise en deux zones : le derme papillaire et le derme réticulaire.

**Le derme papillaire :** il se situe à la jonction dermo-épidermique et constitue le cinquième de l'épaisseur du derme. Il tient son nom de sa surface en papilles, formant les « papilles dermiques », qui servent à accroître l'adhésion et les échanges avec les couches profondes de l'épiderme. Le derme papillaire est très vascularisé, caractérisé par les anses capillaires. Il est riche en fines fibres de collagène entrelacées et orientées perpendiculairement à l'épiderme. Le réseau de fibres élastiques est également vertical. Cette zone renferme aussi des terminaisons nerveuses libres servant de récepteurs sensoriels. La présence de corpuscules de Meissner, récepteurs sensoriels spécifiques du tact, constitue aussi une caractéristique du derme papillaire.

**Le derme réticulaire :** il représente la majeure partie du derme. A ce niveau, les fibres de collagène sont disposées en faisceaux épais et irréguliers horizontalement par rapport à la surface de la peau, et forme un tissu conjonctif plus dense. Le derme réticulaire est moins riche en cellules que le derme papillaire. On y trouve cependant des corpuscules nerveux de la sensibilité tels que les corpuscules de Pacini, ainsi qu'une importante vascularisation. Entre les fibres, les espaces sont occupés par des follicules pileux, mais aussi par des glandes sudoripares et sébacées, respectivement responsables de la sécrétion de la sueur et du sébum.

## **II.1. Les cellules du derme**

**Les fibroblastes** sont les cellules majoritaires du derme. D'origine mésenchymateuse, les fibroblastes sont des cellules de grande taille (longues de 20 à 30  $\mu\text{m}$  et larges de 5 à 10  $\mu\text{m}$ ), fusiformes, caractérisées par un noyau ovale et un cytoplasme parfois étoilé. Les fibroblastes sont responsables de la synthèse de toutes les macromolécules de la matrice extracellulaire. Ils assument aussi d'autres fonctions telles que le renouvellement des fibres de collagène et des fibres élastiques en synthétisant des enzymes capables de les dégrader. Ainsi, des collagénases et des élastases assurent l'entretien de la matrice extracellulaire.

On trouve également des cellules impliquées dans la défense non spécifique et dans la surveillance immunitaire :

**Les mastocytes** se répartissent dans tout le derme. D'origine médullaire, ces cellules granuleuses contiennent des médiateurs chimiques tels que l'histamine, la sérotonine, ou encore l'héparine. En contact avec un allergène, les mastocytes se dégranulent, entraînant la libération des médiateurs. Cela a pour conséquence l'initiation puis l'amplification de la réaction inflammatoire cutanée.

**Les histiocytes** sont des macrophages du tissu conjonctif également d'origine médullaire. Leur principale fonction est la phagocytose. Ils sont capables d'éliminer les virus ou les bactéries qui auraient réussi à passer à travers l'épiderme.

## **II.2. La matrice extracellulaire**

Elle est constituée de protéoglycannes, de composants fibreux (collagène, élastine) et de glycoprotéines de structure.

### **II.2.1. Les protéoglycannes**

En amont de ces molécules, on retrouve les glycosaminoglycannes, anciennement appelés « mucopolysaccharides acides » en raison de leur forte capacité de rétention de l'eau ("muco"), de leur nature glucidique ("polysaccharides") et de leur caractère acide provenant de leurs multiples charges négatives ("acides"). L'acide hyaluronique (ou hyaluronane) est le constituant le plus important des glycosaminoglycannes. Il ne comporte pas de groupement sulfate, ni de partie protéique, contrairement à d'autres glycosaminoglycannes pouvant établir des liaisons covalentes avec des protéines pour former les protéoglycannes. Ces molécules forment la substance



fondamentale très hydratée dont l'ensemble constitue un gel souple à travers lequel peuvent diffuser des métabolites.

### **II.2.2. Les composants fibreux**

Le collagène est une protéine fibreuse dont la fonction la plus remarquable est de stocker les forces de tension. Synthétisé par les fibroblastes, le collagène excrété subit la fibrillogénèse sous l'action d'enzymes telles que la lysiloxydase. Les molécules de collagène ont une structure hélicoïdale rigide à 3 brins (300 nm de longueur pour 1,5 nm de diamètre). Elles vont s'associer entre elles, formant des fibrilles (50 à 200 nm de diamètre) qui vont à leur tour s'agréger en faisceaux, formant des fibres de collagène de plusieurs micromètres de diamètre. La charpente de la matrice dermique est constituée principalement de fibrilles de collagène de type I et III et d'un cœur de collagène V.

Les fibres élastiques du derme sont composées d'élastine, protéine synthétisée par les fibroblastes sous forme d'un précurseur, la tropoélastine. Après sécrétion, cette dernière se polymérise au sein de la substance fondamentale. Contrairement à la plupart des protéines, l'élastine peut adopter diverses conformations et se replier au hasard. Elle a la capacité de se tendre ou se détendre comme un élastique. Le maillage souple créé par ces fibres confère au derme son élasticité.

### **II.2.3. Les glycoprotéines de structure**

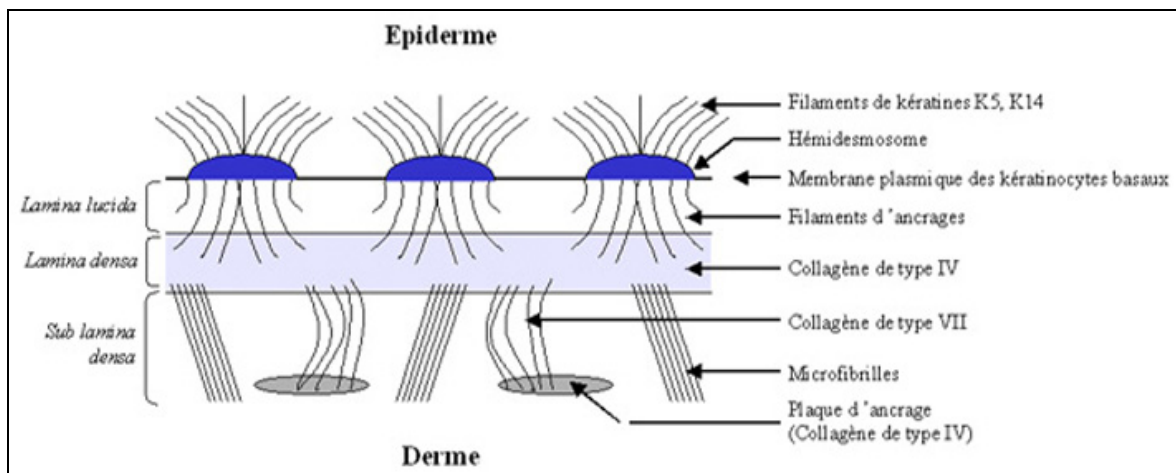
La fibrilline, qui s'incorpore dans et autour des fibres élastiques, est une glycoprotéine de structure requise pour la polymérisation des fibres d'élastine.

La fibronectine est une glycoprotéine multifonctionnelle. Elle présente plusieurs domaines spécialisés dans la liaison à une molécule particulière (collagène, protéoglycannes) ou à une cellule. Elle s'ancre à la surface cellulaire par l'intermédiaire de récepteurs appelés les intégrines et assure l'interaction des cellules avec la matrice extracellulaire.

## **III. La jonction dermo-épidermique**

Appelée également membrane basale, elle provient à la fois des kératinocytes de la couche basale et des fibroblastes du derme. C'est une région acellulaire d'une épaisseur de 120 nm qui sépare le derme de l'épiderme, assurant ainsi une jonction solide entre les deux couches principales de la peau. Elle offre une matrice d'ancrage pour les cellules de la couche basale de l'épiderme, ce qui lui confère un rôle dans la polarité de l'épiderme et dans la régulation de la migration cellulaire.

De plus, la membrane basale permet la diffusion contrôlée des nutriments provenant des vaisseaux sanguins présents dans le derme jusqu'aux kératinocytes de l'épiderme. Sa structure complexe a été mise en évidence par microscopie électronique. La lame basale constitue un réseau de protéines connectées les unes aux autres. Elle contient différents types de laminines, du collagène et de nombreuses glycoprotéines. Elle peut être divisée en trois parties, en partant de la surface vers la profondeur de la peau : la *lamina lucida*, la *lamina densa* et la *sub lamina densa* (Figure 2).



**Figure 2** : Représentation schématique de la jonction dermo-épidermique.

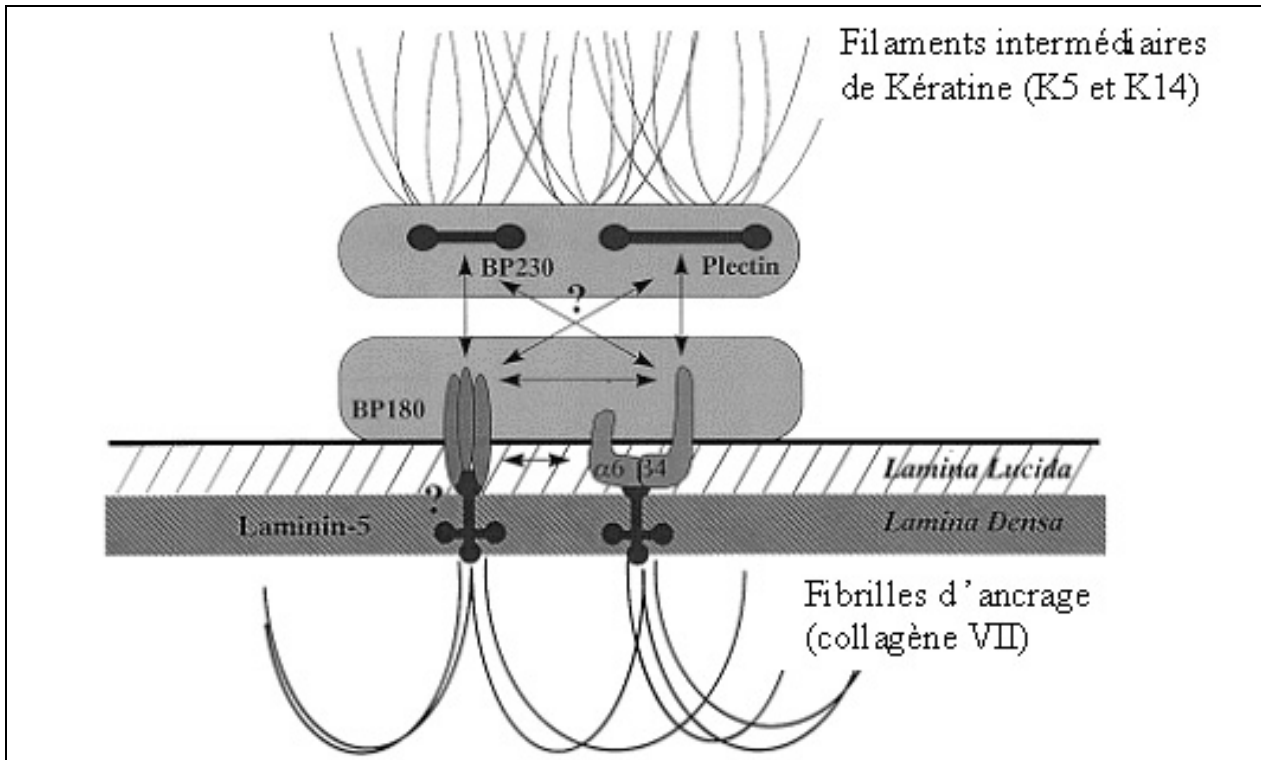
La *lamina lucida* (40-50 nm) est la couche directement en contact avec la membrane plasmique des kératinocytes de la couche basale. Elle doit son nom à sa clarté au microscope. Il est toutefois possible de distinguer des filaments d'ancrage très fins, riches en laminines-1, -5 et -6. Grâce à ces filaments, les cellules de la couche basale de l'épiderme peuvent s'attacher solidement à la matrice.

La *lamina densa* (70 nm), plus dense, forme la zone d'ancrage des filaments issus de la *lamina lucida* avec les fibres dermiques. Elle est principalement composée de molécules de collagène de type IV qui s'associent de façon covalente pour former une trame qui structure la lame basale. Les filaments de collagène IV sont liés à la laminine-1 par des molécules de nidogène.

La *sub lamina densa*, appelée également zone fibrillaire, est principalement constituée de fibres d'ancrage composées de filaments de collagène VII, associés aux filaments de collagène de type IV et à la laminine. Ces structures fibreuses s'étendent jusque dans le derme papillaire où elles s'entrecroisent avec les filaments de collagène I et III. Elles relient ainsi la lame basale au derme sous-jacent.

Il est important de noter ici la présence d'une structure caractéristique de la jonction dermo-épidermique : **les hémidesmosomes** (Figure 3). Bien qu'ils ne soient pas considérés comme un

composant structurel de la lame basale, ils sont nécessaires à son intégrité. Ils forment des complexes spécialisés permettant de relier les kératinocytes de la couche basale à la *lamina densa* par des protéines d'ancrage qui traversent la *lamina lucida*. L'hémidesmosome est constitué d'une plaque résultant de l'interaction des diverses protéines qui la composent, telles que la plectine, les BP180 et 230, dans laquelle vont s'insérer des filaments intermédiaires de kératine. Sur cette plaque dense, on retrouve également des molécules d'intégrines de type  $\alpha 6 \beta 4$  transmembranaires permettant l'ancrage avec notamment les laminines de la membrane basale.



**Figure 3 :** Représentation schématique d'un hémidesmosome.

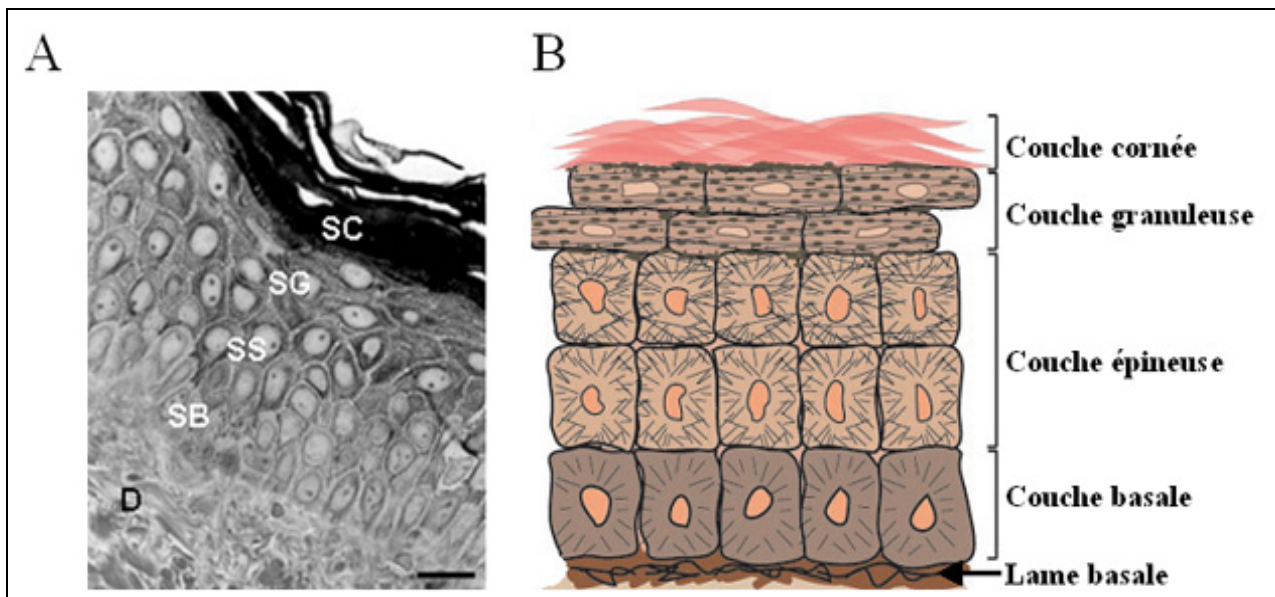
*Repris et modifié d'après (Borradori and Sonnenberg, 1999).*

## **IV. L'épiderme**

L'épiderme est un épithélium pavimenteux, stratifié et kératinisé : pavimenteux car les cellules de sa couche superficielle sont aplaties, stratifié puisqu'il est constitué de plusieurs couches cellulaires, et kératinisé car il synthétise une protéine particulière, la kératine. Son épaisseur moyenne varie de 60 à 100  $\mu\text{m}$  et peut atteindre 600 à 700  $\mu\text{m}$  au niveau palmo-plantaire. L'épiderme n'est irrigué par aucun vaisseau sanguin. Les cellules qui le composent sont alimentées par diffusion depuis le derme. Le kératinocyte est le type cellulaire majoritaire de l'épiderme. On y trouve également d'autres types cellulaires, comme les mélanocytes, les cellules de Langerhans et les cellules de Merkel.

### **IV.1. Les kératinocytes et la synthèse de kératine**

Les kératinocytes représentent entre 80 et 90% des cellules composant l'épiderme. Ce sont des cellules épithéliales dont la principale fonction repose sur la synthèse de kératine. Les kératinocytes sont soumis en permanence à une évolution morphologique témoignant de leur état de kératinisation. Cette évolution se fait de la profondeur vers la surface et permet de distinguer sur une coupe d'épiderme quatre couches superposées : la couche basale, la couche spinuse (ou épineuse), la couche granuleuse et la couche cornée (Figure 4A et 4B). La répartition des kératinocytes en 4 couches superposées explique le caractère stratifié de l'épiderme. La couche basale de l'épiderme, ancrée à la lame basale épidermique, est constituée de kératinocytes capables de proliférer. Puis, les couches suprabasales sont composées de cellules différenciées (Kanitakis, 2002).



**Figure 4 :** Structure de l'épiderme.

*Repris et modifié d'après (Alonso and Fuchs, 2003 ; Tobin, 2006).*

- A.** Coupe de peau humaine en microscopie haute résolution. On distingue le derme (D) des quatre couches cellulaires de l'épiderme : la couche basale ou *Stratum basale* (SB), la couche épineuse ou *Stratum spinosum* (SS), la couche granuleuse ou *Stratum granulosum* (SG) et enfin la couche cornée ou *Stratum corneum* (SC). Barre d'échelle = 30  $\mu\text{m}$ .
- B.** La couche basale de l'épiderme, en contact avec la lame basale, est constituée de cellules germinatives. Ces cellules vont ensuite se détacher de la lame basale et migrer vers les couches suprabasales de l'épiderme. La couche cornée est constituée de cellules mortes qui seront éliminées de la surface de la peau.

#### **IV.1.1. La synthèse de la kératine**

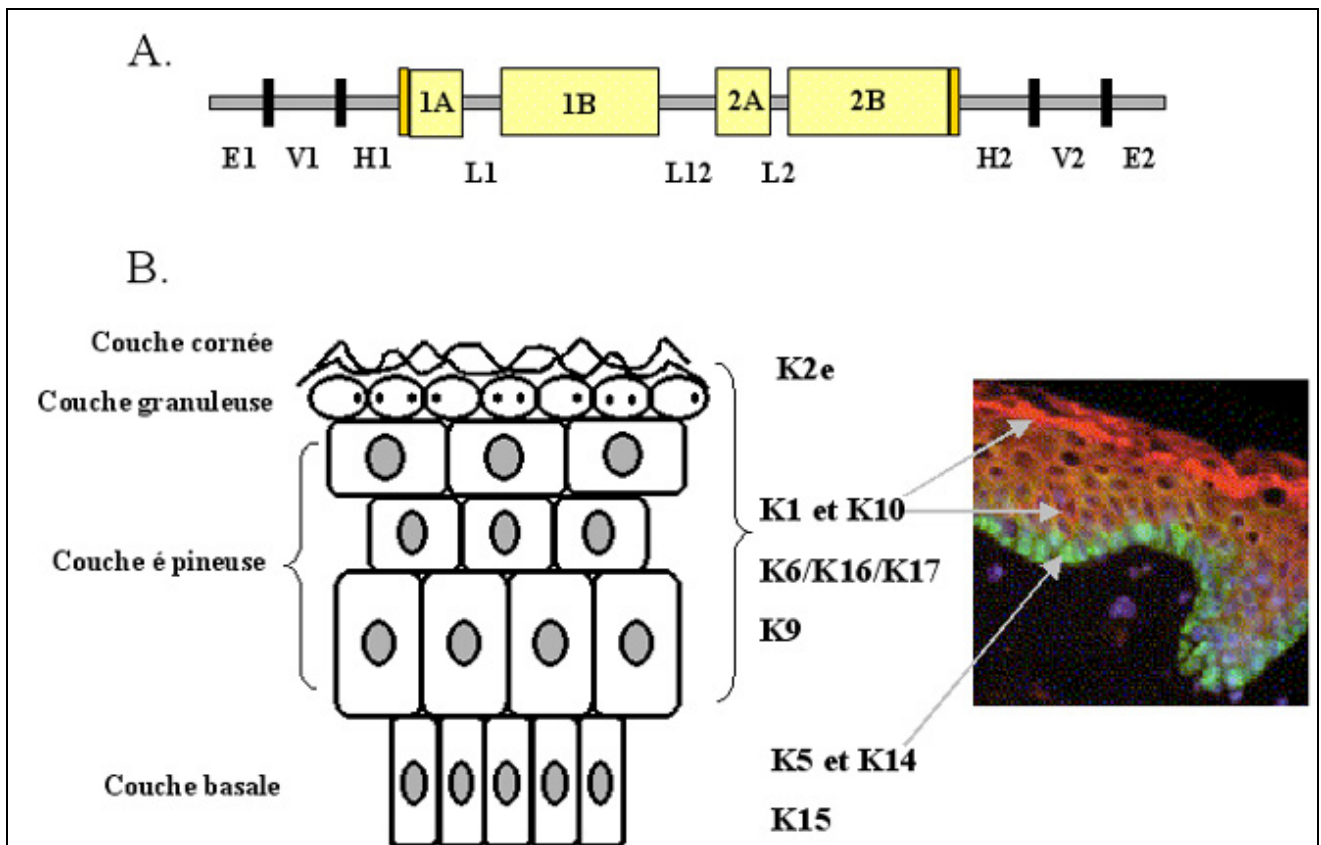
Les kératines épithéliales (ou cytokératines) sont les protéines structurales qui composent les filaments intermédiaires des cellules épithéliales. Elles confèrent une grande résistance mécanique au tissu, lui permettant de résister aux forces de tension qu'il subit. Elles forment, avec les filaments d'actine et les microtubules, le cytosquelette de la cellule. Les kératines sont des protéines fibreuses organisées en tonofilaments. Elles regroupent plus de 35 protéines différentes dont la distribution, qui varie en fonction des tissus, est résumée dans le tableau 1. On distingue les kératines acides de type I des kératines basiques de type II. La polymérisation des filaments de kératine débute par la formation d'un hétérodimère comprenant une kératine de chaque type. Seuls ces hétérodimères sont ensuite capables de se polymériser en filaments intermédiaires (Porter and Lane, 2003).

<b>Kératines de type I (acides)</b>	<b>Kératines de type II (basiques)</b>	<b>Distribution</b>
K5	K14, K15	Kératinocytes des couches basales des épithéliums stratifiés.
	K19	Sous-population de kératinocytes des couches basales de l'épiderme, cellules de Merkel.
K1	K10	Kératinocytes des couches différenciées suprabasales de l'épiderme.
K2e		Kératinocytes des couches les plus différenciées de l'épiderme.
	K9	Kératinocytes des couches différenciées suprabasales des épidermes palmoplantaires.
K3	K12	Kératinocytes des couches différenciées suprabasales de la cornée.
K4, K2p	K13	Kératinocytes des couches différenciées suprabasales des muqueuses orales.
K6a-f	K16, K17	Kératinocytes des annexes cutanées et des couches différenciées suprabasales des épithéliums hyperprolifératifs.
K8, K7	K18, K20	Kératinocytes des épithéliums simples.

**Tableau 1** : Distribution tissulaire et cellulaire des différentes kératines.

Les molécules de kératine comportent trois parties : un domaine  $\alpha$ -hélicoïdal central qui comprend quatre hélices  $\alpha$  séparées par des séquences assez courtes non hélicoïdales, une extrémité C-terminale ainsi qu'une extrémité N-terminale non hélicoïdale située de part et d'autre du domaine central. Contrairement aux hélices  $\alpha$  dont la séquence est très conservée, les deux régions terminales diffèrent au niveau de leur taille et de leur séquence entre les diverses molécules de kératine (Porter and Lane, 2003) (Figure 5A).

L'expression des différents hétérodimères des cytokératines dépend du stade de différenciation kératinocytaire. Ainsi, les kératinocytes de la couche basale de l'épiderme expriment majoritairement les kératines K5 et K14, qui constituent 20 à 25% des protéines totales de la cellule. Lorsqu'ils se différencient et migrent dans les couches suprabasales, les kératinocytes synthétisent de façon prédominante les kératines K1 et K10 (Figure 5B). Ces kératines constituent environ 85% des protéines contenues dans les kératinocytes de la couche cornée. Au cours du processus de cicatrisation, les kératinocytes des couches suprabasales expriment les kératines K6, K16 et K17 plutôt que K1 et K10 (Coulombe, 2003). Quant à la kératine K9, elle s'exprime spécifiquement dans la paume des mains et la plante des pieds.



**Figure 5 :** Structure d'une molécule de kératine et localisation dans l'épiderme.

*Repris et modifié d'après (Porter and Lane, 2003).*

- A.** Les molécules de kératine sont formées d'un domaine  $\alpha$ -hélicoïdal central constitué par 4 hélices  $\alpha$  très conservées : 1A, 1B, 2A et 2B, séparées par des régions non hélicoïdales L1, L12 et L2. La tête et la queue de la protéine comportent les domaines terminaux E1 et E2, les domaines variables V1 et V2 et les domaines homologues H1 et H2.
- B.** Les kératinocytes de la couche basale expriment spécifiquement les kératines K5 et K14, tandis que les cellules des couches suprabasales expriment les kératines K1 et K10. La photographie représente un double marquage par immunofluorescence d'épiderme avec un anticorps anti-K5 (vert) et un anticorps anti-K10 (rouge).

## IV.2 Les mélanocytes

Ils représentent environ 1% de la population cellulaire épidermique. De grande taille, ils s'intercalent au sein des kératinocytes de la membrane basale. Les mélanocytes présentent des dendrites leur conférant une forme étoilée, par lesquels ils peuvent atteindre la couche granuleuse.

Ces cellules ont pour principale activité la synthèse de la mélanine, pigment responsable de la couleur de la peau. La mélanine est synthétisée au sein de vésicules granuleuses apparentées aux lysosomes : les mélanosomes. Ensuite, par l'intermédiaire des dendrites, les mélanosomes sont distribués dans les kératinocytes. Le processus de synthèse et de transfert de la mélanine dans l'épiderme porte le nom de mélanogénèse.

La répartition des mélanocytes n'est pas homogène. Leur densité varie de 1000/mm<sup>2</sup> sur le corps jusqu'à 2000/mm<sup>2</sup> au niveau du visage. En revanche, leur nombre est équivalent dans toutes les populations humaines. Les différences entre les peaux claires et sombres sont essentiellement dues, d'une part, aux caractéristiques des mélanosomes, dont la digestion des membranes par les kératinocytes s'effectue de manière plus ou moins importante suivant le type de peau. Chez les personnes à peau sombre d'origine africaine, les mélanosomes sont larges et sont transférés indépendamment les uns des autres dans les kératinocytes ; ils arrivent intacts jusqu'à la couche cornée. En revanche, chez les Asiatiques ou les Européens, les mélanosomes sont plus petits, transférés par complexes et digérés au niveau des couches suprabasales : ils n'atteignent pas la couche cornée. D'autre part, la nature des pigments contenus dans les mélanosomes et leurs proportions respectives contribuent également à la couleur de la peau. L'eumélanine apporte la couleur noire. Les variantes plus claires résultent de sa combinaison avec la phéomélanine ou encore avec l'érythromélanine, pigment que l'on retrouve chez les individus roux.

### **IV.3. Les cellules de Langerhans**

Découvertes par le docteur Paul Langerhans en 1868, ces cellules sont d'origine médullaire. Les cellules de Langerhans constituent 2 à 5% de la population cellulaire épidermique, pour une densité allant de 300 à 900/mm<sup>2</sup>. Elles sont préférentiellement localisées dans la couche épineuse. Elles possèdent de longs prolongements dendritiques et sont caractérisées par la présence cytoplasmique d'organites en forme de « raquette de tennis », les granules de Birbeck. Les cellules de Langerhans sont les « macrophages » de l'épiderme, dont le nombre augmente lors de désordres cutanés d'origine immunitaire. Mobiles, elles ont pour fonction de présenter les antigènes aux lymphocytes T dans les ganglions lymphatiques. Elles sont donc à l'origine de la mise en place d'une réponse immunitaire spécifique et sont les seules cellules à posséder la capacité de présentation antigénique au niveau des épithéliums.



#### IV.4. Les cellules de Merkel

Mises en évidence en 1875 par le docteur Friedrich Merkel, ces cellules se localisent spécifiquement dans la couche basale de l'épiderme. Leur distribution corporelle est irrégulière : elles peuvent être dispersées ou bien regroupées formant des amas appelés les corpuscules de Merckel. De forme ovale, elles sont disposées parallèlement à la surface cutanée et projettent des expansions villositaires entre les kératinocytes adjacents, auxquels elles sont reliées par des desmosomes. Pauvres en organites intracellulaires, ces cellules sont caractérisées par la présence de granules très denses contenant majoritairement des médiateurs biochimiques. Ces cellules seraient impliquées dans la fonction du tact, mais leur origine ainsi que leur rôle sont encore discutés actuellement.

### V. Caractéristiques des couches épidermiques

L'épiderme est un tissu soumis à un renouvellement constant. La desquamation des kératinocytes au niveau de la couche cornée exige en effet le renouvellement de la population des kératinocytes afin de garantir l'homéostasie de l'épiderme. Les différents types de jonctions intercellulaires qui relient les kératinocytes entre eux, mais surtout la prolifération des kératinocytes constituant la couche basale de l'épiderme, assurent cette homéostasie. Les cellules filles résultantes suivent un programme de différenciation épidermique lors de leur passage dans les couches suprabasales de l'épiderme. Ainsi, le phénotype des kératinocytes est modifié au cours de la différenciation épidermique et peut être caractérisé en fonction de l'expression de certains gènes. On peut ainsi identifier les cellules non différenciées des cellules en différenciation précoce mais aussi des cellules en différenciation tardive. Par exemple, les cellules non différenciées de la couche épidermique basale expriment les kératines 5 et 14. Au niveau de la couche épineuse, l'expression de ces kératines est éteinte en faveur des kératines 1 et 10. Les étapes tardives du processus de différenciation sont notamment caractérisées au niveau de la couche épineuse supérieure et au niveau de la couche granuleuse.

#### V.1. Les jonctions cellule/cellule dans l'épiderme

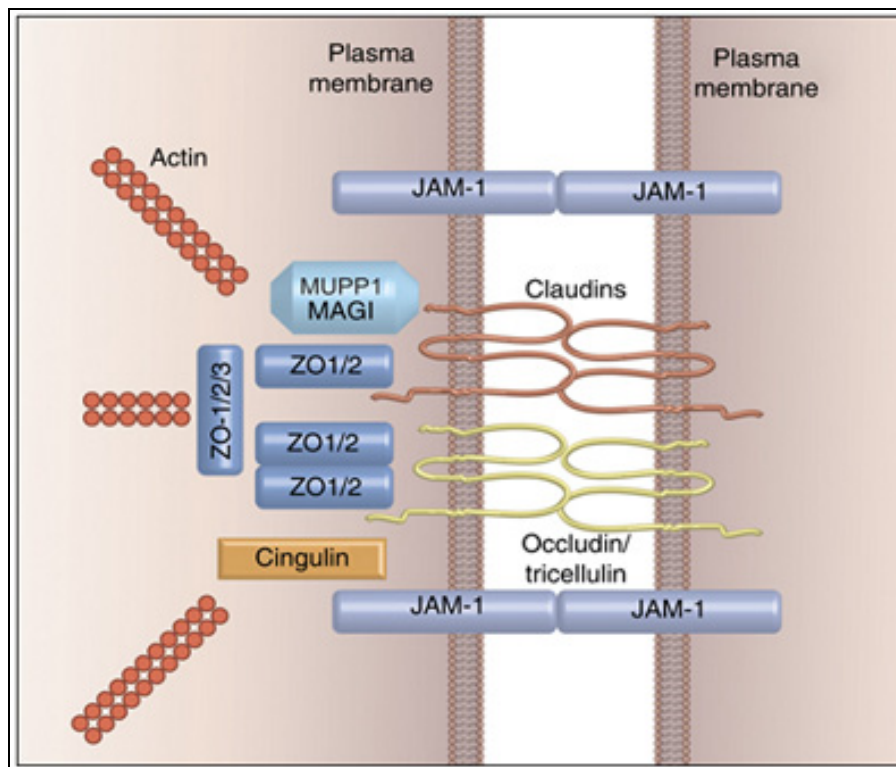
Il existe plusieurs types de jonctions qui unissent les kératinocytes entre eux. A l'heure actuelle, la classification des systèmes de jonction cellule/cellule est histo-fonctionnelle. Ainsi, on distingue :

- les **jonctions imperméables** ou *occludens*, appelées également jonctions serrées, jonctions imperméables, jonctions étanches, *tight-junctions*, jonctions *occludens*.

- les **jonctions communicantes** ou jonctions gap ou nexus.
- Les **jonctions d'adhésions** ou *adherens* appelées également jonctions d'ancrage, qui comprennent les desmosomes et les jonctions adherens.

### V.1.1. Les jonctions imperméables

Dans l'épiderme, les jonctions imperméables (Figure 6) de type *zonula* sont rares, incomplètes et plutôt sous forme de *macula* dans la couche granuleuse. Ici, 3 types de composants structuraux transmembranaires participent à la jonction cellule / cellule : les JAMs (junctional adhesion molecules), les claudines et les occludines. Les protéines ZO-1, ZO-2 et ZO-3 (pour *zonula occludens proteins*) assurent une fonction d'échafaudage dans cet édifice, en interagissant *via* leur extrémité N-terminale avec l'occludine et la claudine et *via* leur extrémité C-terminale avec le cytosquelette d'actine de la cellule. D'autres protéines telles que MUPP1 et MAGI interagissent avec les composants transmembranaires, mais leur fonction exacte n'est pas encore bien caractérisée. Enfin, la cinguline interagit avec les ZOs, les JAMs et également avec le cytosquelette d'actine de la cellule (Niessen, 2007).

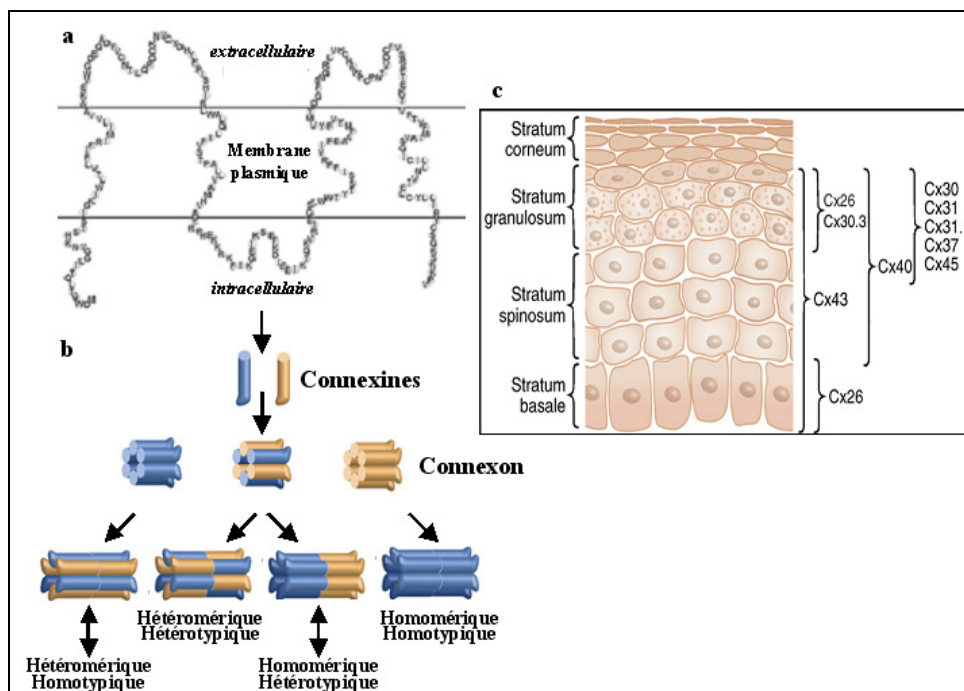


**Figure 6** : Représentation schématique de la structure d'une jonction imperméable.

Repris d'après (Niessen, 2007).

### V.1.2. Les jonctions communicantes

Les jonctions communicantes (Figure 7) sont des canaux intercellulaires qui permettent l'échange, entre 2 cellules adjacentes, de molécules de faible poids moléculaire (<1 kDa), d'ions ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ) ou encore de messagers secondaires. Les cellules adjacentes sont unies entre elles par des petits canaux intercellulaires tubulaires, formés par 2 héli-canaux appelés connexons. Chaque connexon est constitué de 6 sous-unités protéiques appelées connexines (Cx). En fonction de leur état de différenciation, les kératinocytes expriment 10 connexines différentes (Di *et al*, 2001). Des études ont montré que certaines isoformes de connexines auraient un rôle dans la régulation de la différenciation kératinocytaire (Langlois *et al*, 2007).



**Figure 7 :** Jonctions communicantes et expression des connexines.

*Repris et modifié d'après (Mese et al, 2007).*

(a) Représentation schématique d'une connexine (ici Cx26). Les connexines possèdent quatre domaines transmembranaires et trois boucles (deux extracellulaires et une cytoplasmique). Les extrémités N- et C-terminales sont cytoplasmiques. (b) L'assemblage de six connexines permet la formation d'un connexon. La jonction communicante résulte de l'alignement de deux connexons. Différentes connexines peuvent interagir, ce qui entraîne la formation de jonctions homomériques, hétéromériques et hétérotypiques, qui diffèrent dans leur contenu ainsi que dans leur arrangement spatial. (c) L'expression des connexines au sein de l'épiderme varie de façon spatiale et temporelle. Cx43 est la plus largement exprimée, tandis que Cx26 est exprimée très majoritairement au niveau de la couche basale. Cx40 se retrouve dans les couches épineuses et granuleuses. L'expression des six autres isoformes restantes est restreinte aux assises supérieures de la couche épineuse ainsi qu'à la couche granuleuse.

### **V.1.3. Les jonctions d'adhésion**

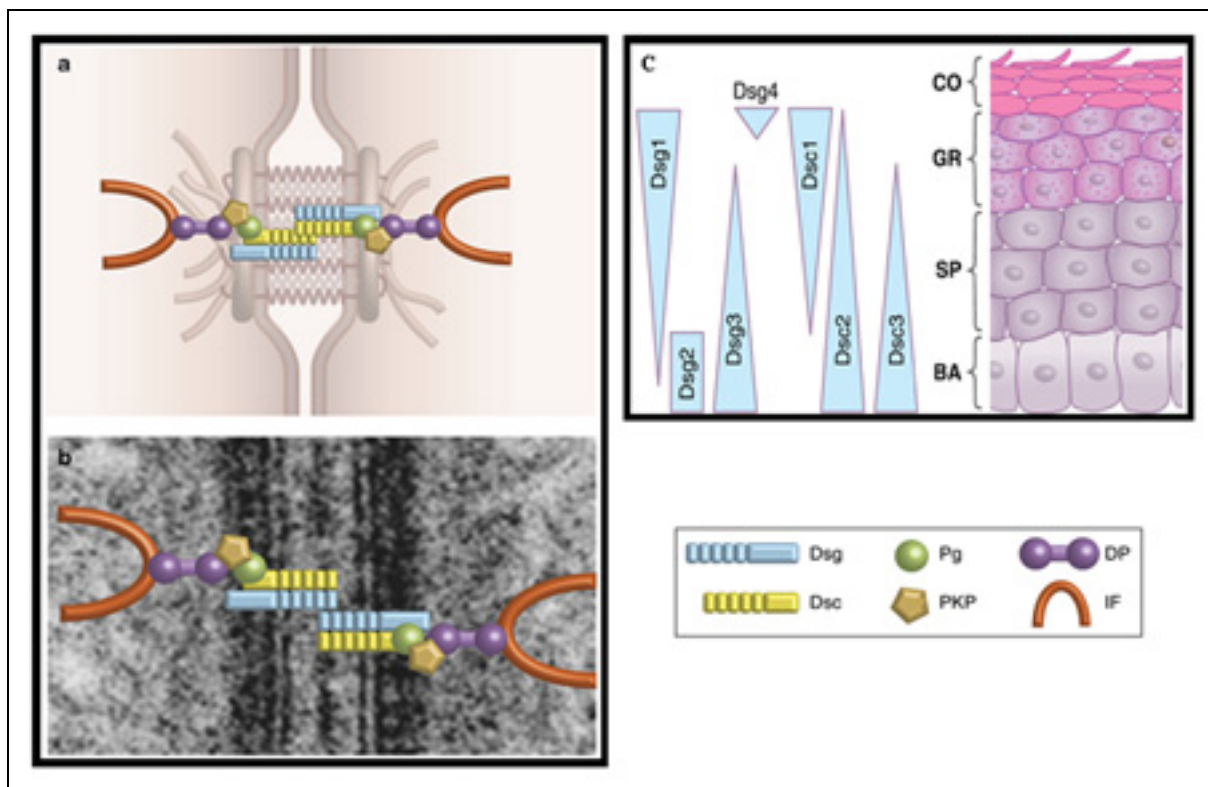
#### **V.1.3.1. Le desmosome**

Le desmosome, système de jonction entre 2 kératinocytes, se présente comme une structure symétrique. De part et d'autre d'une ligne extracellulaire, on retrouve donc la membrane plasmique des kératinocytes, une plaque dense de 0,1 à 2  $\mu\text{m}$  de longueur et d'épaisseur régulière, accolée au feuillet interne de la membrane plasmique, et enfin les tonofilaments accrochés sur cette plaque. Les desmosomes, par les molécules qui les composent, participent au maintien de la cohésion de l'épiderme.

Les molécules qui composent le desmosome se répartissent en deux groupes : les molécules transmembranaires et les molécules des plaques (Figures 8a et 8b).

Les molécules transmembranaires, dites molécules d'adhérence, s'associent entre elles par des liaisons homophiliques. Ce sont les desmoglénines (Dsg1, Dsg2, Dsg3 et Dsg4) et les desmocollines (Dsc1, Dsc2 et Dsc3), qui constituent les cadhérines desmosomales.

Les molécules des plaques servent d'intermédiaires entre les molécules transmembranaires et le cytosquelette de filaments intermédiaires de kératine. Les principales sont les desmoplakines (DP1 et DP2) et la plakoglobine (PG). Les différentes isoformes de desmoglénines et de desmocollines ont une distribution variable dans l'épiderme : Dsg2 est présente dans la couche basale de l'épiderme alors que Dsc2, Dsc3 et Dsg3 se retrouvent dans la couche basale mais aussi dans les couches suprabasales intermédiaires de l'épiderme. Quant à Dsg1, Dsc1 et Dsc4, leur expression s'effectue au niveau de la partie superficielle de l'épiderme (Figure 8c).



**Figure 8 :** Modèle moléculaire de desmosome.

*Repris et modifié d'après (Green and Simpson, 2007).*

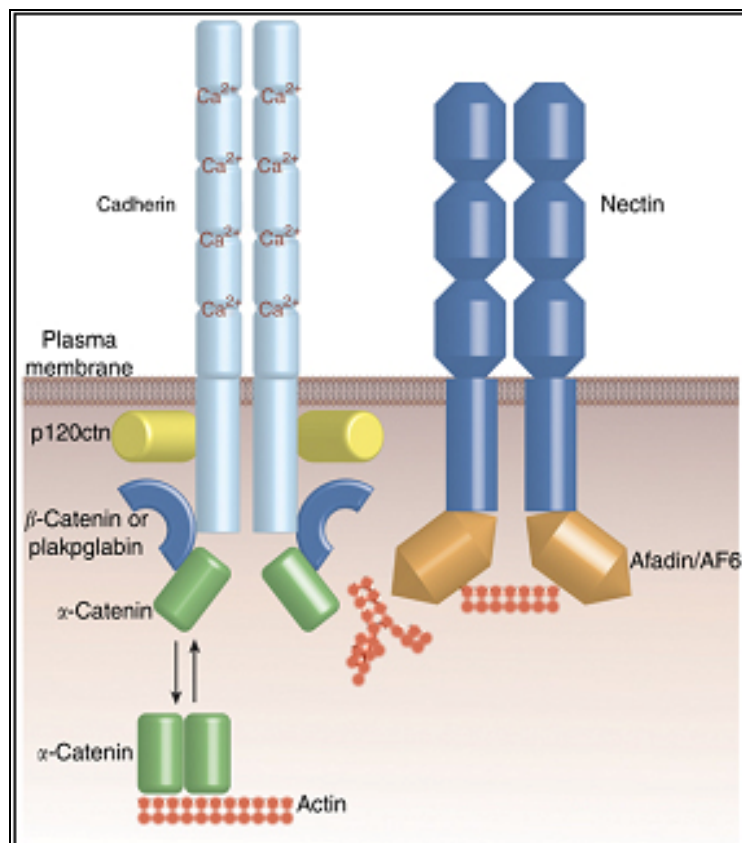
Représentation schématique d'un desmosome **(a)** et micrographie électronique **(b)** sur lesquelles sont superposés les principaux constituants protéiques desmosomiaux. Les cadhérines desmosomales transmembranaires (Dsg et Dsc) sont fixées à la plakoglobine (Pg), laquelle s'ancre alternativement à la plakophiline (PKP) et à la Desmoplakine (DP). La plaque cytoplasmique est stabilisée par des interactions latérales de ces protéines et s'ancre *via* les filaments intermédiaires (IF) des kératinocytes au desmosome. L'expression des cadhérines **(c)** diffère en fonction des couches épidermiques. Les niveaux d'expression ainsi que la localisation des Dsgs et des Dscs dans les couches épidermiques permettent d'établir une structure complexe et isoforme-spécifique des cadhérines desmosomales qui contribue à la morphogénèse et à la différenciation de l'épiderme.

### V.1.3.2. Les jonctions *adherens*

Comme les desmosomes, les jonctions *adherens* (Figure 9) ont une structure symétrique mais sans ligne dense extra-cellulaire bien visible. Leurs plaques sont d'épaisseur plus fines et irrégulières, sur lesquelles s'ancrent non pas des tonofilaments de kératine mais des microfilaments d'actine. Une jonction *adherens* est formée de deux unités adhésives : le complexe nectine-afadine et le complexe classique cadhérine-caténine.

La famille des nectines (NCT) compte 4 membres (de NCT-1 à NCT-4). Les nectines sont composées d'un domaine extracellulaire comprenant 3 boucles IgG-like, un domaine transmembranaire et enfin un domaine cytoplasmique contenant un motif très conservé de 4 acides aminés en position C-terminale (Irie *et al*, 2004). C'est d'ailleurs par ce domaine que la nectine interagit avec l'afadine (appelée également AF-6) pour former ainsi une unité structurale d'adhérence. L'afadine interagit avec la nectine et relie la nectine au cytosquelette d'actine.

Les cadhérines dites « classiques » sont des glycoprotéines transmembranaires. Elles sont dénommées par une lettre qui rappelle le tissu où elles ont été découvertes et où elles sont exprimées de façon préférentielle. Dans l'épiderme, on retrouve les E-cadhérines et les P-cadhérines (pour *epithelial* et *placenta*, respectivement). Ces molécules nécessitent la présence de calcium pour se dimériser. Les cadhérines possèdent 5 domaines extracellulaires, un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique par lequel la cadhérine interagit directement avec deux autres protéines : la p120 caténine (p120 ctn) et la  $\beta$ -caténine. Cette dernière est également liée à l' $\alpha$ -caténine qui interagit à son tour avec les filaments d'actine du cytosquelette.



**Figure 9 :** Représentation schématique d'une jonction *adherens*.

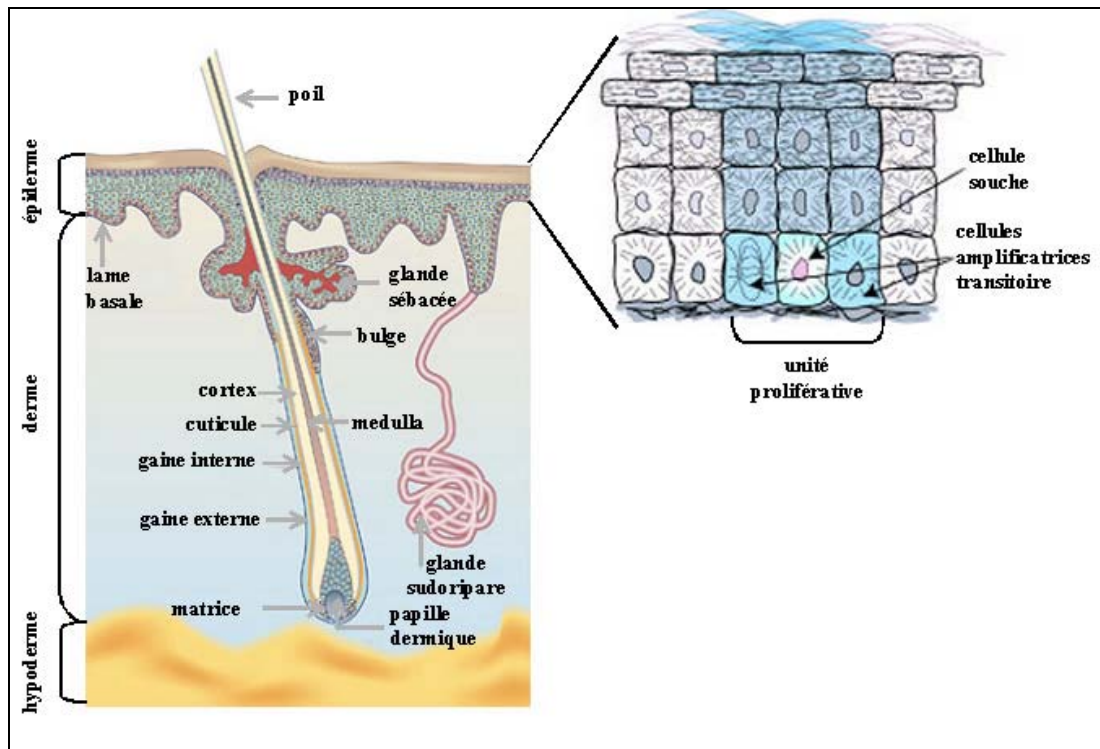
*Repris d'après (Niessen, 2007).*

## V.2. La couche basale

Au sein de l'épiderme, seuls les kératinocytes de la couche basale appelé également *stratum basale* ou encore *stratum germinativum* ont la capacité de proliférer. Cette couche est la plus profonde de l'épiderme. Elle est constituée d'une seule assise de kératinocytes cubiques ayant une activité mitotique intense. Elle est reliée au derme au niveau de la jonction dermo-épidermique par les hémidesmosomes et également par les contacts focaux. Les cellules basales adjacentes sont reliées au niveau de jonctions membranaires : les jonctions *adherens* ainsi que les desmosomes. Au sein de la couche basale, il existe plusieurs sous-populations cellulaires.

### V.2.1. De la cellule souche à la cellule amplificatrice transitoire

Les cellules souches, dotées d'abondants mélanosomes, représentent entre 2 et 7 % de la population kératinocytaire basale. Ces cellules sont caractérisées par un cytoplasme primitif et un rapport volume nucléaire / cytoplasmique élevé. Leur potentiel de division lent (d'où l'abondance de mélanosomes) mais illimité, les rend responsables du renouvellement continu de l'épiderme tout au long de la vie. C'est d'ailleurs grâce à cette propriété qu'elles ont été mises en évidence (Bickenbach, 1981) et qu'il a été possible de caractériser la région où elles sont principalement confinées. En effet, les cellules souches de l'épiderme ont un cycle cellulaire particulièrement long. De ce fait, elles ont été mises en évidence chez la souris grâce à la capacité de rétention de marquage de l'ADN pour la bromodésoxyuridine (BrdU) ou pour la thymidine tritiée, ce qui leur a valu leur nom de « *label retaining cells* » ou LRC. Chez l'humain, ces cellules souches, à fort potentiel clonogénique, ont été identifiées dans une zone du follicule pileux leur servant de niche, le bulge, localisé dans la gaine externe du follicule et qui constitue le prolongement de la couche basale interfolliculaire. On retrouve également les cellules souches au niveau de l'épiderme interfolliculaire (Cotsarelis *et al*, 1990). Les cellules souches du bulge sont multipotentes, pouvant donc engendrer les kératinocytes de la couche basale, mais également les follicules pileux ou encore les glandes sébacées (Taylor *et al*, 2000). Elles sont capables de s'auto-renouveler, mais elles peuvent également engendrer des cellules filles plus différenciées. Parmi ces cellules filles, on retrouve les **cellules amplificatrices transitoires**, dotées d'une capacité mitotique plus rapide que les cellules souches, mais limitée (Jensen *et al*, 1999). Elles vont donc subir plusieurs cycles de multiplication, assurant ainsi une population de kératinocytes qui vont sortir du cycle cellulaire et se différencier (Figure 10). Les kératinocytes de la couche basale, bien que morphologiquement homogènes sont donc en quelque sorte fonctionnellement hétérogènes.



**Figure 10 :** Cellules souches épidermiques.

*Repris et modifié d'après (Alonso and Fuchs, 2003).*

Les cellules souches épidermiques se localisent au niveau du bulge du follicule pileux, ainsi que dans la couche basale de l'épiderme interfolliculaire. Lorsqu'une cellule souche se divise, elle engendre une cellule en amplification transitoire qui se multiplie à son tour avant de migrer vers les couches suprabasales de l'épiderme et de rentrer en différenciation. Une cellule souche et les cellules qui en dérivent restent groupées dans l'épiderme et forment une unité proliférative.

## V.2.2 Caractéristiques protéiques des cellules de la couche basale

### V.2.2.1. Les kératines

Les cellules basales se caractérisent par leur morphologie d'aspect cubique et un noyau volumineux. Leur cytosquelette se compose de filaments intermédiaires de kératine principalement de type 5 et 14, organisées en tonofilaments autour du noyau. Ces deux kératines sont donc spécifiques des kératinocytes basaux.



D'autre part, au niveau de la couche basale, les cellules souches expriment les kératines K15 et K19. Elles peuvent donc être utilisées comme marqueurs spécifiques de cette sous-population de cellules basales (Michel *et al*, 1996 ; Lyle *et al*, 1998).

#### V.2.2.2. Les intégrines

Les intégrines jouent un rôle très important dans les grandes fonctions cellulaires comme l'adhérence, la migration et la prolifération, en transmettant des signaux aux cellules (Hynes, 1992). Les intégrines sont des glycoprotéines transmembranaires qui se présentent sous la forme d'un hétérodimère composé de sous-unités  $\alpha$  (120-180 kDa) et  $\beta$  (90-110 kDa) associées de façon non covalente. La coopération entre les deux sous-unités permet aux intégrines de se lier à différents ligands, dont certaines protéines de la matrice extracellulaire. Dans l'épiderme normal, l'expression des intégrines est confinée au niveau de la couche basale. Leur fonction principale est d'assurer la jonction entre le derme et l'épiderme, mais elles sont également impliquées dans la migration des kératinocytes. Elles régulent également la balance entre les processus de prolifération et de différenciation kératinocytaire, ainsi que l'apoptose (Gniadecki *et al*, 1997). Les ligands et l'expression des principales intégrines kératinocytaires sont résumés dans le tableau 2. Nous ne traiterons ici que les intégrines  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 3\beta 1$ , et  $\alpha 6\beta 4$ , considérées comme les intégrines prédominantes d'un épiderme normal.

Intégrine	Ligand principal	Expression
$\alpha 2\beta 1$	Collagène	Constitutive
$\alpha 3\beta 1$	Laminine	
$\alpha 6\beta 4$	Laminine	
$\alpha v\beta 5$	Vitronectine	Faible
$\alpha 5\beta 1$	Fibronectine	Induction en culture, en cas de blessure ou dans certaines conditions pathologiques
$\alpha v\beta 6$	Fibronectine, tenascine	
$\alpha 9\beta 1$	Tenascine	Augmente durant le phénomène de cicatrisation
$\alpha v\beta 8$	Vitronectine	Couches suprabasales de l'épiderme

**Tableau 2 :** Les intégrines kératinocytaires.

Les hétérodimères d'intégrines majoritairement exprimés par les cellules basales sont les intégrines  $\alpha 2\beta 1$  et  $\alpha 3\beta 1$ . Lors de l'entrée en contact avec leurs ligands, les intégrines de type  $\beta 1$

s'agrègent pour former les contacts focaux, impliqués dans l'adhérence et la migration cellulaire. Les contacts focaux se composent des intégrines, de leurs ligands ainsi que d'autres protéines cytoplasmiques, dont une partie leur permet d'ancrer des filaments d'actine (Wehrle-Haller and Imhof, 2002). Les intégrines de type  $\beta 1$  sont caractéristiques des cellules souches épidermiques. En effet, on retrouve une importante expression de ces intégrines dans les cellules du bulge (Jones *et al*, 1995 ; Lyle *et al*, 1998). Les cellules souches épidermiques expriment deux fois plus d'intégrines de type  $\beta 1$  que les cellules amplificatrices transitoires (Jones *et al*, 1995) ce qui permet de les utiliser comme marqueurs de cellules souches et peut également expliquer leur adhésion plus rapide lors de leur mise en culture. Cette expression plus importante d'intégrines de type  $\beta 1$  intervient également dans le confinement des cellules souches, du fait qu'elles ont une motilité moindre en comparaison avec les cellules amplificatrices transitoires (Jensen *et al*, 1999). D'autre part, ces intégrines sont responsables du maintien du compartiment des cellules souches *via* la voie des MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*) (Zhu *et al*, 1999). **L'intégrine  $\alpha 2\beta 1$**  est la forme la plus abondante dans les kératinocytes de la couche basale. Elle se localise sur toute la longueur des surfaces basolatérales et apicales des cellules, ce qui lui permettrait d'intervenir dans l'adhésion intracellulaire, probablement en interagissant avec les intégrines  $\alpha 3\beta 1$  des cellules adjacentes (Symington *et al*, 1993). **L'intégrine  $\alpha 3\beta 1$** , qui a pour ligand principal la laminine (comme l'hétérodimère  $\alpha 6\beta 4$ ), aurait un rôle prépondérant dans la régulation de la survie cellulaire grâce à sa liaison avec la laminine *via* la voie de signalisation MEK/ERK (Manohar *et al*, 2004).

**Les intégrines  $\alpha 6\beta 4$** , considérées de façon non exclusive comme un composant essentiel des hémidesmosomes, assurent la liaison entre les filaments intermédiaires des kératinocytes basaux à la laminine 5 de la matrice extracellulaire. Elles participent ainsi à la jonction dermo-épidermique en stabilisant l'ancrage des kératinocytes basaux à la membrane basale. L'intégrine  $\alpha 6\beta 4$  intervient également dans la transduction de signaux intracellulaires impliqués dans les phénomènes de survie, de prolifération et de différenciation (Nievers *et al*, 1999).

### V.3. La couche épineuse

Appelée encore *stratum spinosum* ou couche du corps muqueux de Malpighi, elle doit son nom à l'abondance de desmosomes entre les kératinocytes, donnant lieu à une morphologie en épine des contours cellulaires. La couche épineuse se compose de 4 à 8 assises de kératinocytes plus volumineux que ceux de la couche basale. En profondeur, les cellules sont de forme polyédrique alors qu'en position plus superficielle elles ont tendance à s'aplatir. Les kératinocytes de la couche épineuse, plus différenciés qu'au niveau de la couche basale, conservent encore un métabolisme

actif, avec notamment la synthèse des kératines K1 et K10 qui vont remplacer les kératines K5 et K14 synthétisées par les cellules basales (Woodcock-Mitchell *et al*, 1982). Les kératinocytes de la couche épineuse possèdent encore une batterie d'organelles fonctionnelles et témoignent d'une remarquable activité de phagocytose. Les tonofilaments, formés par les kératines K1 et K10, reliés aux desmosomes, sont plus abondants et mieux organisés que dans les cellules basales. Les kératinocytes de la couche épineuse vont migrer vers la couche granuleuse grâce à la poussée des cellules sous-jacentes. C'est également au niveau des assises cellulaires supérieures de la couche épineuse que va débiter la synthèse de l'involucrine, un des précurseurs de l'enveloppe cornée.

#### **V.4. La couche granuleuse**

Appelée également *stratum granulosum*, elle est formée par deux ou trois assises de kératinocytes aplatis et constitue la dernière couche nucléée de l'épiderme. Les kératinocytes de cette couche suprabasale sont caractérisés par la présence de grains de kératohyaline (d'où le nom de couche granuleuse) et de corps lamellaires, appelés également corps d'Odland ou kératinosomes.

Certains précurseurs protéiques de l'enveloppe cornée comme l'involucrine, la loricrine ainsi que d'autres protéines telles que les protéines *small proline rich* (SPR), la cystatine  $\alpha$  ou encore l'élafine (Steinert and Marekov, 1995) débutent leur accumulation. C'est également à ce niveau que va s'exprimer la transglutaminase (TG), enzyme qui catalyse la formation de cette enveloppe protéique dans la couche cornée.

##### **V.4.1. Les grains de kératohyaline et les corps lamellaires**

Les grains de kératohyaline, visibles en microscopie optique, ne sont pas délimités par une membrane. Ce sont des agrégats de protéines insolubles dont on peut distinguer deux populations en fonction des protéines qui les composent (Steven *et al*, 1990) :

1. Les granules L, de forme ronde pour une taille moyenne de 0,5  $\mu\text{m}$ , sont composés de loricrine, une protéine précurseur de l'enveloppe cornée.
2. Les granules F, de forme irrégulière pour une taille moyenne de 1,7  $\mu\text{m}$ , sont composés de profilaggrine, précurseur de haut poids moléculaire (300 kDa) de la filaggrine, dont le rôle va être d'agréger les filaments de kératine. C'est d'ailleurs de cette propriété que lui vient son nom : *filament aggregating activity* (Steinert *et al*, 1981).

Les corps lamellaires sont de petits organites (0,2 à 0,3  $\mu\text{m}$ ) d'origine golgienne. Bien qu'ils commencent à apparaître dans les dernières assises cellulaires de la couche épineuse, ils restent néanmoins caractéristiques de la couche granuleuse. Leur aspect en empilement de lamelles est à

l'origine de leur appellation. Ces organites spécialisés se composent majoritairement de lipides neutres mais également de sphingolipides de type céramides et glucosylcéramides (Vielhaber *et al*, 2001). Ces derniers sont responsables de la formation en structure multilamellaires très compacte des corps d'Odland, et assurent un « stockage » de céramides. On trouve également au sein des corps lamellaires toute une panoplie d'hydrolases acides lysosomales (Menon *et al*, 1992). Grâce à cette dernière propriété, les corps lamellaires peuvent être considérés comme des lysosomes spécialisés.

## V.5. La couche cornée

Près d'un tiers de la composition de la couche cornée est représentée par le facteur naturel d'hydratation, ou NMF (*natural moisturizing factor*). Le NMF se définit comme un ensemble de substances qui ont une forte affinité pour l'eau et permettent donc de la fixer et d'assurer une bonne hydratation de la peau. Il est formé d'acides aminés (40 %), d'acide pyrrolidone carboxyique (12 %), d'urée (7 %), de quelques sucres (glucose, fructose, lactose...) et de quelques oligo-éléments.

La couche cornée, ou *stratum corneum*, est constituée, suivant la région corporelle, de quatre à vingt couches de cellules très aplaties et complètement kératinisées.. Les kératinocytes de la couche cornée sont dépourvus de noyau et d'organites cytoplasmiques. On les appelle les cornéocytes. On distingue deux sous-couches :

1. La couche compacte ou *statum compactum*, qui fait suite à la couche granuleuse et assure la fonction barrière de l'épiderme. Les desmosomes sont remplacés par des structures moins complexes, les cornéodesmosomes, assurant une certaine cohésion entre les cornéocytes.

2. La couche desquamante ou *stratum disjonctum*, qui se trouve en surface et au niveau de laquelle se produit la desquamation des cellules cornées.

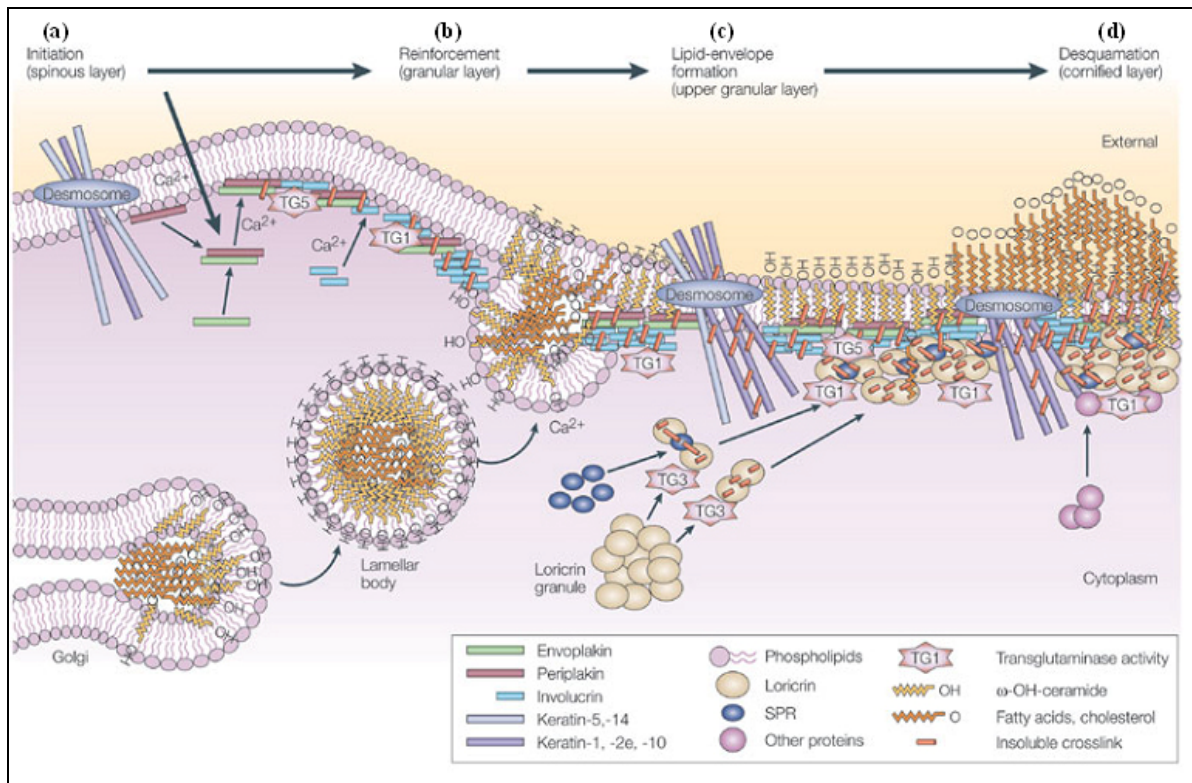
Lors du passage de la couche granuleuse vers la couche cornée, le kératinocyte subit plusieurs changements morphologiques observables. Les granules de kératohyaline se dissolvent dans le cytoplasme et les macrofibrilles de kératine s'y accumulent. Les organites cellulaires, tels que les mitochondries, l'appareil de Golgi, le réticulum endoplasmique et le noyau disparaissent progressivement. Parallèlement, la membrane cytoplasmique s'épaissit, témoignant de la formation de l'enveloppe cornée. La formation de cette structure cornée très dense implique une vingtaine de protéines (Tableau 3).

Nom	Référence OMIM	Locus	Commentaires
Involucrine	147360	1q21	Ces protéines sont codées par des gènes du complexe de différenciation épidermique ( <i>epidermal differentiation complex</i> : EDC), composé à la base, de 3 familles de gènes. La première comprend l'involucrine, la loricrine et les <i>small prolin rich proteins</i> (SPRs), chaque gène codant pour des protéines de structure de l'épiderme humain. La deuxième se compose de la filaggrine et de la trichohyaline, codant des filaments intermédiaires synthétisées dans la couche granulaire de l'épiderme et associés avec les tonofilaments de kératine pendant la cornification. Enfin la troisième famille de gènes dans l'EDC se compose de 10 gènes de la famille S100, codant de petites protéines renfermant une structure de type « main EF » (motif hélice-boucle-hélice) permettant de fixer le calcium. LEP/XP-5 appartient à la famille des <i>late envelope protein</i> (LEPs) (Marshall <i>et al</i> , 2001). Plus récemment, la répétine a été référencée comme appartenant à la deuxième famille de l'EDC (Huber <i>et al</i> , 2005).
Loricrine	152445		
SPR1A	182265		
SPR1B	182266		
SPR2A	182267		
SPR2B	182268		
SPR2C	182269		
SPR3	182271		
Filaggrine	135940		
Trichohyaline	190370		
S100A7	600353		
S100A8	123885		
S100A9	123886		
S100A10	114085		
S100A11	603114		
LEP/XP-5	X		
Repetine	X		
K1	139350	12q13	Les filaments intermédiaires codés par les kératines intègrent la structure de l'enveloppe cornée dans les dernières étapes de la différenciation terminale, lors de la perte de l'intégrité cellulaire.
K5	148040	12q13	
K2e	600149	12q11-13	
K10	148080	17q12-21	
K14	148066		
Desmoplakine	125647	6p24	Ces protéines appartiennent à la famille des plakines. Elles contribuent à l'intégrité structurale des kératinocytes grâce à leur fonction d'ancrage.
Envoplakine	601590	17q25	
Periplakine	602871	16p13.3	
Annexine 1	151690	9q12-21	
Cystatine A	184600	3q21	Se lie spécifiquement à la protéine S100A10.
Elafine	182257	20q12-13	Ce sont des inhibiteurs de protéases. La cystatine A serait impliquée dans l'activité antimicrobienne de la peau. L'élafine, inhibiteur spécifique de l'élastase, aurait également un rôle antimicrobien et antifongique.

**Tableau 3 :** Composition protéique de l'enveloppe cornée des cornéocytes.

Les propriétés de résistance et d'insolubilité de la couche cornée sont ensuite acquises par un processus de réticulation dû à l'activité des transglutaminases (TG). Ces enzymes, calcium dépendantes, catalysent la formation de ponts isopeptidiques entre les constituants de l'enveloppe cornée. Trois membres de cette famille : TG-1, TG-3 et TG-5 permettent l'agrégation de l'involucrine, la loricrine, la filaggrine, la kératine et des SPRs en un réseau dense (Hitomi, 2005). Des lipides, provenant principalement des corps lamellaires, vont combler les espaces intercellulaires, assurant ainsi une meilleure cohésion des cornéocytes mais aussi l'imperméabilisation de la couche cornée. En remontant vers la surface, les filaments de kératines, les interactions lipidiques et les cornéodesmosomes se désorganisent. Ces derniers étant les principaux responsables de la cohésion cellulaire, leur désorganisation entraîne le phénomène de

desquamation. Les étapes principales de la mise en place de l'enveloppe cornée sont résumées dans la figure 11.



**Figure 11 :** Modifications biochimiques des kératinocytes conduisant à la cornification.

*Repris et modifié d'après (Candi et al, 2005).*

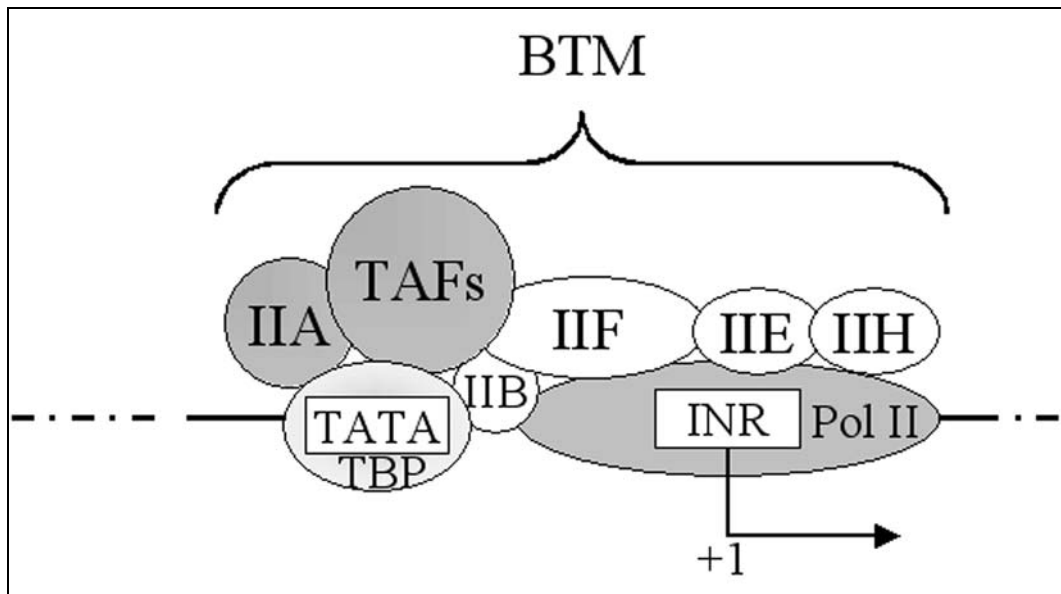
**(a)** Le processus de différenciation débute au niveau de la couche épineuse par l'initiation de la synthèse de protéines structurales de l'enveloppe cornée telles que les kératines 1 et 10 qui se substituent aux kératines 5 et 14 au niveau des desmosomes, puis plus tard d'autres constituants parmi lesquels l'involucrine ou encore la filaggrine. La synthèse des lipides qui seront expulsés pour combler l'espace intercellulaire débute au niveau de l'appareil de Golgi. Les transglutaminases (TG) 1 et 5, grâce au calcium, vont pouvoir réticuler l'envoplakine et la périplakine sous la membrane plasmique afin d'ancrer les desmosomes. **(b)** Une deuxième étape de renforcement se déroule au sein de la couche granuleuse. Les lipides, contenus dans les corps lamellaires vont être attachés aux protéines structurales de l'enveloppe cornée. Les TG1 et 3 vont permettre de réticuler la loricrine aux SPRs au niveau des desmosomes. **(c)** Toujours au sein de la couche granuleuse, les lipides des corps lamellaires (céramides, acides gras et cholestérol) vont être reliés par les TG1 et 5 aux protéines de l'enveloppe, telles que l'envoplakine, la périplakine ou encore l'involucrine, déjà réticulées entre elles. Ces lipides sont ensuite exposés à la surface extérieure des cellules afin de former une enveloppe étanche et hydrophobe. **(d)** La réticulation se poursuit au niveau de la couche cornée. Les lipides sont littéralement extrudés vers l'extérieur de la cellule. Les cornodesmosomes remplacent progressivement les desmosomes. Au stade ultime de la différenciation, les cornéocytes sont éliminés par desquamation.

## La différenciation épidermique

Comme nous l'avons vu précédemment, les kératinocytes subissent plusieurs changements tout au long du processus de différenciation. Afin d'assurer la fonction barrière de la peau, les kératinocytes sont à l'origine de la synthèse de plusieurs protéines permettant la mise en place de l'enveloppe cornée. Dans cette partie, après avoir détaillé la régulation de l'expression génique au cours de la différenciation kératinocytaire, nous étudierons plus en détail les différents gènes du complexe de différenciation épidermique (*epidermal differentiation complex*, EDC) résumés dans le tableau 3 et qui présentent la particularité d'être localisés au niveau du chromosome 1q21.

### I. La régulation génique

En considérant le dogme de la biologie moléculaire, la régulation génique peut s'effectuer à différents niveaux, qui englobent la régulation du taux de synthèse d'ARNm, la stabilité de l'ARNm, le taux auquel l'ARNm est traduit et enfin la stabilité de la protéine. Le mode principal de régulation se situe au niveau transcriptionnel, c'est à dire sur le taux de synthèse d'ARN. En effet, tous les gènes possèdent dans leur séquence un motif dont la fonction est de contrôler le taux de transcription. Ces motifs peuvent se diviser en 2 classes : ceux qui contrôlent un taux basal de transcription et ceux qui modulent ce taux basal en réponse à des stimuli. Les 2 motifs qui contrôlent le taux basal de transcription, communs à la majorité des gènes, sont la boîte TATA ainsi que la séquence d'initiation de la transcription. Ces motifs sont reconnus par tout un complexe de protéines ubiquitaires dont la TATA binding protein (TBP), l'ARN polymérase II, ainsi que d'autres facteurs tels que TFIIA, TFIIB, TFIIE, TFIIF, TFIIH ou encore les *TAFs* (*transcriptional activation factors*). Ces protéines, en l'absence d'autres régulateurs transcriptionnels, sont capables d'assurer la transcription à un taux faible mais détectable. Un schéma du complexe basal de transcription est représenté sur la figure 12.



**Figure 12 :** Le complexe basal de transcription.

*Repris et modifié d'après (Eckert et al, 1997)*

La machinerie basale de transcription (*basal transcription machinery* : BTM) se compose de l'ARN polymérase II fixée sur la séquence INR (*initiator*) où se trouve le point +1 de transcription, et de la TATA binding protein (TBP) qui reconnaît la boîte TATA. D'autres facteurs (TFIIA, TFIIB, TFIIIE, TFIIF, TFIIH et les TAFs) sont ensuite recrutés pour assurer au complexe une activité transcriptionnelle optimale.

Le processus d'activation ou de répression de la transcription est sous le contrôle de diverses familles de protéines appelées facteurs de transcription. Ces derniers assurent l'étape finale du relais de l'information, de la surface cellulaire jusqu'au noyau et enfin au gène. Dans sa forme simpliste, cela s'accomplit par la fixation d'un facteur de transcription sur une séquence d'ADN spécifique dont la longueur varie en moyenne entre 8 et 20 pb. Cette séquence se localise habituellement en amont du site d'initiation de la transcription et peut être à l'origine de l'augmentation (*enhancer*) ou de la diminution (*silencer*) de la synthèse d'ARN. La plupart du temps, ces séquences se situent entre 50 pb et 5000 pb du site d'initiation de la transcription. Les facteurs de transcription sont au minimum composés de 2 domaines fonctionnels : un domaine de liaison à l'ADN et un domaine qui permet de réguler la transcription. Ils peuvent également posséder un domaine qui permet de réguler leur activité, par exemple un site de phosphorylation ou de liaison à un ligand. En général, ces domaines sont physiquement et fonctionnellement séparables.



Au final, des facteurs de transcription de différentes familles peuvent se fixer au niveau de sites de liaisons spécifiques étroitement juxtaposés et ainsi participer sous la forme d'un complexe multimérique à la régulation génique.

## II. L'involucrine

L'involucrine, du nom latin *involucrum* qui signifie enveloppe, est un des composants majeur de l'enveloppe cornée.

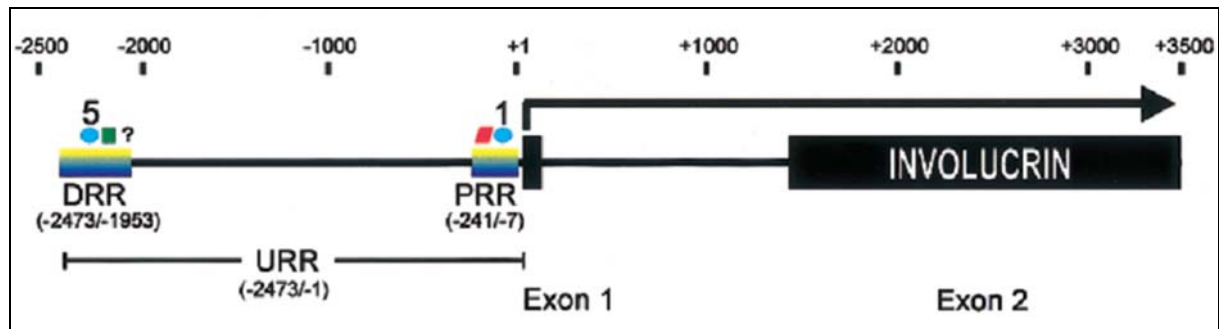
Le gène de l'involucrine ainsi que sa région promotrice ont été caractérisés en détail (Figure 16). La région promotrice du gène de l'involucrine s'étend sur une longueur de 2,5 kb en amont du site d'initiation de la transcription. Cette région, dénommée URR (*Upstream-regulatory region*) est composée d'un site distal DRR (*Distal-regulatory region*) et d'un site proximal PRR (*Proximal-regulatory region*), tous deux requis pour assurer une activité promotrice optimale. En effet, la suppression du site distal (-2473/-1953) entraîne une baisse de l'activité promotrice de 50%. La suppression des deux sites distal et proximal (-241/-7) a pour conséquence une inactivation du promoteur.

Au niveau de l'URR, on retrouve 5 sites de liaison à AP1. Les sites AP1-5 et AP1-1, localisés respectivement au niveau des régions distales et proximales, sont indispensables pour la régulation de la transcription de l'involucrine. En effet, il a été démontré qu'une mutation au niveau des sites AP1-1 ou AP1-5 a pour conséquence une perte substantielle d'activité transcriptionnelle.

Le site distal possède également un domaine de liaison à Sp1, localisé en aval de AP1-5, et séparé de ce dernier par un seul nucléotide. Contrairement au site AP1-5, dans lequel une mutation entraîne une perte complète de l'activité promotrice, une mutation dans le site de liaison à Sp1 a seulement pour conséquence une réduction partielle de l'activité transcriptionnelle de l'involucrine (Banks *et al*, 1998). Plus récemment, un troisième site de liaison au niveau du DRR, en position -2100/-1953 a été mis en évidence. Ce site de liaison est impliqué dans la transcription précoce du gène de l'involucrine, c'est à dire dans les assises supérieures de la couche épineuse (Crish *et al*, 2002).

Le site proximal se caractérise par le site de liaison AP1-1, mais aussi par un site de liaison à C/EPB, ayant également un rôle important dans la régulation de l'expression de l'involucrine. Ces 2 sites sont séparés par seulement 10 nucléotides. Cette proximité permettrait d'assurer les interactions entre AP1-1 et C/EPB. Au niveau du PRR, une mutation dans le site de liaison au C/EBP entraîne une réduction de l'activité transcriptionnelle de l'involucrine, ainsi qu'une diminution de réponse à des agents différenciants, tels que les esters de phorbol (Agarwal *et al*,

1999). Il a été démontré que C/EBP $\alpha$  est responsable de l'augmentation de l'activité transcriptionnelle de l'involucrine. Par contre, la co-expression de C/EBP $\beta$  et C/EBP $\delta$  avec C/EBP $\alpha$  supprime l'activation du promoteur de l'involucrine C/EBP $\alpha$ -dépendante (Agarwal *et al*, 1999), ce qui suggère qu'une fine balance au niveau du ratio cellulaire des isoformes de C/EBP est déterminante dans l'expression de l'involucrine.



**Figure 16 :** Schéma du gène de l'involucrine.

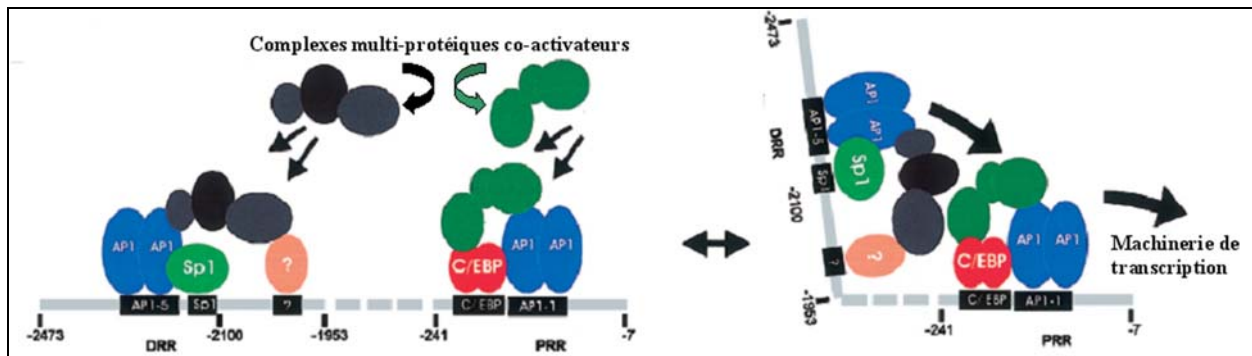
*Repris d'après (Eckert et al, 2004b).*

Le site de départ de transcription se trouve au point +1 et la flèche indique le sens de transcription. Les deux rectangles noirs correspondent aux exons. Seul le deuxième exon code pour la protéine (Eckert and Green, 1986). Les sites de liaisons AP1-1 (PRR) et AP1-5 (DRR) sont représentés par des ronds bleus, le site de liaison SP1 (DRR) par un carré vert et le site de liaison à C/EBP par un parallélogramme rouge. Le point d'interrogation représente le site de liaison impliqué dans la transcription précoce du gène.

Un modèle de régulation du gène de l'involucrine a été proposé par Eckert (Eckert *et al*, 2004b) *via* les sites de liaison des régions distales et proximales du promoteur de l'involucrine (Figure 17).

Les facteurs de transcription se lient aux niveaux des sites AP1-5 et Sp1 du DRR, suivi de protéines adaptatrices toujours en cours d'identification. Une étude récente suggère l'intervention de tout un complexe multiprotéique, dont la protéine p300 histone acétyltransférase (Crish and Eckert, 2008). La liaison des facteurs de transcription sur les 3 sites du DRR est nécessaire pour assurer une transcription « normale » de l'involucrine : le site AP1-5, qui fonctionne tel un « commutateur marche - arrêt », est lié au site Sp1 dans l'activation de l'expression de l'involucrine de manière synergique. Enfin, le site dit précoce est requis pour la transcription de l'involucrine dans les assises cellulaires supérieures de la couche épineuse.

Au niveau du site proximal, le facteur de transcription C/EBP $\alpha$  se lie à son site de liaison respectif. Les facteurs junB, junD et Fra-1 se lient au niveau du site AP1-1.



**Figure 17 :** Coopération du DRR et du PRR dans l'expression de l'involucrine.

Repris et modifié d'après (Eckert et al, 2004b).

Au niveau du DRR, on retrouve les sites de liaison AP1-5 et Sp1 qui reconnaissent spécifiquement les facteurs de transcription AP1 et Sp1 respectivement. Le site de liaison impliqué dans la transcription de l'involucrine au niveau de la couche épineuse, représenté par un point d'interrogation, a été identifié *in vivo*, lors d'études de régulation de l'involucrine sur des souris transgéniques (Crish et al, 2002). Au niveau du PRR, on retrouve les sites de liaison AP1-1 et C/EBP liant respectivement leur facteur de transcription correspondant. Ces complexes agissent l'un sur l'autre mais également avec des complexes multi-protéiques co-activateurs (Crish and Eckert, 2008). La figure 17 suggère que le DRR et le PRR, séparés par 1,7 kb, soient rassemblés pour former un plus grand complexe qui agit l'un sur l'autre puis avec la machinerie de transcription classique afin d'activer l'expression tissu-spécifique et appropriée au programme de différenciation.

Une autre étude rapporte la présence, en position -1277, d'un site de liaison à un facteur de transcription à domaine POU (*Pit-1 Oct-1 Unc86*) (Welter et al, 1996). De manière générale, les facteurs POU se fixent et régulent la transcription *via* un motif octamérique 5'ATGCAAAT3' (Wegner et al, 1993). Néanmoins, l'expression de l'involucrine est réprimée par POU, mais indépendamment de la liaison du facteur sur son site (Welter et al, 1996).

Le gène de l'involucrine code pour une protéine dont la taille est de 68 kDa. D'une longueur de 585 acides aminés chez l'homme, très riche en résidus glutamine et acide glutamique (respectivement 25% et 20% du poids total), l'involucrine est caractérisée par un domaine central très conservé flanqué par des segments de 153 et 45 acides aminés en position N- et C-terminale respectivement. Le domaine central est caractérisé par un motif de 10 acides aminés (ELP/KHL)EQQEGQL répété 39 fois (Eckert and Green, 1986). Des études structurales ont montré que la longueur de la protéine (460 angströms), la structure en hélice  $\alpha$  du domaine central ainsi qu'une distribution circonférentielle des résidus glutamine assurent une conformation optimale de

l'involucrine pour interagir avec d'autres protéines impliquées dans la formation de l'enveloppe cornée (Yaffe *et al*, 1992).

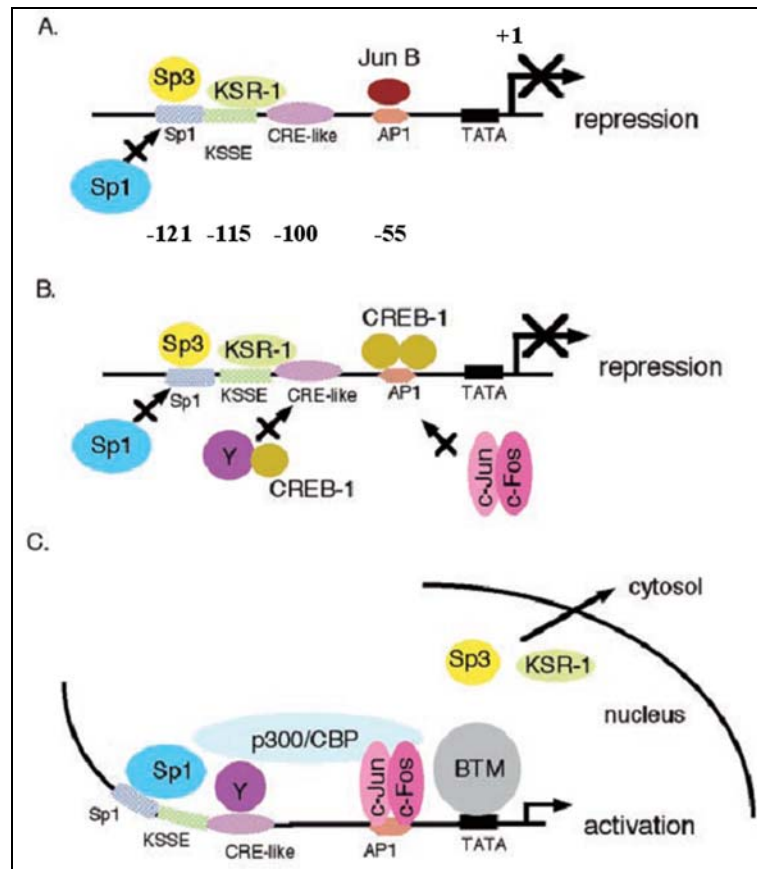
### III. La loricine

La loricine, dont le nom provient du latin *lorica* qui signifie coquille, est le composant majeur de l'enveloppe cornée.

Le gène humain de la loricine a été isolé et caractérisé en détail. Il se compose d'un seul intron d'une longueur de 1188 pb au niveau de la région 5' non transcrite. Il n'y a donc pas d'intron au niveau de la séquence codante. Au niveau de la région promotrice, on retrouve plusieurs sites de liaison pour divers facteurs de transcription. Tout d'abord, un site de liaison AP1 (en position -55) essentiel à la régulation de l'expression de la loricine a été observé ; son activité promotrice est régulée en fonction du dimère qui se lie au site de liaison AP1. En effet, c-Jun/c-Fos et JunD activent l'activité promotrice du gène de la loricine alors que JunB la réprime (Rossi *et al*, 1998). Des expérimentations complémentaires ont permis de localiser 3 autres motifs de liaison à des facteurs de transcription au niveau de la région proximale du promoteur de la loricine : un site Sp1 (-125), un site AP2-like (-115) nommé KSSE (*k*eratinocyte-*s*pecific *s*ilencer *e*lement) ainsi qu'un motif CRE-like (*c*AMP *r*esponsive *e*lement) (-100).

Des analyses fonctionnelles de la région promotrice du gène de la loricine ont permis de proposer un modèle de régulation (Figure 18) tenant compte des différents éléments de liaison ainsi que de la compétition des facteurs de transcriptions pouvant se fixer, entraînant la régulation de l'expression de la loricine (Jang and Steinert, 2002). Au niveau des couches basales et épineuses (Figure 18A et 18B), il n'y a pas d'expression de loricine, celle-ci s'effectuant spécifiquement au niveau de la couche granuleuse. Les mécanismes de répression proposés font intervenir les facteurs JunB, Sp3, et KSR-1 (*k*eratinocyte *s*pecific *r*epressor-*1*), empêchant ainsi Sp1 et c-Jun de se fixer sur leur site de liaison respectif (Figure 18A). L'expression de la loricine est également réprimée si un facteur CREB (*c*AMP *r*esponsive *e*lement *b*inding *p*rotein) se fixe au niveau du site AP1 et / ou se dimérise avec un autre facteur de régulation représenté par la protéine Y (Figure 18B). Lors de la migration des kératinocytes de la couche épineuse vers la couche granuleuse, plusieurs changements se produisent : le ratio Sp1/Sp3 augmente étant donné la migration de Sp3 et de KSR-1 du noyau vers le cytoplasme. Contrairement à Sp1 et c-Jun, le niveau de CREB diminue et s'accompagne du recrutement de p300/CBP, un co-activateur impliqué dans l'activation des facteurs de la famille Jun. La mise en place de la machinerie de transcription au niveau du site

d'initiation résulte de l'interaction de ces différents facteurs, conduisant ainsi à l'expression de la loricrine (Figure 18C).

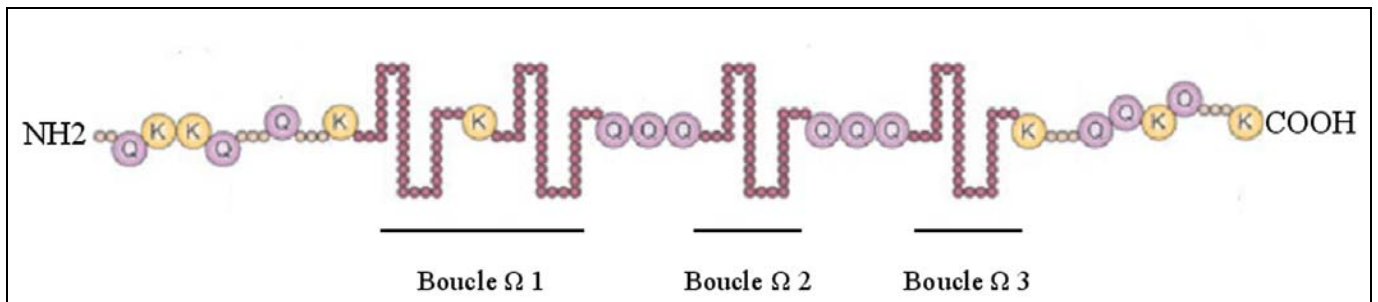


**Figure 18 :** Modèle de régulation du gène de la loricrine.

*Repris et modifié d'après (Jang and Steinert, 2002).*

Ce modèle résume les interactions entre la machinerie de transcription « classique » (BTM) et les facteurs de transcription AP1, Sp1, Sp3, KSR-1, CREB-1 et p300/CBP. Les sites de liaisons Sp1, KSSE, CRE-like et AP1, respectivement en position -121, -115, -110 et -55 sont également indiqués. Y représente l'activateur qui se lie au site de liaison CRE-like et qui permet, avec AP1 et Sp1, le recrutement du co-activateur p300/CBP, ce qui entraîne la stabilisation de la machinerie de transcription et ainsi l'expression de la loricrine.

Chez l'homme, le gène de la loricrine code pour une protéine de 26 kDa (Figure 19). Longue de 312 acides aminés, cette protéine se caractérise par une séquence peptidique riche en glycine (47%), sérine et cystéine, formant au total 3 boucles oméga ( $\Omega$ ). Les résidus glutamine et lysine entre les boucles permettent la fixation avec d'autres protéines de l'enveloppe cornée. Ils sont également à l'origine de liaisons intra- ou inter-chaînes, formant ainsi une structure fortement insoluble essentielle à la fonction barrière de l'épiderme.



**Figure 19** : Représentation schématique de la structure secondaire de la loricrine.

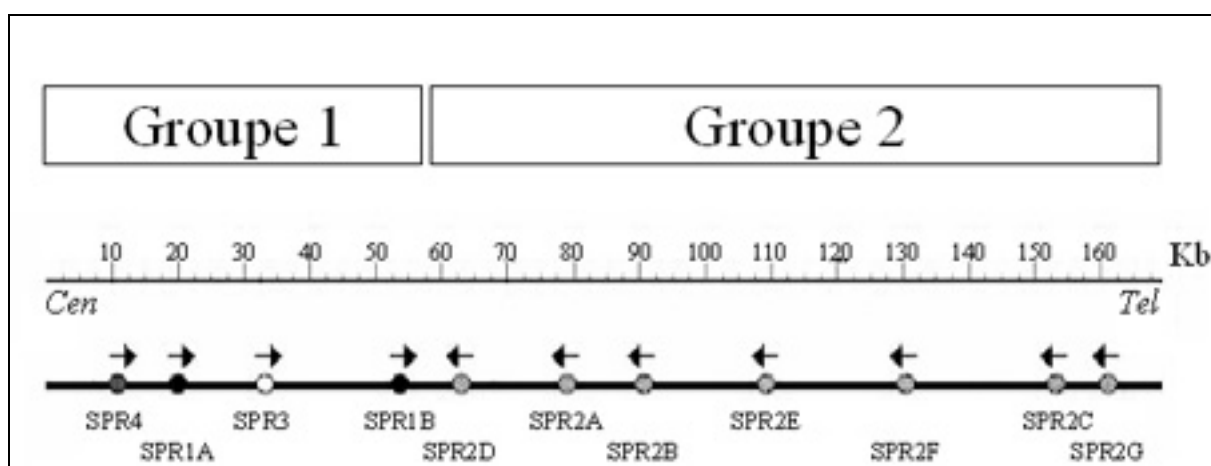
*Repris et modifié d'après (Candi et al, 2005).*

Les 3 boucles  $\Omega$  sont majoritairement constituées de résidus glycine (en rouge). Les résidus lysine (K) et glutamine (Q) sont impliqués dans la formation de liaisons avec d'autres protéines de l'enveloppe cornée.

#### IV. Les small proline rich proteins

Les small proline rich proteins (SPRs ou SPRRs) sont également des constituants de l'enveloppe cornée.

Les SPRs humaines forment une famille multigénique composée de 4 sous-classes (SPR1, SPR2, SPR3 et SPR4), le tout organisé en cluster sur une région de 170 kb du complexe de différenciation épidermique. Ce cluster compte au total 11 gènes : SPR1A, SPR1B, 7 gènes SPR2, SPR3 et enfin SPR4. Les SPRs sont également divisés en 2 groupes en fonction de leur orientation transcriptionnelle : SPR1A, SPR1B, SPR3 et SPR4 sont orientés du centromère vers le télomère et les 7 gènes SPR2, orientés du télomère vers le centromère (Cabral *et al*, 2001b). La figure 20 représente schématiquement la localisation des différents gènes SPRs sur le cluster. Ces gènes ont été mis en évidence suite à l'irradiation UV de kératinocytes en culture (Kartasova and van de Putte, 1988). D'autres expérimentations ont ensuite permis de constater que leur expression était stimulée lors de la différenciation kératinocytaire (Kartasova *et al*, 1988).



**Figure 20** : Cartographie du locus SPR.

Repris et modifié d'après (Cabral *et al*, 2001b).

Les différents sites de liaisons connus des sous-classes de SPRs sont résumés dans le tableau 4.

Gène	Eléments cis-régulateurs (sites de liaison à un facteur de transcription)	Références
<b>SPR 1A</b>	<b>AP1, Ets, doigt de zinc</b>	(Sark <i>et al</i> , 1998)
<b>SPR 1B</b>	<b>AP1, Ets, doigt de zinc, AP1, Oct, Ets, doigt de zinc</b>	(Cabral <i>et al</i> , 2001b)
<b>SPR 2A</b>	<b>AP1, Oct, ISRE, Ets, doigt de zinc</b>	(Fischer <i>et al</i> , 1996)
<b>SPR 2B</b>	Oct, Ets, doigt de zinc	(Cabral <i>et al</i> , 2001b)
<b>SPR 2C</b>		
<b>SPR 2D</b>	AP1, Oct, Ets, doigt de zinc	
<b>SPR 2E</b>		
<b>SPR 2F</b>		
<b>SPR 2G</b>	AP1, Ets, doigt de zinc	
<b>SPR 3</b>	<b>Ets, AP1, ATF, doigt de zinc, IPCS, ?</b>	(Fischer <i>et al</i> , 1999 ; Fischer and Backendorf, 2007)
<b>SPR 4</b>	ND	(Cabral <i>et al</i> , 2001a)

**Tableau 4** : Eléments régulateurs des gènes SPRs.

Les sites répertoriés en **gras** ont été identifiés comme essentiels à l'activité promotrice du gène concerné. Le « ? » correspond au site de fixation de CDTF-1. Quant à SPR4, ses éléments cis-régulateurs ne sont pas encore décrits.

Les gènes SPR1, SPR2 et SPR3 (Sark *et al*, 1998 ; Fischer *et al*, 1999 ; Cabral *et al*, 2001b) présentent une homologie significative au niveau de leur séquence promotrice. Hormis la boîte TATA, on retrouve ainsi un motif de liaison à un facteur en doigt de zinc qui fixe des facteurs de

transcription de la famille de Sp1 (Fischer *et al*, 1996) et / ou de KLF (*Krüpper-like zinc-finger factor*) (Cabral *et al*, 2001b), ainsi qu'un site de liaison *Ets* (*E26 Transformation Specific* ou *E Twenty-Six*) (Fischer *et al*, 1996 ; Sark *et al*, 1998 ; Fischer *et al*, 1999), reconnu, entre autre, par le facteur de transcription ESX/ESE-1. Au niveau des gènes SPR1A et SPR2A, ces deux sites de liaisons sont juxtaposés dans la région proximale du promoteur (aux alentours de la position -55). En revanche au niveau du gène SPR3, la mutation d'une seule paire de base (C→T) de ce même site de liaison à *Ets* de la région proximale empêche la fixation d'un facteur ESE-1 (Fischer *et al*, 1999). Le site de liaison à AP1 est également un motif conservé dans les gènes SPRs. Dans la plupart des cas où la fonctionnalité de ce site a été testée (SPR1A, SPR1B, SPR3), une mutation avait pour conséquence une forte diminution de l'activité promotrice, ce qui n'est pas le cas pour SPR2A. Ce dernier est d'ailleurs le seul gène de la famille des SPRs à posséder un site de liaison ISRE (*interferon-stimulated response element*) (Fischer *et al*, 1996).

Plus récemment, des expérimentations de gel retard ont permis de mettre en évidence deux nouveaux éléments de régulation du gène SPR3, situés en aval d'un motif de liaison à un facteur en doigt de zinc. Ces régions interagissent spécifiquement avec deux complexes, nommés respectivement complexes P et C (Fischer and Backendorf, 2007). L'analyse de la séquence requise pour la fixation du complexe P a révélé un motif CATTT. Ce motif a déjà été identifié pour les gènes IRF-1 (*Interferon regulatory factor*) et p53. Il porte le nom de domaine IPCS (*IRF1 p53 common sequence*), sur lequel se fixe GAAP-1 (*gatekeeper of apoptosis activating proteins*), un facteur nucléaire pro-apoptotique de 68 kDa (Lallemand *et al*, 1997 ; Lallemand *et al*, 2002). Il semblerait donc que le facteur P, qui apparaît comme un inhibiteur de la transcription de SPR3 (Fischer and Backendorf, 2007), soit le facteur GAAP-1. Quant au complexe C, il requiert la présence d'ions divalents et plus particulièrement d'ions calcium pour se fixer à son site de liaison. Il a ainsi été dénommé CDTF-1 (*calcium dependant transcription factor*).

En ce qui concerne SPR4, son expression augmente après une exposition chronique aux UV (Cabral *et al*, 2001a).

Les protéines SPRs ont toutes une caractéristique commune qui consiste à intégrer la composition de l'enveloppe cornée. Les protéines SPRs sont des précurseurs de l'enveloppe cornée et présentent une importante homologie au niveau de leurs séquences N et C-terminales avec l'involucrine et la loricrine. Mais la caractéristique principale des SPRs repose sur la structure polypeptidique de leur segment central, avec la répétition en tandem d'une séquence de huit (SPR1 et SPR3) ou neuf (SPR2) acides aminés dont le motif très conservé est : \*K\* PEP\*\* (Gibbs *et al*, 1993). Les SPRs ont une taille variant de 72 à 169 acides aminés (voir tableau 5). L'induction de



leur synthèse protéique s'effectue durant le processus de différenciation épidermique, hormis pour SPR4 ou seulement une exposition aux UV induit sa synthèse (Cabral *et al*, 2001a). De même, la synthèse de SPR1B ainsi que de SPR2B est induite par une exposition aux UV, ainsi que par des agents carcinogènes tels que le 12-O-tétradécanoylphorbol 13-acétate (TPA) ou encore le 4-nitroquinoline 1-oxide (Kartasova and van de Putte, 1988).

Protéine	Référence Uniprot	Taille (a.a)	Mise en évidence protéique	Autre(s) noms / remarques	Induction de la synthèse protéique
SPR1A	P35321	89	Oui	Cornifine A, pancornuline 19 kDa	Durant le processus de différenciation épidermique
SPR1B	P22528			Cornifine B, pancornuline 14,9 kDa	Durant le processus de différenciation épidermique / lumière UV / agents carcinogènes
SPR2A	P35326	72	Non. Mise en évidence au niveau de l'ARN. De même pour SPR4	<b>SPR2C</b> est un pseudogène : une transition C→T dans le sixième codon a pour conséquence la mise en place d'un codon stop	Durant le processus de différenciation épidermique (+ irradiation UV et agents carcinogènes pour <b>SPRR2B</b> )
SPR2B	P35325				
SPR2D	P22532				
SPR2E	P22531				
SPR2F	Q96RM1				
SPR2G	Q9BYE4	73			
SPR3	Q9UBC9	169	Oui	β-Cornifine, esophagine, pancornuline 22 kDa	Durant le processus de différenciation épidermique
SPR4	Q96PI1	79	non	Non	Lumière UV

**Tableau 5** : Bilan récapitulatif des protéines SPRs.

## V. La filaggrine

La filaggrine (synthétisée sous la forme d'un précurseur, la profilaggrine), est une protéine dont le rôle est d'agrèger les filaments intermédiaires de kératines au niveau de la formation de l'enveloppe cornée.

Le gène qui encode la profilaggrine (le gène *FLG*) présente une organisation génomique particulière. Ce gène se compose de 2 introns respectivement de 9,6 kb et 570 bp ainsi que de 3 exons (Presland *et al*, 1992 ; Markova *et al*, 1993). Le gène *FLG* est défini par une répétition de sous-unités, dont chacune code pour une molécule de filaggrine. Ces sous-unités sont séparées par des portions codant pour des segments peptidiques interdomaines. Toutes les sous-unités ont la même longueur : 972 pb. Cependant, chez l'homme, leur nombre varie de 10 à 12. De plus, on

enregistre des variations importantes de séquence (10-15%) d'une sous-unité à l'autre tant d'un individu à l'autre que d'un tronçon de filaggrine à l'autre. Ces polymorphismes génétiques sont responsables d'une grande variabilité dans la composition en acides aminées de la filaggrine : ainsi 40% des acides aminés peuvent différer entre deux filaggrines d'un même sujet. Si la plupart de ces variations sont conservatrices, certaines induisent des changements d'acides aminés et dans certains cas des changements de la charge électrique de la protéine. Ainsi les filaggrines humaines forment, indépendamment des modifications post-transcriptionnelles, une population hétérogène de molécules de taille similaire mais de séquences et de charges (pHi égal à  $8,3 \pm 1,1$ ) différentes.

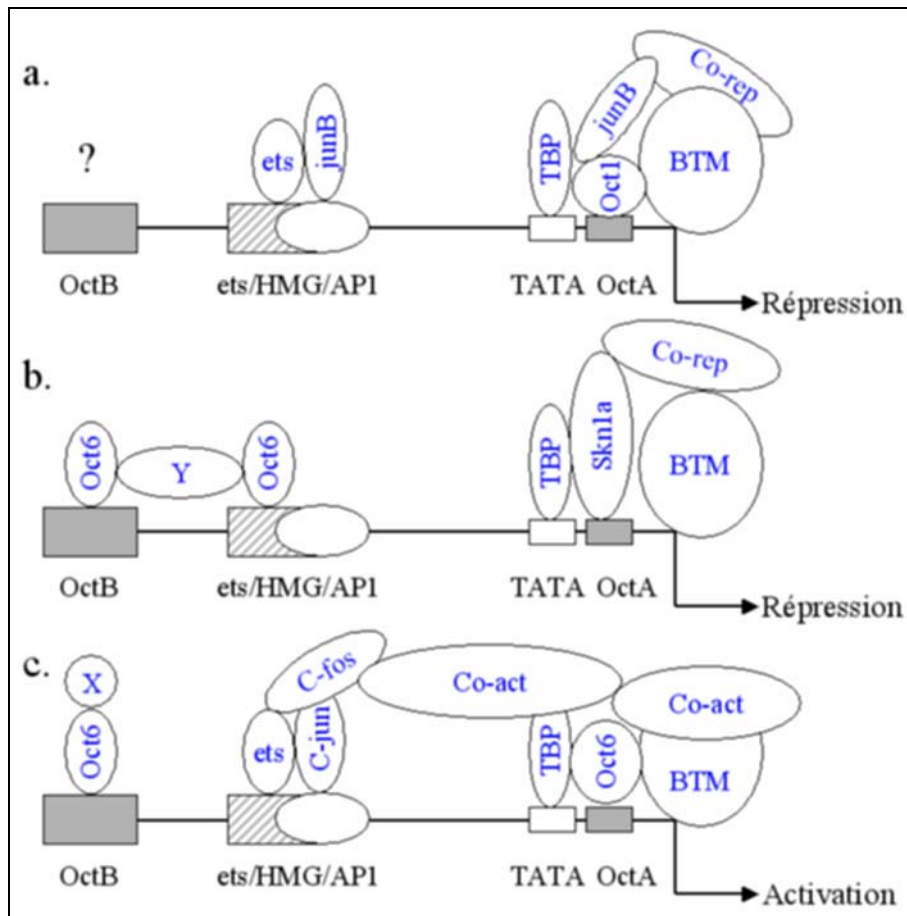
En ce qui concerne la régulation promotrice de *FLG*, un site de liaison à AP1, 7 sites potentiels de liaison à l'acide rétinoïque et / ou à l'hormone thyroïdienne ainsi que 2 séquences « *cytokeratin octamer-like* » ont été cartographiés au niveau de la région 3' du premier intron (Presland *et al*, 1992). Par la suite, plusieurs sites de liaisons, localisés dans la région proximale du site d'initiation de la transcription, ont été mis en évidence. On y retrouve un complexe Ets/HMG/AP-1 (Jang *et al*, 1996 ; Andreoli *et al*, 1997), la boîte TATA, ainsi que 2 séquences riches en AT reconnues par différents facteurs à domaine POU : OctA et OctB (Jang *et al*, 2000).

L'identification de plusieurs facteurs de transcription a permis de proposer un modèle de la régulation génique de la profilaggrine (Figure 21).

Au niveau de la couche basale (Figure 21a), en l'absence de c-Jun, l'activité promotrice est inhibée par la liaison de Jun B sur le site AP-1 (Jang *et al*, 1996) et d'un facteur Ets tel que Elk1 (Andreoli *et al*, 1997).

Lors du passage dans la couche épineuse (Figure 21b), l'augmentation du facteur Oct6 empêche la fixation des complexes Ets/AP1 sur leur site de liaison. Un facteur à domaine POU, Skn1a, se lie spécifiquement à OctA, ainsi qu'un répresseur co-spécifique. Ce complexe interagit avec la machinerie de transcription classique, empêchant l'initiation de la transcription de *FLG*.

Dans la couche granuleuse (Figure 21c), une variété de facteurs de transcription signal-dépendant, tels que c-Jun, c-Fos, Ets1 et Jun augmente. De plus, d'autres co-activateurs spécifiques apparaissent. Ces facteurs vont se fixer à leur motif de liaison, permettant ainsi l'expression de la profilaggrine.



**Figure 21** : Modèle de régulation de l'activité promotrice du gène FLG

*Repris et modifié d'après (Jang et al, 2000)*

La profilaggrine est une protéine très phosphorylée et insoluble. Son poids moléculaire avoisine les 500 kDa. Synthétisée dans la couche granuleuse, sa séquestration sous la forme de grains de kératohyaline est censée protéger la cellule d'une agrégation prématurée des kératines par la filaggrine (Presland *et al*, 2001a). Le passage de la profilaggrine à la filaggrine nécessite l'intervention de phosphatases et de plusieurs protéases, telles que la profilaggrine endoprotéinase 1 (Resing *et al*, 1995), la calpaïne 1 ou  $\mu$ -calpaïne (Yamazaki *et al*, 1997), ou encore la furine (Pearson *et al*, 2001). Plus récemment, des expérimentations ont démontré l'implication de la caspase-14 dans la maturation de la filaggrine. Cette enzyme protéolytique de la famille très conservée des protéinases aspartate-spécifiques clive la profilaggrine *in vitro*. De plus il a été observé une augmentation des grains de kératohyaline ainsi qu'une forte altération du processus de clivage de la profilaggrine dans l'épiderme de souris KO (*Knock Out*) caspase-14 (Nicotera and Melino, 2007 ; Denecker *et al*, 2007).

La région N-terminale de la profilaggrine se divise en deux domaines : un domaine A très conservé composé de deux motifs S100-like pouvant fixer le calcium, ainsi qu'un domaine cationique B moins conservé (Presland *et al*, 1992 ; Markova *et al*, 1993 ; Presland *et al*, 1995). Ce domaine B comporte plusieurs séquences de localisation nucléaire. Bien que la translocation du peptide N-terminal de la profilaggrine du cytoplasme vers le noyau ait été démontrée (Pearton *et al*, 2002), son rôle n'est pas bien défini. Il pourrait être impliqué dans la régulation du processus de maturation de la filaggrine, ou encore dans d'autres évènements de la différenciation terminale conduisant à l'établissement des cornéocytes et donc de la couche cornée (Ishida-Yamamoto *et al*, 1999).

Lors de la transition des kératinocytes de la couche granuleuse vers la couche cornée, la profilaggrine est protéolysée générant alors des molécules de filaggrine basique et fonctionnelle. Les molécules de filaggrine résultantes ont un poids moléculaire de l'ordre de 35 kDa.. Ces molécules vont agréger les filaments intermédiaires de kératine *via* la formation de ponts disulfures, et ainsi permettre la formation des macrofibrilles de kératine. Les unités de filaggrine basique sont alors transformés en variants acides par conversion de leur résidus arginyl en résidus citrullyl. Cette réaction porte le nom de désimination (changement du groupement =NH<sub>2</sub><sup>+</sup> en =O de la chaîne latérale de l'arginine et / ou de méthylarginine) et est catalysé par les peptidyl-arginine désiminases (PADs) (Nachat *et al*, 2005). Cette conversion a pour effet de modifier la charge globale des molécules de filaggrine afin de les rendre moins affines pour les cytokératines et permettre ainsi la dégradation finale de la filaggrine dans la partie supérieure de la couche cornée. Ainsi, les acides aminés libres issus du catabolisme de la filaggrine contribuent à la mise en place du facteur naturel d'hydratation ou NMF (*natural moisturizing factor*) de la peau.

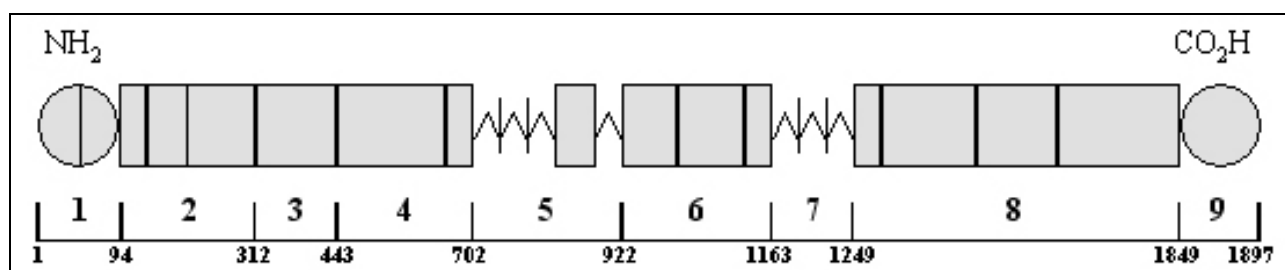
## VI. La trichohyaline

Le gène de la trichohyaline (*TCHY*), a été localisé au niveau du locus 1q21 au début des années 1990 : il se compose de 3 exons et de 2 introns. La longueur du transcrit résultant est de 6,9 kb (Lee *et al*, 1993). L'extrémité 5' du gène *TCHY* présente une similarité remarquable avec celle de la profilaggrine. En effet, tout comme la filaggrine, la trichohyaline, composant et donc précurseur de l'enveloppe cornée, a pour rôle principal d'agréger la kératine lors de la mise en place de l'enveloppe cornée. Elle se localise principalement au niveau de la couche granuleuse de l'épiderme, mais également dans les cellules de la gaine épithéliale interne du follicule pileux. L'expression de la trichohyaline semble en revanche bien distincte de celle de la filaggrine. En effet, des études par marquage immunohistochimique ont démontré que la trichohyaline était bien

co-exprimée avec la filaggrine dans la peau de prépuce humain. En revanche, *in vitro*, l'expression de la trichohyaline semble indépendante de celle de la filaggrine. De plus, la distribution intracellulaire de la trichohyaline est l'inverse de celle de la filaggrine : des granules de filaggrine sont observés au niveau des cellules où la trichohyaline est localisée de façon diffuse. De même, des granules de trichohyaline sont observés dans des cellules ayant un marquage diffus pour la filaggrine, ce qui suggère que leur expression est contrôlée par des mécanismes distincts (Ishida-Yamamoto *et al*, 1997).

D'un point de vue structural, la trichohyaline est une protéine qui se divise en 9 domaines plus ou moins décrits et dont le poids moléculaire avoisine les 248 kDa (Figure 22).

Le premier domaine (résidus 1-94) contient 2 domaines de liaison au calcium de type main EF (Figure 23). On y retrouve 70 % d'homologie de séquence avec la profilaggrine. Ensuite, en ce qui concerne la structure polypeptidique de la trichohyaline, on va retrouver des répétitions en tandems au niveau des domaines 3, 4, 6 et 8. Le troisième domaine (résidus 313-443) peut être sous-divisé en 2 parties : 313-389 et 390-443, sur la base de motifs de 13 (RREQEEERREQQL) et 6 (RREQQL) acides aminés répétés 6 et 9 fois respectivement.



**Figure 22** : Modèle schématique de la trichohyaline.

*Repris et modifié d'après (Lee et al, 1993)*

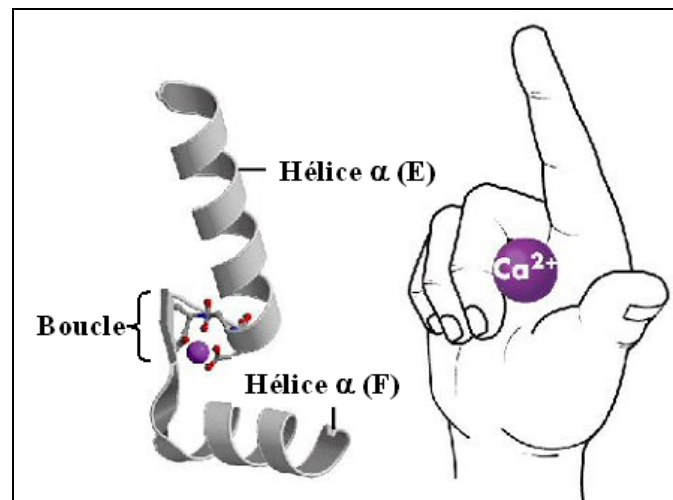
Les domaines 1 et 9 (cercles) constituent les extrémités N- et C-terminales de la protéine. Les domaines 2-4, 6 et 8 (rectangles) ont principalement une structure en hélice  $\alpha$ . Les domaines 5 et 7, permettent un repliement de la protéine.

Le quatrième domaine (444-702) se compose de neuf répétitions d'un motif de 28 acides aminés. Au niveau du sixième domaine (923-1163), on retrouve 8 répétitions d'un motif de 30 acides aminés. C'est d'ailleurs au niveau de ce domaine que la trichohyaline peut se lier directement aux filaments intermédiaires de kératine par établissement de liaisons ioniques. Le huitième domaine se divise en 23 répétitions d'un motif de 26 acides aminés (Lee *et al*, 1993).

## VII. Les protéines S100

Les protéines S100 sont des petites protéines acides dont le poids moléculaire varie entre 10 et 12 kDa. Avec 25 membres plus ou moins décrits chez l'homme, les protéines S100 constituent la plus grande sous-famille de protéines à main EF. Sur ces 25 protéines, 21 ont leur gène localisé au niveau du locus 1q21. En effet, on y retrouve les protéines S100A1 à S100A18 ainsi que la trichohyaline, la filaggrine et la répétine, qui, par la présence de main EF au niveau de ces 3 dernières, peuvent être considérées comme appartenant à cette sous-famille. Les protéines S100 apparaissent comme étant multifonctionnelles. En effet, elles interviendraient aux niveaux intra- et extracellulaires dans la régulation de divers processus tels que la transcription, la phosphorylation de protéines, la prolifération, la motilité, la survie, la différenciation cellulaire, ainsi que la régulation du cycle cellulaire.

Le motif en main EF (Figure 23) a une structure de type hélice  $\alpha$ -boucle- hélice  $\alpha$ . La boucle, constituée de 12 acides aminés, a la capacité de fixer des ions divalents et plus particulièrement l'ion calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ). Les résidus impliqués dans la chélation du  $\text{Ca}^{2+}$  forment une structure conservée, arrangée en pentagone bipyramidal autour de l'ion, utilisant les chaînes latérales des acides aminés aux positions 1, 3, 5, 9 (via des molécules d'eau) et 12, mais aussi le groupe carboxyle du squelette du résidu en position 7. Les motifs EF fonctionnent en « paires » et sont requis pour assurer un repliement correct de la protéine.



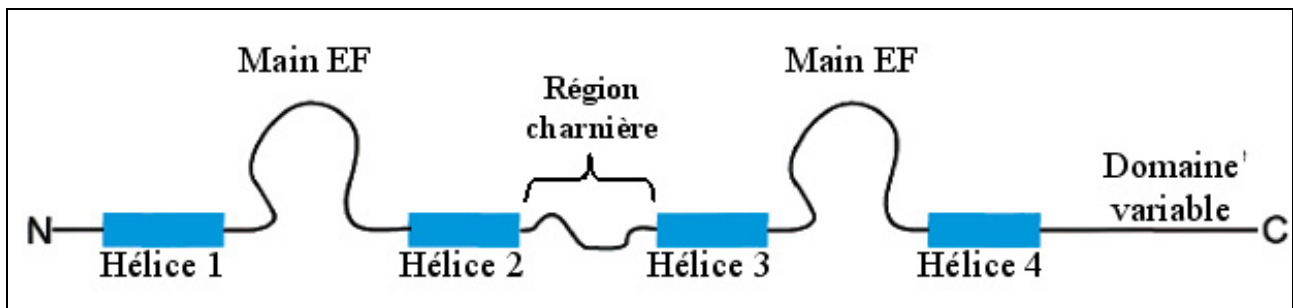
**Figure 23 :** Représentation schématique du motif en main EF.

D'après <http://chemistry.umeche.maine.edu/MAT500/EF-Hand.jpg>.

L'hélice E s'allonge sur l'index, l'hélice F sur le pouce. L'ion  $\text{Ca}^{2+}$  s'introduit dans la « poche » formée par les deux hélices et la boucle.

Les protéines S100 se caractérisent par des motifs structuraux communs incluant deux mains EF séparées par une région charnière et flanquées par des domaines N- et C-terminaux (Figure 24). La main EF en position C-terminale a une affinité pour le calcium 100 fois plus importante que la main EF située en position N-terminale. Le domaine C-terminal présente une grande variabilité et serait responsable de l'interaction sélective de chaque protéine S100 avec sa protéine cible spécifique.

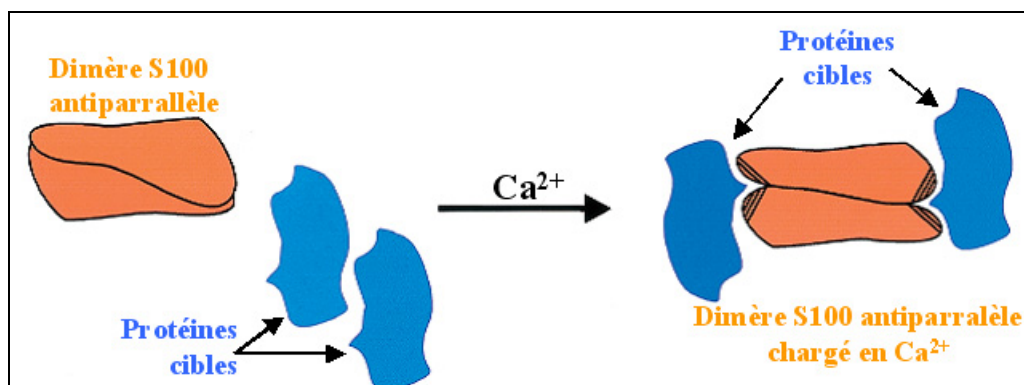
Les protéines S100 sont sous forme d'homo- et / ou d'hétérodimères où les monomères sont liés de façon anti-parallèles par des interactions non covalentes. Dans l'absolu, la présence de  $\text{Ca}^{2+}$  n'est pas nécessaire à la formation du dimère, ce qui suggère que les protéines S100 sont susceptibles d'exister en tant que dimères pré-assemblés.



**Figure 24** : Représentation schématique de la structure d'une protéine S100.

*Repris et modifié d'après (Eckert et al, 2004a).*

Lors de la fixation du  $\text{Ca}^{2+}$ , le réarrangement des hélices permet la formation, au niveau de chaque monomère, d'une « fissure » dont les résidus d'acides aminés présents à ce niveau vont former un site de reconnaissance spécifique pour une protéine cible. Etant donné la structure anti-parallèle du dimère S100, les protéines cibles se fixent de façon inversée aux extrémités du dimère. Le complexe final formé est un hétérotétramère composé de deux sous-unités de protéine S100 et de deux sous-unités de protéine cible (Figure 25).



**Figure 25 :** Modèle d'interaction Protéines S100 / Protéines cibles.

*Repris et modifié d'après (Eckert et al, 2004a).*

Les protéines S100 sont sous forme de dimère antiparallèle. Une augmentation de la concentration calcique entraîne un changement conformationnel du dimère ainsi que l'apparition de deux « fissures », sites de liaison de protéines cibles (en hachuré sur le schéma), au niveau du domaine C-terminal de chaque protéine S100. Ainsi, un seul dimère S100 peut fixer deux protéines cibles.

L'étude des protéines S100 au niveau de l'épiderme a consisté principalement à la localisation de ces protéines et à l'analyse de leur expression. Elles ont démontré leurs rôles dans divers phénomènes tels que la cicatrisation, la différenciation ou encore la réponse à un stress. Par exemple, *in vitro*, la protéine S100A2 a une localisation majoritairement nucléaire. Un stress oxydatif engendré par un traitement avec de l'eau oxygénée a pour conséquence un relargage de S100A2 dans le cytoplasme (Zhang *et al*, 2002). La mort cellulaire est observée 24 heures post-traitement, alors que la translocation de S100A2 s'effectue au bout d'une heure. Ainsi S100A2 peut être considérée comme un marqueur précoce de la mort cellulaire engendrée par un stress oxydatif sur des kératinocytes en culture.

La protéine S100A7, appelée également psoriasine, est originellement caractérisée comme un marqueur du psoriasis. Sa surexpression se retrouve dans d'autres maladies épidermiques inflammatoires telles que la dermatite atopique ou encore la maladie de Darier. Dans l'épiderme normal humain, elle se localise à la périphérie cytoplasmique des kératinocytes en différenciation terminale (Broome *et al*, 2003). *In vivo*, son expression se retrouve très majoritairement au niveau des couches supérieures. *In vitro*, son expression augmente avec l'induction de la différenciation (Martinsson *et al*, 2005). Des études ont montré que S100A7 aurait un rôle équivalent à celui d'un agent chimiotactique ou encore d'une cytokine, ce qui lui permettrait le recrutement de lymphocytes



CD4+ et de neutrophiles (Jinquan *et al*, 1996). L'expression de cette protéine est régulée par divers agents. Par exemple, un traitement avec de l'acide rétinoïque, du calcium ou encore un traitement aux UV sur des kératinocytes en culture a pour conséquence une augmentation de la synthèse de S100A7 (Eckert *et al*, 2004a). En ce qui concerne le type de protéines cibles de S100A7, il a été démontré que E-FABP (*epidermal fatty acid binding protein*) interagit de façon spécifique avec S100A7 (Hagens *et al*, 1999). Cette protéine appartient à une famille multigénique de protéines impliquées dans le métabolisme lipidique, de la solubilisation au stockage, mais aussi dans le transport d'acides gras. Le complexe ainsi formé pourrait avoir un rôle dans le transport et le métabolisme lipidique lors de la mise en place de la barrière lipidique épidermique, mais aussi dans la modulation de la réponse inflammatoire dans certaines maladies de peau telles que le psoriasis.

Les protéines S100A8 et S100A9 peuvent former des homo- et des hétérodimères et sont fréquemment co-exprimées. Elles ont été décrites comme étant induites suite à divers stress de la peau, tels que l'arrachement par ruban adhésif (*tape stripping*), l'exposition à des détergents ainsi qu'aux UV, ou encore l'application de vaseline (Marionnet *et al*, 2003). Dans l'épiderme normal, ces deux protéines sont exprimées à un taux très faible, bien qu'une expression occasionnelle soit observée au niveau de la couche granuleuse, alors qu'elles sont surexprimées et se retrouvent dans les couches basales, épineuses et granuleuses sur un épiderme atteint de psoriasis (Broome *et al*, 2003). Plus récemment, des études ont montré que l'expression de S100A9 se retrouve très majoritairement au niveau des couches supérieures de l'épiderme normal humain *in vivo*. *In vitro*, son expression augmente avec l'induction de la différenciation (Martinsson *et al*, 2005). Ces deux protéines (S100A8 et S100A9) sont très fortement induites après une blessure de l'épiderme, ce qui leur conférerait un rôle dans l'induction et / ou la réponse à un état hyperprolifératif de l'épiderme. De plus, elles sont efficacement sécrétées par les cellules HaCaT, une lignée cellulaire de kératinocytes humains (Thorey *et al*, 2001), sur laquelle il a été mis en évidence que S100A8 inhiberait l'activité télomérase lors de la différenciation (Rosenberger *et al*, 2007). L'irradiation par les UVA constitue un autre facteur qui entraîne la surexpression de S100A8, mais indépendamment de S100A9 (partenaire hétérodimérique de S100A8), ce qui suggère que S100A8 fonctionne sous une forme homodimérique dans ce modèle (Grimbaldeston *et al*, 2003). Cette observation intéressante diffère d'autres résultats obtenus sur des souris KO S100A9, montrant qu'une élimination de S100A9 résultait dans la perte d'expression de S100A8 (Manitz *et al*, 2003).

Nommée également p11, S100A10 se retrouve à la fois au niveau du cytoplasme ainsi qu'à la périphérie cellulaire des kératinocytes des couches basale et épineuse de l'épiderme humain normal (Broome *et al*, 2003). Les homodimères de S100A10 ont pour protéine cible l'annexine A2 formant

ainsi un hétérotétramère : la calpactine I. L'annexine A2 appartient à la famille multigénique des annexines, composée de protéines liant le  $\text{Ca}^{2+}$  et pouvant interagir avec les phospholipides. Contrairement aux autres protéines S100, on retrouve sur S100A10 des mutations de type substitution et délétion au niveau des mains EF, entraînant une inactivation des sites liant le  $\text{Ca}^{2+}$ . Cela n'empêche pas S100A10 d'être en permanence sous forme active d'une manière  $\text{Ca}^{2+}$ -indépendante. Etant donné la capacité de l'annexine A2 à interagir mais aussi à structurer les membranes lipidiques, il n'est pas surprenant de constater que la calpactine I s'associe à la membrane plasmique, ou encore que S100A10 se retrouve incorporée en tant que constituant de l'enveloppe cornée des kératinocytes (Robinson *et al*, 1997). La fonction principale de la calpactine I dans l'épiderme concernerait principalement le remodelage de la membrane plasmique des kératinocytes différenciés. D'autre part, la calpactine I pourrait également former un canal impliqué dans l'influx calcique au sein de l'épiderme (Gerke *et al*, 2005).

La protéine S100A11, aussi appelée S100C ou encore calgizzarine, se localise dans le cytoplasme des kératinocytes de la couche basale ainsi qu'à la périphérie des cellules de la couche épineuse. Une protéine cible de la calgizzarine est l'annexine A1. Le complexe S100A11 / annexine A1 ainsi formé consiste en un hétérotétramère formé de deux S100A11 et de deux annexines A1. A l'image de S100A10, le complexe formé semble intervenir dans la régulation du remodelage de la membrane plasmique des kératinocytes lors de la différenciation. De plus il a été mis en évidence que S100A11, mais aussi l'annexine A1, sont des constituants de l'enveloppe cornée (Robinson *et al*, 1997 ; Rety *et al*, 2000). Bien que cela ne soit pas démontré, il semblerait également que le tétramère (S100A11 / annexine A1) soit à l'origine de la mise en place de canaux calciques, étant donné l'environnement acide et oxydant observé lors de la différenciation kératinocytaire (Gerke and Moss, 2002). D'autres études rapportent également que S100A11 serait impliquée dans l'inhibition de la prolifération cellulaire lors de la différenciation kératinocytaire. En effet, une augmentation de  $\text{Ca}^{2+}$  serait à l'origine de la phosphorylation de S100A11, ce qui faciliterait sa fixation avec la nucléoline, une protéine pourvue d'une séquence NLS (*nuclear localization sequence*). Cette fixation a pour conséquence la translocation de S100A11 vers le noyau. A ce niveau il existerait une compétition à lier la nucléoline entre S100A11 et les facteurs Sp1/Sp3. En effet, l'interaction de S100A11 avec la nucléoline engendrerait un changement conformationnel de cette dernière, empêchant ainsi sa liaison avec Sp1 et Sp3. Cette interaction permettrait l'induction transcriptionnelle par Sp1 et Sp3 de p21, un régulateur négatif de la prolifération cellulaire (Sakaguchi *et al*, 2003).

S100A12, nommée également calgranuline C, est une protéine pro-inflammatoire surexprimée dans plusieurs maladies de la peau, dont le psoriasis. Dans ce dernier cas, elle se localise au niveau des couches suprabasales de l'épiderme. S100A12 interagit avec le récepteur *RAGE* (*receptor for advanced glycation endproducts*). Ces récepteurs appartiennent à la superfamille des immunoglobulines localisées à la surface cellulaire. L'activation du récepteur RAGE par S100A12 contribuerait à l'aggravation du phénotype psoriasique.

Enfin, S100A15 est une protéine présentant 93% d'homologie avec S100A7. Elle a été identifiée pour la première fois dans une peau psoriasique, où le gène de S100A15, en fonction de l'épissage, code pour 2 ARNm. L'expression des deux isoformes est induite lors de la différenciation kératinocytaire ou encore après traitement avec une cytokine de type Th1 *in vitro* (Wolf *et al*, 2007). Une autre étude évoque le rôle antimicrobien de S100A15. En effet, son expression est induite suite à une infection par la bactérie E. Coli (Buchau *et al*, 2007).

En résumé, les protéines S100 auraient plusieurs fonctions dans l'épiderme. Tout d'abord, elles semblent impliquées dans le processus inflammatoire et seraient donc des pièces essentielles dans les maladies inflammatoires épidermiques. Ensuite, elles interviendraient dans le remodelage de la membrane plasmique des kératinocytes. Une autre fonction, étant donné l'interaction avec certaines protéines cibles de type annexine, consisterait à la mise en place de canaux calciques. Puisque certaines protéines S100 se retrouvent dans la structure de l'enveloppe cornée, elles pourraient avoir un rôle dans la protection de la peau contre les infections bactériennes.

## VIII. Les transglutaminases

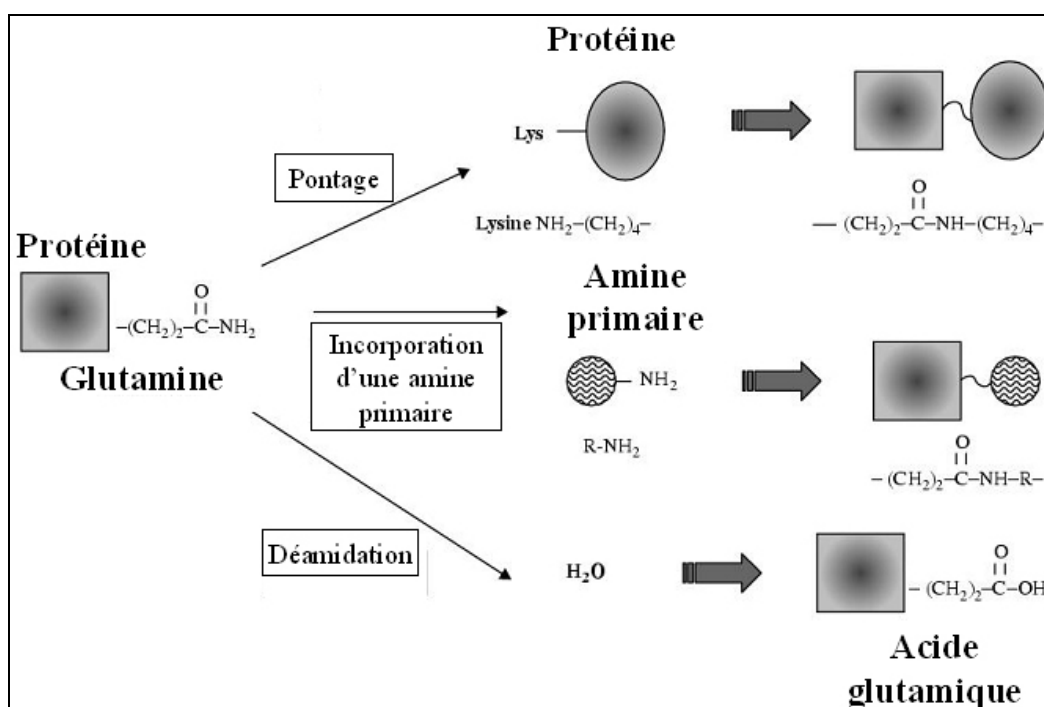
Les transglutaminases (TG) représentent une famille d'enzymes qui catalyse une réaction de pontage protéique. Les transglutaminases agissent en catalysant la formation d'une liaison covalente entre un groupement  $\gamma$ -carboxamide d'un résidu glutamine et un groupement  $\epsilon$ -amine d'un résidu lysine ou d'une polyamine. Elles créent ainsi des ponts entre différentes protéines ou au sein d'une même protéine. En l'absence de groupements amine accepteurs, la transglutaminase tissulaire peut «déamidé» des résidus glutamine en résidus acide glutamique (Figure 26). Cette réaction entraîne soit la formation d'une liaison isopeptidique, soit l'incorporation d'une amine primaire par une protéine. Cette réaction de pontage a pour conséquence la mise en place de structures supramoléculaires possédant une très bonne stabilité.

Chez l'homme, huit isozymes ont été identifiés. Les transglutaminases sont impliquées dans plusieurs processus physiologiques incluant l'apoptose, la coagulation du sang ou encore l'assemblage de la matrice cellulaire. Parmi les huit isozymes répertoriés chez l'homme, trois sont

majoritairement exprimés au niveau de l'épiderme. Il s'agit des TG-1, -3 et -5. Par définition, bien qu'elles ne fassent pas partie de l'EDC, leur activité enzymatique est indispensable à la mise en place de l'enveloppe cornée et donc à la différenciation kératinocytaire. La TG-2, exprimée de façon ubiquitaire, a été localisée dans l'épiderme et le derme, mais à l'heure actuelle, elle n'a pas été observée comme étant impliquée dans la mise en place de l'enveloppe cornée. En revanche, des études ont montré que TG-2 est impliquée principalement dans le pontage des protéines de la matrice extracellulaire et contribue ainsi à la réponse fibroblastique lors du processus de cicatrisation (Stephens *et al*, 2004).

Le gène codant pour l'enzyme TG-1 a une longueur de 14133 pb et se compose de 15 exons et de 14 introns. Le transcrit de la TG-1 a une longueur de 2777 pb. En ce qui concerne sa régulation génique, le gène de la TG-1 possède une région distale dans laquelle on retrouve un site de liaison à AP1 et deux sites de liaison à Sp1. Une mutation au niveau d'un site Sp1 ou d'AP1 a un effet faible sur la transcription de TG-1, tandis qu'une mutation sur chacun des trois sites a pour conséquence une forte inhibition de l'activité transcriptionnelle (Phillips *et al*, 2004). La protéine TG-1 traduite a une longueur de 807 acides aminés. Son poids moléculaire avoisine les 106 kDa. A ce niveau, la TG-1 se retrouve sous sa forme zymogène.

Durant le processus de différenciation kératinocytaire, la TG-1 est donc protéolysée en trois parties (de 10, 33 et 67 kDa) qui sont ensuite reliées par liaisons non covalentes pour ainsi former un complexe responsable de l'activité enzymatique (Kim *et al*, 1995). Bien que les protéases impliquées dans l'activation de la forme zymogène de TG-1 restent non identifiées, des études ont montré que la calpaine, protéase calcium-intracellulaire-dépendante, mais aussi la cathepsine D, une protéase lysosomale, seraient impliquées dans cette fonction. En effet, l'utilisation d'un inhibiteur de la calpaine sur des kératinocytes en culture réduit la formation de l'enveloppe cornée en inhibant le processus d'activation de la TG-1 (Kim and Bae, 1998). De même, des souris KO pour le gène de la cathepsine D montrent une altération morphologique au niveau de la couche cornée équivalente à celle observée lors d'ichtyose lamellaire, une maladie humaine qui se caractérise par un déficit en TG-1 (Egberts *et al*, 2004). La cathepsine D pourrait être une candidate en tant que protéase pour l'activation de TG-1.



**Figure 26 :** Mode d'action des transglutaminases.

*Repris et modifié d'après (Hitomi, 2005).*

L'expression de la TG-1 s'effectue principalement au niveau de la couche granuleuse, bien que sa forme active soit également observée au niveau de la couche épineuse (Iizuka *et al*, 2003). Son expression est également observée à des stades de différenciation plus tardifs sur des kératinocytes en culture (Steinert *et al*, 1996). Sa fonction principale consiste à lier les diverses protéines nécessaires à la formation de l'enveloppe cornée. Elle contribue également à l'ancrage de lipides sur les protéines de l'enveloppe cornée en estérifiant des  $\omega$ -hydroxyceramides majoritairement sur l'involucrine.

La TG-3, codée par un gène de 42,8 kpb, se compose de 13 exons et code pour un ARNm d'une longueur de 2679 bp. Récemment, une étude rapporte l'existence de deux variants, mais ils ne semblent pas être régulés lors du processus de différenciation (Zocchi *et al*, 2007). L'analyse de la région promotrice de TG-3 a permis d'identifier entre les positions -126 et -91 (par rapport au site d'initiation), deux sites de liaisons à Sp1 et Ets (Lee *et al*, 1996), nécessaires à l'expression de TG-3 *in vitro*. Bien que le site de liaison à Ets ait été caractérisé entre les positions -118 et -111, il semble que les nucléotides situés en amont (jusqu'à la position -126) soient indispensables à la transcription de TG-3 (Kim *et al*, 2004).

Durant le processus de différenciation, la TG-3 est tout d'abord synthétisée sous sa forme zymogène de poids moléculaire de 77 kDa, avant d'être clivée en deux éléments de 30 et 47 kDa. Identiquement à la TG-1, les fragments protéolysés s'unissent par l'intermédiaire de liaisons non covalentes pour donner la forme active de la TG-3. Les protéases impliquées dans la maturation de la TG-3 *in vivo* demeurent non identifiées. Néanmoins, la dispase, une protéase bactérienne, clive la TG-3 zymogène en deux fragments de 30 et 47 kDa *in vitro*. Il en est de même pour les cathepsines S et L (Zeeuwen, 2004).

L'expression de la TG-3 se retrouve principalement au niveau des couches granuleuses et cornées de l'épiderme (Hitomi *et al*, 2003). Sur des kératinocytes en culture, la distribution de TG-3 s'effectue de façon diffuse dans le cytoplasme. Une fois mature, la TG-3 permet le pontage de protéines cytoplasmiques impliquées dans la structure de l'enveloppe cornée, telles que la loricrine ou encore les SPRs. La localisation cellulaire différente de la TG-3 par rapport à celle de la TG-1 permet d'établir l'hypothèse que les deux enzymes ont chacune des substrats spécifiques. En effet, *in vitro*, la TG-3 favorise certaines lysines et glutamines de la loricrine recombinante en formant majoritairement des ponts intramoléculaires, tandis que la TG-1 forme principalement de larges complexes oligomériques intermoléculaires impliquant différentes lysines et glutamines (Candi *et al*, 1995). D'autres études réalisées *in vitro* ont montré que la TG-3 ponterait d'abord la loricrine avec SPR1, formant ainsi des petits oligomères qui seraient de manière permanente apposés à l'enveloppe cornée grâce à l'activité de la TG-1 (Candi *et al*, 1999). Ces observations suggèrent que TG-1 et -3 agissent séquentiellement et en utilisant différents résidus lysine et glutamine afin d'effectuer des pontages protéiques.

Le gène de la TG-5, d'une longueur de 35 kb environ, se compose de 13 exons et de 12 introns. Bien que la boîte TATA soit absente, plusieurs sites de régulation ont été identifiés dans la région proximale du promoteur de TG-5 ainsi qu'en aval du site d'initiation, dont un site Ets-1, trois sites Sp1 et un site AP1, typiquement retrouvés au niveau de gènes exprimés spécifiquement dans les kératinocytes. On retrouve également d'autres sites de liaisons dont une boîte CAAT, des sites de liaisons à NFI (*nuclear factor I*), et à USF (*upstream stimulatory factor*). Ces 3 derniers ont déjà été décrits au niveau de gènes dépourvus de boîte TATA. A noter également la présence d'un site de liaison à NFκB et à c-Myb (Grenard *et al*, 2001). Ce dernier a également été identifié comme régulateur de gènes dépourvus de boîte TATA impliqués dans l'hématopoïèse, et interagissant avec Ets (Oh and Reddy, 1999). D'autre part, plusieurs sites AP1 ont été caractérisés dans les 2,5 kb de séquence en aval du gène de TG-5 et pourraient interagir avec le site AP1 situé dans la région proximale du promoteur de TG-3 (Grenard *et al*, 2001).

Le gène de la TG-5 code pour une protéine d'une longueur de 720 acides aminés, dont le poids moléculaire est de 80 kDa. Contrairement à TG-1 et TG-3, TG-5 ne requiert pas d'étape de protéolyse pour être activée. En effet, des études cinétiques ainsi que des expérimentations de « cross-linking » *in vitro* suggèrent que TG-5 est active sous sa forme entière, ses principaux substrats identifiés restant la lorïcricine, l'involucrine ou encore les SPRs impliquées dans la mise en place de l'enveloppe cornée (Candi *et al*, 2001). Néanmoins la TG-5 subit une étape de maturation post-traductionnelle caractérisée par une acétylation au niveau de son extrémité N-terminale (Rufini *et al*, 2004). *In vivo*, la TG-5 se localise principalement au niveau de la couche granuleuse de l'épiderme. Elle est aussi exprimée *in vitro* (Candi *et al*, 2002).

Divers agents intracellulaires, impliqués dans l'activité des TGs ont été rapportés. Par exemple, le GTP (Guanosine triphosphate), inhibe l'activité des TG-2, -3 et -5 *in vitro*. Son effet inhibiteur est stoppé par la présence d'ions  $Ca^{2+}$  (Candi *et al*, 2004). De même, l'oxyde nitrique (nitric oxyd, NO), impliqué dans le processus inflammatoire, la mélanogénèse UV-induite ou encore la cicatrisation, inhibe la formation de l'enveloppe cornée en inactivant TG-1 et TG-3 (Rossi *et al*, 2000). La sphingosylphosphorylcholine (SPC), un sphingolipide de la sphingomyéline, augmente significativement le taux d'ARNm de TG-1 ainsi que son activité enzymatique. De plus SPC active simultanément la cathepsine D, une protéine candidate pour la protéolyse de TG-1 (Higuchi *et al*, 2001). Sur des kératinocytes en culture, la surexpression de TIG3, un membre de la famille des protéines suppresseur de tumeur, est associée avec l'augmentation de l'activité de TG-1 sans variation des taux d'ARNm et de protéine, ce qui suggère une interaction directe de TIG3 avec TG-1 (Sturniolo *et al*, 2003). Le sulfate de cholestérol (SC) est un lipide membranaire formé pendant la différenciation kératinocytaire, grâce à l'activité de la cholestérol sulfotransférase. Le traitement de kératinocytes au SC induit une augmentation de l'expression de TG-1 (Kawabe *et al*, 1998). En revanche, l'utilisation d'une concentration supraphysiologique de SC inhibe en grande partie l'activité de TG-1 (Nemes *et al*, 2000). Enfin, l'acide époxyeicosatriénoïque (epoxyeicosatriénoic acid, EET) est un métabolite du cytochrome P450 CYP2B19. Ce dernier possède une activité époxygénase envers l'acide arachidonique dans la couche granuleuse de l'épiderme. L'ajout exogène d'EET augmente *in situ* l'activité TG sur des kératinocytes en culture. Dans ce cas, l'involucrine est utilisée en tant que substrat préférentiel, associé avec une augmentation de la formation de l'enveloppe cornée (Ladd *et al*, 2003).

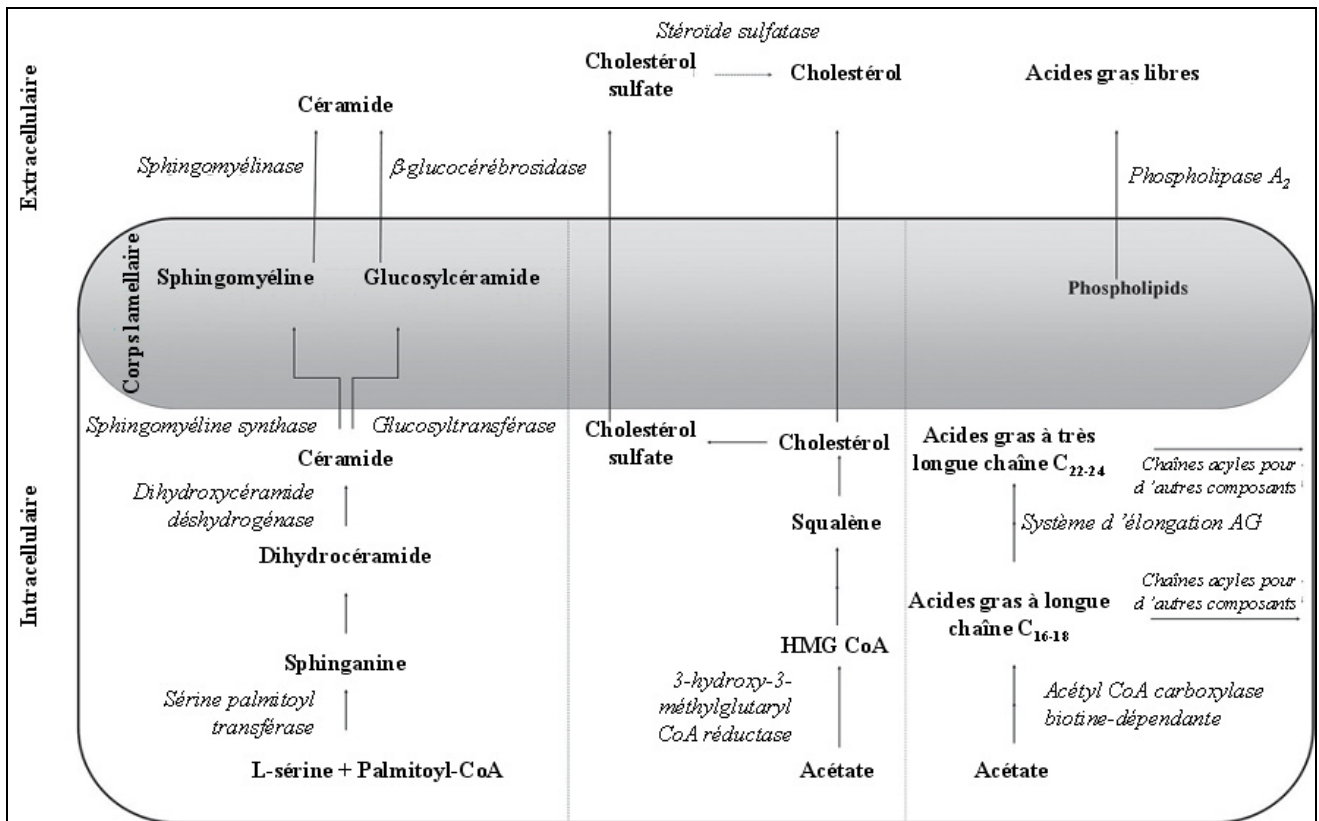
Parmi toutes les protéines impliquées dans la formation de l'enveloppe cornée, les substrats majeur des TG sont l'involucrine, la lorïcricine et les SPRs. Ces protéines se caractérisent par leur séquences riches en résidus glutamine et lysine généralement modifiés par les TG. En effet, la TG-1

est responsable de l'oligomérisation de l'involucrine dès les premières étapes de la formation de l'enveloppe cornée (Steinert and Marekov, 1997) et également de l'ancrage par liaison ester des céramides sur l'involucrine aux temps tardifs (Nemes *et al*, 1999). De même, les SPRs sont ancrées à la loricrine, élément majeur de l'enveloppe cornée (75%). D'autres protéines comme les S100A11 et S100A10 sont décrites comme étant des substrats de la TG (Robinson *et al*, 1997). La filaggrine est également rapportée comme étant un substrat de TG au niveau de l'épiderme plantaire humain (Simon *et al*, 1996). Enfin, la *SKALP* (*skin-derived antileuko-proteinase*), l'élafine, la cystatine  $\alpha$ , l'annexine I, la cornifine ou encore la kératine ont été caractérisées comme étant potentiellement des substrats de TG (Robinson *et al*, 1997 ; Zeeuwen *et al*, 1997 ; Candi *et al*, 1998).

## **IX. Le métabolisme lipidique dans la différenciation kératinocytaire**

La couche cornée est formée de cornéocytes incorporés dans une matrice lipidique intercellulaire. Les lipides de la couche cornée sont à l'origine de la mise en place d'une barrière perméable et sont très différents des lipides qui constituent les membranes biologiques. La matrice lipidique intercellulaire se compose principalement de céramides (60%), de cholestérol (20%), et d'acides gras libres (20%). Elle contient, en quantité moindre, des sulfates de cholestérol ainsi que d'autres lipides (Weerheim and Ponc, 2001). Les céramides présents dans la couche cornée sont très divers. Les acides gras libres sont principalement des acides gras à longues chaînes ( $C_{22}$  et  $C_{24}$ ). Dans le processus de différenciation épidermique, les lipides qui constituent la couche cornée sont stockés sous forme de précurseurs dans les corps lamellaires de la couche granuleuse. Lorsqu'ils sont sécrétés dans les espaces extracellulaires de la couche cornée, ces lipides vont être métabolisés par diverses enzymes également stockées dans les corps lamellaires. L'exocytose de ces lipides ainsi que de certaines enzymes hydrolytiques des corps lamellaires est également déclenchée par l'augmentation du taux de  $Ca^{2+}$  intracellulaire dans les kératinocytes en cours de différenciation. Ce phénomène se produit à l'interface des couches granuleuse et cornée. Les étapes principales de la mise en place de cette barrière lipidique sont résumées dans la figure 27.





**Figure 27 :** Illustration schématique de la génération intracellulaire des précurseurs lipidiques, de leur séquestration dans les corps lamellaires et de la mise en place de la matrice lipidique extracellulaire au niveau de la couche cornée. AG = acide gras.

Repris et modifié d'après (Houben et al, 2007).

## IX.1. Les constituants lipidiques de la couche cornée

### IX.1.1. Les céramides

La synthèse des céramides débute par la condensation de la L-sérine et du palmitoyl-coenzyme A (CoA) par la sérine palmitoyl transférase. La molécule nouvellement synthétisée est alors convertie soit en sphingomyéline, soit en glucosylcéramide, toutes deux stockées dans les corps lamellaires. Les céramides extracellulaires, en plus de leur rôle essentiel dans la « fonction barrière » de l'épiderme, sont décrits pour avoir également un rôle dans la signalisation de plusieurs processus cellulaires dans les kératinocytes. Par exemple, une augmentation de céramides intracellulaires dans des kératinocytes en culture favorise la différenciation kératinocytaire et

l'apoptose, mais inhibe également la prolifération (Geilen *et al*, 1996 ; Geilen *et al*, 1997 ; Bektas *et al*, 1998). La sphingosine est connue pour stimuler la prolifération (Wakita *et al*, 1994), tandis que sa forme phosphorylée, la sphingosine-1-phosphate, possède des propriétés antiprolifératives, augmente la différenciation et protège les kératinocytes de l'apoptose. Des enzymes telles que la céramidase ou encore la sphingosine-1-kinase, impliquées dans la mise en place d'un équilibre des taux de céramides, de sphingosines et de sphingosine-1-phosphate, jouent donc un rôle crucial dans l'homéostasie de l'épiderme et seraient impliquées dans la survie cellulaire (Maceyka *et al*, 2002). Plus récemment, une enzyme impliquée dans l'hydroxylation des dihydrocéramides a été caractérisée chez l'homme. Cette enzyme, nommée DEGS2 (*D*egenerative *S*permatocyte, *drosophila*, *h*omolog of, 2) ou encore hDES2 (*h*uman *DES*2), a la particularité d'être bifonctionnelle : elle possède une activité sphingolipide delta-4 désaturase ainsi qu'une activité sphingolipide C4-hydroxylase. L'expression de cette enzyme augmente pendant le processus de différenciation kératinocytaire (Mizutani *et al*, 2004).

### **IX.1.2. Le cholestérol et le sulfate de cholestérol**

Chez les mammifères, l'épiderme est un site important de la synthèse du cholestérol. Cette dernière s'effectue spécifiquement au niveau de la couche basale. L'enzyme responsable de la synthèse du cholestérol est la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA réductase. Le cholestérol est le stéroïde majoritaire de l'épiderme. Il est stocké et libéré des corps lamellaires sous sa forme définitive. Il n'est donc pas soumis à des transformations extracellulaires. Deux gènes codants pour des protéines impliquées dans le transport du cholestérol sont surexprimés lors de la différenciation kératinocytaire : il s'agit des gènes ABCB1 (*A*TP-*b*inding *c*assette, *s*ubfamily *B*, *m*ember 1) et ABCG1 (*A*TP-*b*inding *c*assette, *s*ubfamily *G*, *m*ember 1) (Kielar *et al*, 2003). Ces gènes appartiennent à la superfamille des transporteurs ABC, qui utilisent comme source d'énergie l'hydrolyse de l'ATP, afin de permettre le passage de composés divers à travers les membranes cellulaires (ions, sucres, acides aminés, vitamines, peptides, polysaccharides, hormones, lipides et xénobiotiques). Au niveau de la couche granuleuse, une infime portion du cholestérol épidermique est sulfatée. Cette réaction se fait *via* l'activité d'une cholestérol sulfotransférase. Pour une desquamation physiologique de la couche cornée, la désulfatation, par l'intermédiaire de sulfatases stéroïdiennes, est requise. Le sulfate de cholestérol faciliterait donc la dissolution du cholestérol pour stabiliser l'organisation lipidique de la couche cornée (Bouwstra *et al*, 1999).

### IX.1.3. Les acides gras

Dans l'épiderme, l'enzyme impliquée dans la synthèse des acides gras est l'acétyl-CoA-carboxylase biotine-dépendante. Elle catalyse la formation du malonyl-CoA, qui est ensuite converti sous la forme d'un acide gras à longue (ou très longue) chaîne typique de l'épiderme. L'acide linoléique, bien que requis pour une fonction barrière perméable normale, n'est pas synthétisé dans l'épiderme, mais est incorporé par les kératinocytes *via* un mécanisme spécifique, qui possède donc une préférence pour cet acide gras essentiel et particulier (Schurer *et al*, 1999). Le transport intercellulaire des acides gras est ensuite assuré, entre autre, par les protéines FABPs (*fatty-acid-binding proteins*) (Schurer, 2002).

Les acides gras *de novo* synthétisés servent comme chaîne acyle pour d'autres composants de l'enveloppe cornée et ne sont donc pas ceux que l'on retrouve au niveau des interstices de la couche cornée. En effet, le contenu en acides gras libres que l'on retrouve dans la couche cornée provient de l'hydrolyse, par des lipases, de phospholipides sécrétés par les corps lamellaires et, dans une mesure moindre, de l'hydrolyse de triglycérides (Mao-Qiang *et al*, 1995).

L'expression de plusieurs gènes impliqués dans le transport des acides gras à longue ou très longue chaîne est modulée pendant le phénomène de différenciation kératinocytaire : *in vitro*, les gènes ABCB9 et ABCD1 sont réprimés alors que d'autres gènes, notamment ABCA7, ABCB1, ABCC1, ABCC3, ABCC4, et ABCG1 sont surexprimés. De même, les gènes FATP1, FATP3, FATP4 et FATP5, membres de la famille FATP (*fatty acid transporter protein*) sont surexprimés pendant la différenciation kératinocytaire *in vitro*. D'autres gènes tels que FABP-PM (*FABP-plasma membrane*) et FABP5 sont également exprimés dans des cultures primaires de kératinocytes, mais aucune surexpression n'a été observée lors de la différenciation kératinocytaire *in vitro* (Kielar *et al*, 2003).

# Cycle cellulaire, apoptose et différenciation épidermique

Par définition, le cycle cellulaire décrit le mécanisme universel de la duplication d'une cellule dont les étapes ont été définies par rapport aux événements majeurs de la vie de la cellule : la synthèse de l'ADN et la division cellulaire. Chez les eucaryotes, le cycle cellulaire assure la duplication et la répartition aux cellules filles de l'ADN génomique (ADNg).

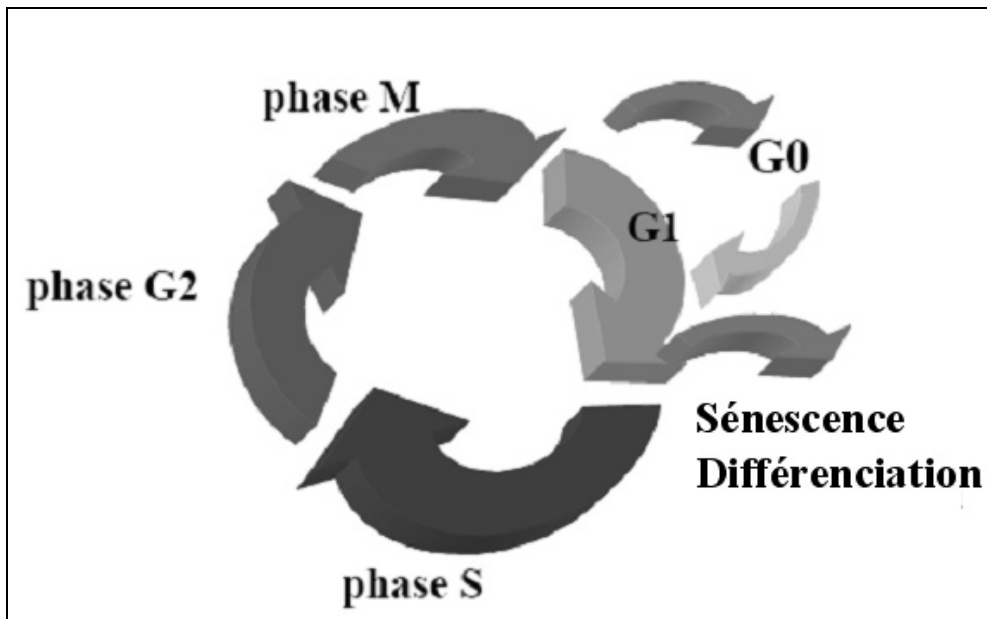
Le cycle cellulaire se divise en quatre phases :

1. La phase G1 : la cellule se prépare pour la réplication de son contenu en ADN. Pendant cette phase, la cellule acquiert les signaux mitogéniques et / ou d'inhibition de la prolifération. Au point de restriction, la cellule prend alors la décision d'arrêter, de sortir ou de procéder au cycle cellulaire.
2. La phase S : cette phase se définit comme l'étape durant laquelle s'effectue la synthèse de l'ADNg. La cellule passe d'un contenu de  $2n$  à  $4n$  chromosomes.
3. La phase G2 : la cellule prépare sa division.
4. La phase M ou mitose : les chromosomes répliqués sont ségrégués dans deux noyaux séparés. La cytokinèse s'effectue. La cellule se divise et donne ainsi naissance à deux cellules filles. Les cellules sont à nouveau en phase G1.

Dans un organisme adulte, la plupart des cellules sont sorties du cycle cellulaire : elles ne progressent plus de G1 vers S. On dit qu'elles sont en quiescence ou G0. Ces cellules en G0 peuvent néanmoins reprendre le cycle cellulaire et ré-initier la progression de G1 vers S ce qui entraîne à nouveau la prolifération cellulaire. En revanche, certaines cellules qui sortent du cycle ne peuvent pas le reprendre parce qu'elles ont subi beaucoup de changements biochimiques : c'est le cas des cellules en différenciation terminale et des cellules sénescents (Figure 28).

## I. La régulation du cycle cellulaire

Toutes les étapes du cycle cellulaire sont finement régulées. La régulation du cycle cellulaire repose essentiellement sur deux structures protéiques complémentaires, les Cdks (Cycline-dependent kinases) et les cyclines qui s'associent pour former ensuite des complexes hétérodimériques.



**Figure 28** : Représentation schématique simplifiée des étapes du cycle cellulaire.

### **I.1. Les complexes Cdk / cycline**

Les Cdks appartiennent à la superfamille des protéines kinases, enzymes dont la fonction principale consiste à assurer une transduction du signal par le biais de la phosphorylation. Les Cdks ne sont actives que lorsqu'elles sont phosphorylées et ont fixé leur partenaire cycline.

Les cyclines constituent la partie régulatrice du complexe Cdk / cycline. Les cyclines ne sont pas présentes pendant tout le cycle. Elles apparaissent puis disparaissent brusquement à des moments précis du cycle cellulaire.

Les complexes Cdk / cycline assurent donc le bon déroulement du cycle cellulaire, permettant ainsi le passage d'une phase à l'autre. Les principaux complexes Cdk / cycline sont décrits dans le tableau 6. Un des éléments régulateurs du cycle cellulaire est donc dû à la variation de l'activité des différents complexes Cdk / cycline, engendrée par la phosphorylation des Cdks, ou encore par le contrôle du taux de cyclines dans le noyau.

Phases du cycle	Complexes Cycline / Cdk	Effets des complexes
<b>G1</b>	Cycline D / Cdk4 et Cycline D / Cdk 6	- Phosphorylent et inactivent la protéine pRb ("Rétinoblastoma protein"), ce qui a pour effet de libérer les facteurs de transcription E2F qui contrôlent l'expression de gènes nécessaires pour la transition G1/S et pour la progression de S (synthèse des cyclines E et A, entre autres).
<b>G1/S</b>	Cycline E / Cdk 2	- Responsable de la transition G1/S. Phosphoryle la protéine pRb.
<b>S</b>	Cycline A / Cdk 2	- Phosphoryle des substrats qui déclenchent et entretiennent la réplication de l'ADN et l'inactivation de facteurs de transcription de la phase G1. - Induit la duplication du centrosome chez les mammifères. - Arrêt de la dégradation de la cycline B qui s'accumule.
<b>G2/M</b>	Cycline B / Cdk 1	- Dirige la transition G2/M par phosphorylation de nombreux substrats et conduit la progression de la mitose.

**Tableau 6 :** Les complexes Cdk / cycline dans les différentes phases du cycle cellulaire.

Lorsqu'une cellule quiescente (en G0) est stimulée de façon à reprendre le cycle cellulaire, les cyclines D (D1, D2 et D3) sont les premières induites. Elles se fixent et activent Cdk4 et Cdk6. Le complexe formé a pour substrat la protéine suppresseur de tumeur pRb (*Retinoblastoma protein*). Cette dernière a un rôle critique et apparaît comme un composant majeur du réseau moléculaire impliqué dans le contrôle de la régulation de la phase G1. En effet, il a été démontré qu'elle se fixe à un grand nombre de protéines, dont les facteurs de transcription de la famille E2F. Ces derniers régulent l'expression de plusieurs gènes codant des protéines impliquées dans la progression du cycle cellulaire et dans la synthèse de l'ADN. La fixation de pRb à E2F inhibe l'activité transcriptionnelle de ce dernier. La phosphorylation de la protéine pRb par le complexe Cdk / cycline D a pour conséquence de dissocier pRb de E2F, permettant ainsi l'expression des gènes reconnus par E2F.

Après l'activation de E2F, la cycline E est induite et s'associe avec Cdk2. Le complexe formé est indispensable au passage de G1 vers S et participe au maintien de pRb sous sa forme hyperphosphorylée, ce qui permet également l'accumulation de E2F sous sa forme active. Comme beaucoup d'autres complexes Cdk / cycline, Cdk2 / cycline E phosphoryle l'histone H1, protéine

impliquée dans la structure de la chromatine ce qui confère à Cdk2 / cycline E un rôle dans le réarrangement de la chromatine lors de la réplication du génome.

La cycline A, qui est en partie régulée par E2F, s'accumule lors de la transition G1 / S et se retrouve durant la phase S. La cycline A est initialement associée avec Cdk2, puis avec Cdk1 dans les dernières étapes de la phase S. Le complexe Cdk2 / cycline A est indispensable à l'entrée et au bon déroulement de la phase S, ainsi qu'à l'entrée en phase M.

La phase G2 possède également un point de contrôle en réponse aux dommages qu'il peut y avoir sur l'ADNg. Cette quatrième étape du cycle cellulaire est régulée par Cdk1 associée avec les cyclines A, B1 et B2. Ces complexes Cdk / cycline phosphorylent des protéines du cytosquelette telles que les lamines ou encore l'histone H1. Une fois la mitose achevée, la cellule reprend le cycle cellulaire en phase G1.

## **I.2. Les inhibiteurs physiologiques des Cdks : les CKIs**

L'activité des complexes Cdk / cycline est contrôlée par les CKIs (*cyclin-dependent kinase inhibitors*). Il existe deux familles de CKIs : les Cip/Kip et INK4.

### **I.2.1. La famille des Cip/Kip**

Les membres de la famille Cip/Kip agissent sur plusieurs complexes Cdk / cycline ainsi que sur d'autres kinases, formant ainsi un hétérotrimère. Le premier membre de cette famille à avoir été isolé est p21<sup>Cip1/WAF1/SDI1/CAP20/PIC1/mda-6</sup>, plus couramment appelé p21 (Weinberg and Denning, 2002). Cette protéine interagit avec Cdk2, mais aussi avec PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*), un facteur d'élongation de l'ADN polymérase  $\delta$  également impliqué dans la réparation de l'ADN. La liaison de p21 à PCNA empêche ce dernier d'agir sur la réplication de l'ADNg, mais pas de réparer l'ADNg. De plus, p21 a également été mis en évidence en tant que gène induit par la protéine suppresseur de tumeur p53 (el-Deiry *et al*, 1993). En réponse à des dommages causés sur l'ADNg, la protéine p53 est stabilisée et activée en tant que facteur de transcription. Le gène de p21 possède un site de liaison à p53 ce qui permet à cette dernière d'activer la transcription de p21. L'induction de p21 inhibe la progression du cycle cellulaire de deux manières : en inhibant divers complexes Cdk / cycline mais aussi en inhibant la synthèse d'ADNg *via* sa fixation avec PCNA.

Les deux autres membres de la famille Cip/Kip sont p27<sup>Kip1</sup> (p27) et p57<sup>Kip2</sup> (p57). Comme p21, ces protéines se fixent à plusieurs complexes Cdk / cycline. La protéine p27 est impliquée dans la médiation de plusieurs facteurs responsables de l'inhibition de la croissance cellulaire, comme le facteur de croissance TGF- $\beta$  (*transforming growth factor- $\beta$* ) ou encore l'inhibition de contact.

Contrairement à p21 et p27 qui ont une expression ubiquitaire, p57 possède un pattern d'expression tissu-spécifique, ce qui suggère que p57 a une fonction de régulation très spécifique au sein du cycle cellulaire.

### **I.2.2. La famille des INK4**

La famille des INK4 se compose des protéines p16<sup>INK4a</sup> (p16), p15<sup>INK4b</sup> (p15), p18<sup>INK4c</sup> (p18) et p19<sup>INK4d</sup> (p19). Elles interagissent spécifiquement et seulement avec les kinases Cdk4 et Cdk6. Les INK4 empêchent ainsi aux deux Cdks de s'associer avec une cycline D.

La protéine p16 semble être impliquée uniquement dans la régulation de pRb. Dans plusieurs tumeurs et lignées cellulaires ayant une délétion de p16, le gène p15 est également affecté. Malgré une fine homologie entre p16 et p15, ces dernières semblent avoir des fonctions biologiques différentes. En effet, contrairement à p16, le taux de p15 ne varie pas en fonction de pRb, mais augmente suite à un traitement au TGF- $\beta$ . Il y a alors interaction entre p15 nouvellement synthétisé et Cdk4 et / ou Cdk6. Cela entraîne le déplacement de p27 des complexes formés par Cdk4 et Cdk6 et l'accumulation de p27 aux niveau des complexes Cdk2 / cycline E (Reynisdottir and Massague, 1997). Ainsi, les protéines INK4 peuvent « indirectement » réguler l'activité des Cdks.

En ce qui concerne p18 et p19, ces protéines semblent sensibles aux stimuli extracellulaires. Le traitement de cellules Daudi à l'interféron  $\alpha$ , un inhibiteur de cytokine, altère l'expression de p18 (Sangfelt *et al*, 1997). En revanche, l'interleukine 6 induit à la fois l'expression de p18 et de p19 dans des cellules hématopoïétiques, ce qui corrèle avec un arrêt en phase G1 mais aussi avec le processus de différenciation terminale (Morse *et al*, 1997).

### **I.3. Le point de restriction et la transition G1→S**

Le point de restriction, qui engage irréversiblement la cellule dans le cycle cellulaire, est principalement contrôlé par pRb et E2F.

Dans les cellules quiescentes ou en début de phase G1, les protéines de la famille pRb (pRb, p130 et p107), en se fixant aux facteurs E2F, bloquent leur activité transcriptionnelle. Cette inhibition de la transcription s'exerce également sous l'action du recrutement des histone-désacétylases (HDAC) par les protéines pRb. Les HDAC ont pour rôle de compacter la chromatine, afin de la rendre inaccessible aux facteurs de transcription, en particulier E2F et DP. La transition G1→S est alors assurée en partie par les complexes Cdk4-6 / cycline D qui phosphorylent pRb, bloquant l'interaction pRb / E2F et libérant E2F, ce qui permet ainsi l'expression des gènes codant pour les protéines essentielles à l'entrée en phase S et à la réplication de l'ADNg. A l'inverse, les CKIs



maintiennent pRb dans son état répresseur en bloquant l'activité kinase de Cdk4 ou Cdk6. La terminaison de la phase S nécessite l'intervention de Cdk2 qui assure la dissociation de E2F de ses sites de liaison à l'ADNg.

Une autre voie impliquée dans la prolifération cellulaire est celle de l'oncogène Myc, dont l'expression est étroitement liée à la prolifération. Myc est une protéine labile qui se fixe à son partenaire Max, une protéine stable et dépourvue d'activité transcriptionnelle propre. Parmi les gènes activés par Myc, on trouve les cyclines D et E ainsi que la phosphatase Cdc25 A, toutes trois impliquées dans la transition G1→S. Myc activerait également la transcription des gènes codant pour Cdk4 et les facteurs E2F et réprimerait celle de p21 (Grandori *et al*, 2000). L'induction de l'expression de la cycline E par E2F et Myc ainsi que l'activation de Cdk2 entraînent la phosphorylation et donc l'inactivation de pRb. Cela a pour conséquence de créer une boucle rétro-activatrice qui libère l'activité de E2F et contribue à l'irréversibilité de la transition G1→S, définissant ainsi le point de restriction.

#### **I.4. Régulation moléculaire des points de surveillance du cycle cellulaire**

Ces points de surveillance assurent le contrôle qualité du cycle cellulaire, et plus particulièrement la fidélité de la duplication du matériel génétique. En cas d'anomalies, le cycle cellulaire est stoppé et le processus de réparation de l'ADNg est activé. Si les dommages sont trop importants, il y a alors activation de la mort cellulaire par apoptose.

Le système de régulation du cycle cellulaire peut être schématisé en trois niveaux :

1. Les détecteurs (*sensors*) sont sensibles aux anomalies de l'ADNg, aux perturbations métaboliques ou encore aux défauts du cytosquelette.
2. Les messagers (*transducers*) sont pour la plupart des protéines kinases et des molécules régulatrices fonctionnant comme des adaptateurs.
3. Les effecteurs (*effectors*) modifient directement les molécules impliquées dans le cycle cellulaire.

##### **I.4.1. Les kinases phosphatidylinositols-dépendantes**

Cette famille de kinases (*PI3K-related kinases*) est impliquée dans la coordination du cycle cellulaire avec le métabolisme de l'ADNg et de la cellule (Durocher and Jackson, 2001). Trois de ces kinases sont directement activées en présence de coupures sur l'ADNg : DNA-PK (DNA-

*dependant protein kinase*), ATM (*ataxia-telangiectasia mutated*) et ATR (*ataxia-telangiectasia-like and Rad3 homolog*). L'activation de ces kinases est impliquée dans l'arrêt du cycle cellulaire, ce qui permet aux systèmes de réparation de se mettre en place. Ces kinases seraient également impliquées dans l'activation de ces systèmes de réparation mais aussi dans le contrôle des voies de l'apoptose.

DNA-PK, plutôt considérée comme un détecteur (Durocher and Jackson, 2001), est une enzyme qui est activée par les coupures double brins sur l'ADN. Lors de dommages sur l'ADN, plusieurs études démontrent que l'activation de DNA-PK est indépendante de l'activité de la protéine suppresseur de tumeur p53, ce qui suggère que DNA-PK n'est pas impliquée dans la signalisation de l'ADN endommagé vers la machinerie de contrôle (Rathmell *et al*, 1997 ; Jhappan *et al*, 2000). En revanche, DNA-PK semble impliqué dans la signalisation de l'ADN endommagé vers la machinerie apoptotique (Wang *et al*, 2000a). Génétiquement, le rôle principal de DNA-PK semble être de réparer une coupure double brins par recombinaison non homologue. L'activité kinase de la DNA-PK est requise pour la mise en place du processus de réparation de l'ADN, ce qui suggère que DNA-PK joue un rôle de catalyseur.

La protéine ATM phosphoryle un grand nombre de protéines cibles en aval du processus de réparation dont p53, Chk1 ou encore Chk2, agissant ainsi comme un messenger.

Le gène codant pour la kinase ATR est indispensable à la survie ainsi qu'à la prolifération cellulaire. De ce fait, peu d'outils existent afin d'étudier sa fonction.

Ainsi, ATM et ATR sont activées par différents signaux et ont chacune une réponse spécifique aux lésions de l'ADN. Néanmoins, il semblerait qu'il existe un certain niveau de redondance fonctionnelle entre elles. En fait, ATR peut phosphoryler un set de protéines similaire à celui de ATM, bien que leur cinétique ainsi que leurs signaux d'activation soient différents.

#### **I.4.2. Les protéines kinases Chk1 et Chk2**

Les protéines Chk (*checkpoint kinases*) 1 et 2 sont deux kinases principalement et respectivement activées par ATR et ATM. Comme leur nom l'indique, ces protéines sont impliquées dans la mise en place des points de contrôle du cycle cellulaire. L'expression de Chk1 est maximale pendant les phases S et G2 alors que Chk2 est exprimée indépendamment du cycle et de la prolifération cellulaire. Du fait que Chk1 et 2 possèdent des substrats communs (p53, Cdc25, BRCA1), elles pourraient donc avoir des fonctions partiellement redondantes destinées à assurer la solidité du point de surveillance du cycle cellulaire.

En réponse à des lésions sur l'ADN, la protéine Chk1 est phosphorylée par ATR. Il a également été démontré que l'activité kinase de Chk1 permet la phosphorylation des phosphatases Cdc25-A, Cdc25-B et Cdc25-C.

La protéine Chk2 est activée suite à sa phosphorylation par ATM. L'analyse biochimique de Chk2 a permis de mettre en évidence que cette protéine phosphoryle les phosphatases Cdc25-A, Cdc25-C et BRCA1, ainsi que p53 (Bartek and Lukas, 2003). Cette enzyme semble d'avantage impliquée dans le processus apoptotique engendré par p53 (Takai *et al*, 2002).

Il semble donc exister deux voies parallèles dans les cellules de mammifères : la voie ATR-Chk1 et la voie ATM-Chk2.

### **I.4.3. La phosphatase Cdc25A et la voie p53-p21 dans le point de surveillance G1-S**

Deux mécanismes agissent sur le point de contrôle G1-S. L'un est rapide, et implique l'activation en cascade de kinases (ATM / ATR → Chk2) qui conduit à l'inactivation et à la dégradation de la phosphatase Cdc25-A, ce qui empêche l'activation des complexes Cdk4-6 / cycline D et Cdk2 / cycline A-E (Mailand *et al*, 2000).

Le second mécanisme est plus lent car il implique l'activation de p53 ainsi que l'expression des gènes qu'elle active. Dans des cellules normales, le taux de p53 est relativement faible. De plus, cette protéine présente une demi-vie très courte. Diverses perturbations, dont des lésions de l'ADN, ont pour conséquence l'augmentation du taux cellulaire de p53. Cette augmentation est due à la phosphorylation de p53, effectuées par les kinases ATM et ATR (sur le résidu Ser<sub>15</sub>), et par Chk2 et Chk1 (sur le résidu Ser<sub>20</sub>), (Chehab *et al*, 1999). La phosphorylation de Ser<sub>15</sub> a pour conséquence l'inhibition de l'interaction entre p53 et Mdm2, une oncoprotéine agissant comme régulateur négatif de p53. La stabilisation de p53 induit l'expression de p21, inhibiteur des complexes Cdk2 / cycline A-E et Cdk1 / cycline B, mais également l'expression de Mdm2 par un effet de rétrocontrôle négatif. Enfin, la liaison de p21 avec le complexe Cdk4 / cycline D empêche la phosphorylation de pRb.

### **I.4.4. La phosphatase Cdc25C et la protéine p53 dans le point de surveillance G2-M**

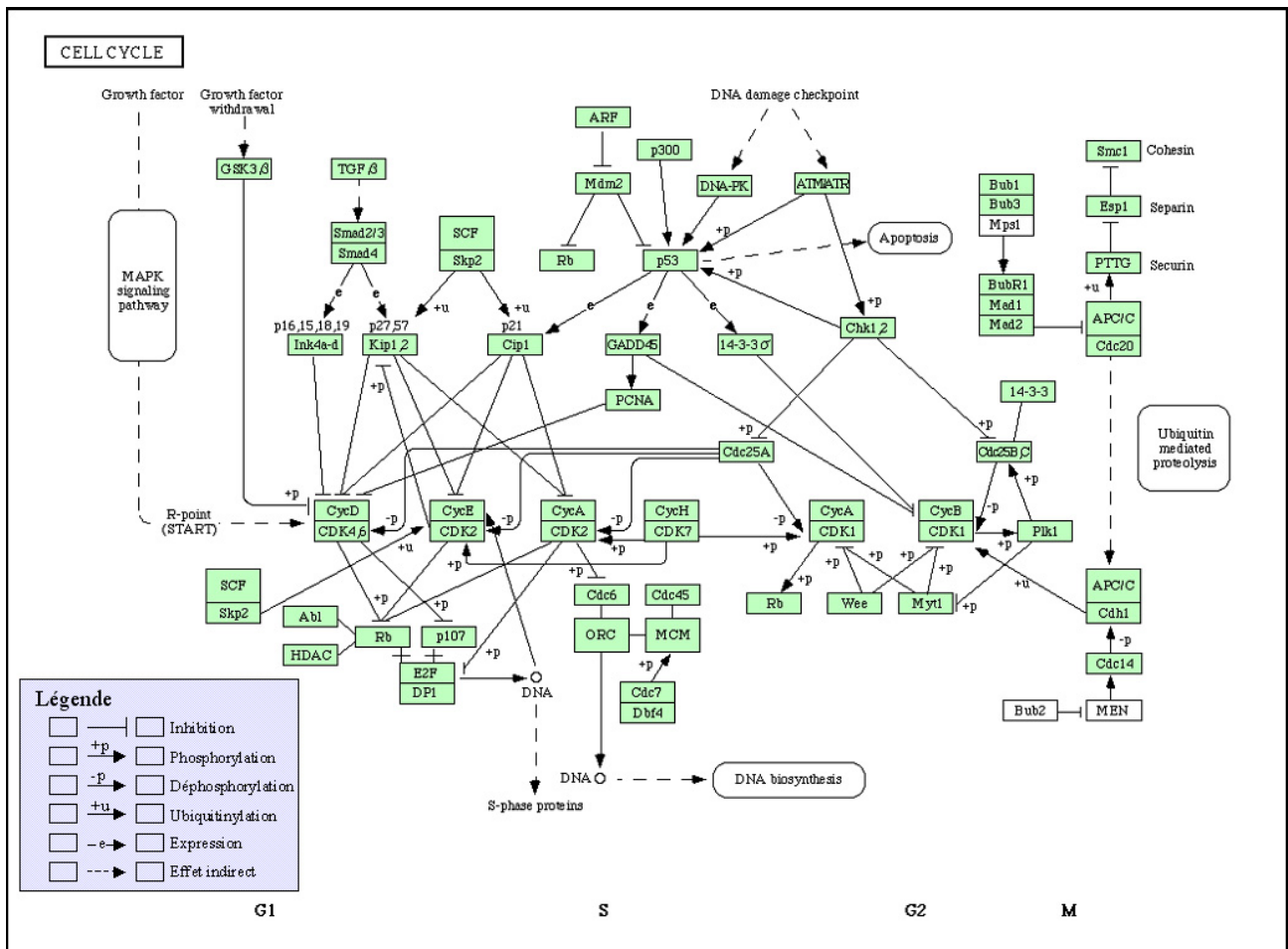
Comme pour la transition G1→S, la surveillance de la transition G2→M se compose d'une réponse rapide par phosphorylation, et d'une réponse lente par contrôle transcriptionnel impliquant p53.

Les Chks ont un rôle majeur dans la réponse rapide, en phosphorylant Cdc25C. Cette phosphorylation crée un site de liaison pour les protéines 14-3-3, très conservées et synthétisées de manière ubiquitaire, ce qui a pour conséquence la séquestration de Cdc25C dans le cytoplasme, loin de son substrat nucléaire Cdk1. L'inhibition de Cdk1 due à des lésions sur l'ADN peut aussi s'effectuer *via* une hyperphosphorylation par la kinase Wee1. La réponse rapide peut également être due à la séquestration des complexes Cdk1 / cycline B dans le cytoplasme des cellules ayant leur ADN endommagé. En effet, cela empêche la phosphorylation des substrats nucléaires de Cdk1 / cycline B impliqués dans la transition G2→M.

La protéine p53 n'est pas nécessaire pour la décision d'arrêt en G2, mais elle joue un rôle dans sa persistance, en bloquant l'activité du complexe Cdk1 / cycline B (Taylor and Stark, 2001). Les gènes de Cdk1 et de la cycline B1 contiennent un site de liaison à p53. Celle-ci, en se fixant, réprime leur expression. L'induction de 14-3-3 provoque la séquestration cytoplasmique du complexe Cdk1 / cycline B1 et de Cdc25C.

## **I.5. La complexité du cycle cellulaire**

Comme nous avons pu le décrire précédemment, la régulation du cycle cellulaire se caractérise par une cascade de transductions de signaux impliquant plusieurs voies métaboliques, dont les principaux mécanismes sont très majoritairement contrôlés par des réactions de phosphorylation et / ou de déphosphorylation. Les phases du cycle cellulaire ainsi que les molécules impliquées dans leur régulation forment ainsi un réseau métabolique complexe où la découverte de nouveaux régulateurs sera toujours d'actualité. Le schéma suivant (Figure 29) reprend les grandes étapes de la régulation du cycle cellulaire, permettant d'avoir un aperçu visuel sur la grande complexité de ce processus.



**Figure 29** : Schéma métabolique de la complexité du cycle cellulaire.

*Source* : [http://www.genome.jp/dbget-bin/www\\_bget?pathway+hsa04110](http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?pathway+hsa04110)

Cette figure reprend les grandes étapes de la régulation du cycle cellulaire en fonction des différentes phases (G1, S, G2, M) chez l'humain : on retrouve tous les complexes décrits précédemment, ainsi que d'autres molécules.

## II. L'apoptose

Par définition, l'apoptose est un processus actif d'autodestruction par fragmentation de certaines cellules aboutissant à leur phagocytose ; cette mort cellulaire, contrairement à la nécrose, n'est pas consécutive à une agression mais génétiquement programmée.

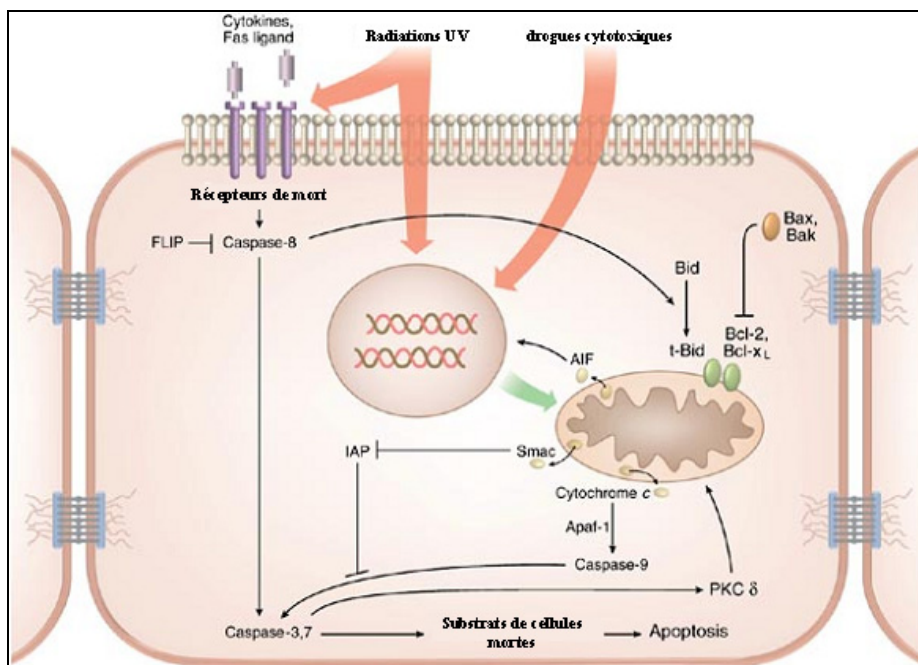
En effet, la nécrose est une mort cellulaire dite « accidentelle », qui survient lors d'un dommage tissulaire et qui implique des groupes de cellules. Lors de la nécrose, la cellule gonfle, puis la membrane cellulaire éclate déversant le contenu cellulaire dans le tissu environnant et

provoquant une réaction d'inflammation. Les mitochondries et le noyau restent intacts tout au long de ce processus.

L'apoptose, ou mort cellulaire programmée, est une forme physiologique de mort cellulaire hautement régulée. Elle est nécessaire à la survie des organismes multicellulaires. L'apoptose implique habituellement des cellules individuelles dans un tissu et ne provoque pas l'inflammation. La peau représente le système organique dans lequel l'apoptose joue le plus de rôles essentiels. En effet, la mort cellulaire par apoptose est un processus critique de l'homéostasie épidermique, qui assure la balance entre la prolifération des kératinocytes et la formation de la couche cornée. L'apoptose représente également un mécanisme de défense important contre le cancer : les kératinocytes ayant accumulés des mutations ou d'autres dommages génétiques à la suite d'expositions au rayonnement UV sont éliminés par apoptose.

## II.1. Voies et mécanismes généraux du processus apoptotique

Lors de la mise en place du processus apoptotique, les cellules répondent à des signaux environnementaux extra- et intracellulaires par l'intermédiaire de « détecteurs » qui permettent leur coordination ainsi que leur intégration. Les voies ainsi que les régulateurs apoptotiques potentiellement importants dans les kératinocytes sont illustrés dans la figure 30.



**Figure 30 :** Voies et mécanismes généraux du processus apoptotique.

*Repris et modifié d'après (Raj et al, 2006).*

La voie extrinsèque est stimulée par la liaison de Fas-L (*Fas-ligand*), de TNF (*Tumor necrosis factor*) ou d'une cytokine spécifique à un récepteur membranaire extracellulaire qualifié comme « récepteur de mort ». Une fois stimulés, ces récepteurs induisent l'activation des caspases (*cysteine aspartic acid-specific proteases*), proenzymes constitutives qui s'auto-activent ou sont activées par d'autres caspases, engendrant alors une cascade protéolytique.

La voie intrinsèque est induite par des drogues cytotoxiques ou encore suite à des lésions de l'ADN. Elle implique la libération mitochondriale de cytochrome c, qui, en se combinant avec le cofacteur Apaf-1 et la procaspase-9, forment un complexe appelé l'apoptosome.

Une fois le complexe formé, il permet l'activation de la caspase-9. Les mitochondries peuvent également induire l'apoptose *via* la libération de la protéine Smac/Diablo, qui agit comme un inhibiteur des IAPs (*inhibitor of apoptosis proteins*), protéines qui fonctionnent comme des inhibiteurs de caspases. La voie intrinsèque est aussi à l'origine de la libération du facteur AIF (*apoptosis-inducing factor*) qui est ensuite transloqué dans le noyau et permet d'induire l'apoptose par une voie caspases indépendante. La libération de ces facteurs proapoptotiques est régulée par des protéines de la famille de Bcl-2. Ces protéines s'organisent en homo- ou hétérodimères et contrôlent la perméabilité de la membrane mitochondriale. Certaines (Bcl-2 et Bcl-x<sub>L</sub>) bloquent l'apoptose, tandis que d'autres (Bax, Bak et Bid) induisent l'apoptose en interférant dans les interactions décrites ci-dessus.

Les voies ex- et intrinsèques sont potentiellement liées. En effet, Bid est clivé par la caspase-8 ce qui entraîne la formation du fragment t-Bid. Ce dernier est adressé aux mitochondries, ce qui déclenche le relargage de cytochrome c et l'activation de la caspase-9. L'activation des caspases 8 et 9 entraîne l'activation des caspases 3 et 7. Ces dernières démantèlent les cellules en clivant les protéines de la membrane nucléaire impliquées dans la structure du cytosquelette, la réparation de l'ADN et les systèmes de la réplication.

## **II.2. Stimulation du programme apoptotique kératinocytaire**

Il existe une grande diversité d'agents pouvant déclencher le processus apoptotique sur des kératinocytes en culture. Les UVB (290-320 nm), constituent l'agent déclencheur le plus largement étudié. Diverses études ont montré qu'une radiation d'intensité comprise entre 200 et 700 J.m<sup>2</sup> induit l'apoptose kératinocytaire dans un intervalle temporel compris entre 24 et 48 heures. Les UVB déclenchent la multimérisation des récepteurs de mort Fas, entraînant l'activation de la caspase-8 et donc le clivage de Bid important pour l'amplification de la réponse apoptotique (Assefa *et al*, 2000). Bien que les caspases -8 et -9 semblent être activées simultanément en réponse

aux UVB, une étude rapporte que la caspase-9 a été identifiée comme la caspase critique dans l'initiation de la réponse apoptotique induite par les UVB (Sitailo *et al*, 2002). La signalisation précoce induite par les UVB lors de la mise en place du processus apoptotique stimule également la phosphorylation et la stabilisation de la protéine kinase de la famille des MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) p38. Il a été démontré que l'inhibition de p38 empêche la mise en place du processus apoptotique, mais aussi la translocation mitochondriale de Bax et le relargage de cytochrome c (Van *et al*, 2004). Enfin, les UVB peuvent également induire l'apoptose *via* l'activation de la céramide synthase et donc la synthèse de céramides (Uchida *et al*, 2003).

*In vivo*, après une exposition aiguë aux UV solaires et notamment les UVB, les kératinocytes présentent un aspect photodyskératosique, avec un noyau très condensé voire absent et un cytoplasme éosinophile. Ce phénotype particulier est la conséquence de ce que l'on appelle en terme plus familier, le « coup de soleil ». Les kératinocytes atteints par ce phénomène (*sunburn cells*) ont déclenché une réponse apoptotique UVB-induite et peuvent être identifiés et marqués *in situ* par la technique TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labelling*), ou par coloration de la caspase-3 active. Typiquement, le nombre de kératinocytes « brûlés » atteint un pic 24 heures post-irradiation, et ensuite diminue graduellement pendant plusieurs jours. Il a également été démontré que la formation des *sunburn cells* requiert p53, dont l'expression augmente dans des kératinocytes UVB-irradiés *via* la croissance de sa stabilité protéique (Liu *et al*, 1994). Une des cibles transcriptionnelles de p53 également très exprimée dans les *sunburn cells*, est la galectine-7 (PIG1), dont la surexpression est suffisante pour induire l'apoptose *via* l'activation des caspases et la libération de cytochrome c (Kuwabara *et al*, 2002). De même, les UVB induisent sur la peau la surexpression de Bax mais aussi la répression de Bcl-2 (Lee *et al*, 2003). La signalisation *via* l'activation du récepteur Fas apparaît également impliquée dans la formation des *sunburn cells* (Bang *et al*, 2003). L'activation de ces voies apoptotiques est équilibrée par le facteur de transcription E2F1, qui est surexprimé en réponse aux dommages causés sur l'ADN et déclenche sa réparation.

D'autres longueurs d'ondes UV peuvent induire l'apoptose de kératinocytes *in vitro*. Bien que les UVC (100-290 nm) endommagent l'ADN et forment un stimuli apoptotique plus efficace que les UVB, ils sont très largement absorbés dans l'atmosphère et n'atteignent pas la surface de la Terre. En revanche, les UVA (320-400 nm), certes moins efficaces que les UVB, déclenchent l'apoptose par l'intermédiaire de dommages oxydatifs (Fu *et al*, 2000).

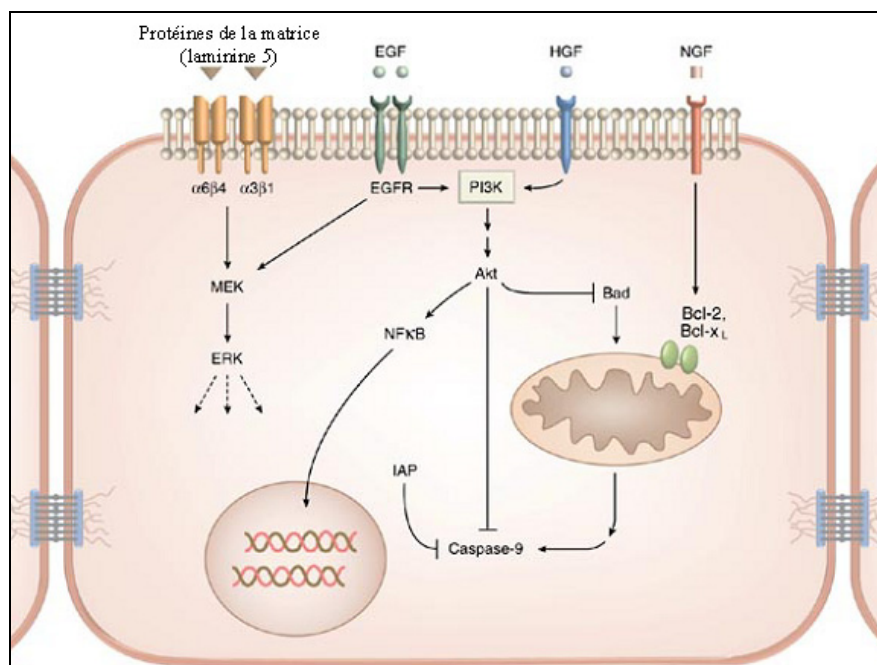
En plus des radiations UV, d'autres stimuli apoptotiques ont été observés *in vitro*, dont l'agoniste du récepteur de mort TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*), l'anoikis, la



privation de facteurs de croissance, la vitamine D3, le facteur de croissance TGFβ1 (Benassi *et al*, 1997), mais également des molécules naturelles d'origine végétale telles que l'acide ursolique (Harmand *et al*, 2003). L'apoptose induite par ces différents agents implique généralement l'activation des caspases ainsi que la voie mitochondriale.

### II.3. Les voies de survie (antiapoptotique)

Comme il a été mentionné précédemment, la première voie de signalisation menant à la mort cellulaire s'effectue *via* l'activation de la MAP kinase p38, suivit par la dépolarisation mitochondriale et l'activation des caspases. Cette voie est sous le contrôle de p53 et Bax dont l'expression est minimale dans les kératinocytes en prolifération. Deux voies antiapoptotiques ont été caractérisées dans les kératinocytes et sont schématisées par la figure 31.



**Figure 31 :** Voies antiapoptotiques (de survie) dans le kératinocyte.

*Repris et modifié d'après (Raj et al, 2006)*

La première est une voie MAPK, déclenchée par le facteur de croissance épidermique ou EGF (*epidermal growth factor*) et la phosphorylation de son récepteur EGFR (*epidermal growth factor receptor*). Tandis que l'EGF protège les kératinocytes de l'apoptose UVB-induite, les inhibiteurs d'EGFR l'active. La signalisation *via* EGFR stimule une cascade de MAPK, ce qui entraîne la phosphorylation séquentielle ainsi que l'activation des MAPK kinases MEKs et de kinases qui régulent le signal extracellulaire ERKs (*extracellular signal-regulated kinases*).

L'EGF stimule également une autre voie qui implique l'activation des kinases PI3K (*phosphatidylinositol 3-kinase*) puis de la kinase Akt. Dans d'autres types cellulaires, Akt est activée par les facteurs de croissance et permet la survie cellulaire en phosphorylant directement et inhibant la protéine Bad ainsi que la caspase-9. Etant donné l'importance du rôle d'Akt dans l'apoptose kératinocytaire, il n'est pas surprenant que cette protéine soit impliquée dans la survie cellulaire. De plus, Akt permet d'assurer la survie cellulaire en activant NF- $\kappa$ B (*nuclear factor-kappa B*), un facteur de transcription réprimé lorsqu'il interagit avec son inhibiteur I $\kappa$ B (*I $\kappa$ B inhibitor*). En effet, il a été décrit que l'inhibition de NF- $\kappa$ B *via* le protéasome ou I $\kappa$ B augmente la susceptibilité d'apoptose dans les kératinocytes (Nickoloff *et al*, 2002). L'activation de NF- $\kappa$ B *via* Akt semble donc jouer un rôle dans la survie kératinocytaire en modulant l'expression des IAPs et des facteurs TRAFs (*TNF-R associated factors*).

Il est important de noter qu'un stimuli apoptotique peut activer plusieurs voies simultanément. En effet, plusieurs études rapportent que les UVB et le TNF- $\alpha$  peuvent activer la voie apoptotique p38 MAPK, mais aussi les voies de survie MEK/ERK et Akt/ NF- $\kappa$ B (Nickoloff *et al*, 2002). Les kératinocytes coordonnent donc l'étroite balance des forces pro- et antiapoptotiques en réponse à des stimuli extracellulaires, ce qui a pour conséquence de décaler leur équilibre vers la mort ou la survie cellulaire lorsqu'une voie prédomine.

Plusieurs types cellulaires sont plus sensibles à l'apoptose *in vitro* qu'*in vivo*. C'est également le cas des kératinocytes. Par exemple, l'induction du processus apoptotique nécessite une dose d'UVB plus faible sur des kératinocytes en culture en comparaison avec de la peau humaine normale. Les multiples signaux de survie présents dans les tissus sont susceptibles d'expliquer cette résistance accrue à l'apoptose *in vivo*, dont plusieurs proviennent de l'interaction avec des protéines de la matrice extracellulaire.

En plus de l'EGF, d'autres facteurs de croissance forment une deuxième classe de signaux de survie qui peuvent potentiellement contribuer à la résistance à l'apoptose *in vivo*. Par exemple, les récepteurs nucléaires PPARs (*peroxysome proliferator-activated receptors*) peuvent déclencher la voie Akt *via* leurs effets transcriptionnels (Di-Poi *et al*, 2002).

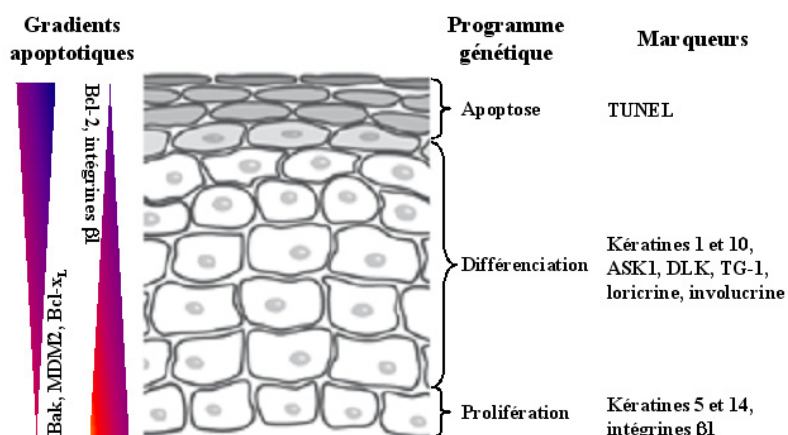
## **II.4. L'apoptose, l'homéostasie épidermique et la formation de la couche cornée**

Bien que le taux de prolifération kératinocytaire et l'apoptose soient élevés dans la peau d'un nouveau-né et diminuent avec l'âge, ils restent néanmoins coordonnés durant toute la vie afin

de maintenir l'homéostasie épidermique. Deux molécules clés, activées par la cascade MAPK, sont exprimées au niveau des couches supérieures de l'épiderme et semblent impliquées dans la mise en place du programme de différenciation kératinocytaire : il s'agit de ASK1 (*apoptosis signal-regulating kinase-1*) et DLK (*dual leucine zipper-bearing kinase*). L'introduction *in vitro* de ASK1 (Sayama *et al*, 2001) ou DLK (Robitaille *et al*, 2005) sous forme active dans des kératinocytes est suffisante pour induire des changements morphologiques typiques du processus de différenciation, ainsi que l'expression de marqueurs de différenciation tels que la TG-1, la loricrine ou l'involucrine. Dans les couches intermédiaires, l'expression de la caspase-14 corrèle avec ces changements morphologiques. Le « programme génique de l'apoptose », contrairement à ceux de la prolifération et de la différenciation, ne se localise pas sur une région particulière, mais se retrouve dans toute les couches épidermiques (Figure 32).

Par exemple, les kératinocytes basaux se protègent de l'apoptose en exprimant la protéine Bcl-2, absente des couches suprabasales (Hockenbery *et al*, 1991). Parallèlement, pour mettre en place la mort cellulaire, l'expression de Bak augmente en remontant vers la surface tissulaire (Krajewski *et al*, 1996).

Des expériences de fractionnement par gradient de densité à partir d'un épiderme normal ont permis d'évaluer l'expression de diverses molécules apoptotiques (Nickoloff *et al*, 2002). Bien que certains récepteurs comme TNFR-1 (*tumor necrosis factor receptor-1*), DR-4 (*death receptor-4*), mais également la caspase-8 soient plus exprimés dans les fractions inférieures, d'autres molécules dont DR-5, la caspase-14 ou encore Bcl-xL se retrouvent très majoritairement dans les fractions supérieures.



**Figure 32 :** Schématisation des programmes génétiques du développement épidermique.

*Repris et modifié d'après (Raj et al, 2006).*

Il a été également suggéré que la répression des intégrines  $\beta 1$ , en association avec la sortie des kératinocytes du compartiment basal, est à l'origine de « l'anoikis *in vivo* » (Ishida-Yamamoto *et al*, 1999). Bien que le point à partir duquel les kératinocytes sont irréversiblement engagés dans le processus apoptotique ne soit pas encore totalement clarifié, l'intégration de la machinerie apoptotique dans leur programme développemental doit être fortement régulée afin que l'apoptose ne précède pas la différenciation. Pour cela, l'expression et l'activation des facteurs de survie Bcl-2, Akt, et NF- $\kappa$ B empêchent le déclenchement d'un programme apoptotique prématuré. Il est également important que la synchronisation de la différenciation soit « commandée » afin que l'apoptose ne soit pas retardée. Même si l'expression de ASK1 ou DLK active le processus de différenciation et non l'apoptose, plusieurs stimuli induisant la différenciation *in vitro* peuvent également déclencher l'apoptose (Benassi *et al*, 1997). Cependant, des kératinocytes en culture qui deviennent sénescents sont résistants à l'apoptose, ce qui démontre l'existence d'une régulation très fine de ces 2 processus pour l'homéostasie épidermique.

## **II.5. L'apoptose en tant que mécanisme de défense contre le cancer : rôle de p53**

Comme décrit précédemment, la réponse apoptotique kératinocytaire est de manière générale p53-dépendante. L'activation de p53 entraîne un retard au niveau de la progression du cycle cellulaire (en G1 en induisant p21, l'inhibiteur du complexe Cdk2 / cycline 2 et en G2 *via* 14-3-3 $\sigma$ , inhibiteur de Cdc25) durant une période pendant laquelle l'ADN est réparé. En tant que facteur de transcription, p53 active mais inhibe aussi l'expression de gènes impliqués dans le processus apoptotique. En effet, la transcription de régulateurs proapoptotiques impliqués dans la voie mitochondriale (Bax, Noxa, Puma, Apaf-1) et certains récepteurs (Fas, DR4, DR5) sont activés par p53. De même, l'activité de p53 réprime certaines molécules antiapoptotiques (Bcl-2, Bcl-xL, survivine) (Yu and Zhang, 2005).

## **II.6. Rôle de p21 dans le processus apoptotique**

La protéine p21 a clairement un rôle complexe dans la réponse aux stimuli apoptotiques car c'est une cible de p53 induite lors de lésions sur l'ADN et elle intervient dans l'arrêt du cycle cellulaire.

De plus, p21 est aussi un substrat de la caspase-3 et sa protéolyse semble être impliquée dans l'abandon du cycle cellulaire en faveur du processus apoptotique. La p21 humaine est clivée par la caspase-3. Cette forme tronquée de p21 est alors dépourvue de son domaine de liaison à PCNA, de

son domaine de liaison aux cyclines mais aussi de sa séquence de localisation nucléaire, ce qui empêche p21 de médier l'arrêt de la prolifération (Zhang *et al*, 1999).

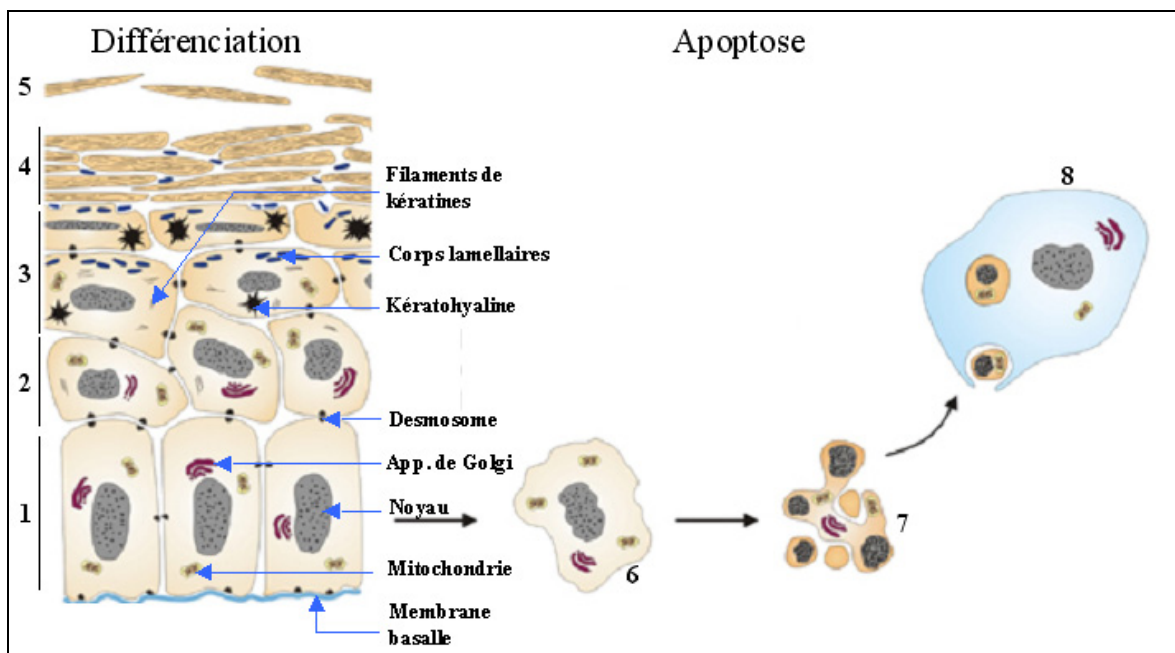
La protéine p21 peut aussi interagir avec la procaspase-3, forme inactive précurseur de la caspase-3, ce qui entraîne l'inhibition de l'activation de la caspase-3 (Suzuki *et al*, 1999). La formation du complexe p21 / procaspase-3 est induite suite à la phosphorylation de p21 par la protéine kinase A (Suzuki *et al*, 2000). Ainsi, l'induction de p21 en réponse à des stimuli apoptotiques entraîne l'arrêt du cycle cellulaire *via* l'inhibition de cdk2 et cdk4, et peut également aider à empêcher l'exécution de l'apoptose en liant et inhibant la procaspase-3.

## **II.7. Apoptose et différenciation kératinocytaire : deux processus distincts**

La différenciation terminale des kératinocytes a pour conséquence ultime la mort cellulaire. Lorsque les kératinocytes atteignent l'étape de cornification, les filaments intermédiaires, reliés à d'autres composants structuraux, remplissent en grande partie le compartiment cytoplasmique des cellules. La membrane plasmique est remplacée par l'enveloppe cornée, les organites sont détruits et l'ADN est dégradé (Candi *et al*, 2005). Pendant des années, on a supposé que la mort cellulaire subie par les kératinocytes en différenciation terminale était contrôlée par le processus apoptotique, étant donné l'expression de certains facteurs comme Bcl-2, Bcl-xL, Bax ou encore le facteur de transcription NF- $\kappa$ B (Weisfelner and Gottlieb, 2003). Cependant, il est maintenant considéré que le processus de cornification kératinocytaire, et donc de différenciation, est bien distinct de l'apoptose (Figure 33), ceci en dépit du fait que la mort cellulaire pour les kératinocytes soit programmée à partir du moment où ils quittent la couche basale.

D'autres expérimentations basées principalement sur la technique TUNEL ont permis de mettre en évidence que la différenciation terminale et l'apoptose étaient deux processus bien distincts (Gandarillas *et al*, 1999). Le terme de « mort cellulaire épidermique programmée » semble donc être plus approprié lorsque la différenciation terminale est à l'origine de la mort cellulaire. Les raisons de cette divergence sont dues aux faits que les cornéocytes ne subissent pas la phagocytose et que leur cytosquelette n'est pas détruit mais réorganisé. De plus, la plupart des caspases décrites comme étant impliquées dans l'apoptose ne sont pas activées pendant la cornification. Bien que la destruction du noyau soit un phénomène récurrent de ces deux processus, différents mécanismes moléculaires sont à l'origine de cet événement. Pendant l'apoptose, plusieurs protéines structurales nucléaires telles que les lamines, sont dégradées par les caspases, ce qui entraîne l'effondrement de l'échafaudage nucléaire. Les voies entraînant la perte du noyau lors de la cornification restent

évasives. Une protéase a néanmoins été identifiée comme intervenant dans ce phénomène : il s'agit de la desquamine. L'expression de cette protéase s'effectue au niveau de la zone de transition entre les couches granuleuse et cornée de l'épiderme. Cette enzyme est capable d'hydrolyser les desmosomes et donc de moduler la desquamation de la peau. *In vitro*, cette glycoprotéine est peu exprimée. En revanche, l'addition de desquamine dans le milieu de culture de kératinocytes primaires permet d'augmenter leur maturation en provoquant la destruction des noyaux. Elle présente également une activité ribonucléasique qui permet la dégradation de l'ARN (Selvanayagam *et al*, 1998).



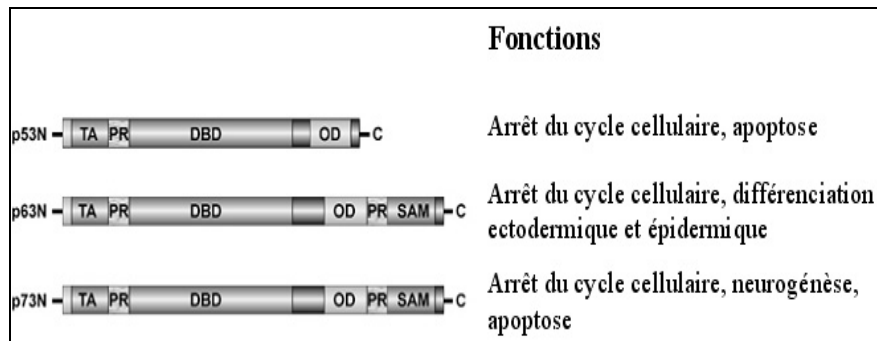
**Figure 33** : Changements morphologiques et biochimiques pendant les processus de différenciation et / ou d'apoptose.

*Repris et modifié d'après (Lippens et al, 2005).*

(1) Les kératinocytes de la couche basale ont une activité mitotique intense. (2) Une fois détachés de la membrane basale, les kératinocytes atteignent la couche épineuse où débute le processus de différenciation caractérisé par la synthèse des kératines K1 et K10, mais également la formation des desmosomes. (3) La couche granuleuse se caractérise par la présence des grains de kératohyaline. Les organites cytoplasmiques disparaissent et l'ADN est dégradé. L'enveloppe cornée se forme. (4) Les kératinocytes de la couche cornée sont des cellules mortes très aplaties. (5) Lors de la desquamation les cornéocytes sont rejetés dans le milieu extérieur. (6) L'induction de l'apoptose provoque l'activation des caspases et le bourgeonnement de la membrane plasmique. (7) La condensation de la chromatine et du cytoplasme mènent au démantèlement de l'architecture cellulaire (fragmentation), permettant l'empaquetage du contenu cellulaire dans des corps apoptotiques suite à l'invagination de la membrane cellulaire. (8) Lors de l'ultime étape de l'apoptose, les corps apoptotiques sont phagocytés et dégradés.

## II.8. Apoptose ou différenciation : rôle de p63

La protéine p53, très impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire et la régulation du processus apoptotique, ne semble pas avoir de rôle dans la différenciation. Le facteur de transcription p53 appartient à une famille protéique qui porte son nom (la famille des facteurs p53) et compte trois membres : p53, p63 et p73 (Melino *et al*, 2003). Ces trois protéines ont une forte homologie au niveau de leur domaine structural (Figure 34).



**Figure 34** : Représentation schématique des protéines p53, p63 et p73.

*Repris et modifié d'après (Lippens et al, 2005).*

La protéine p53 se compose d'un domaine TA (*transactivation*), d'un domaine riche en prolines (PR pour *prolin rich*), d'un domaine de liaison à l'ADN (DBD pour *DNA-binding domain*) et d'un domaine d'oligomérisation (OD pour *oligomerization domain*).

En comparaison avec p53, p63 et p73 possèdent en C-terminal un domaine riche en prolines ainsi qu'un domaine SAM (*sterile alpha motif*). De plus, p63 et p73 possèdent plusieurs isoformes avec des extrémités N- et / ou C-terminales distinctes et impliquant les domaines TA, PR et SAM.

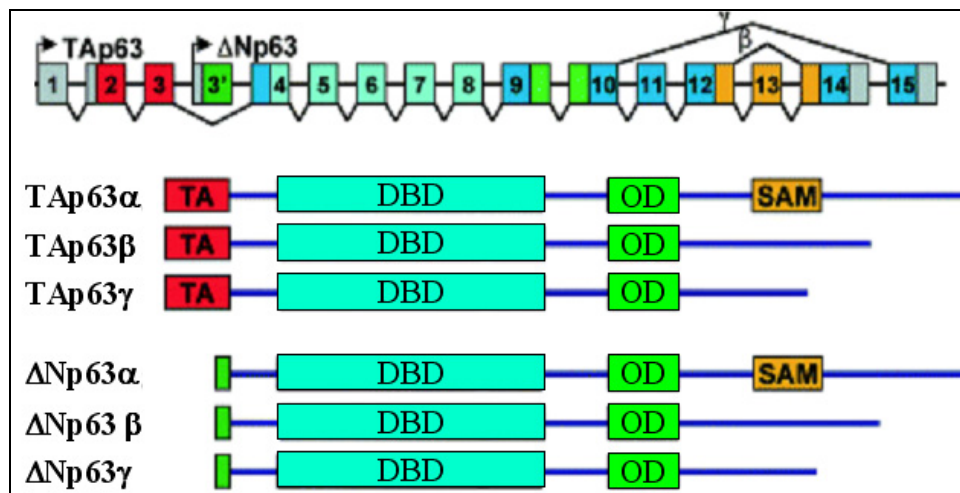
L'expression de p63 corrèle avec la capacité des kératinocytes à proliférer *in vitro*, ce qui a permis de proposer d'utiliser p63 en tant que marqueur de cellules souches épidermiques (Pellegrini *et al*, 2001). Le mode de fonctionnement de p63 dans la prolifération n'est pas totalement élucidé. Néanmoins, il semblerait que p53 soit impliqué dans ce mécanisme. En effet, l'inhibition de p63 avec l'utilisation de siRNA entraîne l'arrêt du cycle cellulaire et l'expression de p21 (Truong *et al*, 2006). Mais l'inhibition simultanée de p53 et p63 a pour conséquence de réprimer l'activation de p21 et de restaurer convenablement le cycle cellulaire, ce qui indique que les effets de p63 sur la prolifération seraient p53-dépendants. Deux mécanismes potentiels ont été proposés afin de comprendre la relation entre p53 et p63 dans le contrôle de la prolifération cellulaire. Il semblerait que l'isoforme  $\Delta$ Np63 (absence du domaine TA en position N-terminale, Figure 34) puisse interagir

directement avec p53 *via* les domaines DBD et / ou OD, ce qui empêcherait alors p53 de se fixer à un de ses sites de liaison spécifiques et ainsi de ne pouvoir activer l'expression de son gène cible. Cependant, il n'existe que peu d'évidences confortant cette hypothèse. Par exemple, il n'a été démontré aucune interaction entre les domaines OD de p53 et p63 *in vitro* (Davison *et al*, 1999), tandis que certains mutants de p53 présentent une certaine affinité à se lier avec p63 (Gaiddon *et al*, 2001). Etant donné l'importante homologie entre les domaines DBD de p53 et p63, il serait possible qu'il existe une compétition directe entre ces deux facteurs de transcription pour se fixer sur un gène cible. Bien que l'élément de réponse optimal de p53 diffère de celui de p63, ce dernier peut néanmoins activer l'expression de gènes possédant des éléments de réponses à p53 (Kurata *et al*, 2004). De plus, plusieurs gènes cibles de p63 ont été identifiés en partant du fait qu'ils étaient déjà connus comme étant des cibles de p53. Très souvent, p63 se fixe sur le même site de liaison que p53 (Ihrle *et al*, 2005). Il apparaît donc probable que p53 et p63 régulent toute une panoplie de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire pour lesquels la fixation de p63 réprimerait les gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire, tandis que p53 les activerait. C'est le cas par exemple de la protéine p21 (Westfall *et al*, 2003).

Bien que l'arrêt de la prolifération soit souvent associé avec l'initiation de la différenciation, ces deux processus ne sont pas inextricablement couplés. En effet, l'induction de l'arrêt du cycle cellulaire n'entraîne pas obligatoirement la différenciation. Cela a été observé en réprimant l'expression de p63 : les kératinocytes ne prolifèrent plus et p21 est surexprimé, contrairement aux marqueurs de différenciation (K1, K10, TG1 et loricrine). D'autre part, l'inhibition simultanée de p53 et de p63 permet de retrouver un taux de prolifération normal mais ne restaure pas l'expression des marqueurs de différenciation et donc du processus de différenciation. Ces observations suggèrent donc que la prolifération s'effectue *via* un mécanisme p53-dépendant tandis que la différenciation s'exerce par une voie p53-indépendante (Truong *et al*, 2006), mais aussi que p63 semble réguler la prolifération et la différenciation de manière bien distincte.

Une hypothèse du contrôle de p63 sur la différenciation épidermique repose sur l'expression de ses différentes isoformes (Figure 35). En effet, l'existence de six isoformes distinctes soulève la question de leurs rôles dans le contrôle de l'homéostasie épidermique. Il semble possible qu'un changement d'expression des isoformes puisse déclencher le programme de différenciation kératinocytaire (Koster *et al*, 2004).





**Figure 35 :** Structure schématique du gène et des six isoformes de p63.

*Repris et modifié d'après (Koster et al, 2002).*

Le gène de p63 possède deux promoteurs alternatifs (flèches). Ils donnent lieu à deux classes d'isoformes qui possèdent soit un domaine de transactivation (TA), analogue à celui de p53 en position N-terminale, ou qui en sont dépourvus ( $\Delta N$ ). De plus, l'épissage alternatif permet de générer trois extrémités C-terminales différentes ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ). L'extrémité  $\alpha$  est la plus longue et contient un domaine SAM, motif fréquemment trouvé dans les protéines impliquées dans le développement et la différenciation. Sur le schéma, les exons sont codés par des couleurs indiquant les différents domaines fonctionnels.

L'expression des  $\Delta Np63$  est importante au niveau de la couche basale et diminue drastiquement dans les couches suprabasales. Le phénomène inverse est observé pour l'expression des isoformes de TAp63. En revanche, la surexpression de TAp63 inhibe la différenciation terminale, ce qui suggère que l'activité de  $\Delta Np63$  est nécessaire à la mise en place de ce processus (Koster *et al*, 2004). Une autre étude indique que les isoformes  $\Delta Np63$  sont prédominantes et actives à la fois dans les processus de stratification et de différenciation tandis que les isoformes TAp63 ne semblent avoir qu'un rôle mineur dans la différenciation (Truong *et al*, 2006).

Le mécanisme par lequel p63 initie la différenciation serait lié avec la division cellulaire asymétrique des kératinocytes de la couche basale. En effet, la division cellulaire asymétrique n'est pas observée dans des kératinocytes dépourvus de p63 (Lechler and Fuchs, 2005). D'autre part, p63 active l'expression de protéines directement impliquées dans le programme de différenciation kératinocytaire. Une cible critique de p63 pour le développement et l'intégrité de l'épiderme est la protéine desmosomale Perp (Ihrie *et al*, 2005). De plus, p63 régule plusieurs gènes impliqués dans

l'adhésion cellulaire dont certains contribuent à la mise en place du processus de différenciation (Vigano *et al*, 2006 ; Carroll *et al*, 2006).

# Les agents inducteurs de la différenciation kératinocytaire

Depuis de nombreuses années, la recherche et l'étude d'agents qui permettent d'induire ou de réprimer la différenciation kératinocytaire sont à l'origine d'une meilleure compréhension des mécanismes activés lors de la mise en place de ce processus. Elles peuvent également permettre de cibler des molécules qui pourront ensuite être testées comme agent thérapeutique de maladies cutanées causées par un dysfonctionnement au niveau de l'homéostasie épidermique. Dans cette partie, nous détaillerons l'effet de plusieurs molécules ainsi que les voies de signalisation impliquées qui permettent de moduler la différenciation kératinocytaire.

## I. Le calcium

### I.1. Effets du calcium extracellulaire sur la culture de kératinocytes

Depuis presque trente ans, un grand nombre d'études mettant en évidence un rôle majeur du calcium dans la régulation de la différenciation kératinocytaire a été publié. Tout d'abord, il a été observé que la mise en place de l'enveloppe cornée par les transglutaminases était favorisée par la présence d'ions calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) (Rice and Green, 1979). D'autres études, effectuées *in vitro* sur des kératinocytes murins et humains, ont démontré que les cellules prolifèrent plus rapidement si la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  du milieu de culture est inférieure ou de l'ordre de 0,07 mM (Boyce and Ham, 1983). Lorsque la concentration calcique du milieu de culture est supérieure à 1 mM, elle engendre la synthèse de transglutaminase et d'involucrine et permet ainsi la formation de l'enveloppe cornée ainsi que la stratification (Watt, 1984 ; Pillai *et al*, 1990). Il a également été démontré que l'augmentation de la concentration calcique *in vitro* induit la formation des desmosomes (Watt *et al*, 1984) et entraîne la redistribution de plusieurs protéines dont les cadhérines (Hennings and Holbrook, 1983), la desmoplakine, la plakoglobine, les caténines, les intégrines, ou encore la vinculine, du cytosol vers la membrane plasmique où elles participent à la formation des jonctions d'ancrage intercellulaires (Braga *et al*, 1995). Ces événements s'accompagnent du réarrangement des filaments d'actine dont la perturbation peut bloquer la redistribution des protéines citées ci-dessus et ainsi bloquer le procédé de différenciation. Dans les heures qui suivent l'augmentation de la concentration du  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire, les kératinocytes synthétisent les kératines suprabasales K1 et K10 à défaut des kératines basales K5 et K14 (Yuspa *et al*, 1989), suivi par l'augmentation du taux de profilaggrine, de loricrine, d'involucrine (Rice and

Green, 1979 ; Hohl *et al*, 1991a) et de transglutaminase (Hennings *et al*, 1981). Au bout de deux jours, parallèlement à l'activation de la transglutaminase, la formation de l'enveloppe cornée est évidente (Hennings *et al*, 1981 ; Pillai *et al*, 1990). L'effet du  $\text{Ca}^{2+}$  sur la synthèse de ces protéines spécifiques de la différenciation kératinocytaire se traduit d'abord au niveau transcriptionnel. En effet, une augmentation du taux d'ARNm de chacun des gènes impliqués dans la formation de l'enveloppe cornée est observée après augmentation de la concentration du  $\text{Ca}^{2+}$  dans le milieu de culture (Yuspa *et al*, 1989 ; Hohl *et al*, 1991b ; Su *et al*, 1994a ; Gibson *et al*, 1996). L'enchaînement de ces phénomènes est bien décrit pour des kératinocytes murins. Une série d'événements très semblable s'effectue dans des kératinocytes humains normaux. Néanmoins, la cinétique de la mise en place du processus de différenciation, caractérisée par l'induction des marqueurs de différenciation après ajout de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le milieu de culture, est plus lente (Gibson *et al*, 1996). Ainsi, la majorité des protéines codées par les gènes de l'EDC décrites précédemment nécessite la présence de  $\text{Ca}^{2+}$ , c'est le cas de l'involucrine. Des expérimentations ont permis de mettre en évidence la présence d'un élément de réponse au calcium (CaRE, calcium responsive element). Ce CaRE contient un site AP1 indispensable à l'augmentation de l'expression transcriptionnelle de l'involucrine lorsque les kératinocytes sont cultivés en présence de 1,2 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  (Ng *et al*, 2000). De même, les expressions de la filaggrine (Dale *et al*, 1983), de la loricrine (Hohl *et al*, 1991a) ou encore de K1 (Huff *et al*, 1993) sont modulées en fonction de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  du milieu de culture. En plus d'agir directement et / ou indirectement sur la transcription de gènes impliqués dans la mise en place de l'enveloppe cornée, le  $\text{Ca}^{2+}$  a également un rôle important dans la conformation de protéines impliquées dans la formation de cette enveloppe. C'est le cas des protéines qui possèdent au moins un domaine en main EF telles que les protéines S100, la filaggrine ou encore la trichohyaline.

## **I.2. Effets du calcium sur la différenciation épidermique *in vivo***

*In vivo*, des études de détection microscopique des ions  $\text{Ca}^{2+}$  ont permis de mettre en évidence que l'épiderme humain contient un gradient de concentration croissant de  $\text{Ca}^{2+}$  en remontant vers la surface tissulaire (Menon *et al*, 1985). Ce gradient aide au maintien de la différenciation épidermique en étant étroitement lié avec la barrière lipidique mise en place à la surface épidermique. En effet, la rupture de cette barrière a pour conséquence la perte du gradient de  $\text{Ca}^{2+}$  épidermique suivie d'une augmentation de la prolifération ainsi que d'une diminution de l'expression de marqueurs de différenciation tels que la profilaggrine, la loricrine ou encore l'involucrine (Mauro *et al*, 1998). En revanche, la restauration d'une barrière lipidique efficace

s'accompagne de la reformation du gradient de  $\text{Ca}^{2+}$ . Cette reformation s'effectuerait de manière passive et serait due à la diffusion d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  de la couche basale vers les couches supérieures. En effet, une hypothèse soutient que la faible perte d'eau transépidermique observée lorsque la barrière lipidique est fonctionnelle s'accompagnerait d'un mouvement d'ions vers la surface tissulaire (Elias *et al*, 2002). Cela expliquerait que la perte permanente d'eau au niveau de l'épiderme serait à l'origine de la mise en place du gradient de  $\text{Ca}^{2+}$ .

D'autre part, la modulation de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  de l'épiderme provoque la diminution de la synthèse de marqueurs de différenciation telles que la loricrine, l'involucrine ou encore la filaggrine (Elias *et al*, 2002). Cependant, une diminution de cette concentration au niveau des kératinocytes de la couche granuleuse a pour conséquence l'exocytose des corps lamellaires, tandis que son augmentation ralentit l'exocytose de ces organites (Elias *et al*, 2002).

### **I.3. La signalisation calcique dans le kératinocyte**

La réponse kératinocytaire due au  $\text{Ca}^{2+}$  est complexe. Un modèle est schématisé sur la figure 36. L'augmentation de la concentration extracellulaire en  $\text{Ca}^{2+}$  de 0,07 à plus de 1 mM entraîne l'élévation de la concentration calcique intracellulaire ( $\text{Ca}_i$ ) qui peut être considérée comme un événement précoce de la différenciation kératinocytaire *in vitro*. Des expérimentations complémentaires ont permis d'observer que la  $\text{Ca}_i$  de kératinocytes cultivés avec 0,07 mM  $\text{Ca}^{2+}$  était de  $104 \pm 3$  nM et que l'augmentation de la concentration extracellulaire en  $\text{Ca}^{2+}$  à 2 mM provoquait l'élévation de  $\text{Ca}_i$  à  $135 \pm 4$  nM (Sharpe *et al*, 1993). Néanmoins, certains agents dont l'ATP ou encore l'EGF permettent l'augmentation de  $\text{Ca}_i$  sans stimuler la différenciation kératinocytaire (Pillai and Bikle, 1992) ce qui caractérise bien le système complexe de la signalisation calcique dans la différenciation kératinocytaire.

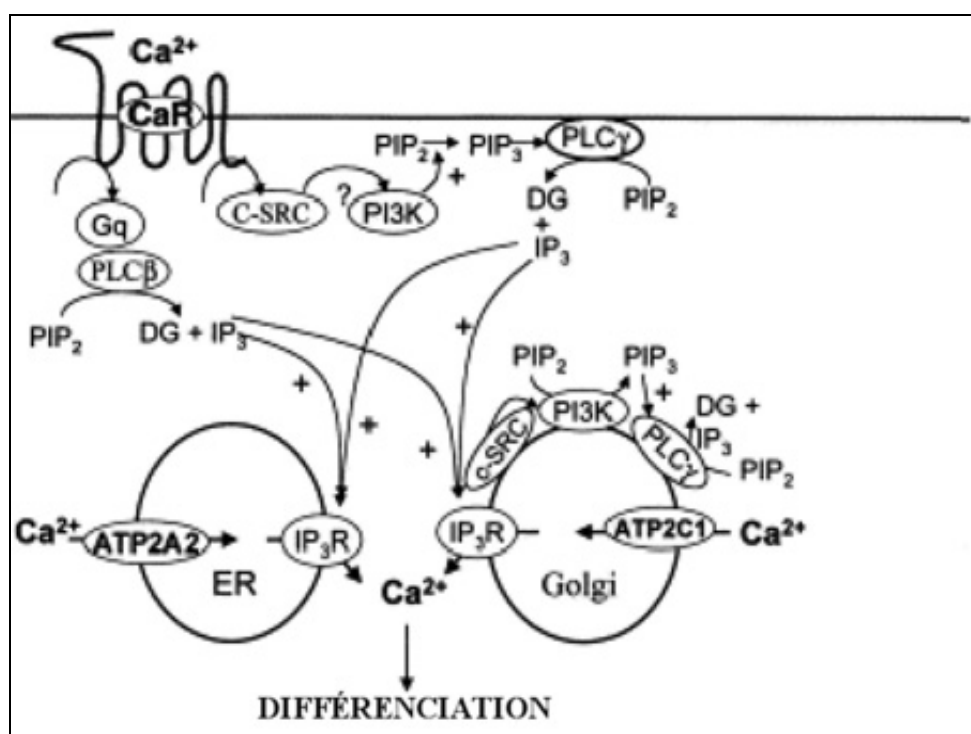
#### **I.3.1. Rôle du récepteur au calcium**

La réponse kératinocytaire au  $\text{Ca}^{2+}$  ressemble à celle des cellules parathyroïdiennes. Ces dernières fixent le  $\text{Ca}^{2+}$  par l'intermédiaire d'une protéine à sept domaines transmembranaires couplée aux protéines G et nommée CaR (Calcium Receptor). Le même récepteur a été identifié dans des kératinocytes. Des études ont démontré que le CaR se localise principalement dans le compartiment intracellulaire et périnucléaire, ainsi qu'au niveau de la membrane plasmique des kératinocytes, mais en taux plus faible (Tu *et al*, 2001 ; Tu *et al*, 2004). Plus récemment une étude a mis en évidence que le CaR se localiserait principalement au niveau de la face trans de l'appareil de Golgi et formerait un complexe protéique en interagissant directement avec  $\text{IP}_3\text{R}$ ,  $\text{PLC}\gamma 1$ , et la

pompe à  $\text{Ca}^{2+}$  SPCA1 (*secretory pathway  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase*) (Tu *et al*, 2007). D'autres expérimentations ont permis de mettre en évidence l'existence d'un variant CaRalt (*CaR alternative*) dans lequel il manque le cinquième exon de CaR. Des expérimentations effectuées sur un modèle murin ont permis d'observer que l'introduction d'une cassette néomycine au niveau de l'exon 5 du gène de CaR, afin d'éteindre la synthèse de sa forme complète, n'empêche pas la synthèse de CaRalt. Cependant, ces souris présentent un épiderme anormal, dans lequel un très faible taux de marqueurs de différenciation, tels que la loricrine ou la profilaggrine, est observé. De plus, les kératinocytes issus de ces souris ne répondent pas au calcium par une élévation substantielle de  $\text{Ca}_i$  (Oda *et al*, 2000). Ceci suggère que la forme complète du CaR est requise pour établir la différenciation épidermique. De plus, le blocage de la synthèse du CaR (les deux formes) par une construction antisens diminue le taux de  $\text{Ca}_i$  et empêche également l'induction de la transglutaminase et de l'involucrine (Tu *et al*, 2001).

L'induction du CaR par le  $\text{Ca}^{2+}$  entraîne l'activation de la phospholipase C (PLC) qui convertit le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate en diacylglycérol et inositol triphosphate ( $\text{IP}_3$ ). L' $\text{IP}_3$  se fixe ensuite à son récepteur ( $\text{IP}_3\text{R}$ ) localisé à la surface membranaire du réticulum endoplasmique (RE) et de l'appareil de Golgi, ce qui déclenche la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  de ces organites de stockage et provoque ainsi une augmentation du  $\text{Ca}_i$ . La libération du  $\text{Ca}^{2+}$  de ces organites de stockage active les canaux SOCs (*store-operated channels*). Ces canaux dits « capacitifs » (*capacitative calcium channels*) forment une famille de canaux calciques de la membrane plasmique responsables d'un flux de  $\text{Ca}^{2+}$  observé en réponse à la vidange des stocks internes (par exemple du RE). Ces canaux sont responsables d'un phénomène appelé « entrée capacitive » (*capacitative  $\text{Ca}^{2+}$  entry*, CCE). Cette augmentation de  $\text{Ca}_i$  active directement les canaux de la membrane plasmique, ce qui amplifie l'influx de  $\text{Ca}^{2+}$  prolongeant ainsi l'élévation du  $\text{Ca}_i$ . Ce taux de  $\text{Ca}_i$  est finement régulé afin d'empêcher une trop forte stimulation des réponses cellulaires ainsi qu'une cytotoxicité en raison d'une élévation prolongée du  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique. Il existe donc au niveau des kératinocytes une homéostasie du  $\text{Ca}^{2+}$  qui implique les protéines cytosoliques qui fixent le  $\text{Ca}^{2+}$ , les pompes à  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases) ainsi que les canaux échangeurs  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Na}^+$  de la membrane plasmique, mais également les organites de stockage du  $\text{Ca}^{2+}$  que sont le RE ou encore l'appareil de Golgi (Figure 36).

Ces cycles répétés de libération et d'assimilation génèrent une oscillation du  $\text{Ca}^{2+}$  qui entraîne la réponse cellulaire et la transcription de certains gènes (Berridge, 2001).



**Figure 36 :** Modèle de la signalisation calcique kératinocytaire.

Repris et modifié d'après (Bikle et al, 2004).

Le  $\text{Ca}^{2+}$  active sa voie de signalisation en partie *via* le CaR (*Calcium Receptor*). Ce dernier stimule l'hydrolyse de  $\text{PIP}_2$  (*phosphatidyl inositol bis phosphate*) en activant PLC- $\beta$  (*phospholipase C- $\beta$* ), permettant la libération des messagers secondaires que sont l' $\text{IP}_3$  (*inositol tris phosphate*) et le DG (*diacyl glycerol*). L' $\text{IP}_3$  active son récepteur  $\text{IP}_3\text{R}$  afin de permettre le relargage de  $\text{Ca}^{2+}$  des organites de stockage intracellulaires que sont le RE (*réticulum endoplasmique*) et l'appareil de Golgi. Le DG active des protéines kinases (non montrées ici) importantes dans la régulation de la signalisation calcique. Le  $\text{Ca}^{2+}$  active aussi PLC- $\gamma$  *via* les kinases Src et PIP3K (*phosphatidyl inositol 3 kinase*). Le RE et l'appareil de Golgi participent à la régulation du calcium intracellulaire. Ces deux organites ont chacun des pompes à  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{IP}_3\text{R}$ . Les canaux calciques dont les SOCs, ont également un rôle important dans l'influx calcique (non montré sur ce modèle. )

Il semblerait que la suppression de la réponse cellulaire due au  $\text{Ca}_i$  suivant l'inhibition du CaR soit causée par la rupture du relargage de  $\text{Ca}^{2+}$  des organites de stockage, ou encore par une rupture de l'influx de  $\text{Ca}^{2+}$  *via* les canaux de la membrane plasmique. En effet, l'inhibition de l'expression du CaR provoque la réduction de  $\text{Ca}_i$  au niveau des organites de stockage, compensée par une entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  *via* les SOCs. Néanmoins l'inhibition du CaR empêche l'expression de la TG-1 et de la filaggrine même lorsque la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  du milieu de culture est de 2 mM (Tu et al, 2007). Récemment, il a également été démontré que le CaR est impliqué dans la formation des jonctions

*adherens*. En effet, l'inhibition de l'expression du CaR entraîne la suppression de la formation des jonctions *adherens*, en empêchant la formation des complexes E-cadhérines / cathénines mais sans affecter leur synthèse protéique (Tu *et al*, 2008).

Une augmentation persistante du  $Ca_i$  est nécessaire pour l'induction et le maintien de la différenciation kératinocytaire. L'utilisation d'un agent chélateur du  $Ca_i$  empêche l'induction de la différenciation par le  $Ca^{2+}$  extracellulaire. L'activité de la PLC $\gamma$ 1 (*phospholipase C  $\gamma$ 1*) est impliquée dans le maintien du taux de  $Ca_i$  nécessaire à l'initiation de la différenciation. L'augmentation de  $Ca^{2+}$  extracellulaire stimule non seulement l'activité lipase de PLC $\gamma$ 1 mais également l'augmentation de son expression (Xie *et al*, 2005), ce qui entraîne l'augmentation d'IP $_3$  et la libération de  $Ca^{2+}$  des organites de stockage. Après vidange des organites de stockage, PLC $\gamma$ 1 et IP $_3$ R augmentent le  $Ca_i$  en activant l'entrée de  $Ca^{2+}$  *via* une interaction directe avec les SOCs (Tu *et al*, 2005).

### **I.3.2. Les canaux calciques**

Les canaux perméables aux ions et particulièrement au  $Ca^{2+}$  sont tous des candidats potentiels susceptibles de participer à l'augmentation de l'influx calcique kératinocytaire (Mauro *et al*, 1993). Les protéines TRP (*transient receptor potential*) forment une superfamille de canaux ioniques. Elles affichent un assortiment extraordinaire de sélectivités et de mécanismes d'activation, dont certains représentent des modes précédemment non reconnus pour des canaux de régulation ionique. De plus, les rôles biologiques des canaux TRP semblent être également très diversifiés (Montell *et al*, 2002).

Dans cette superfamille, TRPV6 (*TRP sous-famille V membre 6*) a déjà été décrit comme un canal hautement sélectif au  $Ca^{2+}$  et exprimé dans plusieurs tissus. Récemment, des expérimentations ont permis de mettre en évidence son implication dans la différenciation kératinocytaire *in vitro*, induite par ajout de  $Ca^{2+}$  dans le milieu de culture (Lehen'kyi *et al*, 2007). En effet, ces travaux ont démontré que l'augmentation de la concentration en  $Ca^{2+}$  extracellulaire (de 0,07 mM à 1,8 mM) induisait l'expression de TRPV6, en corrélation avec celle de marqueurs de différenciation tels que l'involucrine ou encore K10. De plus, il semble que TRPV6 soit impliqué de manière constitutive dans l'augmentation du  $Ca_i$  en réponse à l'élévation de la concentration calcique extracellulaire. L'inhibition de l'expression de TRPV6 par l'utilisation de SiRNA spécifique provoque une forte diminution de l'expression des marqueurs de différenciation, mais affecte également les changements morphologiques classiquement observés lorsque des kératinocytes en culture se différencient, ce qui suggère l'implication de TRPV6 dans ce processus.



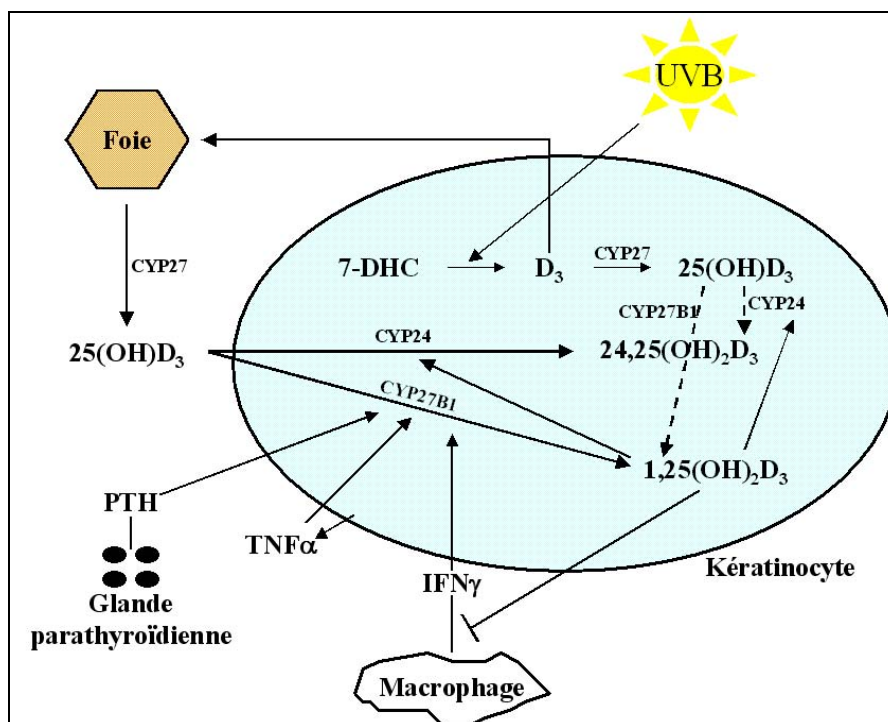
La sous famille TRPC semble également impliquée dans l'influx calcique ainsi que dans la différenciation kératinocytaire. En effet, des travaux ont démontré l'expression de TRPC dans des kératinocytes épidermiques (Tu *et al*, 2005). Plus récemment, il a été démontré que les isoformes TRPC1 et TRPC4 étaient impliquées dans la différenciation kératinocytaire *in vitro* après augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire (Beck *et al*, 2008). En effet, l'inhibition de l'expression de ces canaux par siRNA empêche la mise en place du processus de différenciation engendré par l'élévation de  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire. Ceci suggère que TRPC1 ainsi que TRPC4 sont requis pour générer l'influx calcique nécessaire à l'induction de la différenciation.

## II. La vitamine D<sub>3</sub>

La vitamine D<sub>3</sub> est une vitamine liposoluble synthétisée à partir d'un dérivé du cholestérol sous l'action des rayonnements UV. Egalement appelée cholécalciférol, elle n'atteint sa forme active qu'après plusieurs modifications enzymatiques catalysées par des hydroxylases.

### II.1. Production épidermique de la vitamine D<sub>3</sub>

Un schéma récapitulatif de la production et du métabolisme de la vitamine D<sub>3</sub> est représenté sur la figure 37. Les kératinocytes sont non seulement capables de produire la vitamine D<sub>3</sub> mais aussi de la métaboliser *via* la vitamine D-25 hydroxylase et la 1 $\alpha$ -hydroxylase, afin d'obtenir le métabolite actif de la vitamine D<sub>3</sub> : la 1,25 dihydroxyvitamine D<sub>3</sub> ou « 1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> » (ajout d'un groupement hydroxyle sur les carbones 1 et 25). La vitamine D-25 hydroxylase kératinocytaire est la même enzyme mitochondriale (CYP27) qui convertit la vitamine D<sub>3</sub> en 25(OH)D<sub>3</sub> dans le foie. Son expression est augmentée par les UVB solaires. Similairement, la 1 $\alpha$ -hydroxylase épidermique est la même enzyme (CYP27B1) que celle retrouvée dans le rein. Son expression ainsi que son activité enzymatique sont finement régulées et sont couplées au processus de différenciation épidermique. L'activité enzymatique de ces deux hydrolases est plus importante dans les cellules non différenciées. En effet, la culture de kératinocytes dans un milieu contenant au maximum 0,1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  permet aux cellules de maintenir une activité de la 1 $\alpha$ -hydroxylase plus importante que lorsque la culture est effectuée dans un milieu contenant 1,2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  (Bikle *et al*, 1989). Néanmoins, la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire n'a que très peu d'effet sur la production de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, la forme active de la vitamine D<sub>3</sub>. Ces observations *in vitro* corrélerent avec le fait que l'expression de la 1 $\alpha$ -hydroxylase est plus importante au niveau de la couche basale de l'épiderme *in vivo* (Zehnder *et al*, 2001).



**Figure 37 :** Métabolisme de la vitamine D<sub>3</sub>.

Repris et modifié d'après (Bikle, 2004).

Chez l'homme, la vitamine D<sub>3</sub> est synthétisée dans la peau à partir du 7-déhydrocholestérol (7-DHC) suite à une réaction photochimique due à l'irradiation UV apportée par la lumière solaire. La vitamine D<sub>3</sub> ainsi produite est soit transportée vers le foie où elle est convertie en 25(OH)D<sub>3</sub> (ajout d'un groupement hydroxyle sur le carbone 25), soit métabolisée directement en 25(OH)D<sub>3</sub> dans le kératinocyte par une enzyme : la 25-hydroxylase (CYP27). Cette forme intermédiaire est ensuite métabolisée soit en 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, soit en 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> respectivement par les enzymes 24-hydroxylase (CYP24) et 1 $\alpha$ -hydroxylase (CYP27B1). L'hormone parathyroïdienne (*parathyroid hormone*, PTH), sécrétée par la glande parathyroïdienne stimule la production de la forme active de la vitamine D<sub>3</sub> « 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> », de même que le TNF $\alpha$  (*tumor necrosis factor- $\alpha$* ) sécrété par les kératinocytes ou encore l'interféron  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) sécrété par les macrophages. La forme 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> active son propre catabolisme en induisant la 24-hydroxylase et en diminuant la sécrétion d'IFN $\gamma$  par les macrophages.

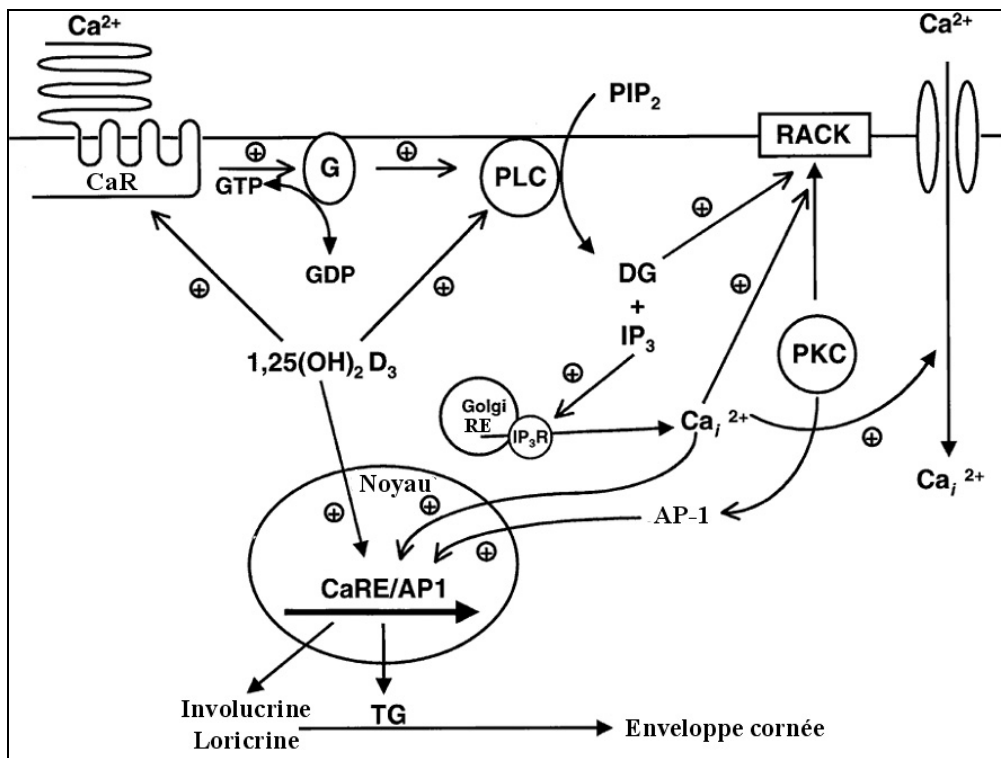
## II.2. Interactions de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> et du Ca<sup>2+</sup>

Les mécanismes par lesquels la forme active de la vitamine D<sub>3</sub>, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, module la différenciation kératinocytaire sont multiples et chevauchent les mécanismes par lesquels le Ca<sup>2+</sup> régule le processus de différenciation (Figure 38). Le Ca<sup>2+</sup> ainsi que la 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> interagissent dans leur capacité à inhiber la prolifération mais aussi à stimuler l'expression de l'involucrine ou encore de la transglutaminase (Su *et al*, 1994b). Plus la concentration en Ca<sup>2+</sup> extracellulaire est

importante, plus les kératinocytes sont sensibles à l'effet antiprolifératif de la 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Cette synergie peut s'expliquer par la capacité de la 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> à induire le CaR (Ratnam *et al*, 1999) ce qui rend les kératinocytes plus sensibles au Ca<sup>2+</sup> extracellulaire. De plus, le Ca<sup>2+</sup> ainsi que la 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> induisent les enzymes de la famille des PLC (Xie and Bikle, 1997). Le mécanisme par lequel le Ca<sup>2+</sup> induit la PLC reste flou. Néanmoins, la présence d'un élément de réponse à la vitamine D au niveau du promoteur du gène PLC-γ1 indispensable à son induction par la 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> a été observée. La régulation de gènes tels que l'involucrine ou encore la transglutaminase est plus complexe. Le Ca<sup>2+</sup> (en absence de la 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) mais également la 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (à 0,03 mM Ca<sup>2+</sup>) augmentent le taux d'ARNm de ces deux gènes de façon dose-dépendante. Cette stimulation est synergique pour une concentration intermédiaire en Ca<sup>2+</sup> (0,1 mM) et en 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (10<sup>-10</sup> M), mais n'est plus valable pour des concentrations supérieures. Cette synergie est d'autant plus importante à un temps précoce après ajout de Ca<sup>2+</sup> (4 heures) qu'à un temps plus tardif (24-72 heures). Ce résultat semble dû à l'augmentation du renouvellement des transcrits de ces gènes en présence d'une forte concentration en Ca<sup>2+</sup> et en 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Néanmoins, ceci permet d'empêcher une production excessive d'involucrine et de transglutaminase suite à une concentration en calcium et / ou en 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> accrues, et peut être considéré comme un mécanisme par lequel la production de telles protéines est séquentiellement modulée lors de la différenciation kératinocytaire *in vivo*. Une explication plausible de l'induction synergique de l'involucrine viendrait du fait que son promoteur possède un CaRE mais également un élément de réponse à la vitamine D (VDRE) spatialement proches. Mais bien qu'une mutation au niveau du site AP-1 du CaRE bloque à la fois l'induction de l'involucrine par le Ca<sup>2+</sup> et la 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, la mutation du VDRE n'engendre que l'inhibition de la réponse à la 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (Bikle *et al*, 2002).

### II.3. Le récepteur à la vitamine D et ses coactivateurs

L'effet du métabolite actif de la vitamine D<sub>3</sub>, la 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, s'effectue *via* son interaction avec un récepteur nucléaire : le récepteur à la vitamine D (*vitamin D receptor*, VDR). Le VDR appartient à la superfamille des récepteurs aux hormones stéroïdiennes et il régule l'expression génique en formant un hétérodimère avec le récepteur au rétinoïde X. La fixation de la 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> au VDR module la transcription de gènes cibles résultant de l'inhibition de la prolifération et la stimulation des kératinocytes (Bikle, 2004).



**Figure 38** : Régulation de la différenciation par la vitamine D<sub>3</sub>.

*Repris et modifié d'après (Bikle, 2004).*

Le CaR et les PLCs sont induits par la 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> et sont à l'origine de l'augmentation de Ca<sub>i</sub>, d'IP<sub>3</sub> et de diacylglycerol (DG). L'augmentation de ces messagers secondaires entraîne l'activation de la PKC. Cette activation entraîne la translocation de la PKC vers son récepteur membranaire spécifique (RACK) et l'ouverture des canaux calciques de la membrane plasmique. La 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, en combinaison avec l'augmentation de Ca<sub>i</sub> et le facteur de transcription AP-1 activé par la PKC, stimulent alors la différenciation en induisant les substrats (par exemple l'involucrine et la loricrine) et la transglutaminase (TG) qui permet de lier ces substrats pour ainsi former l'enveloppe cornée.

Un certain nombre de coactivateurs impliqués dans la transcription *via* le VDR ont été récemment découverts. Ces coactivateurs interagissent avec le VDR pour former un complexe qui active la transcription, vraisemblablement soit en interagissant avec le VDRE et formant ainsi un complexe d'initiation, soit en augmentant l'accessibilité du site d'initiation suite à la modification structurale de la chromatine. Des études ont montré que le VDR se lie séquentiellement avec deux complexes de coactivateurs lors de la différenciation kératinocytaire : DRIP (*VDR-interacting protein*) et SRC (*steroid receptor coactivator*). L'utilisation de siRNA spécifiques a permis de caractériser leurs rôles dans le processus de différenciation (Oda *et al*, 2007). Il s'avère que

l'inhibition de DRIP et / ou de VDR entraîne une augmentation de la prolifération kératinocytaire *in vitro*. En revanche, l'inhibition de SRC n'a aucun effet sur la prolifération. De plus, l'inhibition de SRC et / ou de VDR provoque une forte diminution de l'expression des marqueurs de différenciation que sont K1 ou encore la filaggrine et donc un blocage du processus de différenciation. En revanche, l'inhibition de DRIP n'affecte pas l'expression de K1 mais seulement celle de la filaggrine. Des marquages immunohistochimiques effectués sur des coupes de peau humaine ont également permis de localiser *in vivo* les coactivateurs. DRIP a une localisation exclusivement nucléaire dans les kératinocytes des couches basale et suprabasale, bien qu'il soit plus abondant au niveau des couches basale et épineuse en comparaison à la couche granuleuse. En revanche SRC montre un pattern d'expression totalement différent : il se localise à la fois au niveau nucléaire et cytoplasmique et son niveau maximum d'expression se retrouve dans les kératinocytes les plus différenciés de l'épiderme, avec notamment une augmentation graduelle de la couche épineuse en remontant vers la couche granuleuse. Toutes ces observations indiquent que SRC, comparé à DRIP, semble d'avantage impliqué dans le processus de différenciation (Oda *et al*, 2007).

### III. Les rétinoïdes

Les rétinoïdes sont des dérivés de synthèse de la vitamine A naturelle ou rétinol. Les propriétés très intéressantes de la vitamine A dans le contrôle de la différenciation et de la croissance des cellules épithéliales ont conduit à la synthèse de dérivés en vue d'obtenir des produits encore plus efficaces. Ce sont l'acide rétinoïque (*retinoic acid*, RA) ou trétinoïne, l'acide 13-cis-rétinoïque ou isotrétinoïne et l'acitrétine. L'acide rétinoïque, également connu sous l'appellation d'acide tout-trans-rétinoïque (*all-trans-retinoic*), diffère de la vitamine A par le remplacement d'un groupement CH<sub>2</sub>OH par un groupement acide COOH. C'est le métabolite de la vitamine A qui agit dans la croissance et la différenciation cellulaire. Quant à l'isotrétinoïne, ou acide 13-cis-rétinoïque, c'est l'isomère de la trétinoïne obtenu par synthèse.

Parmi tous les rétinoïdes, c'est l'acide rétinoïque qui apparaît comme ayant l'effet le plus important sur la peau. Bien que le mécanisme précis par lequel l'acide rétinoïque intervient dans le programme de différenciation ne soit pas complètement élucidé, certaines évidences rapportent le rôle essentiel de ses récepteurs appartenant à la superfamille des récepteurs nucléaires, parmi lesquels RAR (*retinoic acid receptor*) et RXR (*retinoid X receptor*) qui se lient spécifiquement et respectivement à l'acide rétinoïque et à son isomère 9-cis-RA (Fisher *et al*, 1995). Ces récepteurs possèdent plusieurs isoformes. Le contrôle de la différenciation épidermique impliquerait les

isoformes RAR $\gamma$  et RXR $\alpha$ . L'isoforme RAR $\alpha$  est faiblement détectée dans l'épiderme, tandis que l'expression de RAR $\beta$  n'est pas observée dans la peau humaine (Elder *et al*, 1992).

Dans la peau, le taux d'acide rétinoïque est autorégulé suivant trois boucles de rétroaction différentes qui sont :

1. L'induction de l'expression des CRABPs (*cellular RA-binding proteins*) corrélée avec la concentration décroissante d'acide rétinoïque libre. En effet, les CRABPs sont des protéines cytoplasmiques d'environ 15 kDa, impliquées dans la séquestration cytoplasmique et / ou le transport de l'acide rétinoïque. Elles possèdent des constantes de dissociation similaires à celles des RARs et auraient un rôle dans la régulation de l'équilibre de la concentration intracellulaire en acide rétinoïque (Fisher *et al*, 1995). De plus, l'acide rétinoïque induit *in vivo* la transcription de l'isoforme CRABP2 *via* un élément de réponse à l'acide rétinoïque (*retinoic acid response element*, RARE) (Astrom *et al*, 1994).
2. L'induction des CRBPs (*cellular retinol-binding proteins*), protéines impliquées dans la régulation intracellulaire du rétinol (Astrom *et al*, 1991).
3. L'induction des enzymes impliquées dans la biosynthèse de l'acide rétinoïque, telles que ADH3 (*alcohol dehydrogenase 3*). Le gène de cette déshydrogénase, exprimée uniquement dans des kératinocytes en différenciation, possède un motif RARE dans sa région promotrice.

L'acide rétinoïque est un régulateur efficace de plusieurs gènes impliqués dans la différenciation kératinocytaire telles que les kératines, la loricrine, la profilaggrine ou encore la transglutaminase. De plus, l'acide rétinoïque régule certaines enzymes impliquées dans son propre métabolisme ainsi que d'autres protéines avec lesquelles il interagit. Par exemple, l'expression de CRABP2 est induite après traitement à l'acide rétinoïque. Cette induction requiert la mise en place de la stratification ainsi que l'interaction entre le derme et l'épiderme (Astrom *et al*, 1991).

*In vitro*, des expérimentations ont permis de démontrer que l'acide rétinoïque inhibe l'expression de marqueurs de différenciation : les kératines K1 et K10, la profilaggrine ou encore la loricrine (Fuchs, 1990 ; Fisher *et al*, 1995). En revanche, *in vivo*, l'acide rétinoïque a l'effet inverse sur l'expression de ces marqueurs et entraîne une hyperprolifération kératinocytaire accompagnée de l'épaississement de l'épiderme (Fisher and Voorhees, 1996).

Les trois récepteurs à l'acide rétinoïque (RAR $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ) inhibent l'expression génique des kératines K3, K5, K6, K10, K13, K14, K16 et K17 (Fisher *et al*, 1995). *In vitro*, des expérimentations ont démontré que le promoteur de K14 possède un motif RARE (Radoja *et al*, 1997) sur lequel les RARs ainsi que les RXRs peuvent se fixer (Tomic-Canic *et al*, 1996). De même, l'acide rétinoïque

induit *in vivo* la transcription génique de K6 *via* un motif RARE localisé en amont de sa séquence promotrice (Navarro *et al*, 1995). Les kératines K19 et K13, marqueurs des épithéliums non stratifiés, peuvent également être induites dans des kératinocytes en culture par l'acide rétinoïque (Schon and Rheinwald, 1996). Néanmoins, d'autres expérimentations rapportent que l'acide rétinoïque induirait l'expression de K19 *via* un mécanisme post-transcriptionnel impliquant la stabilité de son ARNm (Crowe, 1993).

L'acide rétinoïque affecte également la régulation de la profilaggrine, en inhibant son expression génique, mais également en intervenant sur son processus de maturation post-traductionnelle. *In vitro*, la profilaggrine ne s'exprime que si la concentration en acide rétinoïque du milieu de culture est inférieure à  $10^{-8}$  M. D'autres expérimentations ont permis de mettre en évidence la présence de motifs RAREs au niveau de la région promotrice du gène de la profilaggrine. Néanmoins, le mode de régulation génique de la profilaggrine par l'acide rétinoïque semble s'effectuer de manière indirecte et pourrait nécessiter la présence de cofacteurs en plus des récepteurs aux rétinoïdes, car ces derniers ne se fixent pas directement sur leur motif de liaison (Presland *et al*, 2001b). L'acide rétinoïque empêche également l'expression de la loricrine *in vitro* (Magnaldo *et al*, 1992), même en présence d'une concentration élevée en  $Ca^{2+}$ . Aucun motif RARE n'a été identifié au niveau de sa séquence génique (Fisher *et al*, 1995).

L'expression ainsi que l'activité enzymatique de la transglutaminase sont également affectées par l'acide rétinoïque. En effet, une étude rapporte qu'*in vitro* l'acide rétinoïque inhibe la transglutaminase de façon post-traductionnelle (Michel *et al*, 1989) alors que d'autres expérimentations suggèrent une inhibition au niveau transcriptionnel (Liew and Yamanishi, 1992). En revanche, *in vivo*, un traitement topique à l'acide rétinoïque entraîne une augmentation de l'expression de la transglutaminase (Griffiths *et al*, 1992).

#### **IV. Les facteurs de croissance**

Plusieurs types de facteurs de croissance sont impliqués dans la régulation fonctionnelle des kératinocytes normaux humains, parmi lesquels les famille des EGF (*epidermal growth factor*) et des TGF- $\beta$  (*transforming growth factor- $\beta$* ) jouent des rôles cruciaux. Les kératinocytes humains synthétisent quatre facteurs de croissance de la famille EGF : le TGF- $\alpha$ , l'amphiréguline, HB-EGF (*heparin binding-EGF*) et l'épiréguline. Ces facteurs régulent les processus de prolifération et de différenciation kératinocytaire de façon autocrine et paracrine. Les kératinocytes humains synthétisent également TGF- $\beta$ 1 et TGF- $\beta$ 2, qui sont des inhibiteurs efficaces de la prolifération kératinocytaire.

Les facteurs de la famille EGF possèdent tous six résidus cystéine très conservés avec un espacement similaire. Ils possèdent également au moins un domaine EGF ainsi qu'un domaine transmembranaire. Les formes précurseurs de ces facteurs sont ancrées dans la membrane plasmique et sont enzymatiquement activées dans le milieu extracellulaire afin de libérer les formes solubles matures, qui agissent alors en tant que facteurs de croissance autocrine, bien que certains membres de la famille EGF peuvent agir en tant que facteur de croissance juxtacrine. A l'origine, le concept de croissance autocrine a été évoqué afin d'expliquer la prolifération autonome de cellules malignes. La première observation d'un facteur de croissance autocrine a été rapporté pour le TGF- $\alpha$ . Ensuite, l'amphiréguline, HB-EGF et l'épiréguline ont été décrits comme étant des facteurs de croissance autocrine des kératinocytes. Les facteurs de croissance autocrine de la famille EGF peuvent également induire d'autres facteurs de croissance de la famille EGF. Ce phénomène porte le nom de *cross-induction*. Par exemple, l'épiréguline induit l'expression de HB-EGF, de l'amphiréguline et du TGF- $\alpha$  (Hashimoto, 2000).

La famille des TGF- $\beta$  comprend cinq isoformes, TGF- $\beta$ 1-5, ainsi que d'autres membres tels que l'activine ou encore BMP (*bone morphogenic protein*). Les facteurs TGF- $\beta$  exercent une large gamme d'effets biologiques sur les kératinocytes, la principale étant l'inhibition de la prolifération. En effet, une concentration extracellulaire de l'ordre de 0,3 ng/mL de TGF- $\beta$ 1 inhibe de façon presque totale la prolifération kératinocytaire *in vitro* (Hashimoto, 2000).

## **IV.1. Le récepteur à l'EGF : EGFR**

Le schéma métabolique qui implique EGFR est très complexe. En effet, ce récepteur se retrouve dans la régulation de diverses voies de signalisation cellulaires fondamentales telles que la prolifération, la différenciation, la motilité ou encore la survie cellulaire. L'EGFR est également impliqué dans le processus de cicatrisation ainsi que dans la mise en place de la réponse inflammatoire.

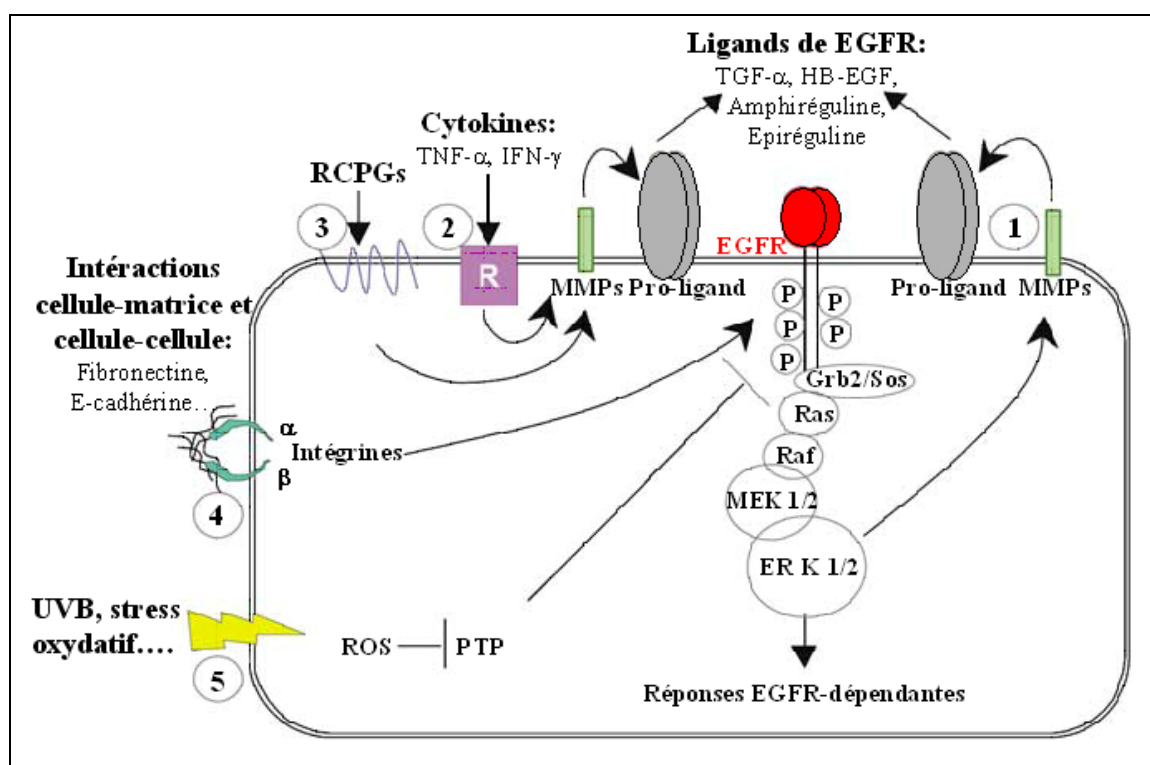
### **IV.1.1. L'activation d'EGFR s'effectue *via* divers mécanismes**

L'EGFR, en fonction des conditions physiologiques, peut être activé par plusieurs mécanismes (Figure 39).

Indépendamment de son activation directe par des ligands spécifiques (TGF $\alpha$ , HB-EGF...), il existe également des mécanismes ligand-dépendants hétérologues qui peuvent activer la voie EGFR. C'est le cas, par exemple, des récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs). Il existe environ 200 types de RCPGs. Ils représentent la plus grande famille de protéines chez les eucaryotes. Ces récepteurs à



sept domaines transmembranaires possèdent un très grand nombre de ligands divers et variés ( $\text{Ca}^{2+}$ , lipides, peptides...). Ils peuvent également être activés par des stimuli sensoriels. Dans la peau, ils sont impliqués dans le processus de cicatrisation. La stimulation de RCPGs a comme conséquence l'activation de l'EGFR *via* l'activité des métalloprotéinases matricielles MMPs (*matrix metalloproteinases*). Ces enzymes  $\text{Zn}^{2+}$ -dépendantes permettent la libération du pro-ligand de la membrane plasmique, qui peut alors aller se fixer sur l'EGFR. Ce dernier peut également être activé *via* un mécanisme ligand-indépendant et impliquant les intégrines (Cabodi *et al*, 2004). Il existe des phosphatases (*receptor-type protein-tyrosine phosphatase- $\kappa$* , RTPTP- $\kappa$ ) qui peuvent inhiber, suite à la déphosphorylation de l'EGFR, la transduction du signal *via* la voie EGFR (Xu *et al*, 2005). Alternativement, la génération d'espèces réactives de l'oxygène suite à l'activation de l'EGFR par des irradiations UV entraîne l'inactivation réversible de ces phosphatases (Xu *et al*, 2006).



**Figure 39** : Mécanismes d'activation de EGFR dans les kératinocytes.

*Repris et modifié d'après (Pastore et al, 2008)*

Lorsqu'il n'est pas stimulé, EGFR régule sa propre activation *via* une boucle auto/paracrine basée sur la synthèse *de novo* suivie de la fixation de ses ligands sous forme mature (1). Divers ligands de RCPGs tels que les catécholamines ou encore l'angiotensine (2) mais également des cytokines pro-inflammatoires fixées à leur récepteur [R] (3) entraînent la maturation des ligands de EGFR *via* l'activité des MMPs. De plus, les intégrines s'associent à l'EGFR afin de déclencher la signalisation EGFR ligand-indépendante (4). Enfin, l'inactivation des protéines tyrosine phosphatases (PTP) suite à la génération intracellulaire d'espèces réactives de l'oxygène (*reactive oxygen species*, ROS) en réponse à des stimuli oxydatifs (5) permet de maintenir EGFR sous sa forme active, avec éventuellement la stimulation de l'activité ERK.

#### **IV.1.2. Evènements moléculaires et fonctions cellulaires qui impliquent EGFR**

La cascade de transduction de signaux classiques qui suit l'activation de EGFR est relayée par les kinases MAPKs et ERKs. Ces dernières sont succinctement représentées sur la figure 39. Lorsque EGFR est activé, ses sites d'autophosphorylation peuvent interagir avec plusieurs autres protéines possédant un domaine de liaison à la phosphotyrosine. C'est le cas, par exemple, de PLC- $\gamma$ 1 ou encore de la sous-unité p85 $\alpha$  de PI3K. Dans la voie PI3K-dépendante, la phosphorylation de

la sérine/thréonine kinase Akt entraîne la phosphorylation de toute une panoplie de protéines impliquées dans la survie cellulaire.

#### **IV.1.2.1. Survie cellulaire et protection de l'apoptose**

Le blocage de la signalisation *via* EGFR avec un anticorps spécifique ou encore une molécule inhibitrice n'induit pas la mort cellulaire, mais rend la cellule plus sensible à l'induction de la mort cellulaire. Des effets similaires peuvent être observés suite à l'inhibition de ERK. En revanche, la réponse anti-apoptotique mise en place après une irradiation aux UVB, ou encore suite à un stress oxydatif, est activée par la voie EGFR-PI3K-Akt (Wang *et al*, 2000b ; Canguilhem *et al*, 2005). EGFR est impliqué dans le relais de signaux critiques qui retardent le processus apoptotique déclenché, à l'origine, par la perte de l'interaction cellule-matrice. Ces mécanismes ERK-dépendants ont une pertinence particulière pour les pathologies dans lesquelles l'expression de EGFR et / ou de ses ligands est généralement observée. C'est le cas par exemple du processus de cicatrisation (Marikovsky *et al*, 1993) ou encore de certaines maladies cutanées entraînant une hyperprolifération kératinocytaire (Mascia *et al*, 2003).

#### **IV.1.2.2. EGFR est responsable de la stimulation mitogénique**

Sur des kératinocytes en culture, l'activation de EGFR par un de ses ligand entraîne la capacité de ces cellules à se répliquer de façon autonome. Parallèlement, les inhibiteurs spécifiques de la signalisation *via* EGFR bloquent la prolifération des kératinocytes humains *in vitro* (Powell *et al*, 1999). L'amphiréguline est le ligand de EGFR qui fournit de loin la stimulation autocrine la plus importante pour la prolifération cellulaire, en sachant que ce ligand est celui qui est le plus abondamment exprimé dans des kératinocytes non stimulés (Shirakata *et al*, 2000), suivi ensuite de HB-EGF (Hashimoto *et al*, 1994). En revanche, TGF- $\alpha$ , un inducteur potentiel d'autres ligands de EGFR et de lui-même, ne semble pas avoir d'effets mitogéniques directs *in vitro* (Pittelkow *et al*, 1993), tandis qu'il n'y a aucune évidence quant à la stimulation de la prolifération par l'épiréguline *in vitro* (Pastore *et al*, 2008).

*In vivo*, la surexpression de ligands de EGFR est caractéristique des conditions hyperprolifératives d'origine bénigne ou maligne de la peau. Par exemple, dans les lésions psoriasiques, il y a surexpression de EGFR, de TGF- $\alpha$ , d'amphiréguline, de HB-EGF et d'épiréguline. L'activation de EGFR est également à la base des effets hyperprolifératifs engendrés par les rétinoïdes. En effet, HB-EGF est significativement induit en réponse à un traitement aux rétinoïdes, à la fois *in vitro* et *in vivo*. De plus, une inhibition de EGFR altère l'hyperprolifération rétinoïde-dépendante (Stoll and

Elder, 1998). Enfin, l'application d'acide tout-trans-rétinoïque sur la peau humaine induit spécifiquement la transcription de HB-EGF et de l'amphiréguline. En revanche, cela n'entraîne pas l'induction de TGF- $\alpha$ . Dans ces conditions, la neutralisation des ligands HB-EGF avec un anticorps spécifique réduit également l'hyperplasie épidermique causée par un traitement topique avec l'acide rétinoïque (Rittie *et al*, 2006).

#### **IV.1.2.3. Rôle de EGFR dans l'adhésion et la migration cellulaire**

Les intégrines, complexes formés de sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ , sont des récepteurs qui ancrent les protéines de la matrice extracellulaire au cytosquelette d'actine, permettant ainsi l'adhésion des cellules entre elles ou encore à la matrice extracellulaire. Les intégrines, en fonction de leur expression et de leur localisation, sont à l'origine du déclenchement de diverses voies de signalisation et sont impliquées dans divers processus tels que la prolifération, la différenciation ou encore la survie cellulaire. Les intégrines forment également des complexes avec les récepteurs aux facteurs de croissance, et l'adhésion cellulaire intégrine-dépendante entraîne l'activation de EGFR d'une manière ligand-indépendante. Réciproquement, la signalisation induite par les intégrines semble nécessaire à l'activation des réponses transcriptionnelles EGFR-dépendantes, incluant également celles dépendantes de ERK (Cabodi *et al*, 2004). En d'autres termes, cette interférence bi-directionnelle suggère une coopération entre les intégrines et EGFR afin que la réponse biologique soit complète (Bill *et al*, 2004).

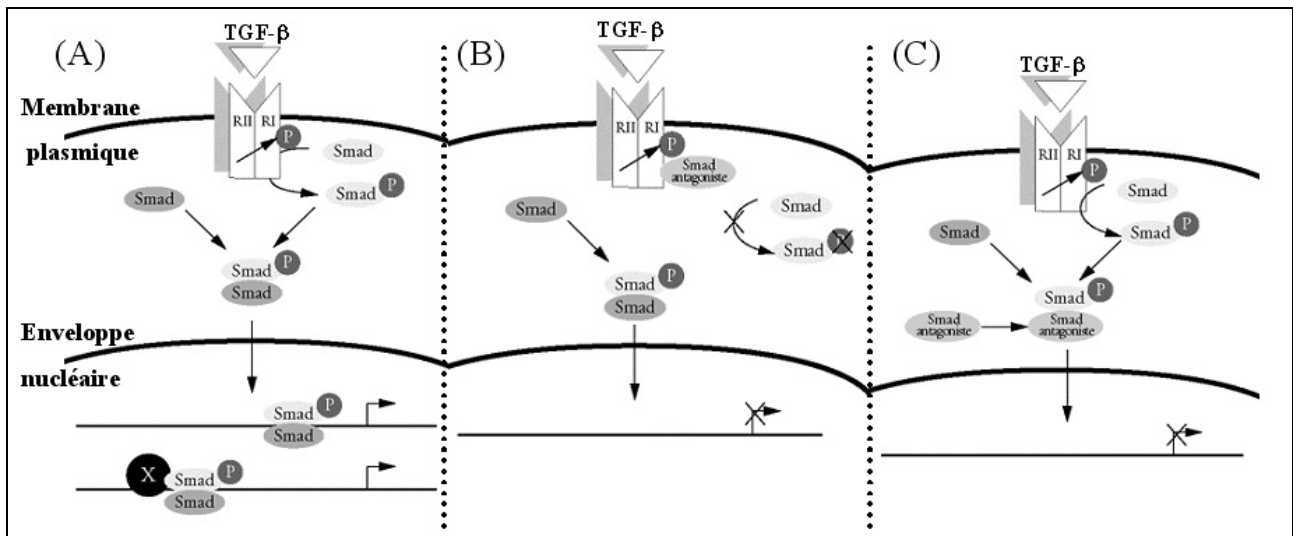
Les ligands de EGFR sont potentiellement des facteurs ayant une activité pro-migratoire pour les kératinocytes. L'activation ligand-dépendante de EGFR provoque une rupture des hémidesmosomes, et plus précisément des intégrines  $\alpha6\beta4$  avec les molécules du cytosquelette. Ce phénomène est préalable à la migration des kératinocytes (Mariotti *et al*, 2001). En effet, un stimuli de type blessure induit la maturation immédiate des ligands de EGFR et donc leur décrochage de la membrane plasmique. Ce processus peut être bloqué *via* l'inhibition des MMPs, ce qui empêche alors la migration kératinocytaire *in vitro*. Néanmoins, la migration peut être restaurée après l'ajout exogène d'EGF-recombinant (EGFr), ce qui suggère que la maturation du pro-ligand, qui consiste en son décrochage de la membrane plasmique est un événement clé du phénomène de migration kératinocytaire (Tokumaru *et al*, 2000). Dans le sérum humain, le TGF- $\alpha$  fait figure de facteur de croissance principal pour la mise en place de ce processus : il interviendrait à raison de plus de 80% de l'activité migratrice kératinocytaire lors de la cicatrisation (Li *et al*, 2006). Le processus de migration kératinocytaire implique la perte de la membrane basale, échafaudage fondamental de l'adhésion cellulaire. La collagénase-1, une MMP produite par les kératinocytes basaux qui clive les

fibrilles de collagène de type I, est indispensable à la migration lorsque les cellules sont cultivées sur une matrice de collagène de type I (Pilcher *et al*, 1997). D'autres expérimentations ont permis ensuite de mettre en évidence que l'expression de cette enzyme est dépendante de l'activation autocrine du récepteur EGFR (Pilcher *et al*, 1999). L'activation de ERK est également impliquée dans ce processus de migration (Li *et al*, 2004).

## **IV.2. Signalisation induite par TGF- $\beta$**

Les principales étapes de cette voie de signalisation sont schématisées sur la figure 40. Les facteurs TGF- $\beta$  transduisent leurs signaux *via* leur liaison avec des récepteurs à activité sérine / thréonine kinase. Tout d'abord, le TGF- $\beta$  se fixe à un récepteur de type 2, ce qui permet ensuite le recrutement d'un récepteur de type 1. Pour cela, le récepteur de type 2 phosphoryle le récepteur de type 1 afin de l'activer. Ce dernier peut alors activer à son tour des médiateurs cytoplasmiques : les protéines SMADs. Ces protéines servent de navettes entre la membrane cellulaire et le noyau où elles régulent la transcription de gènes cibles. Chez l'homme huit protéines SMAD (SMAD-1 à -8) ont été identifiées. Elles sont classées en trois groupes fonctionnels : les protéines SMAD inductibles (SMAD-1, -2, -3, -5, -8), les protéines co-activatrices (SMAD-4) et les protéines SMAD antagonistes (SMAD-6, -7).

Les protéines SMAD inductibles sont recrutées par le récepteur de type I dont l'activité kinase va permettre leur phosphorylation. A la suite de cette phosphorylation, les protéines SMAD activées se dissocient du récepteur pour s'associer avec les protéines «co-activatrices», telles que SMAD-4, et ainsi migrer dans le noyau. Ces complexes protéiques se fixent au niveau des séquences promotrices des gènes cibles, soit de façon directe, soit en association avec d'autres facteurs de régulation de la transcription (Figure 40A). Quant aux protéines SMAD antagonistes, elles peuvent entraver la signalisation TGF- $\beta$  de deux façons distinctes. Elles peuvent en effet se fixer au récepteur de type I activé, empêchant ainsi le recrutement et l'activation des protéines SMAD «inductibles» (Figure 40B). Elles sont également susceptibles de s'associer, de façon compétitive avec SMAD-4 ou encore avec les protéines SMAD activées, ce qui donne lieu à un complexe SMAD inactif (Figure 40C).



**Figure 40 :** Représentation schématique de la voie de signalisation induite par le TGF- $\beta$ .

Repris et modifié d'après (Vignais, 1999).

*In vitro*, les kératinocytes expriment SMAD-1, -2, -3, -4 et 7. L'addition de 10 ng/ml de TGF- $\beta$  augmente nettement l'expression de SMAD-7 dès une heure de traitement, ce qui suggère que SMAD 7 est impliquée dans le mécanisme de rétroaction négative de la voie de signalisation de TGF- $\beta$  dans les kératinocytes. D'autres expérimentations ont rapporté que les kératinocytes synthétisent et sécrètent TGF- $\beta$ 1 et TGF- $\beta$ 2, alors que TGF- $\beta$ 3 ne semble pas être un facteur majeur dans les kératinocytes humains (Hashimoto, 2000). Il a été proposé que la forme active de la vitamine D<sub>3</sub> serait impliquée dans l'induction de la synthèse de TGF- $\beta$ . En effet, l'ajout de 1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> augmente l'expression de TGF- $\beta$ 2 d'un facteur compris entre 4 et 5 (Haugen *et al*, 1996). En revanche, l'expression de TGF- $\beta$ 1 et TGF- $\beta$ 3 n'est pas augmentée. Toutes ces données suggèrent que les TGF- $\beta$ s intrinsèques régulent d'une façon autonome la croissance des kératinocytes humains (Hashimoto, 2000).

## V. Les PPARs

Les PPARs (*peroxysome proliferator-activated receptor*) appartiennent à la superfamille des récepteurs nucléaires. Trois isoformes génétiquement et fonctionnellement distinctes ont été décrites : PPAR $\alpha$  (NR1C1), PPAR $\beta/\delta$  (nommé également NR1C2, FAAR [*fatty acid activated receptor*], ou NUC1 [*nuclease abnormal-1*]) et PPAR $\gamma$  (NR1C3). Les trois isoformes possèdent des patterns de distribution tissulaire bien distincts. Elles diffèrent également au niveau de leur domaine

de liaison à leur ligand, et sont impliquées dans plusieurs voies physiologiques distinctes mais souvent complémentaires. Chaque isoforme est codée par un gène différent.

Les PPARs sont des facteurs de transcription ligand-dépendants. Chaque PPAR s'hétérodimérise avec le récepteur RXR, formant ainsi un complexe qui est ensuite transloqué du cytoplasme vers le noyau afin de réguler l'expression génique de gènes cibles. La conformation des PPARs est altérée et / ou stabilisée par la fixation d'agonistes, ce qui entraîne ensuite le recrutement de coactivateurs transcriptionnels. Le complexe hétérodimérique forme le facteur de transcription fonctionnel qui peut se fixer à une séquence d'ADN caractéristique nommé PPRE (*peroxysome proliferator responsive element*). Les PPREs sont des répétitions directes formées de deux hexanucléotides AGGTCA séparés d'un ou deux nucléotides. Ces séquences sont souvent localisées dans la région promotrice des gènes cibles comme c'est le cas pour ACOX (*acyl-CoA oxidase*) (Varanasi *et al*, 1996), bien que certains gènes, comme ACBP (*acyl-CoA-binding protein*), ont un PPRE localisé dans un intron (Helledie *et al*, 2002).

Les PPARs sont exprimés de façon prédominante dans les tissus ayant un métabolisme lipidique important. Les trois isoformes ont été détectées au niveau de l'épiderme humain. Dans des kératinocytes humains en culture, le sous-type PPAR $\beta/\delta$ , en comparaison avec PPAR $\alpha$  et PPAR $\gamma$ , est l'isoforme la plus exprimée (Westergaard *et al*, 2001). D'autres études rapportent que PPAR $\beta/\delta$  semble jouer un rôle important dans la différenciation de cellules épithéliales (Matsuura *et al*, 1999). L'activité pro-différenciante de PPAR $\beta/\delta$  a été suggérée suite à des expérimentations utilisant des agonistes non sélectifs des PPARs tels que l'acide tétradécylthioacétique ou encore un ligand spécifique de PPAR $\beta/\delta$  : le L165041 (Westergaard *et al*, 2001). Cette même étude rapporte également que l'utilisation de ligands des isoformes PPAR $\alpha$  et PPAR $\gamma$  a un effet négligeable sur la différenciation kératinocytaire, bien qu'il ait été par ailleurs démontré qu'un traitement sur des kératinocytes en culture avec du clofibrate, un ligand potentiel de PPAR $\alpha$ , ou encore avec des doses physiologiques d'acides gras, tels que les acides oléique, linoléique ou encore eicosatétraénoïque, également connus pour être des ligands de PPAR $\alpha$ , induisent l'expression de l'involucrine et de la transglutaminase, essentielles pour la formation de la couche cornée (Hanley *et al*, 1998).

Comme il a été évoqué précédemment, l'administration d'acide tétradécylthioacétique et / ou de L165041, ligands de PPAR $\beta/\delta$ , entraîne la surexpression des marqueurs de différenciation que sont l'involucrine et la transglutaminase, mais également une très forte diminution de la prolifération kératinocytaire. De plus, l'activation *in vitro* de PPAR $\beta/\delta$  induit l'expression génique d'ADRP (*adipose differentiation-related protein*) et de FIAF (*fasting induced adipose factor*) (Schmuth *et al*, 2004). Le gène ADRP code pour une protéine qui facilite le transport des acides gras à longue

chaîne. Son expression est induite pendant la différenciation adipocytaire, mais aussi dans d'autres tissus pour lesquels il existe un métabolisme des triglycérides et des acides gras. Le rôle biologique de FIAF est encore mal défini. Cependant, il semble impliqué dans le catabolisme lipidique, en inhibant la lipoprotéine lipase (LPL), une enzyme qui catalyse le clivage d'une lipoprotéine en une partie protéique et une partie lipidique.

Un traitement topique avec du TPA (*12-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate*), molécule connue pour induire la différenciation kératinocytaire (Fuchs, 1990), entraîne une hyperplasie épidermique sur des souris déficientes en PPAR $\beta/\delta$ . Cela suggère qu'*in vivo*, la prolifération et / ou la différenciation kératinocytaire est modulée en fonction du niveau d'expression de PPAR $\beta/\delta$  (Peters *et al*, 2000). Lors de la différenciation de kératinocytes humains effectuée *ex vivo*, le taux d'expression de PPAR $\beta/\delta$  reste important, alors que l'expression de PPAR $\alpha$  et PPAR $\gamma$  augmente de manière significative (Rivier *et al*, 1998 ; Matsuura *et al*, 1999 ; Westergaard *et al*, 2001). D'autre part, l'addition simultanée de L165041, le ligand PPAR $\beta/\delta$ -sélectif, et de BRL49653, un ligand PPAR $\gamma$ -sélectif, provoque une forte induction d'involucrine (Westergaard *et al*, 2001), ce qui signifie un effet synergique de PPAR $\beta/\delta$  et PPAR $\gamma$  sur la différenciation de kératinocytes humains (Wahli, 2002).

Des expérimentations à partir d'un modèle de peau reconstruite ont permis de mettre en évidence que les activateurs de PPAR $\alpha$  influent sur le métabolisme lipidique et activent également la synthèse des kératinosomes. Ces derniers qui sont ensuite sécrétés dans l'espace extracellulaire sont à l'origine des composants structuraux de la barrière épidermique (Rivier *et al*, 2000). Quant à PPAR $\gamma$ , une augmentation graduelle de la couche basale vers la couche granuleuse a été observée, de même que ses ligands spécifiques induisent l'expression de gènes impliqués dans le processus de différenciation épidermique (Westergaard *et al*, 2001).



## **La différenciation kératinocytaire *in vitro***

L'épiderme se régénère continuellement et présente une organisation pluristratifiée où chaque couche représente un stade de différenciation : cette organisation peut être un très bon modèle d'homéostasie tissulaire et d'étude de la différenciation. Un autre avantage majeur réside dans le fait qu'il soit possible de reproduire *in vitro*, du moins en partie, ce processus complexe. En effet, *in vivo*, l'épiderme est un tissu complexe dans lequel plusieurs types cellulaires coexistent. Au niveau de la couche basale, les kératinocytes sont influencés par leur ancrage à la jonction dermo-épidermique. D'une manière plus générale, les kératinocytes sont également soumis à l'influence des autres types cellulaires épidermiques, ainsi qu'à l'influence des cellules dermiques. Cette complexité du tissu épidermique rend difficile l'étude d'un phénomène précis ou encore l'effet d'un facteur particulier sur le phénotype des kératinocytes *in vivo*.

### **I. Les modèles de culture primaire de kératinocytes**

Dans les années 1970, la mise au point de la culture de kératinocytes a permis de faciliter l'étude de la différenciation épidermique ainsi que ses mécanismes de régulation. Idéalement, un modèle de culture primaire de kératinocytes doit permettre de maintenir leur prolifération, mais également d'induire leur différenciation, afin de mieux cibler l'étude d'étapes précises de ce processus ou de l'effet éventuel de facteurs exogènes.

#### **I.1. Le modèle de culture de Rheinwald et Green**

Les premières cultures de kératinocytes ont été mises au point par Rheinwald et Green en 1975 (Rheinwald and Green, 1975). La culture s'effectue à partir d'une biopsie de peau saine. Les cellules basales de l'épiderme capables de proliférer, sont isolées par un traitement enzymatique à la trypsine. Dans ce premier modèle, la culture de kératinocytes est effectuée sur une couche nourricière de fibroblastes murins 3T3 préalablement irradiés. Cela permet de stopper la multiplication des fibroblastes sans altérer leur potentiel sécrétoire. Il est également possible d'inhiber la multiplication des fibroblastes par la mitomycine C. Les fibroblastes fournissent des facteurs de croissance nécessaires à la prolifération des kératinocytes. D'autres facteurs de croissance sont apportés *via* le milieu de culture, qui contient 10% de sérum de veau fœtal (SVF), ainsi que divers facteurs comme l'insuline, la toxine cholérique, le facteur de croissance épidermique (*epidermal growth factor*, EGF) ou l'hydrocortisone. Une fois mis en culture, les kératinocytes vont adhérer à leur support. Rheinwald et Green ont calculé un indice de la capacité

d'adhésion des kératinocytes appelé « *plating efficiency* » correspondant au nombre de cellules adhérentes au support pour 100 cellules ensemencées (ce chiffre étant compris entre 0,1 et 1 cellule adhérente pour 100 cellules ensemencées). Cet indice est un témoin de la quantité de kératinocytes à l'état de cellules souches épidermiques présentes dans l'épiderme de culture car ce sont celles-ci qui vont adhérer et se diviser en culture. Les kératinocytes ayant adhéré vont ensuite se diviser pour former des colonies puis proliférer jusqu'à la constitution d'une monocouche cellulaire. Après la confluence, la stratification débute. Ce modèle, permettant la génération d'un feuillet stratifié de kératinocytes, a été appliqué au traitement des grands brûlés à partir de 1981. Cependant, il est impossible de contrôler la composition exacte du milieu étant donné la présence des fibroblastes nourriciers et de SVF. De plus, il est important de noter que si le potentiel de division des kératinocytes est peu modifié, leur différenciation par cette méthode de culture est altérée ou partielle. Bien que ce modèle ait néanmoins permis l'étude de certaines phases de la différenciation épidermique, ses caractéristiques le rendent peu approprié à l'étude des mécanismes régulateurs de la différenciation, en particulier lorsqu'il s'agit d'analyser l'implication de facteurs solubles sur ce processus.

## **I.2. Le modèle de culture de Boyce et Ham**

A la suite des découvertes portant sur le rôle du calcium extracellulaire pour induire la différenciation de kératinocytes murins *in vitro* (Hennings *et al*, 1980), des études ont montré que des kératinocytes humains en culture peuvent proliférer en étant cultivés dans un milieu contenant une faible concentration en calcium (0,1 mM), sans fibroblastes nourriciers ni ajout de SVF (Boyce and Ham, 1983). Dans ce modèle, la capacité mitotique des kératinocytes reste néanmoins sous la dépendance d'extrait pituitaire bovin, ainsi que de facteurs de croissance tels que l'insuline ou encore l'EGF. Malgré l'absence de SVF, l'ajout d'extrait pituitaire bovin entraîne un paramètre non contrôlé dans la composition du milieu de culture. Boyce et Ham ont également mis en évidence que l'augmentation de la concentration en calcium du milieu de culture (1 mM) entraînait une très nette diminution de la prolifération ainsi que l'induction de la différenciation, suggérée par la stratification des cellules et la formation d'enveloppes cornées.

## **I.3. Le modèle de culture en condition autocrine**

Dans ce modèle, des chercheurs ont démontré que des kératinocytes normaux humains cultivés dans un milieu dépourvu de facteurs de croissance exogènes pouvaient proliférer à condition que la densité cellulaire soit supérieure à 5000 cellules par cm<sup>2</sup> (Cook *et al*, 1991b).

Néanmoins, l'ajout de facteurs de croissance exogènes, tels que l'insuline, l'EGF ou encore l'extrait pituitaire bovin, reste nécessaire afin d'initier la prolifération des kératinocytes. La même équipe a ensuite démontré que la prolifération des cellules était due à la stimulation autocrine du récepteur de l'EGF (Pittelkow *et al*, 1993). En effet, dans ces conditions, il a été observé que le milieu de culture contient un facteur de croissance sécrété par les kératinocytes et régulé par l'héparine sulfate : l'amphiréguline, membre de la famille de l'EGF (Cook *et al*, 1991a), capable de lier et d'activer le récepteur de l'EGF, nécessaire à la croissance clonale des kératinocytes.

#### **I.4. Le modèle de culture avec une interface air-liquide**

*In vivo*, les cellules épidermiques interfolliculaires sont en contact permanent avec l'air ambiant. Afin de reproduire plus finement les conditions physiologiques d'exposition à l'atmosphère, des chercheurs ont mis au point un système permettant la culture de kératinocytes primaires au niveau d'une interface air-liquide. Bien que plusieurs méthodes peuvent s'appliquer à la culture en interface air-liquide, elles nécessitent systématiquement la présence d'un support matriciel, tel qu'un gel de collagène, un derme dé-épidermisé, un substrat (ou un équivalent) dermique (Prunieras *et al*, 1983). Apparemment, l'interface avec l'air stimule la synthèse de la profilaggrine dans les kératinocytes, et donc l'apparition des grains de kératohyaline, spécifique des kératinocytes de la couche granuleuse. Ce modèle de culture semble donc être le plus performant en ce qui concerne la différenciation terminale. Cependant, des études révéleront que ce modèle nécessite la présence de vitamine C afin d'améliorer le profil lipidique ainsi que la fonction barrière de la couche cornée (Ponec *et al*, 1997). A défaut d'utiliser un substrat organique, il a été montré que des cultures primaires de kératinocytes pouvaient également atteindre une différenciation terminale sur un support inerte tel que des filtres poreux en acétate de cellulose ou en polycarbonate (Rosdy and Clauss, 1990). En effet, ces filtres fournissent un support solide sur lequel les kératinocytes s'ancrent afin de former les couches épidermiques typiques. Ces dernières peuvent alors être facilement exposées au niveau de l'interface air-liquide quand le milieu de culture est seulement présent dans le compartiment prévu à cet effet, sous le filtre.

## **II. La lignée cellulaire HaCaT**

Afin d'étudier et de comprendre les mécanismes impliqués dans le contrôle des processus physiologiques kératinocytaires, la culture primaire de kératinocytes normaux humains s'avère être un système expérimental idéal, malgré certaines limites. Comme nous l'avons décrit précédemment,

elle présente une certaine complexité quant au choix du modèle de culture et des conditions requises. De plus, la recherche ainsi que la variabilité des donneurs, la durée de vie courte symbolisée par un faible nombre de passages des kératinocytes en culture, mais aussi le taux de croissance faible de ces cellules constituent les principaux inconvénients des cultures primaires de kératinocytes.

L'utilisation d'une lignée cellulaire, telle que les cellules HaCaT, permet de s'affranchir des limites engendrées par les primocultures. La lignée cellulaire HaCaT résulte de l'immortalisation spontanée de kératinocytes normaux humains.

## **II.1. Processus d'immortalisation conduisant à l'établissement de la lignée HaCaT**

Historiquement et dans le but de générer de façon reproductible une lignée cellulaire, les premières transformations de kératinocytes humains ont été effectuées par infection de cellules avec le virus simiesque 40 (SV40), ainsi que par transfection de kératinocytes avec l'ADN du virus SV40 (Steinberg and Defendi, 1979 ; Banks-Schlegel and Howley, 1983 ; Brown and Parkinson, 1984). Ces expériences ont permis de générer des lignées cellulaires de kératinocytes potentiellement immortelles et non tumorigéniques, c'est-à-dire qui ne forment pas de tumeurs lorsqu'elles sont injectées sous la peau d'un animal. Mais les études sur ces lignées transformées ont démontré des altérations au niveau de leurs propriétés prolifératives et de kératinisation (Steinberg and Defendi, 1983 ; Banks-Schlegel and Howley, 1983). Ces résultats, tout comme ceux obtenus sur des lignées cellulaires provenant de carcinomes humains (Rheinwald and Beckett, 1980 ; Boukamp *et al*, 1985) ont conduit à penser que la déficience du processus de différenciation dans ces lignées était invariablement associée avec la transformation et / ou avec la malignité de ces cellules.

Pour générer la lignée HaCaT, l'équipe du Professeur Fusenig s'est appuyée sur ses travaux antérieurs concernant la transformation spontanée de kératinocytes de souris (Fusenig *et al*, 1985 ; Breitkreutz *et al*, 1986 ; Bohnert *et al*, 1986). A l'origine, l'échantillon de peau ayant permis de créer cette lignée provenait d'une excision chirurgicale effectuée sur un homme de 62 ans. Après isolement, les kératinocytes ont été cultivés dans un milieu contenant une faible concentration en calcium (0,2 mM) et à température élevée (38,5°C). Au bout de 5 mois de culture, le réensemencement des cellules « proliférantes » après décollement « classique » (EDTA / trypsine) fut un échec, contrairement aux cellules détachées de leur support de culture par « pipetage vigoureux ». Ces dernières, firent l'objet du premier passage des cellules HaCaT. En effet, les kératinocytes issus de cette première sous-culture atteignirent un état de confluence au bout de 4 à 6

semaines. Après trypsinisation, la forte densité cellulaire de réensemencement (facteur 1/2) fut essentielle pour la continuité de la prolifération cellulaire. Enfin, au bout du quatrième passage, la densité d'ensemencement ne fut plus critique pour maintenir une prolifération cellulaire satisfaisante. La lignée cellulaire résultante de cette longue période de culture fut nommée HaCaT en référence à son origine de kératinocytes humains adultes cultivés avec une faible concentration en calcium et à température élevée (Boukamp *et al*, 1988).

## II.2. Les causes de l'immortalisation spontanée

Bien que le mécanisme exact de l'immortalisation spontanée n'ait pas été précisément élucidé, plusieurs évidences sembleraient montrer qu'elle serait due à des altérations génétiques, dont la perte de gènes de sénescence. En effet, il a été observé une perte de copies du bras court du chromosome 3 (Chr 3p) après une culture à long terme de 300 générations, suggérant que ce bras court 3p hébergerait un ou plusieurs gènes de sénescence et que sa perte constituerait un événement majeur dans l'immortalisation des cellules HaCaT (Boukamp *et al*, 1997).

Une autre hypothèse concernant l'immortalisation spontanée des cellules HaCaT implique le gène p53, dont le produit est familièrement appelé le « gardien du génome ». En effet, les mécanismes régulant les réparations de l'ADN lorsque celui-ci est endommagé sont en grande partie contrôlés par p53. Des mutations du gène p53 se retrouvent dans un très grand nombre de tumeurs de la peau de type carcinomes dont le principal facteur de développement reste l'exposition au soleil. Les mutations les plus fréquemment observées sont des transitions cytosine-thymine (C→T), incluant environ 10% de double mutations (CC→TT), caractéristique des mutations UV-induites sur l'ADN. De plus, des travaux démontrant une immortalisation cellulaire après transfection avec un gène p53 muté ont appuyé l'hypothèse d'une mutation de p53 dans l'immortalisation spontanée des cellules HaCaT, qui, effectivement, présentent des mutations de p53, localisées sur le codon 179 (C→T) ainsi que sur les codons 281 et 282 (CC→TT) (Lehman *et al*, 1993). Etant donné que ces mutations sont typiquement UV-induites et que l'échantillon de peau à l'origine des cellules HaCaT est issu d'une zone corporelle exposée au soleil, les mutations observées sur p53 sont probablement issues directement du donneur et non des conditions de culture (Fusenig and Boukamp, 1998). Néanmoins, ces seules mutations sont insuffisantes à la mise en place de l'immortalisation des cellules HaCaT. En effet, la seule transfection de kératinocytes primaires avec un mutant de p53 ne permet pas l'induction de cette immortalité (Fusenig and Boukamp, 1998).

Un autre mécanisme a également été proposé pour justifier l'immortalisation des cellules HaCaT et concerne l'activité télomérase de ces cellules. Par définition, un télomère est une région d'ADN non codante située à l'extrémité d'un chromosome. En quelque sorte, les télomères constituent l'horloge biologique de la cellule. Généralement, au bout de plusieurs divisions, les cellules qui entrent en sénescence présentent un raccourcissement continu de leur séquence télomérique, alors que les cellules qui échappent au phénomène de sénescence conservent une longueur télomérique stable. Cela est généralement associé avec l'expression de la télomérase, une reverse transcriptase spécifique qui permet le maintien de la longueur télomérique. Dès le deuxième passage, l'activité télomérase des cellules HaCaT est significativement augmentée (Fusenig and Boukamp, 1998), ce qui suggère que sa surexpression aurait contribué au processus d'immortalisation.

Boukamp et Fusenig, considérés comme les « parents » de la lignée HaCaT, soutiennent de façon hypothétique que l'immortalisation spontanée de la lignée HaCaT serait en fait la somme de ces trois principales altérations génétiques : perte des gènes de sénescence, mutations sur p53 et inactivation des télomères. Les intérêts d'une telle lignée sont multiples. En effet, malgré l'immortalisation, elle conserve la capacité à reconstituer un tissu épidermique après transplantation sur une souris nude (Boukamp *et al*, 1988) ce qui rend possible son utilisation pour l'étude de la différenciation kératinocytaire. D'autre part, des expérimentations de transfections avec l'oncogène *ras* ont permis d'établir la lignée tumorigénique HaCaT-*ras* (Boukamp *et al*, 1990), considérée comme un modèle de carcinogenèse de kératinocytes humains (Fusenig and Boukamp, 1998), conférant également l'utilisation des cellules HaCaT comme modèle de lignée cancéreuse.

# MATERIELS ET METHODES

## I. Culture cellulaire

Toutes les cultures cellulaires sont effectuées en conditions stériles sous une hotte à flux laminaire (Flux France, France). Les cellules sont contrôlées quotidiennement par observation avec un microscope à contraste de phase (Nikon, France). Les différents supports de culture utilisés en fonction des expérimentations sont placés dans un incubateur thermostaté à 37°C ayant une atmosphère saturée en eau et contenant 5% de CO<sub>2</sub>.

### I.1. Milieu de culture et solutions utilisés

- Quelque soit le type cellulaire, les expérimentations sont effectuées avec un milieu spécifique pour la culture de kératinocytes : le « Keratinocyte Serum Free Medium » (KSFM, réf : 17005, GibcoBRL, Cergy-Pontoise, France). Il contient par défaut 0,09 mM de Ca<sup>2+</sup>. Ce milieu de culture est complété avec de l'extrait pituitaire bovin (*bovin pituitary extract*, BPE, réf : 13028, GibcoBRL) et du facteur de croissance épidermique recombinant (*recombinant epidermal growth factor*, rEGF, réf : 10450, GibcoBRL), à des concentrations finales de 25 µg/ml et 1,5 ng/ml respectivement. Le milieu est alors dit « complet ».

- Entre chaque renouvellement du milieu de culture ou avant d'être décollées de leur support, les cellules sont rincées avec une solution de PBS (*phosphate buffered saline*).

**Solution de PBS pH=7,4 :** 8 g NaCl ; 0,2 g KCl ; 1,44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ; 12H<sub>2</sub>O, 0,24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ; qsp 1L H<sub>2</sub>O.

- Afin de faciliter le décollement de leur support, les cellules sont mises en contact pendant deux minutes avec une solution de HBSS-EDTA.

**Solution de HBSS-EDTA :** Hank's Balanced Salt solution - Ethylene-diaminetetraacetic acid. 55 mg EDTA (Sigma Saint-Quentin Fallavier, France) dans 50 ml de milieu de culture HBSS (Gibco BRL).

- Pour procéder au comptage des cellules, une solution de bleu trypan est utilisée.

**Solution de bleu trypan :** 14 mg de bleu trypan (réf : T6146, Sigma) qsp 10 ml HBSS.

- Dans le but d'étudier l'effet du calcium sur la différenciation de kératinocytes normaux humains (KNHs) et sur la lignée HaCaT, une solution mère de 0,3 M est préparée dans de l'eau

stérile puis stockée à 4°C. Cette solution est utilisée pour augmenter la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  du milieu de culture de 0,09 mM à 1,2 mM.

**Solution  $\text{Ca}^{2+}$  0,3 M** : 441,06 mg  $\text{CaCl}_2$  (réf: C7902, Sigma) qsp 10 ml  $\text{H}_2\text{O}$ .

## **I.2. Les kératinocytes normaux humains**

Pour chacune de nos expériences, les peaux proviennent de chirurgie plastique, plus précisément de réductions mammaires d'individus sains.

Les prélèvements sont systématiquement manipulés avec des pinces de dissection et en conditions stériles. La peau est rincée plusieurs fois avec du PBS froid puis dans 2 bains d'éthanol froid à 75% pendant 30 secondes. Elle est ensuite lavée 10 fois pendant 10 minutes dans du PBS froid contenant 1% d'une solution antibiotique / antimycosique (réf : 15240-062, GibcoBRL), avant d'être étalée sur un support en liège recouvert de papier aluminium puis d'un champ stérile. A l'aide d'un coupe corps ou d'un scalpel, des lambeaux de peau (épiderme et un peu de derme) sont découpés puis déposés dans une boîte de Pétri contenant une solution de PBS-trypsine à 0,25% (réf : 15090-046, GibcoBRL) pendant 16 à 18 h à 4°C, l'épiderme étant orienté vers le dessus. L'action de la trypsine est alors stoppée en plongeant les lambeaux de peau dans une boîte de Pétri contenant du milieu de culture *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM, réf : 42430, GibcoBRL), complémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal (SVF, GibcoBRL). Le derme est alors séparé de l'épiderme avec des pinces à dissection. La face supérieure du derme est grattée afin de récupérer les kératinocytes de la couche basale restés accrochés. L'épiderme est également gratté afin de le disloquer. A l'aide d'une pipette, les cellules sont séparées par aspiration et refoulement. La suspension cellulaire résultante est récupérée dans un tube. Après agitation vigoureuse, les couches cornées flottent à la surface et sont écartées du milieu. La suspension cellulaire obtenue est filtrée sur un tamis de 70  $\mu\text{m}$  (réf : 352350, BD Falcon, BD Biosciences, Erembodegem, Belgique) puis centrifugée 10 minutes à 1400 rpm. Le culot cellulaire est repris dans du KSFM complet. Après une dilution appropriée au bleu trypan (Sigma), les cellules sont comptées sur un hémocytomètre de Malassez. Seules les cellules non colorées, viables, sont comptabilisées, les cellules bleues étant des cellules mortes à l'intérieur desquelles le colorant a diffusé. Les cellules sont ensuiteensemencées à une densité de  $5 \times 10^6$  cellules pour un flacon de culture de 75  $\text{cm}^2$ , et 13 ml de KSFM complet contenant 0,09 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  par défaut (*low calcium-KSFM*, LC-KSFM). Le milieu de culture est changé tous les trois jours. Les KNHs sont systématiquement cultivés en présence d'un cocktail d'agents antibiotiques spécifiques pour les cultures primaires : la primocin™ (réf : ant-pm-1, Invivogen, Toulouse, France), utilisée à une concentration finale de 100  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .



### **I.3. La lignée cellulaire HaCaT**

Les cellules HaCaT proviennent du laboratoire de biologie cellulaire de l'Institut de Recherche Pierre Fabre (Toulouse, Hôtel Dieu Saint Jacques).

En routine, la lignée cellulaire HaCaT est entretenue en flacons de culture de 75 cm<sup>2</sup>, dans 10 ml de milieu DMEM complété par 10% de SVF et par une solution de pénicilline / streptomycine (Pen Strep, réf : 15140, GibcoBRL, Cergy Pontoise, France), en concentration finale de 100 U/ml et 100 µg/ml respectivement. Avant d'être utilisées en expérimentation, les cellules HaCaT sont cultivées avec du milieu KSFM complet contenant également de la pénicilline et de la streptomycine à 100 U/ml et 100 µg/ml respectivement.

### **I.4. Entretien cellulaire et ensemencement**

Lorsque les cellules arrivent à 60-70% et 70-80% de confluence, respectivement pour les KNHs et les cellules HaCaT, les cellules sont détachées de leur support afin d'être de nouveau ensemencées. Pour cela, le tapis cellulaire est, dans un premier temps, « lavé » avec du PBS, puis les cellules sont recouvertes par 2 ml d'une solution de HBSS-EDTA pendant deux minutes, afin de favoriser leur décollement du support. L'EDTA est un chélateur d'ions divalents nécessaire à l'adhérence des cellules sur leur support (Ca<sup>2+</sup> et Mg<sup>2+</sup> principalement). Après avoir écarté le surnageant HBSS-EDTA, les cellules sont incubées pendant 3 à 4 minutes dans 2 ml d'une solution de PBS-trypsine à 0.25%. Après décollement des cellules, l'action de la trypsine est inhibée par ajout de DMEM (5 ml) utilisé en routine, contenant du SVF. Les cellules sont ensuite centrifugées (5 minutes à 1000 rpm) puis reprises dans un volume de milieu de culture pour être comptées sur un hémocytomètre de Malassez par le test d'exclusion au bleu trypan.

En entretien, les KNHs et les cellules HaCaT sont ensemencés à une densité de 10<sup>6</sup> cellules par flacon de 75 cm<sup>2</sup>.

Pour nos différentes expérimentations, les cellules sont ensemencées dans du LC-KSFM à une densité de 30000 cellules / cm<sup>2</sup>. Après 24h d'incubation, les cellules ont adhéré au support et le milieu de culture est changé. Les cellules sont alors incubées, soit dans du milieu LC-KSFM, soit dans du HC-KSFM (*high calcium-KSFM*), dans lequel la concentration extracellulaire en Ca<sup>2+</sup> est ajustée à 1,2 mM à partir de la solution mère à 0,3 M. Le milieu de culture est renouvelé tous les 3 jours et les prélèvements expérimentaux sont systématiquement effectués aux jours 1, 3, 6, 9 et 13.

Contrairement à la lignée cellulaire HaCaT, le nombre de passages des KNHs est limité : ces cellules ne peuvent donc pas être décollées de leur support et réensemencées un grand nombre de

fois. C'est pourquoi les expérimentations concernant les KNHs ont toujours été effectuées entre les passages 1 et 3.

## **II. Techniques pour l'étude de la prolifération cellulaire**

### **II.1. Comptage cellulaire par la technique du bleu trypan**

Après décollement de leur support, les cellules sont systématiquement comptées en utilisant la technique du bleu trypan. Les cellules mortes présentent une membrane perméable et vont donc être colorées en bleu, tandis que les cellules vivantes resteront réfringentes.

Pour cela, une dilution de la suspension cellulaire est effectuée avec une solution de bleu trypan (0,2% dans du PBS). Après homogénéisation, un prélèvement de la dilution (15  $\mu$ l) est compté sur un hémocytomètre de Malassez. Seules les cellules vivantes, non colorées, sont comptées.

### **II.2. Technique du MTT**

Afin d'évaluer l'activité proliférative des cellules cultivées avec (1,2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ) ou sans (0,09 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ) calcium, nous avons utilisé la technique colorimétrique du MTT (Mosmann, 1983). Ce test est basé sur l'activité des déshydrogénases mitochondriales des cellules vivantes à réduire le MTT (3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényl tétrazolium bromide), un sel de tétrazolium de couleur jaune, en cristaux de formazan violet. La quantité de formazan formée est directement proportionnelle au nombre de cellules vivantes et peut se mesurer en spectrophotométrie UV à 550 nm ( $\text{DO}_{550}$ ).

La solution de MTT (5 mg/ml) est préparée dans du milieu PBS, filtrée sous 0,2  $\mu$ m et conservée à 4°C pendant un mois à l'abri de la lumière.

Lors des études de prolifération, les cellules sontensemencées à une densité de 30000 cellules /  $\text{cm}^2$  dans du LC-KSFM en plaque de 96 puits pour un volume final de 100  $\mu$ l / puits. Au bout de 24 heures, le milieu de culture est changé comme décrit précédemment. Au terme de chaque temps d'incubation (1, 3, 6, 9, 13 jours) 10  $\mu$ l / puits de MTT sont ajoutés. Après 4 heures d'incubation à 37°C, 100  $\mu$ l d'une solution de SDS (*sodium dodecyl sulfate* 10% dans HCl 0,01 N) sont ajoutés afin de solubiliser les cristaux de formazan. Après 4 heures d'incubation à 37°C et agitation afin de compléter la solubilisation des cristaux de formazan, l'absorbance à 550 nm est mesurée avec un lecteur de plaque ELISA.

### III. Analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux (CMF)

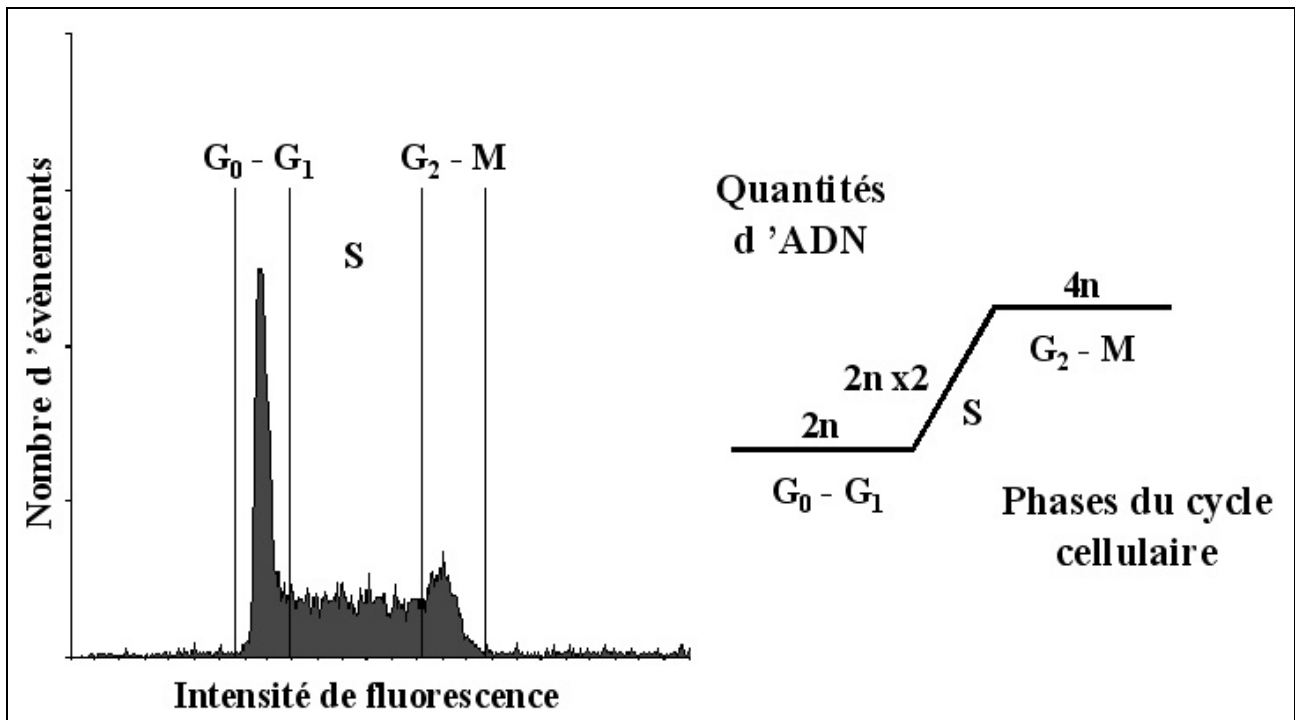
Cette technique a été utilisée afin de déterminer l'effet du  $\text{Ca}^{2+}$  sur la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire.

Les cellules sontensemencées et cultivées dans des boîtes de Pétri de 100 mm de diamètre. Après chaque période d'incubation (1, 3, 6, 9 et 13 jours) les cellules sont décollées de leur support. Chaque suspension cellulaire obtenue est comptée au bleu trypan, puis centrifugée 5 minutes à 1000 rpm. Le culot cellulaire est repris dans 3 ml de PBS froid puis à nouveau centrifugé dans les mêmes conditions. Enfin, le culot cellulaire est repris avec 300  $\mu\text{l}$  de PBS froid, auxquels sont rapidement rajoutés 700  $\mu\text{l}$  d'éthanol (EtOH, conservé à  $-20^\circ\text{C}$ ). L'éthanol permet de fixer les cellules mais également de perméabiliser les membranes plasmiques et nucléaires. Après cette étape, les échantillons peuvent être conservés à  $-20^\circ\text{C}$  pendant 1 mois.

Avant l'analyse en CMF et afin de marquer le contenu en ADN des cellules, les échantillons sont placés à température ambiante ( $T^\circ\text{A}$ ) pendant 10 minutes. Après centrifugation à 1000 rpm pendant 5 minutes, les cellules sont rincées deux fois au PBS. Le culot cellulaire est repris dans 1 ml de PBS auquel sont rajoutés 30  $\mu\text{l}$  d'une solution de RNase A\* afin d'éliminer l'ARN. Après une période d'incubation d'environ 30 minutes à  $T^\circ\text{A}$ , 50  $\mu\text{l}$  d'iodure de propidium (IP, Molecular Probes, Pays Bas) à 1 mg/ml sont ajoutés. L'IP est un intercalant de l'ADN qui fluoresce dans le rouge.

L'analyse par CMF est effectuée sur un analyseur-trieur Facs Vantage (Becton-Dickinson, San Jose, CA, USA) équipé d'un laser Argon à 488 nm et du logiciel Cell Quest (Becton-Dickinson). Pour chaque échantillon, une analyse conditionnelle est effectuée à l'aide d'un cytogramme FSC (*forward scatter*) versus SSC (*side scatter*) afin d'exclure les événements correspondants aux agrégats ou encore aux débris de petite taille. Au moins  $2 \times 10^4$  cellules sont analysées par le logiciel Cell Quest. La fluorescence rouge émise par l'IP est recueillie à l'aide d'un filtre « passe-haut » de 600 nm. La distribution cellulaire en fonction des différentes phases du cycle cellulaire est effectuée avec le logiciel ModFit LT™ (Verity Software House Inc., Topsham, ME, USA). Ce logiciel permet d'exclure les doublets cellulaires, ou les cellules accolées. En effet, il est primordial d'éliminer ces dernières lors de l'analyse car un doublet de cellules en phase G1 serait comptabilisé en phase G2 ou M, de part son contenu en ADN, ce qui fausserait l'interprétation des résultats. Classiquement, les résultats obtenus sont représentés par un cytogramme, comme indiqué sur la figure 41.

\* : **RNase A** : 25 mg (50 UI Kunitz, Roche Molecular, France) dans 2,5 ml de Tampon Tris (Tris 0,1 M ; NaCl 0,1 M ; pH = 7,6).



**Figure 41** : Représentation théorique de la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire en fonction de leur contenu en ADN.

#### **IV. Etude de l'expression génique par la technique de Rétrotranscription - Réaction de Polymérisation en Chaîne semi-quantitative en temps réel (RT-PCR)**

Cette technique a été utilisée dans le but d'analyser l'expression génique de marqueurs de différenciation ainsi que d'autres gènes à différents temps (1, 3, 6, 9 et 13 jours) après ajout / ou non de Ca<sup>2+</sup> extracellulaire, sur des KNHs, mais également sur la lignée HaCaT.

La technique de RT-PCR (*reverse transcription polymerase chain reaction*) en temps réel se divise en quatre grandes étapes :

1. L'extraction des ARN totaux.
2. Le dosage des ARN totaux.
3. La réverse transcription des ARN messagers (ARNm) en ADN complémentaires (ADNc).
4. La réaction de polymérisation en chaîne en temps réel.

## IV.1. Extraction des ARN totaux

Les cellules sont ensemencées à une densité de 30000 cellules / cm<sup>2</sup> en plaque de 24 puits et cultivées avec ou sans Ca<sup>2+</sup> aux différents temps d'incubation. Les ARN totaux sont extraits par purification sur colonne (RNeasy Mini kit, Qiagen, Hilden, Allemagne) dans les conditions d'utilisation recommandées par le fabricant.

Les cellules sont d'abord rincées au PBS puis lysées avec un tampon dénaturant (tampon *RLT*) contenant un inhibiteur de RNase (Guanidine Isothiocyanate) auquel est ajouté 1% de  $\beta$ -mercaptoéthanol (Sigma). Un volume d'éthanol à 70% est ensuite ajouté au lysat cellulaire pour atteindre les conditions optimales de fixation de l'ARN total à la membrane de silice de la colonne. Cette dernière est placée sur un tube collecteur, le mélange est déposé sur la colonne, une centrifugation de 15 secondes à 10000 g est effectuée et l'éluat est écarté. Les contaminants sont ensuite éliminés par plusieurs lavages de la colonne. Un premier lavage est réalisé (tampon *RWI*) sur la colonne. Une centrifugation de 15 secondes à 10000 g est effectuée et l'éluat est écarté. L'ADN génomique restant est éliminé grâce à un traitement de 15 minutes à la DNase (Qiagen). Après un deuxième lavage (tampon *RWI*), la colonne est rincée (tampon *RPE*). Les ARN totaux sont élués par ajout d'eau *RNase-Free*, puis stockés à -80°C.

## IV.2. Analyse et dosage des ARN totaux

Le dosage des ARN totaux est effectué sur un Bioanalyser 2100 (Agilent technologies, Waldbronn, Allemagne), à l'aide du kit « RNA 6000 Nano LabChip ». Pour le dosage est utilisée une puce sur laquelle douze échantillons peuvent être déposés. Cette technique permet de quantifier les ARN, mais aussi de contrôler leur degré de pureté par rapport à la présence d'ADN génomique dans les échantillons. La visualisation des ARN 18S et 28S ainsi que le ratio Quantité d'ARN 28S / Quantité d'ARN 18S, permettent de vérifier que l'ARN n'est pas dégradé. Les ARN sont séparés dans la puce par électrophorèse au sein de capillaires et visualisés grâce à un agent intercalant fluorescent (*RNA Nano Dye*). Comme pour une électrophorèse classique, cette méthode nécessite un mélange d'étalonnage : le « *RNA 6000 Ladder* » (Ambion, Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Cette solution contient six fragments d'ARN allant de 0,2 à 6 kb à une concentration de 150 ng / $\mu$ l. La concentration en ARN des échantillons est déterminée par comparaison avec ce marqueur de taille. Avant d'être déposés sur la puce, les échantillons ainsi que le marqueur de taille sont dénaturés à 70°C pendant 2 minutes.

### IV.3. Rétro-transcription des ARNm

Les ARNm sont ensuite rétro-transcrits en ADNc (Reverse Transcription system, Promega, Madison, WI, USA). La réaction s'effectue dans un volume final de 20  $\mu$ l et sur une quantité d'1  $\mu$ g d'ARN pour tous les échantillons. Les échantillons d'ARN sont dénaturés 10 minutes à 70°C puis stockés dans de la glace avant l'ajout du mélange réactionnel\*. L'élongation est ensuite effectuée avec un thermocycleur (60 minutes à 42°C). La Réverse Transcriptase est inactivée par élévation de la température (5 minutes à 95°C). Les ADNc sont ensuite stockés à -20°C.

**\* : Mélange réactionnel :** tampon de réaction (50 mM Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM spermidine, 10 mM DTT), 1 mM dNTP, 1 U/ $\mu$ l d'inhibiteur de ribonucléases RNasin<sup>®</sup>, 0,75 U/ $\mu$ l d'«AMV Reverse Transcriptase », 25 ng/ $\mu$ l d'Olido(dT)<sub>15</sub>.

### IV.4. PCR semi-quantitative en temps réel

La réaction d'amplification d'une séquence d'ADN cible suit les mêmes étapes qu'en PCR classique c'est-à-dire dénaturation, hybridation, élongation. A la différence d'une PCR classique, la PCR en temps réel utilise une sonde fluorescente qui permet la quantification et la caractérisation de l'amplicon formé en temps réel. Cette technique permet de faire une quantification relative de l'expression de gènes d'intérêts dans des échantillons donnés, par rapport à un gène de référence dont l'expression ne varie pas en fonction des conditions.

La PCR en temps réel permet donc de suivre en direct la production d'amplicons (produit de PCR) d'ADNc en fonction du nombre de cycles de PCR effectués, de façon à définir la phase exponentielle d'amplification de l'ADN, période pendant laquelle le nombre de molécules amplifiées est proportionnel au nombre de molécules cibles de la matrice. Le principe de la quantification repose sur le fait que le nombre de copies de la séquence est directement lié à la quantité initiale, au nombre de cycles et au rendement de la PCR. Dans notre cas, nous avons effectué une quantification relative, c'est-à-dire que nous avons étudié le facteur d'expression au cours du temps (jours 1, 3, 6, 9 et 13), d'un gène d'intérêt, entre des cellules traitées (HC-KSFM) et / ou non traitées (LC-KSFM) avec du Ca<sup>2+</sup>. Les cellules contrôles correspondent aux cellules cultivées en LC-KSFM au jour 1.

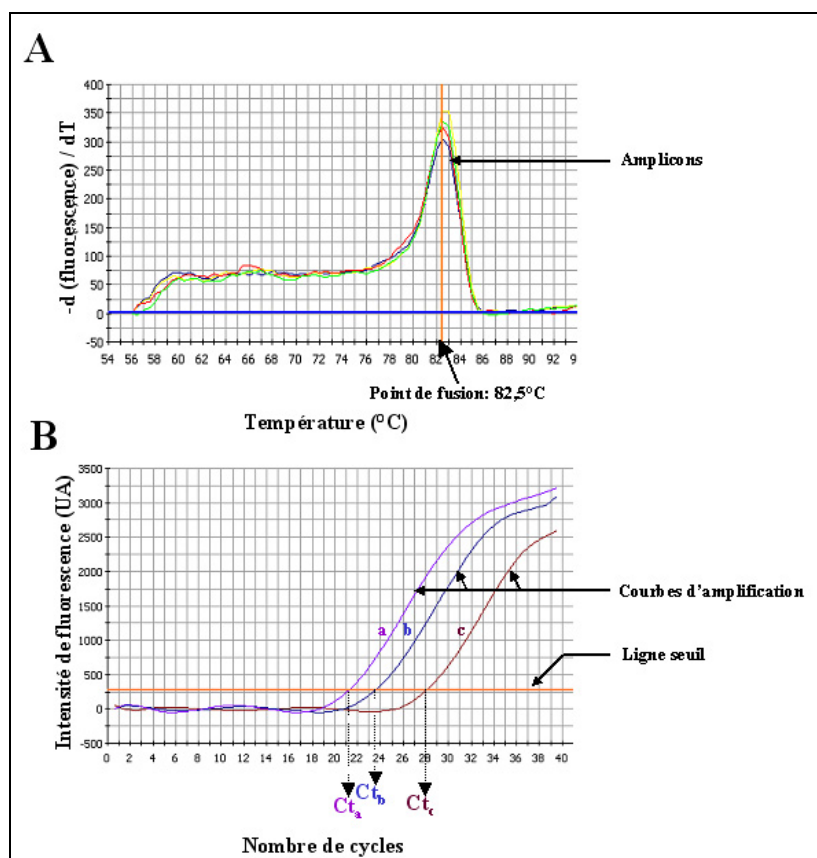
Les ADNc relatifs aux gènes d'intérêts et aux gènes de références sont amplifiés de manière sélective et indépendante par l'intermédiaire d'un couple d'amorces spécifiques. Celles-ci ont été définies avec le logiciel Beacon Designer 2 (PREMIER Biosoft International, Palo Alto, CA, USA) et leur efficacité a été préalablement testée. Les réactions d'amplification sont effectuées sur 5  $\mu$ l d'ADNc dilués au 1/40<sup>ème</sup>, auxquels sont ajoutés 20  $\mu$ l de mélange réactionnel\*\*. Un témoin

contenant de l'eau à la place des ADNc est systématiquement effectué pour s'assurer que le mélange de PCR ne soit pas contaminé. Ce témoin permet également de vérifier, *via* la courbe de fusion, que les amorces ne s'hybrident pas entre elles (Figure 42).

**\*\* : Mélange réactionnel :** 300 nM d'amorces sens et antisens, 12,5 µl « SYBR Green Super Mix » (iQ™ SYBR® Green Supermix, Bio-Rad) qsp 20 µl H<sub>2</sub>O.

Les cycles de PCR sont réalisés avec un thermocycleur iCycler™ iQ (Biorad, Hercules, CA, USA) selon les conditions de réaction suivantes : 3 minutes de dénaturation à 95°C, 40 cycles de dénaturation / hybridation - élongation (15 secondes à 95°C suivi de 30 secondes à 60°C) puis 90 secondes de dénaturation à 95°C. Enfin, la courbe de fusion des amplicons néo-synthétisés est déterminée par une chute graduelle de la température allant de 95°C à 55°C par palier de 0,5°C toutes les 10 secondes (Figure 42A).

Le suivi de l'amplification des ADNc de départ est possible grâce à l'utilisation d'un agent intercalant fluorescent de l'ADN double brin : le « SYBR Green » (iQ™ SYBR® Green Supermix, Bio-Rad). L'augmentation de la fluorescence au cours du temps est donc enregistrée en temps réel et un profil d'amplification est obtenu pour chaque échantillon sous la forme d'un graphique où l'on retrouve l'intensité de fluorescence en fonction du nombre de cycles de PCR qui ont été effectués (Figure 42B).



**Figure 42 :** Courbes de fusion et d'amplification d'une PCR en temps réel.

(A) La courbe de fusion en PCR en temps réel est une étape programmée supplémentaire qui s'effectue à la fin des cycles d'amplification et qui sert de contrôle. Le thermocycleur passe de 95°C à 55°C par palier de 0,5°C toutes les 10 secondes. L'acquisition de l'intensité de fluorescence en continu permet de vérifier qu'il n'y a qu'un seul produit de PCR amplifié. Le point de fusion doit être le même pour tous les échantillons et le pic doit correspondre au  $T_m$  (température de fusion) de l'amplicon. Le témoin dans lequel l'ADNc est remplacé par de l'eau permet de vérifier que les amorces ne s'hybrident pas entre elles. (B) Les courbes d'amplifications (ici a, b et c) correspondent à l'augmentation de la fluorescence en fonction du nombre de cycles. La ligne seuil permet de fixer le  $C_t$  (*cycle threshold* ou cycle seuil), dont la valeur est proportionnelle au nombre de copies initiales d'ADNc cible et donc d'ARNm.

Parmi les amorces choisies (Tableau 7), une analyse BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*, NCBI, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) a été systématiquement effectuée et a permis de mettre en évidence qu'aucun couple d'amorces ne présente une hybridation avec d'autres gènes. Les résultats obtenus pour les différents gènes d'intérêts (**gi**) vont être normalisés par l'étude de trois gènes de référence (*housekeeping gene*, **hg**), dont la quantification a été réalisée en parallèle, via l'utilisation du logiciel GeNorm (Vandesompele *et al*, 2002).



Gènes	Amorces		Positions	Tailles Amplicons	N° d'accension GenBank
Kératine 1	S	5'ATTTCTGAGCTGAATCGTGTGATC3'	1233-1256	131 pb	BC063697
	AS	5'CTTGGCATCCTTGAGGGCATT3'	1364-1344		
Kératine 5	S	5'ATGGCAGTGGCAGTGGCTAT3'	1668-1687	80 pb	NM_000424
	AS	5'GCTACCTCCGGCAAGACCTC3'	1747-1729		
Kératine 10	S	5'TGATGTGAATGTGGAAATGAATGC3'	910-933	146 pb	NM_000421
	AS	5'GTAGTCAGTTCCTTGCTCTTTCA3'	1056-1033		
Involucrine	S	5'GCCAGGTCCAAGACATTCAAC3'	1668-1688	115 pb	BC046391
	AS	5'GGGTGGTTATTTATGTTTGGGTGG3'	1783-1760		
Filaggrine	S	5'GCAAGGTCAAGTCCAGGAGAA3'	4426-4446	122 pb	NM_002016
	AS	5'CCCTCGGTTTCCACTGTCTC 3'	4548-4529		
TG-1	S	5'CTGATGGTCTCTGTGATGCTGAT3'	658-680	128 pb	X57974
	AS	5'CACTTCCTTCTTGGTCTCCTTGA3'	786-764		
p21	S	5'CCCTCTGCTGCTGTCCCTC3'	1389-1407	138 pb	NM_000389
	AS	5'GGTGCCCTTCTTCTTGTGTGTC3'	1526-1505		
ABCD1	S	5'GGTGGCGAGAAGCAGAGAATC3'	2205-225	155 pb	NM_000033
	AS	5'GTGATGGAGAGCAGGGCAATG3'	2359-2329		
ABCG1	S	5'AACTGCCCAACCTACCACAAC3'	1010-1030	101 pb	NM_207629
	AS	5'CCCTCCCGAACCGCTCTC3'	1110-1093		
FATP4	S	5'ATGACGGTGGTATTCCGGAAG3'	1200-1220	109 pb	NM_005094
	AS	5'GGAGGTAGCGGCACAGTTCA3'	1308-1289		
DEGS2	S	5'CTACGCCGCCTCCTTCAAG3'	392-410	139 pb	NM_206918
	AS	5'CAGCACCAGCCAGAGCAG3'	530-513		
FIAF	S	5'CCAGCAACTTCCACAAGGT3'	543-563	145 pb	NM_139314
	AS	5'CCTCTTTCTTCGGGCAGGCT3'	687-668		
ADRP	S	5'CTCAACTGGCTGGTAGGTCC3'	1371-1390	135 pb	NM_001122
	AS	5'ATAGGGGCAGGTTTAATGAGTTTT3'	1505-1482		
PPAR $\alpha$	S	5'AGAAGACGCTGGTGGCCAAG3'	1018-1037	107 pb	NM_005036
	AS	5'GCTCCGTGACGGTCTCCACT3'	1125-1106		
PPAR $\beta/\delta$	S	5'TGGAGTACGAGAAGTGTGAGCGCAGC3'	671-696	104 pb	NM_006238
	AS	5'TGTGTGACATGCCAGTGCCAGG3'	775-753		
PPAR $\gamma$	S	5'CCTCATGAAGAGCCTTCCAACCTC3'	464-486	111 pb	L40904
	AS	5'CTTGCATCCTTCACAAGCATGGAAC3'	568-545		
HPRT	S	5'GGACAGGACTGAACGTCTTGCT3'	214-235	96 pb	NM_000194
	AS	5'AAAGAATTTATAGCCCCCTTGA3'	310-288		
GAPDH	S	5'TGCACCACCAACTGCTTAGC3'	492-511	86 pb	BC020308
	AS	5'GGCATGGACTGTGGTCATGAG3'	578-558		
UBC	S	5'ATTTGGGTGCGGTTCTTG3'	400-418	133 pb	NM_021009
	AS	5'TGCCTTGACATTCTCGATGGT3'	532-512		

**Tableau 7 :** Gènes étudiés et couples d'amorces respectifs.

Ce tableau résume les différents gènes étudiés ainsi que les amorces sens (S) et anti-sens (AS) utilisées. La position des amorces, les tailles d'amplificons ainsi que le numéro d'accension GenBank sont également indiqués. Toutes les séquences d'amorces ont été dessinées avec le logiciel Beacon Designer 2 excepté celles de la GAPDH (Vandesompele *et al*, 2002) et des isoformes PPARs (Rival *et al*, 2004). Chaque couple d'amorce possède un Tm de 60°C, ce qui permet de tester plusieurs gènes d'intérêts lors d'une même expérimentation.

Le logiciel Genorm permet de calculer un facteur de dispersion des échantillons pour chaque gène de référence afin de déterminer un facteur de normalisation pour chaque échantillon. Un gène

de référence est considéré comme tel si le facteur de dispersion obtenu est inférieur à 0,5. Ici, l'utilisation de Genorm nous permet de sélectionner le « meilleur » gène de référence parmi la D-glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH), l'hypoxanthine phosphoribosyl transferase (HPRT) et l'ubiquitine (UBC).

## IV.5. Quantification relative des gènes d'intérêts

L'expression relative des gènes d'intérêts est déterminée par la méthode des delta-delta-Ct ( $\Delta\Delta Ct$ ). Pour chaque gène d'intérêt étudié, une ligne seuil (*threshold*) est déterminée. Elle correspond à un niveau de fluorescence suffisamment bas pour que les courbes d'amplification soient en phase exponentielle, mais suffisamment élevé pour être au-dessus du bruit de fond. Elle permet d'obtenir la valeur de cycle seuil (*Cycle threshold*, Ct) d'un gène d'intérêt ( $Ct_{gi}$ ) en fonction des conditions de cultures cellulaires (temps d'incubation et concentration en  $Ca^{2+}$  extracellulaire). De même, pour une condition identique à celle qui a permis d'obtenir la valeur de  $Ct_{gi}$ , la valeur du cycle seuil du gène de référence ( $Ct_{hg}$ ) est déterminée. La valeur de  $Ct_{hg}$  est ensuite soustraite à la valeur de  $Ct_{gi}$  ce qui permet d'obtenir le  $\Delta Ct$ , qui représente une quantité relative de transcrits du gène d'intérêt analysé. Le  $\Delta\Delta Ct$  est ensuite obtenu en effectuant le calcul suivant :

$$\Delta\Delta Ct = [\Delta Ct (\text{cellules traitées (ou non) au } Ca^{2+}) - \Delta Ct (\text{cellules contrôles})]$$

Enfin, le facteur d'expression est calculé *via* la formule  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Pour le contrôle, la valeur de  $\Delta\Delta Ct$  est égale à 0 et donc le facteur d'expression est automatiquement de 1.

## IV.6. Analyse statistique

Pour chaque expérimentation de RT-PCR semi-quantitative en temps réel, la significativité a été calculée à partir des valeurs de  $\Delta Ct$ , *via* un test ANOVA. Quant aux déviations standards, elles ont été calculées à partir de la formule :  $-(\ln 2) \times 2^{-\Delta\Delta Ct} \times (-SD_{\Delta\Delta Ct})$ , dans laquelle  $SD_{\Delta\Delta Ct}$  représente l'écart type des  $\Delta\Delta Ct$  pour un même point (même temps et même  $[Ca^{2+}]$ ) mais lors d'expérimentations différentes et indépendantes. Une p-value inférieure à 0,05 ( $p < 0,05$ ) est statistiquement considérée comme significative. Pour chaque expérimentation de RT-PCR, deux types de significativité, en corrélation avec les paramètres d'expérimentations, ont été analysés :

- La significativité entre les échantillons LC-KSFM et HC-KSFM pour un même temps d'incubation (\* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$  et \*\*\* :  $p < 0,001$ ).
- La significativité pour un même groupe d'échantillon (LC-KSFM ou HC-KSFM) en fonction du temps.

## V. Etude de l'expression protéique par la technique du Western Blot

Cette technique a été utilisée dans le but de caractériser l'expression protéique des trois marqueurs de différenciation que sont les kératines K1 et K10, ainsi que l'involucrine, sur des cellules KNHs et HaCaT après traitement (ou non) avec du  $\text{Ca}^{2+}$  à différents temps d'incubation (1, 3, 6, 9 et 13 jours).

La technique du Western Blot se divise en plusieurs étapes :

1. Lyse et extraction des protéines.
2. Dosage des protéines (technique de Bradford).
3. Dénaturation des protéines.
4. Migration des protéines sur un gel de polyacrylamide.
5. Transfert des protéines sur une membrane de fluorure de polyvinylidène (*polyvinylidene Fluoride*, PVDF).
6. Marquage immunocytochimique :
  - Marquage avec l'anticorps primaire.
  - Marquage avec l'anticorps secondaire.
7. Révélation par réaction de chimiluminescence.

### V.1. Préparation des échantillons protéiques

Les cellules sontensemencées à une densité de 30000 cellules /  $\text{cm}^2$  dans des flacons de culture de 75  $\text{cm}^2$  comme décrit précédemment. Une fois les cellules décollées de leur support, les différents échantillons sont comptés par la technique du bleu trypan puis centrifugés 5 minutes à 1000 rpm. Le culot cellulaire est ensuite repris par du tampon de lyse RIPA\* (100  $\mu\text{l}$  pour  $10^6$  cellules). Le tampon de lyse est extemporanément complété avec une solution d'inhibiteurs de protéases (Complete Mini, Roche Diagnostics, Meylan, France) selon les instructions du fabricant. Les échantillons sont ensuite incubés sur la glace pendant 10 minutes avant d'être centrifugés à 14000 g pendant 20 minutes à 4°C. Les surnageants contenant les protéines sont récupérés et peuvent être conservés à -80°C.

**\* : Tampon RIPA pH=7,5 :** HEPES 50 mM, NaCl 150 mM, déoxycholate 1%, Nonidet P-40 0,1%, SDS 0,1%, aprotinine 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

## V.2. Dosage protéique des extraits cellulaires

La concentration protéique des différents échantillons est déterminée par la méthode de Bradford (Bradford, 1976)(Bio Rad protein assay, Cat. No. 500-0006, Bio Rad). Pour chaque échantillon, 5 µl de surnageant issus de l'extraction sont ajoutés à 2,5 ml du mélange réactionnel de Bradford (2 ml H<sub>2</sub>O + 500 µl de réactif de Bradford). Les différents tubes sont ensuite incubés 5 minutes dans la glace. La DO<sub>595</sub> est lue à l'aide d'un spectrophotomètre (UV/Vis, V-560, Ubest). Préalablement au dosage, une gamme étalon est effectuée avec différentes dilutions d'une solution de BSA (*bovine serum albumine*).

## V.3. Préparation et dénaturation des échantillons protéiques

Cette étape permet la dénaturation des structures secondaires, tertiaires et quaternaires des protéines. La quantité de protéines déposée peut varier de 15 à 50 µg. Chaque échantillon est mélangé volume à volume avec un tampon de charge\*, puis chauffé 5 minutes à 95°C pour permettre la dénaturation des protéines.

**\* : Tampon de charge 2X, pH = 6,8 :** Tris-HCl 50 mM, β-mercaptoéthanol 100 mM, SDS 0,2%, bleu de bromophénol 0,1%, glycérol 10%, DTT 0,1 M (extemporanément).

## V.4. Migration par électrophorèse des protéines sur gel de polyacrylamide

Les protéines sont séparées, en fonction de leur taille, par migration SDS-PAGE (SDS-*Polyacrylamide gel electrophoresis*). La concentration du gel en acrylamide / bisacrylamide varie de 10 à 15% en fonction du poids moléculaire des protéines à analyser. Après avoir déposé les différents échantillons ainsi qu'un marqueur de poids moléculaire (SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard, Invitrogen ou ColorBurst™ Electrophoresis Marker, Sigma), la migration s'effectue à voltage constant (90 Volts) pendant 2 heures dans du tampon de migration\*.

**\* : Tampon de migration pH=8,3 :** Tris-HCl 25 mM, Glycine 250 mM, SDS 0,1%.

## V.5. Transfert des protéines sur membrane de PVDF

Après la migration, les protéines sont transférées sur une membrane PVDF (polyvinylidène difluoride) (Amersham Bioscience, UK). La membrane est préalablement immergée quelques secondes dans du méthanol avant d'être rincée à l'eau puis équilibrée quelques minutes dans du tampon de transfert\*. Le gel de polyacrylamide est également équilibré quelques minutes dans le

tampon de transfert avant d'être mis en contact avec la membrane. Le transfert s'effectue à ampérage constant (100 mA) pendant 1h30.

**\* : Tampon de transfert pH= 8,1-8,5 :** Tris 48 mM, Glycine 39 mM, Méthanol 20% ; SDS 0,03%.

## V.6. Marquage de la membrane avec les anticorps primaires et secondaires

Afin de saturer la membrane, celle-ci est tout d'abord incubée dans une solution de blocage\* pendant 1h, à T°A et sous légère agitation.

Une fois la saturation terminée, le tampon de blocage est éliminé et la membrane est rincée brièvement avec un tampon de lavage\*\* avant d'être incubée pendant 12h à 4°C sous agitation douce avec l'anticorps primaire dilué dans du tampon de blocage. La membrane est alors lavée plusieurs fois sous agitation vigoureuse avec du tampon de lavage avant d'être incubée avec l'anticorps secondaire conjugué à une peroxydase. La révélation des complexes antigène-anticorps spécifiques se fait sous agitation douce pendant 1h à T°A, en présence de l'anticorps secondaire dilué dans du tampon de blocage. La membrane est ensuite rincée plusieurs fois dans du tampon de lavage afin d'éliminer l'excès d'anticorps secondaire. Les différents anticorps primaires et secondaires utilisés dans cette étude sont résumés dans le tableau 8. Le poids moléculaire des bandes spécifiques ainsi révélées est déterminé grâce à la migration de marqueurs de poids moléculaires connus (SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard, Invitrogen ou ColorBurst™ Electrophoresis Marker, Sigma).

**\*Tampon de blocage pH = 8 :** Tris 25 mM, NaCl 140 mM, Tween® 20 à 0,1%, lait 4%.

**\*\*Tampon de lavage pH = 8 :** Tris 25 mM, NaCl 140 mM, Tween® 20 à 0,1%.

## V.7. Révélation par réaction de chimiluminescence

La membrane est incubée sous agitation pendant 1 minute dans un mélange volume à volume des solutions 1 et 2 du réactif de chimiluminescence\*. Puis la membrane est égouttée, et disposée dans une cassette d'exposition avant d'être mise en contact avec un film autoradiographique\*\*. Le temps de contact entre la membrane et le film peut varier en fonction de l'anticorps, le but étant d'obtenir un signal d'intensité optimale. Les films sont révélés par un développeur automatique (Kodak DiagnosticImaging, RPX-OMAT processor modèle M6B).

**\* : Solution 1 et 2 du réactif de chimiluminescence :** ECL Western Blotting Detection Reagents (Amersham Biosciences).

**\*\* : Film radiographique :** Hyperfilm ECL (Amersham Biosciences).

Anticorps primaires	Fournisseurs	Provenance	Dilution	Poids moléculaire
Anticorps polyclonal anti-cytokératine 1	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY	Chèvre	1/2000	67 KDa
Anticorps monoclonal anti-cytokératine 10	DAKO CYTOMATION	Souris	1/2000	56,5 KDa
Anticorps monoclonal anti-involucrine	SIGMA	Souris	1/5000	120 KDa
Anticorps monoclonal anti-actine	SIGMA	Souris	1/5000	43 KDa
Anticorps anti-IgG de souris	DAKO CYTOMATION	Lapin	1/1000	X
Anticorps anti-IgG de chèvre	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY	Singe	1/1000	X

**Tableau 8 :** Anticorps primaires et secondaires utilisés pour les expérimentations de Western Blots.

## VI. Fractionnement par couplage flux-force de sédimentation (SdFFF) de la lignée HaCaT

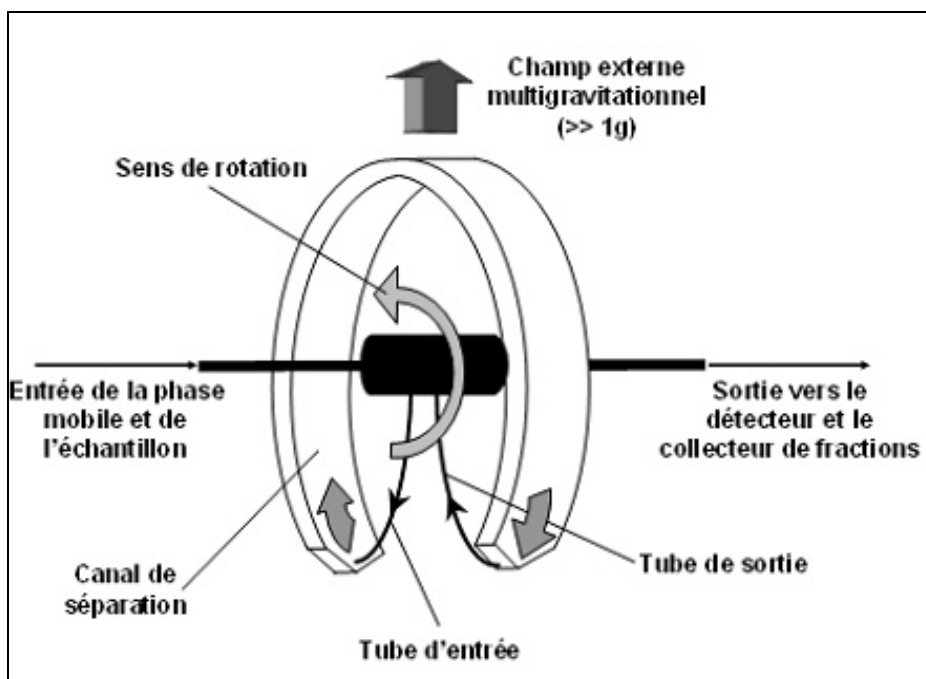
La SdFFF (*Sedimentation field flow fractionation*) est une technique de séparation que l'on pourrait apparenter à la chromatographie en phase liquide. Elle permet de fractionner des cellules sans modifier leur viabilité. De plus, elle n'induit pas l'apoptose et n'altère ni le stade de différenciation, ni la maturation des cellules.

### VI.1. Principe de la SdFFF

Les méthodes de séparation par couplage flux-force représentent une famille de techniques apparentées à la chromatographie liquide, où la colonne est remplacée par un canal en forme de ruban de très faible épaisseur (80-250  $\mu\text{m}$ ) devant la largeur (1-2 cm) et la longueur (50-90 cm).

Son principe est basé sur l'éluion différentielle de diverses espèces microniques ( $> 1 \mu\text{m}$ ) dans une phase mobile qui passe dans un canal soumis à un champ externe gravitationnel perpendiculaire au canal.

La SdFFF utilise un champ multigravitationnel généré par la rotation du cylindre ; elle est préférentiellement utilisée pour séparer des espèces de la grandeur du micron telles que des cellules (Figure 43).



**Figure 43** : Schéma du canal de SdFFF.

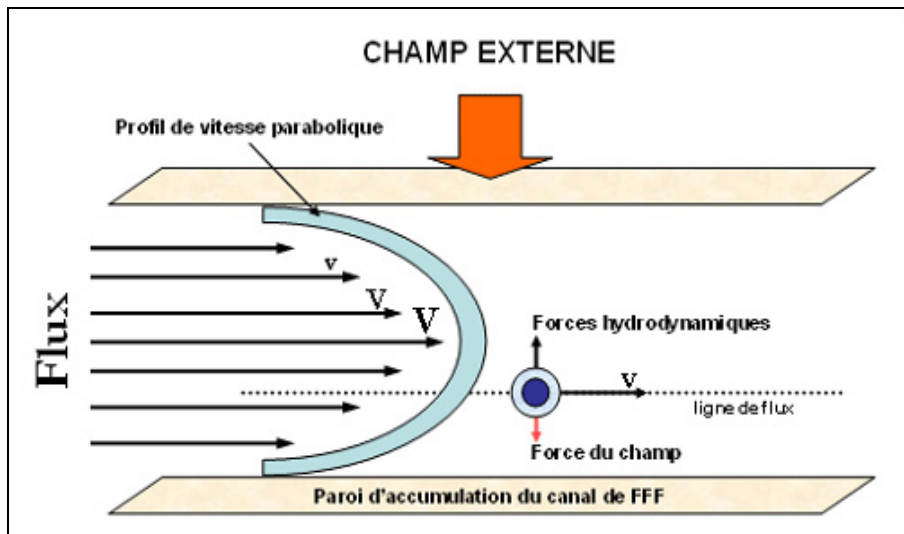
L'utilisation du mode dit « inertiel » permet de faire circuler les cellules dans le canal tout en évitant les interactions des cellules avec la paroi d'accumulation qui pourraient altérer leur intégrité. La séparation des espèces cellulaires dépend alors de leur sensibilité à deux forces antagonistes:

1. Une force résultant d'un champ externe multigravitationnel.
2. Une force d'élévation d'origine hydrodynamique.

La balance de ces deux forces définit une position d'équilibre pour chaque population de particules (Figure 44).

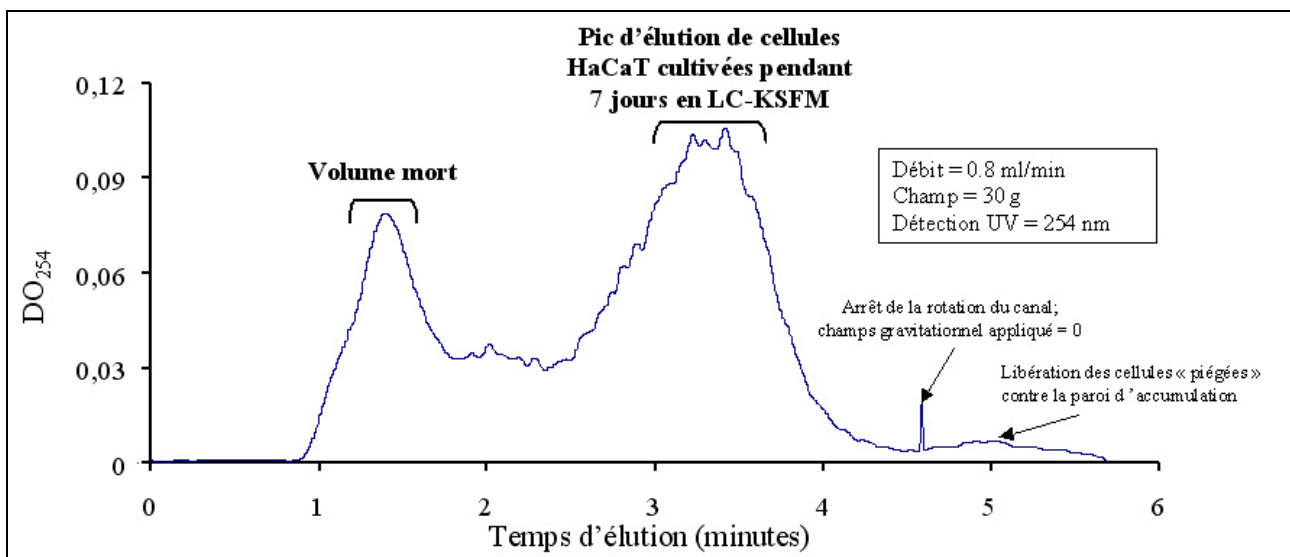
En mode inertiel, les caractéristiques de la SdFFF permettent la séparation de cellules en fonction de leur taille, de leur densité et de leur forme.

A densité équivalente (lorsque les cellules ont atteint leur position d'équilibre dans le canal), les particules de grande taille génèrent plus de forces hydrodynamiques et se positionnent donc plus près du milieu du canal. Elles sont éluées plus rapidement et sortent alors en premier, par rapport aux particules de petite taille (Figure 44).



**Figure 44 :** Principe d'élution des cellules en SdFFF.

Le profil d'élution des cellules ou « fractogramme » dépend des caractéristiques cellulaires ; il est composé d'un volume mort correspondant à des espèces non retenues dans le canal, et d'un pic d'absorbance correspondant au plus grand nombre de cellules semblablement éluées (Figure 45).



**Figure 45 :** Fractogramme représentatif de l'élution de cellules HaCaT.

Dans le système SdFFF, la séparation des cellules ne dépend que de leur taille et de leur densité car le rapport de rétention (temps d'élution du volume mort / temps de rétention) est fonction de la vitesse du flux de la phase mobile ainsi que du champ externe. Le temps de rétention



est estimé par le temps nécessaire pour atteindre le sommet du pic d'éluion et comparé, suivant les conditions de culture.

## **VI.2. Tri de populations cellulaires différenciées par SdFFF**

Les cellules HaCaT sontensemencées à une densité de 30000 cellules / cm<sup>2</sup>, en flacon de culture de 75 cm<sup>2</sup>. Après 7 jours de culture avec ou sans ajout de Ca<sup>2+</sup> extracellulaire, les cellules sont décollées puis concentrées à 1,5×10<sup>6</sup> cellules / ml dans du PBS. Elles sont ensuite injectées, *via* un injecteur et sa boucle d'injection (100 µl), dans un canal de 125 µm d'épaisseur. La suspension cellulaire est alors entraînée par la phase mobile (PBS) dont le débit est régulé à 0,5 ml/min par une pompe à chromatographie Spectroflow 400-ABI Kratos (ABI-Kratos, Ramsey, NJ, USA). A l'intérieur du canal, les cellules sont soumises à un champ gravitationnel de 50 g créé par la rotation du bol de centrifugation. L'éluion des cellules est mesurée à 254 nm par un détecteur d'absorbance Water 484 (Water associate, Milford, MA, USA). Le pic d'éluion des cellules cultivées en présence de 1,2 mM Ca<sup>2+</sup> extracellulaire est partagé en trois fractions (F1, F2 et F3) qui sont collectées successivement. Une collecte du pool total est également effectuée (HC-PT). Quant aux cellules cultivées sans ajout de Ca<sup>2+</sup> extracellulaire, seulement une collecte du pool total est effectuée (LC-PT).

Plusieurs expérimentations ont été réalisées sur les différentes fractions F1, F2 et F3 ainsi que sur les pools totaux LC-PT et HC-PT, telles que :

### **- L'analyse de la prolifération cellulaire par la technique du MTT :**

Pour cela, les fractions F1, F2 et F3 ainsi que l'échantillon HC-PT sont réensemencés à une densité de 3000 cellules / puits en plaque de 96 puits, dans du milieu de culture HC-KSFM. L'échantillon LC-PT est réensemencé dans du milieu de culture LC-KSFM. La prolifération cellulaire est mesurée avec le test MTT à 24h, 72 h et 120 h après réensemencement.

### **- L'expression génique de marqueurs de différenciation épidermique :**

Le protocole expérimental suivi reprend les mêmes étapes que celui décrit dans le chapitre IV. Seul change le kit d'extraction d'ARN (Micro-to-Midi Total RNA Purification System, Invitrogen). De même, le dosage des ARN totaux a été effectué avec un NanoDrop™ ND-1000 (NanoDrop Technologies, LLC, Wilmington, Delaware, USA) et l'intégrité des ARN est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose 1,2%. Les RT ont été réalisées à partir d'1 µg d'ARN avec la SuperScript™ III Reverse transcriptase (Invitrogen) dans les conditions d'utilisation recommandées par le fabricant. Les PCR en temps réel ont également été effectuées avec la technologie SYBR

Green sur un Rotor Gene™ 6000 (Corbett Life Science, Sydney, Australie). Les résultats ont été traités de la même manière que celle décrite dans le chapitre IV.

**- Analyse du cycle cellulaire dans les différentes fractions :**

Les différentes fractions obtenues en sortie de SdFFF ont été analysées en CMF afin d'observer la répartition des cellules dans le cycle cellulaire pour chaque fraction. Le protocole expérimental est identique à celui décrit dans le chapitre III.

# RESULTATS

## Rappel des objectifs

Dans le but de savoir si les cellules HaCaT peuvent être considérées comme un modèle de différenciation kératinocytaire *in vitro*, nous avons mené une étude comparative entre cette lignée et les kératinocytes normaux humains (KNHs). La différenciation a été induite en augmentant la concentration du  $\text{Ca}^{2+}$  dans le milieu de culture. En effet, il est généralement admis que l'augmentation en  $\text{Ca}^{2+}$  induit le processus de différenciation kératinocytaire *in vitro* sur des KNHs. Ce processus est accompagné par l'inhibition de la prolifération (Sakaguchi *et al*, 2003), des changements morphologiques (Lewis *et al*, 1994), une accumulation des cellules en phase G0-G1 du cycle cellulaire (Missero *et al*, 1996) et une surexpression de gènes considérés comme marqueurs de différenciation (Fuchs, 1990).

Au cours de ce travail comparatif, une cinétique (1, 3, 6, 9 et 13 jours) a été mise en place, afin d'étudier ces différents aspects biologiques entre des KNHs et des cellules HaCaT, cultivés dans un milieu avec ou sans  $\text{Ca}^{2+}$ .

## I. Effets du $\text{Ca}^{2+}$ sur les cellules KNHs et HaCaT : Etude comparative

Dans cette étude comparative, nous avons utilisé un milieu de culture spécifique pour la culture de kératinocytes : le KFSM (keratinocyte serum-free medium). Ce milieu contient par défaut 0,09 mM de  $\text{Ca}^{2+}$ . Pour induire la différenciation, la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  du milieu de culture est ajustée à 1,2 mM.

Nos résultats sont donc obtenus en fonction de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  du milieu de culture :

- LC pour low calcium-KFSM (0,09 mM  $\text{Ca}^{2+}$ )
- HC pour high calcium-KFSM (1,2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ )

### I.1. Prolifération cellulaire et changements morphologiques

La culture des cellules KNHs en présence d'une concentration extracellulaire en  $\text{Ca}^{2+}$  supérieure à 1 mM, entraîne l'arrêt de la prolifération cellulaire et la mise en place du processus de différenciation (Boyce and Ham, 1983). En revanche, il existe peu d'informations en ce qui concerne l'effet du  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire sur les cellules HaCaT cultivées dans un milieu spécifique

pour la culture des KNHs, tel que le KSFM. Nous avons donc étudié l'activité proliférative des deux types cellulaires par la technique du MTT et observé les changements morphologiques en fonction de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$ .

### **I.1.1. Prolifération cellulaire**

- *KNHs*

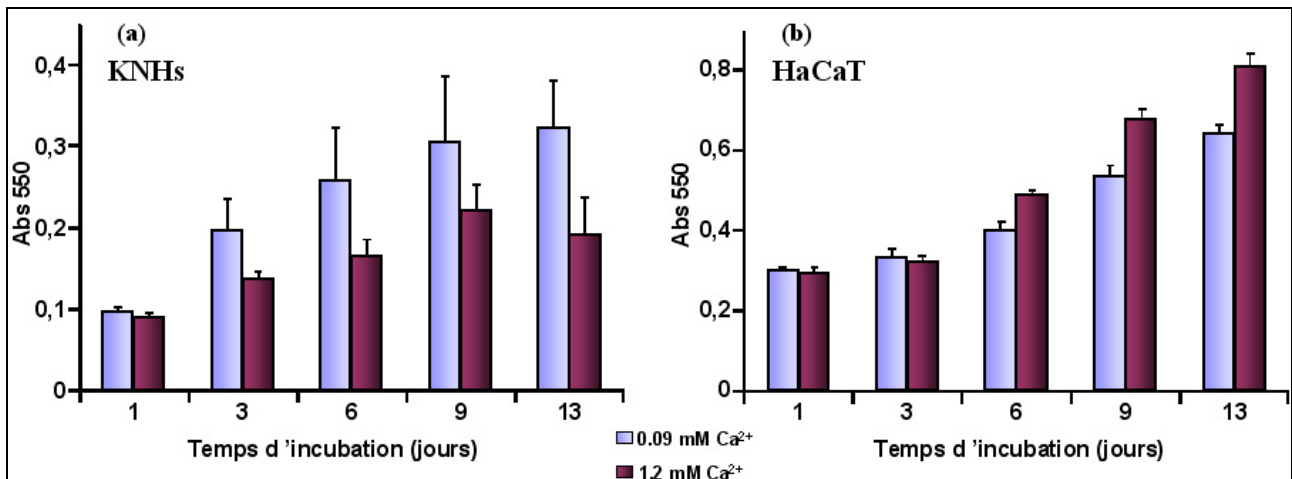
- Lorsque les KNHs (Figure 46a) sont cultivés avec du milieu LC, une augmentation régulière de leur activité métabolique en fonction du temps de culture est observée.

En revanche, l'addition de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le milieu de culture provoque une très nette diminution de cette activité, de l'ordre de 30 à 40%, respectivement après 3 et 13 jours de culture.

- *HaCaT*

- Les cellules HaCaT (Figure 46b) cultivées en LC présentent un profil relativement similaire à celui obtenu pour les KNHs dans les mêmes conditions. Cependant, les différentes valeurs d'absorbance indiquent un nombre de cellules plus important comparativement aux KNHs.

Cultivées en HC, le nombre de cellules est identique à celui obtenu en LC jusqu'au jour 3. En revanche, à partir de six jours d'incubation, il est supérieur à celui des cellules cultivées en LC. En effet, cette augmentation est de l'ordre de 22% au jour 6 et de 26 % au jour 13.



**Figure 46 :** Etude de l'activité proliférative des KNHs (a) et de la lignée HaCaT (b).

Ces histogrammes montrent l'activité métabolique pour les deux types cellulaires étudiés en fonction de la concentration en Ca<sup>2+</sup> extracellulaire. Pour chaque expérimentation les cellules ont étéensemencées à la même densité ( $3 \times 10^4$  cellules / cm<sup>2</sup>) et le nombre de cellules relatif (Abs<sub>550</sub>) aux différents temps d'incubation est obtenue avec la technique du MTT. Les valeurs expérimentales sont représentatives d'expérimentations distinctes et indépendantes (n=3).

- Etude comparative

- Les études précédentes démontrent que les cellules HaCaT ont une activité proliférative plus importante en milieu HC, ce qui n'est pas le cas pour les KNHs.

### I.1.2. Changements morphologiques

Les changements morphologiques ont été observés en microscopie à contraste de phase pour les deux types cellulaires, en fonction de la concentration en Ca<sup>2+</sup> du milieu de culture et du temps d'incubation (Figure 47).

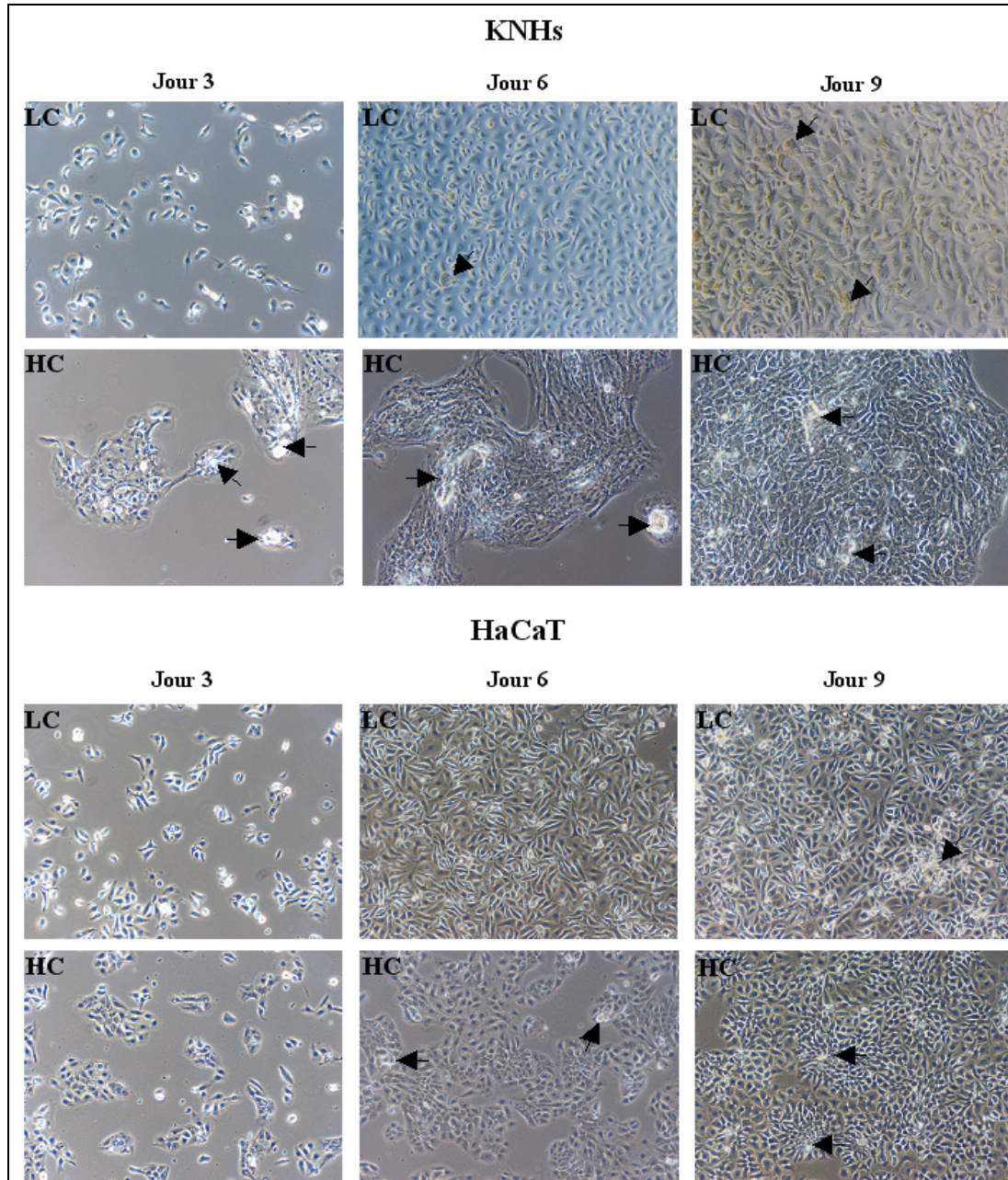
- KNHs et HaCaT

- On observe que les cellules cultivées en LC (KNHs et HaCaT) sont dispersées et ont une forme aplatie.

- Les cellules cultivées en HC sont plus petites, de formes pavimenteuses, et présentent localement des squames cellulaires.

- Etude comparative

- On peut également constater que les changements morphologiques engendrés par l'augmentation de la concentration en  $Ca^{2+}$ , tels que l'adhésion intercellulaire, la stratification, ou encore l'apparition de squames cellulaires, apparaissent plus rapidement et de façon plus prononcée sur les KNHs comparativement à la lignée HaCaT.



**Figure 47 :** Changements morphologiques des KNHs et des cellules HaCaT.

Cette figure montre les changements morphologiques observables en microscopie à contraste de phase en fonction de la concentration extracellulaire en  $Ca^{2+}$  aux différents temps indiqués (jours 3, 6 et 9). Les flèches indiquent la présence locale de squames cellulaires.

## I.2. Répartition des cellules dans le cycle cellulaire

*In vitro*, la différenciation kératinocytaire entraîne une accumulation des KNHs en phase G0-G1 (Missero *et al*, 1996). Notre objectif a donc été d'étudier si la différenciation induite par l'ajout de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le milieu de culture provoquait une accumulation des cellules en phase G0-G1 dans les deux types cellulaires.

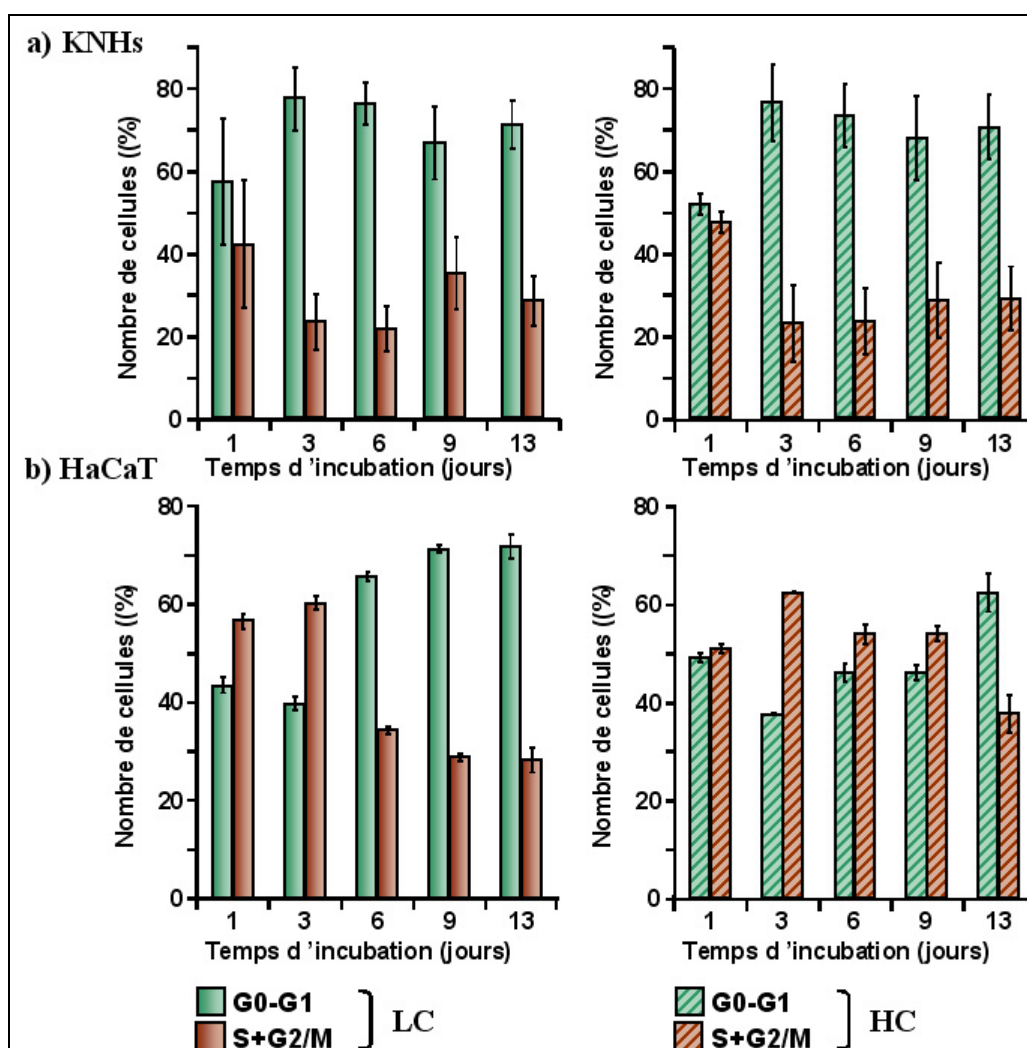
- KNHs

- Cultivés avec ou sans  $\text{Ca}^{2+}$ , le profil de répartition des KNHs dans les phases du cycle est très similaire : 75% des cellules sont en phase G0-G1 et 25% en phase S/G2-M à partir du jour 3 (Figure 48a).

- HaCaT

- En ce qui concerne ces cellules (Figure 48b) cultivées en LC, une légère augmentation en S/G2-M est observée entre les jours 1 et 3. Des changements importants dans la répartition des cellules apparaissent au jour 6. En effet, on peut observer une accumulation de cellules en G0-G1 (de 39,8% au jour 3 à 65,6% au jour 6) dont le seuil est atteint au jour 9 (71,2% en G0-G1).

En revanche, en HC, les cellules s'accumulent principalement en S/G2M (62,4% au jour 3, 54% aux jours 6 et 9), hormis au jour 13 (37,7%).



**Figure 48 :** Effet du Ca<sup>2+</sup> sur la répartition des KNHs (a) et des cellules HaCaT (b) dans les différentes phases du cycle cellulaire.

Pour ces expérimentations, les deux types cellulaires ont étéensemencés à la même densité ( $3 \times 10^4$  cellules / cm<sup>2</sup>) et cultivés dans un milieu LC (0,09 mM Ca<sup>2+</sup>) ou HC (1,2 mM Ca<sup>2+</sup>) pendant 13 jours. La distribution cellulaire a été déterminée par un marquage IP suivi d'une analyse en CMF. Les données sont représentatives d'expérimentations distinctes et indépendantes (n=3).

- Etude comparative

- Ces résultats font apparaître qu'en milieu HC, les cellules HaCaT sont majoritairement en phase S/G2-M alors que les KNHs sont majoritairement en phase G0-G1.



### **I.3. Analyse de l'expression génique**

L'objectif de ces expérimentations a été d'analyser l'expression de gènes connus comme marqueurs de la différenciation kératinocytaire tels que les kératines K1 et K10, l'involucrine, la transglutaminase-1 (TG-1) et la filaggrine. De même, un gène spécifique de la couche basale, la kératine 5, un gène impliqué dans le cycle cellulaire, p21, mais aussi des gènes impliqués dans le métabolisme lipidique tels que FATP-4, ABCD-1, ABCG-1, DESG-2, ADRP et FIAF, ont été étudiés. Enfin, les trois isoformes PPARs ( $\alpha$ ,  $\beta/\delta$  et  $\gamma$ ) ont été analysées. Pour chaque gène, les résultats obtenus sont présentés, d'une part, en fonction du type cellulaire, du temps d'incubation et de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  du milieu de culture. D'autre part, indépendamment du type cellulaire et pour chaque expérimentation de RT-PCR semi quantitative en temps réel, les résultats sont exprimés par un facteur d'induction. Ce dernier permet de comparer l'expression de l'ARNm du gène d'intérêt à chaque temps et pour chaque condition de culture, par rapport au premier jour d'incubation pour des cellules cultivées en LC. Ce premier temps (jour 1) est donc considéré comme l'équivalent d'un taux d'expression basal du gène d'intérêt, et, de ce fait, est utilisé en tant que référence.

#### **I.3.1 Expression de marqueurs de la différenciation kératinocytaire**

L'expression de plusieurs gènes considérés dans la littérature comme des marqueurs de la différenciation kératinocytaire a été analysée.

##### **I.3.1.1. Kératines K1, K10 et involucrine**

Les kératines K1 et K10 sont impliquées dans la mise en place du cytosquelette des kératinocytes des couches suprabasales de l'épiderme. Leur expression s'effectue principalement au niveau de la couche épineuse. En ce qui concerne l'involucrine, c'est une protéine précurseur de l'enveloppe cornée, dont l'expression se situe majoritairement au niveau de la couche granuleuse.

- KNHs

- Les analyses de RT-PCR pour les KNHs cultivés en LC montrent une faible induction de l'expression génique de K1 et de K10 (Figures 49a, b) entre les jours 1 et 3. En revanche, l'expression de ces deux marqueurs augmente de façon significative entre les jours 3 et 6 ( $\times 64$ ,  $p < 0,05$  pour K1 et K10), ainsi qu'entre les jours 6 et 13 ( $\times 23$ ,  $p < 0,001$  pour K1 et  $\times 9$ ,  $p < 0,05$  pour K10).

Lorsque les KNHs sont cultivés en HC, l'expression génique de K1 et de K10 augmente avec le temps d'incubation ( $\times 20$ ,  $p < 0,01$  et  $\times 41$ ,  $p < 0,01$  entre les jours 1 et 3 ;  $\times 25$ ,  $p < 0,001$  et  $\times 95$ ,  $p < 0,01$  entre les jours 3 et 13, respectivement pour K1 et K10).

Comparativement aux KNHs cultivés en LC, l'induction de l'expression de K1 est significative dès le jour 1 ( $\times 43$ ,  $p < 0,001$ ). Aux temps suivants, les taux de transcrits de K1 et de K10 sont significativement plus importants, excepté au jour 13 ( $\times 171$ ,  $p < 0,001$  et  $\times 23$ ,  $p < 0,01$  au jour 3 ;  $\times 11$ ,  $p < 0,01$  et  $\times 9$ ,  $p < 0,05$  au jour 6 ;  $\times 10$ ,  $p < 0,01$  et  $\times 15$ ,  $p < 0,01$  au jour 9, respectivement pour K1 et K10).

- En ce qui concerne l'expression de l'involucrine (Figure 49c), une induction de son expression est observée au jour 6 ( $\times 2$ ,  $p < 0,05$  entre les jours 1 et 6) dans les KNHs cultivés en LC. Cette induction est mise en évidence aux temps suivants et atteint son maximum au jour 13 ( $\times 5$ ,  $p < 0,05$  entre les jours 9 et 13).

En HC, l'expression de l'involucrine reste sensiblement identique entre les jours 1 et 9. Une augmentation est observée au dernier temps d'incubation ( $\times 2$ ,  $p < 0,05$  entre les jours 1 et 13).

L'induction de l'expression de l'involucrine due à l'augmentation en  $\text{Ca}^{2+}$  du milieu de culture est observée dès le jour 1 ( $\times 7,3$ ,  $p < 0,001$ ). Excepté au jour 13, le taux d'involucrine est significativement supérieur à celui observé pour les KNHs cultivés en LC ( $\times 10$ ,  $p < 0,001$  au jour 3 ;  $\times 3$ ,  $p < 0,01$  au jour 6 et  $\times 3$ ,  $p < 0,05$  au jour 9).

- HaCaT

- Pour les cellules HaCaT, les ARNm de K1 et K10 (Figure 49d, e) ne sont pas détectés au jour 1, indépendamment de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$ .

En LC, une induction significative est observée entre les jours 3 et 6 ( $\times 11386$ ,  $p < 0,01$  pour K1 et  $\times 1752$ ,  $p < 0,001$  pour K10). Après le jour 6, aucune augmentation significative de l'expression de K1 et de K10 n'est observée.

En HC, l'expression génique de K1 augmente de manière significative entre les jours 3 et 9 ( $\times 1137$ ,  $p < 0,001$  entre les jours 3 et 6 et  $\times 4$ ,  $p < 0,05$  entre les jours 6 et 9). Une augmentation continue de l'expression de K1 est observée jusqu'au dernier temps ( $\times 4$  entre les jours 9 et 13), mais les analyses statistiques n'ont pas confirmé de différence significative du taux d'expression de K1 entre

les jours 9 et 13. Le même profil est observé pour K10 : son expression augmente avec le temps d'incubation ( $\times 344$ ,  $p < 0,001$  entre les jours 3 et 6 et  $\times 11$ ,  $p < 0,01$  entre les jours 6 et 13).

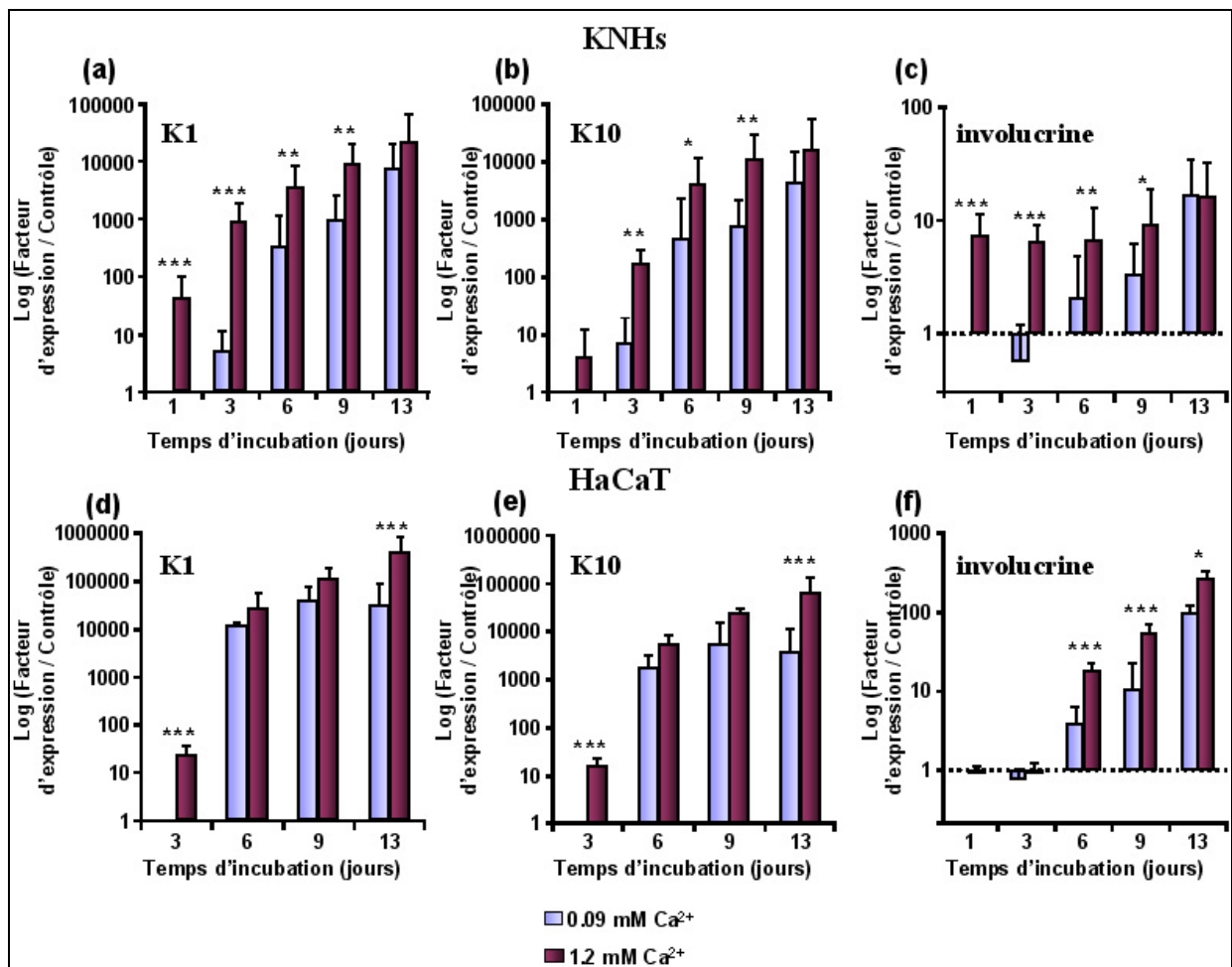
Comparativement aux cellules HaCaT cultivées en LC, une induction significative de l'expression de K1 et de K10 est détectée dès le jour 3 ( $\times 23$ ,  $p < 0,001$  pour K1 et  $\times 16$ ,  $p < 0,001$  pour K10). Pour chacun des temps suivants, bien que leur niveau d'expression apparaît systématiquement plus important dans les cellules cultivées en HC, seul le jour 13 présente une induction significative de l'expression de ces deux gènes ( $\times 13$ ,  $p < 0,001$  pour K1 et  $\times 17$ ,  $p < 0,01$  pour K10).

- En ce qui concerne l'involucrine (Figure 49f), on peut tout d'abord observer qu'un « taux basal » au jour 1 est détecté. Il peut ainsi être utilisé comme référence.

En LC, l'augmentation de l'expression de l'involucrine est observée à partir du jour 6 ( $\times 4$ ,  $p < 0,01$  entre les jours 1 et 6). Cette augmentation est également mise en évidence pour les temps suivants ( $\times 3$ ,  $p < 0,05$  entre les jours 6 et 9 et  $\times 9$ ,  $p < 0,001$  entre les jours 9 et 13).

En HC, l'expression de l'involucrine augmente également à partir du jour 6 ( $\times 18$ ,  $p < 0,001$  entre les jours 1 et 6). Elle continue d'augmenter aux temps suivants ( $\times 3$ ,  $p < 0,01$  entre les jours 6 et 9 et  $\times 5$ ,  $p < 0,01$  entre les jours 9 et 13).

Comparativement aux cellules HaCaT cultivées en LC, une induction significative de l'expression de l'involucrine est observée à partir du jour 6 jusqu'au jour 13 ( $\times 5$ ,  $p < 0,001$  au jour 6 ;  $\times 5$ ,  $p < 0,001$  au jour 9 et  $\times 3$ ,  $p < 0,05$  au jour 13).



**Figure 49 :** Profil d'expression génique des kératines K1, K10 et de l'involucrine dans les KNHs (a, b et c) et les cellules HaCaT (d, e et f).

Pour une meilleure appréciation des résultats, ces derniers sont tous présentés avec une échelle logarithmique. Pour chaque marqueur, les taux de transcrits ont été normalisés par un gène de ménage. Leur taux d'expression est représenté par un facteur d'expression en fonction de la valeur obtenue en LC au jour 1, excepté K1 et K10 pour la lignée HaCaT où leur taux de transcrits est donné par le facteur d'expression en fonction de la valeur obtenue au jour 3 en LC, car aucune expression d'ARNm n'est détectée au jour 1 pour ces deux marqueurs. Les astérisques représentent la significativité entre les deux conditions (LC et HC) pour un même temps : \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,001$ . Les données sont représentatives d'expérimentations distinctes et indépendantes :  $n=7$  pour les KNHs et  $n=5$  pour les HaCaT.

- Etude comparative

- De manière générale et pour chaque type cellulaire, ces résultats démontrent que les profils d'expression des kératines K1 et K10 évoluent d'une façon similaire, avec un facteur d'expression plus important pour les cellules cultivées en HC. En revanche, par rapport aux KNHs, l'induction

de l'expression de ces deux marqueurs est retardée pour les cellules HaCaT, indépendamment de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  du milieu de culture.

- L'expression de l'involucrine présente un profil d'expression similaire lorsque les deux types cellulaires sont cultivés en LC. En effet, une augmentation régulière de son expression est mise en évidence à partir du jour 6. Lorsque les cellules HaCaT sont cultivées en HC et comparativement aux KNHs dans les mêmes conditions, l'induction de l'expression de l'involucrine est également retardée. En effet, pour les KNHs, un seuil maximal d'expression est pratiquement atteint dès le jour 1, alors que l'induction significative de l'involucrine ne s'observe qu'à partir du jour 6 dans les cellules HaCaT.

### **I.3.1.2. Filaggrine et transglutaminase-1**

La filaggrine est une protéine précurseur de l'enveloppe cornée. Son expression s'effectue majoritairement au niveau de la couche granuleuse de l'épiderme. Son rôle consiste à agréger les filaments de kératine. La transglutaminase-1 (TG-1) est une enzyme indispensable à la mise en place de l'enveloppe cornée. En effet, elle catalyse la liaison de plusieurs précurseurs de cette enveloppe.

- KNHs

- Dans les KNHs (Figure 50a) cultivés en LC, l'augmentation de l'expression de la filaggrine est observée à partir du jour 6 ( $\times 10$  entre les jours 1 et 6,  $p < 0,05$ ). Cette augmentation est également mise en évidence aux temps suivants ( $\times 10$  entre les jours 6 et 13,  $p < 0,01$ ).

Un profil semblable est observable lorsque les KNHs sont cultivés en HC : l'expression de la filaggrine augmente de manière significative à partir du jour 6 ( $\times 5$ ,  $p < 0,05$  entre les jours 1 et 6 ;  $\times 6$ ,  $p < 0,01$  entre les jours 6 et 13).

Comparativement aux KNHs cultivés en LC et principalement aux temps précoces (jours 1 et 3), l'expression de la filaggrine est plus importante lorsque ces cellules sont cultivées en HC, excepté au jour 13. Cependant, pour tous les temps d'incubations, l'analyse statistique des résultats montre que cette surexpression n'est pas significative.

- En ce qui concerne le profil d'expression de la TG-1 (Figure 50b) dans les KNHs cultivés en LC, on observe une augmentation à partir du jour 6 jusqu'au jour 13 ( $\times 6$ ,  $p < 0,01$  entre les jours 1 et 6 et  $\times 11$ ,  $p < 0,001$  entre les jours 6 et 13).

En HC, l'expression de la TG-1 n'augmente pas de façon significative entre les différents temps d'incubations.

Cependant, comparativement aux KNHs cultivés en LC, une induction significative aux jours 1 et 3 ( $\times 11$ ,  $p < 0,01$  et  $\times 4$ ,  $p < 0,05$  respectivement) est observée. Pour les temps suivants, le taux de transcrits est sensiblement identique, excepté au jour 13. Bien que les études statistiques n'aient pas montré de différence significative entre les deux conditions au dernier temps, l'expression de la TG-1 apparaît plus importante en LC.

- HaCaT

- Pour la lignée HaCaT (Figure 50c) cultivée en LC, une augmentation significative de l'expression génique de la filaggrine est observée uniquement au dernier temps d'incubation ( $\times 45$ ,  $p < 0,001$  entre les jours 1 et 13).

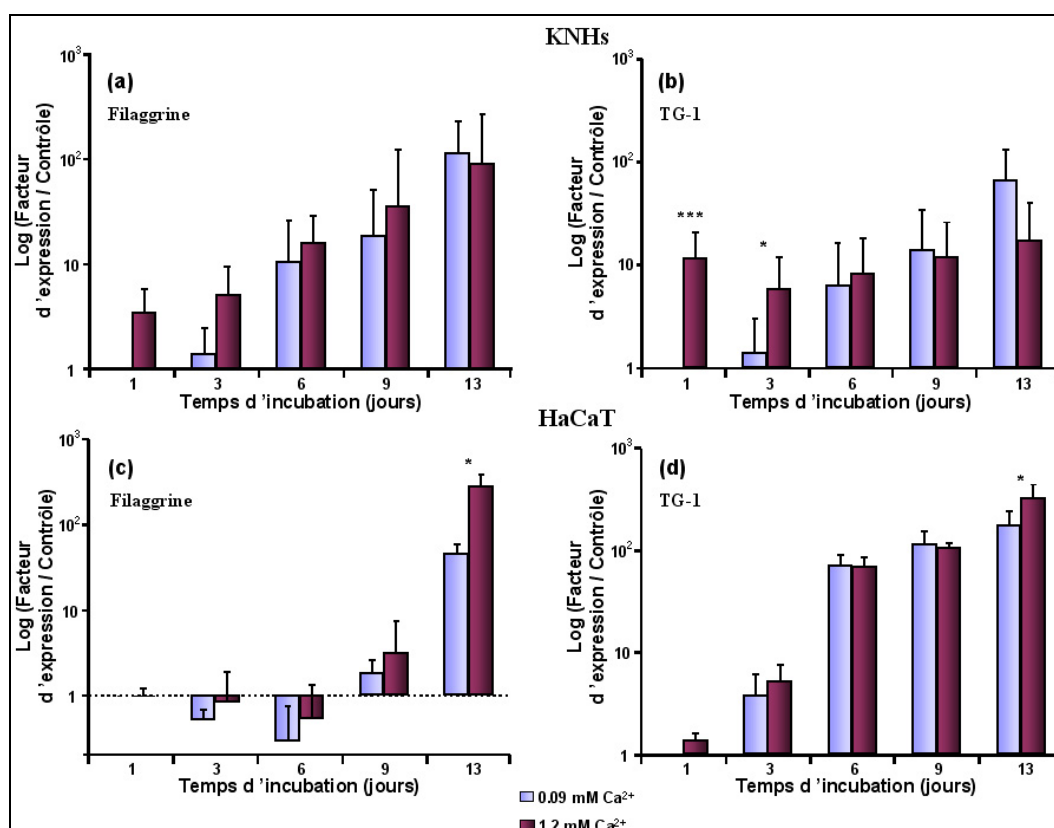
En HC, le profil d'expression de la filaggrine est très similaire à celui observé en LC. Cependant une augmentation significative du taux de transcrits est détectée à partir du jour 9 ( $\times 3$ ,  $p < 0,05$  entre les jour 1 et 9) pour atteindre une valeur maximale au jour 13 ( $\times 95$ ,  $p < 0,01$  entre les jours 9 et 13).

Si l'on compare ces deux profils, on constate que l'ajout de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le milieu de culture induit une surexpression de la filaggrine uniquement au jour 13.

- L'expression de la TG-1 (Figure 50d) dans les cellules HaCaT cultivées en LC augmente significativement à partir du jour 6 ( $\times 70$ ,  $p < 0,001$  entre les jours 1 et 6). Cette augmentation est également observée jusqu'au dernier temps d'incubation ( $\times 2,5$ ,  $p < 0,05$  entre les jours 6 et 13).

En HC, l'expression de la TG-1 dans les cellules HaCaT augmente de manière significative entre chaque temps d'incubation ( $\times 4$  entre les jours 1 et 3,  $p < 0,001$  ;  $\times 13$  entre les jours 3 et 6,  $p < 0,01$  ;  $\times 1,5$  entre les jours 6 et 9,  $p < 0,05$  et  $\times 3$  entre les jours 9 et 13,  $p < 0,01$ ).

Cependant, avec ou sans  $\text{Ca}^{2+}$ , l'expression de la TG-1 est sensiblement identique pour chaque temps d'incubation. Une induction significative de la TG-1, due à l'augmentation en  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire, est observée seulement au niveau du dernier temps d'incubation ( $\times 2$ ,  $p < 0,05$ ).



**Figure 50 :** Profil d'expression génique de la filaggrine et de la transglutaminase-1 dans les KNHs (a et b) et les cellules HaCaT (c et d).

Les données sont représentatives d'expérimentations distinctes et indépendantes : n=7 pour les KNHs et n=5 pour les cellules HaCaT.

- Etude comparative

- Au sein d'un même type cellulaire, une importante similarité dans les profils d'expressions est observée entre LC et HC : dans nos conditions expérimentales, le Ca<sup>2+</sup> n'induit pas de façon significative l'expression de la filaggrine dans les KNHs ; en revanche, il l'induit sur la lignée HaCaT, bien que tardivement (jour 13). Cependant, le taux d'expression génique de la filaggrine augmente plus précocement dans les KNHs, indépendamment de la concentration en Ca<sup>2+</sup> du milieu de culture.

- Dans les KNHs, le Ca<sup>2+</sup> induit significativement l'expression de la TG-1 uniquement aux temps précoces (jours 1 et 3). De plus, son profil d'induction ressemble à celui obtenu pour l'involucrine dans les mêmes conditions, avec l'atteinte d'un seuil d'expression dès le premier jour d'incubation. Pour la lignée HaCaT, l'augmentation de l'expression de la TG-1 s'opère de manière

régulière avec le temps d'incubation, indépendamment de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$ , sauf au dernier temps d'incubation où le taux de transcrits observé est significativement plus important en HC.

### I.3.2. Expression de la Kératine 5

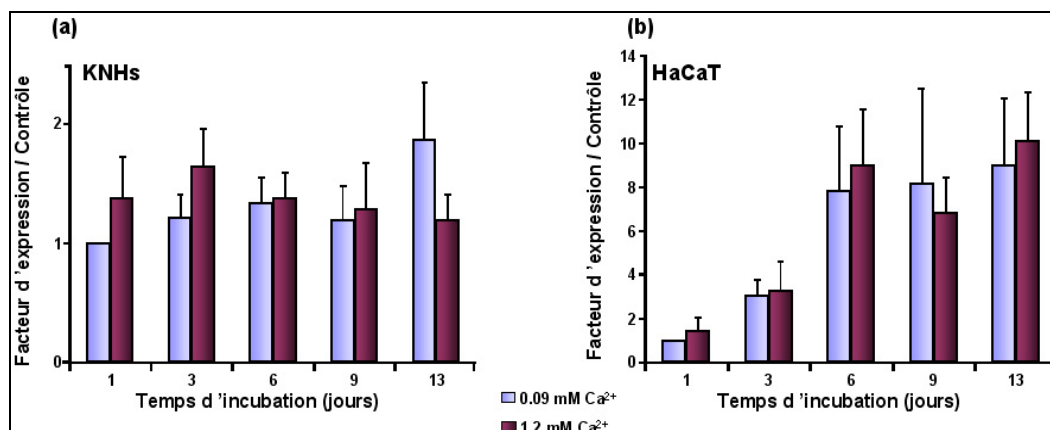
La kératine 5 (K5) est une kératine qui ne s'exprime qu'au niveau de la couche basale des kératinocytes de l'épiderme : elle peut donc être utilisée comme un marqueur de cette couche.

- KNHs

- Pour les KNHs (Figure 51a), on peut constater que l'expression de K5 reste relativement constante, indépendamment de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  du milieu de culture. En effet, dans nos conditions expérimentales, aucune variation significative de son expression n'a été observée, ni en fonction de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$ , ni en fonction du temps de culture.

- HaCaT

- Pour les cellules HaCaT (Figure 51b), une augmentation du taux de transcrits est observée, mais indépendamment de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$ . L'expression de K5 augmente significativement dès les temps précoces ( $\times 3$ ,  $p < 0,05$  entre les jours 1 et 3) et atteint un palier au niveau du jour 6 ( $\times 8$ ,  $p < 0,01$  et  $\times 9$ ,  $p < 0,01$  pour les cellules cultivées en LC et HC, respectivement).



**Figure 51 :** Profil d'expression génique de K5 dans les KNHs (a) et les cellules HaCaT (b).

Les données sont représentatives d'expérimentations distinctes et indépendantes :  $n=7$  pour les KNHs et  $n=5$  pour HaCaT.



- Etude comparative

- Dans nos conditions de culture, la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  ne modifie donc pas l'expression de K5 dans les KNHs et dans la lignée HaCaT. Cependant, dans la lignée HaCaT, l'expression de K5 augmente avec le temps de culture.

### **I.3.3. Expression de p21**

La protéine p21 est impliquée dans la régulation du cycle cellulaire et le processus apoptotique. Elle intervient également dans l'arrêt de la prolifération cellulaire lors de la mise en place du processus de différenciation kératinocytaire (Weinberg and Denning, 2002). Il nous a donc semblé intéressant d'étudier sa régulation génique.

- KNHs

- Dans les KNHs (Figure 52a) cultivés en LC, le taux de transcrits de p21 reste relativement constant entre les jours 1 et 9. Une augmentation significative de l'expression de p21 est observée entre les jours 9 et 13 ( $\times 8$ ,  $p < 0,01$ ).

En HC, l'expression génique de p21 dans les KNHs augmente de manière régulière jusqu'au jour 6 ( $\times 3$ ,  $p < 0,05$  entre les jours 1 et 6). Pour les temps suivants, les analyses statistiques n'ont pas montré d'augmentation significative de l'expression de p21.

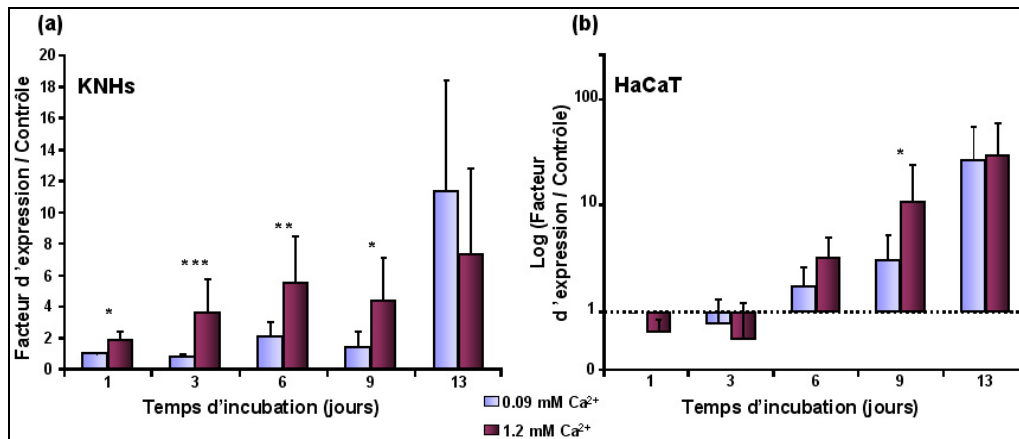
En HC, les KNHs présentent donc une induction de l'expression de p21 dès le premier jour ( $\times 2$ ,  $p < 0,05$ ). Cette induction reste significativement plus importante pour les trois temps suivants ( $\times 4,5$ ,  $p < 0,01$  au jour 3,  $\times 2,6$ ,  $p < 0,01$  au jour 6 et  $\times 3$ ,  $p < 0,05$  au jour 9). En revanche, au jour 13, l'expression génique de p21 est plus importante dans les KNHs cultivés en LC.

- HaCaT

- Dans les cellules HaCaT (Figure 52b) cultivées en LC, on observe une légère augmentation de l'expression de p21 à partir du jour 6 et jusqu'au jour 13 ( $\times 2$ ,  $p < 0,001$  entre les jours 1 et 6 et  $\times 9$ ,  $p < 0,01$  entre les jours 9 et 13).

En HC, les cellules HaCaT présentent un profil relativement similaire à celui observé en LC : l'augmentation de l'expression de p21 débute au jour 6 ( $\times 3$ ,  $p < 0,05$  entre les jours 1 et 6) jusqu'au jour 13.

Cependant, l'ajout de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le milieu de culture induit une augmentation de l'expression de p21, à partir du jour 6 ( $\times 1,5$ ). Cette augmentation est significative uniquement au jour 9 ( $\times 4$ ,  $p < 0,01$ ). Au dernier temps on observe un taux de transcrits quasiment identique quelque soit la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire.



**Figure 52 :** Profil d'expression génique de p21 dans les KNHs (a) et les cellules HaCaT (b).

Les données sont représentatives d'expérimentations distinctes et indépendantes :  $n=7$  pour les KNHs et  $n=5$  pour les cellules HaCaT.

- Etude comparative

- Dans les KNHs, l'augmentation de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  du milieu de culture entraîne donc une surexpression significative de p21 dès le jour 1 et pour les temps suivants, hormis au jour 13, où le taux de transcrits de p21 est supérieur dans les cellules cultivées en LC. Pour la lignée HaCaT, le profil d'expression de p21 est relativement similaire quelque soit la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  du milieu. Néanmoins, on observe une surexpression significative due à l'augmentation en  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire uniquement au jour 9. Dans les KNHs cultivés en HC et comparativement aux cellules HaCaT dans les mêmes conditions, une surexpression plus précoce de p21 est observée.

### 1.3.4. Expression des isoformes PPARs

Les PPARs sont des facteurs de transcription décrits comme étant impliqués dans plusieurs processus cellulaires, dont la différenciation kératinocytaire : nous avons donc suivi leur profil d'expression en fonction du temps et de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire dans les KNHs et les cellules HaCaT (Figure 53).

#### **I.3.4.1. PPAR $\alpha$**

- KNHs

- Les expérimentations de RT-PCR semi-quantitative en temps réel n'ont révélé aucune induction de PPAR $\alpha$  dans les KNHs (Figure 53a). En effet, l'augmentation de la concentration en Ca<sup>2+</sup> extracellulaire et le temps de culture n'influencent pas de manière significative l'expression de PPAR $\alpha$ .

- HaCaT

- Une augmentation régulière de l'expression de PPAR $\alpha$  (Figure 53d) dans la lignée HaCaT cultivée en LC est observée du jour 1 au jour 9 ( $\times 3$ ,  $p < 0,001$  entre les jours 1 et 9).

En HC, l'expression de PPAR $\alpha$  reste relativement constante à tous les temps, mais sans être surexprimée par rapport à LC.

#### **I.3.4.2. PPAR $\beta/\delta$**

- KNHs

- Le profil d'expression génique de PPAR $\beta/\delta$  dans les KNHs (Figure 53b) est relativement similaire à celui observé pour PPAR $\alpha$  : il n'y a pas d'induction significative de l'expression de PPAR $\beta/\delta$  en fonction du temps de culture ou de la concentration en Ca<sup>2+</sup> du milieu.

- HaCaT

- Le niveau d'expression de PPAR $\beta/\delta$  (Figure 53e) dans la lignée HaCaT cultivée en LC reste relativement constant jusqu'au jour 6. Une augmentation significative de l'expression de PPAR $\beta/\delta$  est observée à partir du jour 9 jusqu'au jour 13 ( $\times 3$ ,  $p < 0,05$  entre les jours 1 et 9 et  $\times 4$ ,  $p < 0,001$  entre les jours 9 et 13).

En HC, les cellules HaCaT présentent un profil d'expression de PPAR $\beta/\delta$  similaire à celui observé en LC : le niveau d'expression de PPAR $\beta/\delta$  reste relativement constant jusqu'au jour 6, puis augmente jusqu'au jour 13 ( $\times 5$ ,  $p < 0,001$  entre les jours 6 et 13).

L'augmentation de la concentration en Ca<sup>2+</sup> du milieu de culture n'induit donc pas de surexpression de PPAR $\beta/\delta$ . Pour chaque temps d'incubation, hormis au jour 1, l'expression de PPAR $\beta/\delta$  est plus importante dans les cellules cultivées en LC.

### I.3.4.3. PPAR $\gamma$

- KNHs

- L'expression de PPAR $\gamma$  (Figure 53c) dans les KNHs cultivés en LC reste constante du jour 1 au jour 9. Elle augmente uniquement au dernier temps ( $\times 3$ ,  $p < 0,01$  entre les jours 1 et 13).

En revanche, dans les KNHs cultivés en HC, le taux de transcrits de PPAR $\gamma$  augmente de manière régulière avec le temps d'incubation ( $\times 3$ ,  $p < 0,05$  entre les jours 1 et 3 et  $\times 2$ ,  $p < 0,05$  entre les jours 3 et 13).

Si l'on compare les deux profils, l'augmentation de la concentration en Ca<sup>2+</sup> extracellulaire entraîne une surexpression significative relativement précoce ( $\times 2$ ,  $p < 0,05$  au jour 3). Pour tous les temps suivants, le taux de transcrits de PPAR $\gamma$  est significativement plus important lorsque les KNHs sont cultivés en HC ( $\times 3$ ,  $p < 0,01$  au jour 6 ;  $\times 4$ ,  $p < 0,001$  au jour 9 et  $\times 3$ ,  $p < 0,01$  au jour 13).

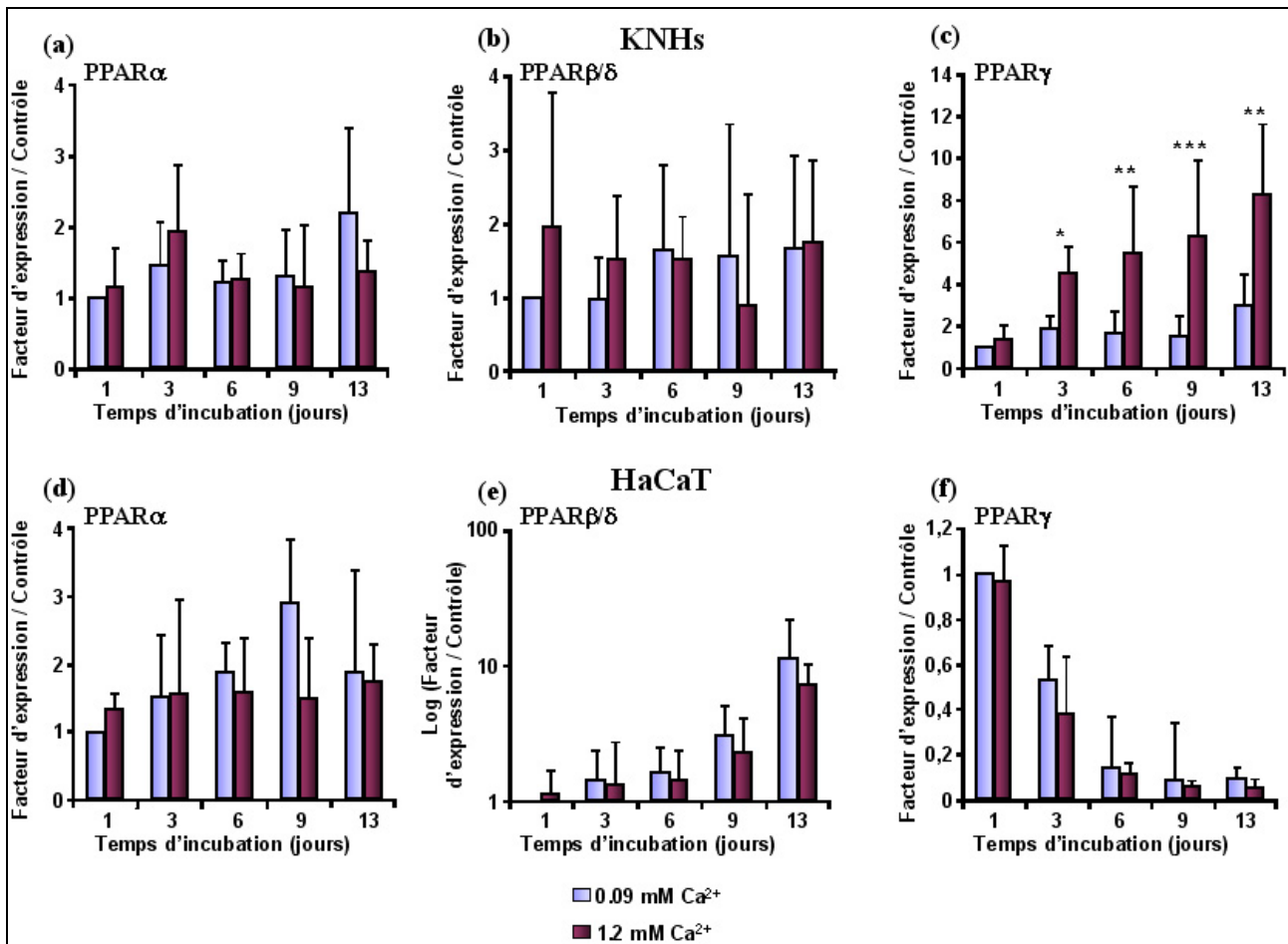
- HaCaT

- Pour la lignée HaCaT, le profil d'expression de PPAR $\gamma$  (Figure 53f) est totalement différent de celui obtenu avec les KNHs.

En LC, une diminution relativement précoce de l'expression de PPAR $\gamma$  dans les cellules HaCaT est observée ( $\times 0,5$ ,  $p < 0,05$  entre les jours 1 et 3). Cette diminution est également mise en évidence aux temps d'incubations suivants ( $\times 0,3$ ,  $p < 0,01$  entre les jours 3 et 6 ;  $\times 0,6$ ,  $p < 0,01$  entre les jours 6 et 9).

En HC, le même profil est observé : la diminution de l'expression de PPAR $\gamma$  s'opère dès le jour 3 ( $\times 0,4$ ,  $p < 0,01$  entre les jours 1 et 3 ;  $\times 0,3$ ,  $p < 0,001$  entre les jours 3 et 6 et  $\times 0,5$ ,  $p < 0,01$  entre les jours 6 et 9).

La diminution de l'expression de cette isoforme PPAR s'effectue donc en fonction du temps d'incubation des cellules. En revanche, elle est indépendante de la concentration en Ca<sup>2+</sup> du milieu de culture.



**Figure 53 :** Profil d'expression génique des isoformes PPARs dans les KNHs (a, b et c) et les cellules HaCaT (d, e et f).

Les données sont représentatives d'expérimentations distinctes et indépendantes : n=7 pour les KNHs et n=5 pour les cellules HaCaT.

- *Etude comparative*

- Pour les deux types cellulaires, l'augmentation de la concentration en Ca<sup>2+</sup> du milieu n'induit donc pas de surexpression de PPAR $\alpha$ .

- Pour l'isoforme PPAR $\beta/\delta$ , son expression reste constante quelque soit la concentration en Ca<sup>2+</sup> du milieu dans les KNHs. Dans les cellules HaCaT, le Ca<sup>2+</sup> extracellulaire n'a également aucun effet sur l'expression de PPAR $\beta/\delta$ . En revanche, indépendamment de la concentration en Ca<sup>2+</sup> du milieu, on observe une augmentation de son expression avec le temps d'incubation, ce qui n'est pas le cas dans les KNHs.

- Enfin, PPAR $\gamma$  est surexprimé dans les KNHs cultivés en HC, tandis que l'expression de cette isoforme PPAR diminue indépendamment de la concentration en Ca<sup>2+</sup> extracellulaire dans la lignée HaCaT.

### **I.3.5. Expression de gènes impliqués dans le métabolisme lipidique**

La différenciation kératinocytaire s'accompagne d'un relargage de lipides des corps lamellaires. Ce phénomène permet la mise en place de la barrière épidermique, comparable à un modèle de briques et de mortier, dans lequel les briques sont les cellules et le mortier les lipides intercellulaires (Elias, 1983).

Nous avons donc voulu observer dans nos conditions expérimentales le profil d'expression de plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme lipidique.

#### **I.3.5.1. DEGS2**

Le gène DEGS2 (*degenerative spermatocyte, drosophila, homolog of, 2*) code pour une enzyme à activité désaturase et hydrolase. DEGS2 intervient dans la régulation du niveau endogène des céramides (Mizutani *et al*, 2004).

- KNHs

- Le taux de transcrits de DEGS2 dans les KNHs (Figure 54a) cultivés en LC reste relativement constant entre les jours 1 et 3. Une augmentation de son expression est observée à partir du jour 6 ( $\times 9,4$ ,  $p < 0,05$  entre les jours 1 et 6). Cette augmentation est mise en évidence jusqu'au dernier temps d'incubation ( $\times 2$ ,  $p < 0,05$  entre les jours 6 et 9 et  $\times 6$ ,  $p < 0,05$  entre les jours 9 et 13).

En HC, une augmentation est observée à partir du jour 3 ( $\times 11$ ,  $p < 0,01$  entre les jours 3 et 13).

L'ajout de Ca<sup>2+</sup> dans le milieu de culture permet donc d'induire significativement l'expression de DEGS2 aux temps précoces ( $\times 10$ ,  $p < 0,01$  au jour 1 et  $\times 7$ ,  $p < 0,05$  au jour 3). A partir du jour 6, bien que l'augmentation constante de l'expression de DEGS2 soit mise en évidence, elle est relativement similaire à celle observée pour les KNHs cultivés en LC, hormis au dernier temps d'incubation ( $\times 109$  en LC contre  $\times 48$  en HC au jour 13).

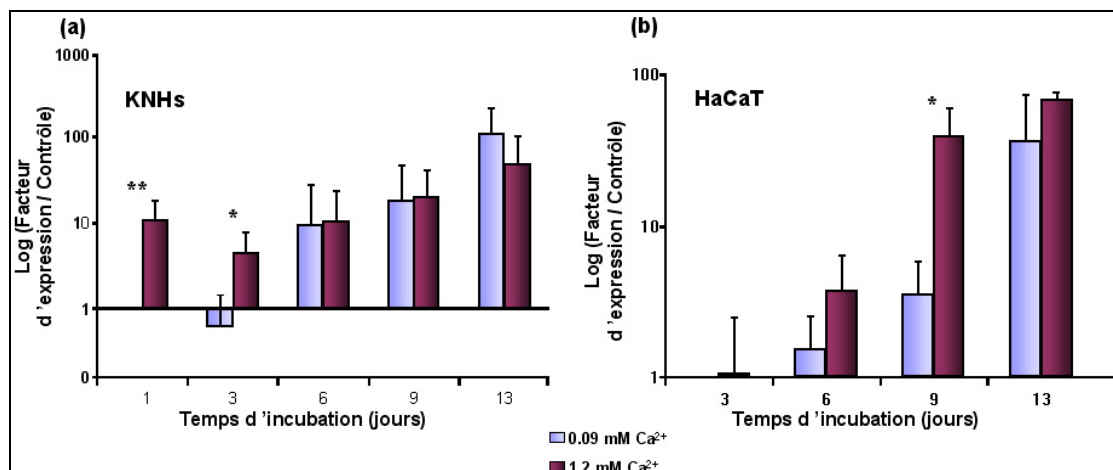
- HaCaT

- Pour les cellules HaCaT (Figure 54b), l'ARNm de DEGS2 n'est pas détecté au jour 1, indépendamment de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$ .

En LC, une augmentation régulière de l'expression de DEGS2 dans les cellules HaCaT est observée entre les jours 3 et 9 ( $\times 2$ ,  $p < 0,05$  entre les jours 3 et 6, puis entre les jours 6 et 9). Cette augmentation est mise en évidence jusqu'au jour 13 ( $\times 9$ ,  $p < 0,05$  entre les jours 9 et 13).

En HC, le profil d'expression de DEGS2 est similaire à celui observé en LC : l'augmentation du taux d'ARNm de DEGS2 est observée entre les jours 3 et 6 ( $\times 4$ ,  $p < 0,05$ ), jusqu'au dernier temps d'incubation ( $\times 10$ ,  $p < 0,01$  entre les jours 6 et 13).

Pour tous les temps d'incubation, l'ajout de  $\text{Ca}^{2+}$  permet donc une induction plus importante de l'expression de DEGS2 dans les cellules HaCaT. Bien que cette surexpression ne soit significative qu'au jour 9 ( $\times 10$ ,  $p < 0,05$ ), la comparaison des deux profils (LC et HC) met en évidence une surexpression de DEGS2 plus précoce lorsque les cellules sont cultivées en HC.



**Figure 54 :** Profil d'expression génique de DEGS2 dans les KNHs (a) et les cellules HaCaT (b).

Les données sont représentatives d'expérimentations distinctes et indépendantes :  $n=7$  pour les KNHs et  $n=5$  pour les cellules HaCaT.

- Etude comparative

Le profil d'expression de DEGS2 présente plusieurs points différents entre les deux types cellulaires. Tout d'abord, indépendamment de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$ , un retard dans l'expression de DEGS2 est observé pour la lignée HaCaT (ARNm non détecté au jour 1). Ensuite, l'induction significative de DEGS2, due à l'augmentation en  $\text{Ca}^{2+}$  du milieu, s'observe précocement (jours 1 et

3) dans les KNHs et plus tardivement (jour 9) dans les cellules HaCaT. Cependant, l'expression de DEGS2 est systématiquement plus importante pour tous les temps lorsque les cellules HaCaT sont cultivées en HC. En revanche, dans les KNHs, l'expression de DEGS2 est similaire à partir du jour 6, avant d'être finalement plus importante au jour 13 lorsque les KNHs sont cultivés en LC.

### **I.3.5.2. ABCG1**

Le gène ABCG1 (*ATP-binding cassette, subfamily G, member 1*) code pour une protéine impliquée dans le transport du cholestérol. Ce gène appartient à la superfamille des transporteurs ABC qui utilisent comme source d'énergie l'hydrolyse de l'ATP, afin de permettre le passage de composés divers à travers les membranes cellulaires (ions, sucres, acides aminés, vitamines, peptides, polysaccharides, hormones, lipides et xénobiotiques).

- KNHs

- Pour les KNHs (Figure 55a) cultivés en LC, une augmentation régulière de l'expression d'ABCG1 est observée avec le temps d'incubation. Cette augmentation est significative à partir du jour 6 ( $\times 3,6$ ,  $p < 0,01$  entre les jours 1 et 6), jusqu'au jour 13 ( $\times 12,4$ ,  $p < 0,001$  entre les jours 6 et 13). Dans les KNHs cultivés en HC, l'expression d'ABCG1 reste relativement constante jusqu'au jour 6, puis augmente de manière significative aux temps tardifs ( $\times 6$ ,  $p < 0,05$  entre les jours 1 et 9 et  $\times 10$ ,  $p < 0,01$  entre les jours 1 et 13).

Bien que le taux de transcrits d'ABCG1 soit supérieur aux temps précoces (jours 1 et 3) dans les KNHs cultivés en HC, l'augmentation de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire n'induit pas son expression de façon significative. Pour les deux temps suivants (jours 6 et 9), on observe un taux de transcrits similaire entre les deux conditions. Enfin, au dernier temps (jour 13), on observe une plus importante expression d'ABCG1 dans les KNHs cultivés en LC.

- HaCaT

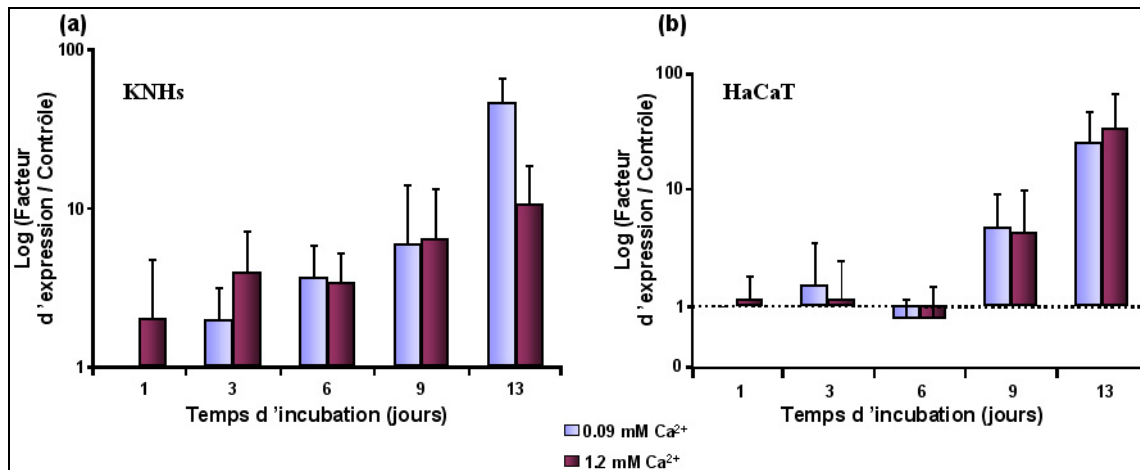
- Dans la lignée HaCaT (Figure 55b) cultivée en LC, l'expression du gène ABCG1 reste relativement constante entre les jours 1 et 6. Une augmentation significative et régulière du taux de transcrits est observée à partir du jour 9 ( $\times 6$ ,  $p < 0,01$  entre les jours 6 et 9 et  $\times 5$ ,  $p < 0,01$  entre les jours 9 et 13).

En HC, le profil d'expression génique d'ABCG1 est identique à celui observé en LC : l'augmentation de l'expression d'ABCG1 s'effectue à partir du jour 9 ( $\times 4$ ,  $p < 0,01$  entre les jours 1



et 9). Cette augmentation est mise en évidence jusqu'au dernier temps d'incubation ( $\times 33$ ,  $p < 0,01$  entre les jours 1 et 13).

L'analyse des deux profils ne montre donc aucune différence d'expression d'ABCG1 dans les cellules HaCaT.



**Figure 55 :** Profil d'expression génique d'ABCG1 dans les KNHs (a) et les cellules HaCaT (b).

Les données sont représentatives d'expérimentations distinctes et indépendantes :  $n=7$  pour les KNHs et  $n=5$  pour les cellules HaCaT.

- Etude comparative

Pour les deux types cellulaires, bien que le Ca<sup>2+</sup> n'induit pas de surexpression significative d'ABCG1, une augmentation de son taux de transcrits est observée tout au long de la cinétique. Contrairement aux cellules HaCaT, il semblerait cependant que le Ca<sup>2+</sup> puisse induire une surexpression d'ABCG1 aux temps précoces (jours 1 et 3) dans les KNHs. En revanche, au jour 13, bien que l'écart ne soit pas significatif, le taux de transcrits d'ABCG1 apparaît plus important lorsque les KNHs sont cultivés en LC ( $\times 45$  en LC contre  $\times 10$  en HC). De plus, la surexpression d'ABCG1 est induite plus précocement dans les KNHs, comparativement aux cellules HaCaT.

### 1.3.5.3. FATP4, ABCD1 et ADRP

Les gènes FATP4 (*fatty acid transporter member 4*), ABCD1 (*ATP-Binding Cassette, subfamily D, member 1*) et ADRP (*adipose differentiation-related protein*), codent pour des protéines impliquées dans le transport des acides gras à longues chaînes. FATP4 appartient à la famille des FATPs et intervient dans le transport des acides gras du milieu extracellulaire vers les

kératinocytes. Comme ABCG1, ABCD1 appartient à la superfamille des transporteurs ABC qui utilisent comme source d'énergie l'hydrolyse de l'ATP. Le gène ADRP code pour une protéine qui facilite le transport des acides gras à longues chaînes. Son expression est induite pendant la différenciation adipocytaire, mais aussi dans d'autres tissus pour lesquels il existe un métabolisme des triglycérides et des acides gras. De plus, le gène d'ADRP possède un élément de réponse aux PPARs dans sa région promotrice (PPRE).

- KNHs

- L'étude de l'expression du gène FATP4 (Figure 56a) dans des KNHs cultivés en LC fait apparaître une augmentation régulière tout au long de la cinétique ( $\times 4$ ,  $p < 0,01$  entre les jours 1 et 13).

En HC, c'est au jour 1 que l'expression du gène de FATP4 est la plus importante. Pour les temps suivants, l'expression de FATP4 reste relativement constante.

L'ajout de  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire permet donc une induction précoce et significative de l'expression de FATP4 dès le jour 1, comparativement aux KNHs cultivés en LC ( $\times 4$  au jour 1,  $p < 0,05$ ). Aux temps suivants, le taux d'expression de FATP4 est relativement équivalent dans les deux conditions de culture. En revanche, au jour 13, bien que non significative, l'expression de FATP4 apparaît plus importante lorsque les KNHs sont cultivés en LC ( $\times 4,4$  en LC contre  $\times 3,2$  en HC).

- En ce qui concerne l'expression génique d'ABCD1 (Figure 56b) dans les KNHs cultivés en LC, elle reste relativement constante pour tous les temps.

En HC, le même profil est observé : il n'y a pas de variations significatives de l'expression d'ABCD1 avec le temps de culture.

Pour les KNHs, l'expression d'ABCD1 reste donc constante aussi bien en fonction du temps que de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  du milieu de culture.

- L'analyse du profil d'expression génique d'ADRP (Figure 56c) dans les KNHs cultivés en LC révèle une augmentation de l'expression de ce gène avec le temps de culture ( $\times 4$ ,  $p < 0,01$  entre les jours 1 et 6 puis  $\times 8$ ,  $p < 0,05$  entre les jours 6 et 13), hormis au jour 9.

En HC, l'étude de l'expression d'ADRP fait apparaître une augmentation régulière avec le temps d'incubation ( $\times 9$ ,  $p < 0,001$  entre les jours 1 et 13).

L'expression génique d'ADRP n'est donc pas spécifiquement induite par l'augmentation de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  du milieu de culture. En effet, pour chaque temps, le taux de transcrits d'ADRP est relativement équivalent, hormis au jour 13, où l'expression d'ADRP apparaît plus importante dans les KNHs cultivés en LC.

- HaCaT

- Aucune augmentation de l'expression de FATP4 (Figure 56d) avec le temps d'incubation n'est observée dans la lignée HaCaT cultivée en LC. En effet, le taux de transcrits de FATP4 reste équivalent à celui du jour 1 tout au long de la cinétique.

En HC, l'expression de FATP4 reste relativement constante entre les jours 1 et 6. Ensuite, une augmentation régulière de son expression est mise en évidence à partir du jour 6 jusqu'au jour 13 ( $\times 3$ ,  $p < 0,001$  entre les jours 9 et 13).

Si on compare les profils LC et HC aux mêmes temps, on observe qu'une induction significative de FATP4 due à l'ajout de  $\text{Ca}^{2+}$  est détectée au jour 1 ( $\times 1,6$ ,  $p < 0,05$ ). Ce n'est pas le cas pour les jours 3 et 6, bien que le taux de transcrits de FATP4 soit légèrement supérieur dans les cellules cultivées en HC. Aux jours 9 et 13, on observe de nouveau une surexpression significative de FATP4 due à l'ajout de  $\text{Ca}^{2+}$ .

- En ce qui concerne l'expression d'ABCD1 (Figure 56e) dans la lignée HaCaT cultivée en LC, une augmentation régulière avec le temps a été mise en évidence ( $\times 5,3$ ,  $p < 0,001$  entre les jours 1 et 13).

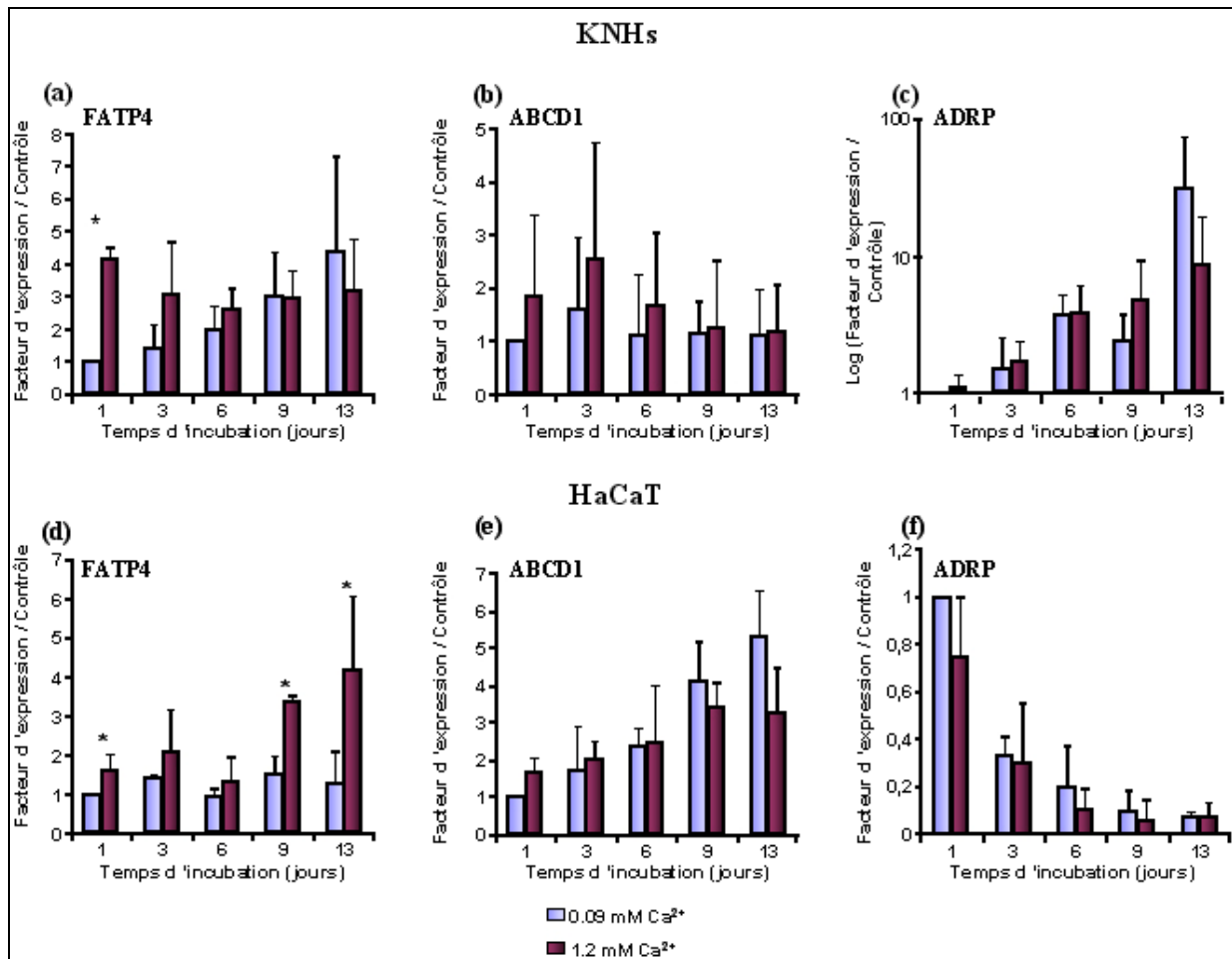
Un profil relativement similaire est observé dans les cellules HaCaT cultivées en HC, mais l'augmentation de l'expression génique d'ABCD1 atteint un seuil au jour 9 ( $\times 2$ ,  $p < 0,01$  entre les jours 1 et 9).

En revanche, pour les cellules HaCaT cultivées en HC, le taux de transcrits d'ABCD1 est inférieur pour les deux derniers temps d'incubation, comparativement aux cellules cultivées en LC.

- L'étude de l'expression d'ADRP (Figure 56f) dans les cellules HaCaT cultivées en LC, présente un taux maximal d'expression au premier jour d'incubation. En effet, pour les temps suivants, on observe une diminution de son expression jusqu'au jour 13.

En HC, le profil observé est identique : l'expression d'ADRP diminue avec le temps d'incubation des cellules HaCaT.

L'expression d'ADRP n'est donc pas régulée par l'augmentation de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  du milieu de culture. En revanche, son expression diminue avec le temps de culture.



**Figure 56 :** Profil d'expression génique de FATP4, d'ABCD1 et d'ADRP dans les KNHs (a, b et c) et les cellules HaCaT (d, e et f).

Les données sont représentatives d'expérimentations distinctes et indépendantes : n=7 pour les KNHs et n=5 pour les cellules HaCaT.

- Etude comparative

- Dans les KNHs, une induction significative et précoce de l'expression de FATP4 (jour 1), due à l'augmentation de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  du milieu de culture est donc observée. Cette induction se retrouve également dans les cellules HaCaT. En revanche, son expression est significativement plus importante aux jours 9 et 13 dans les cellules HaCaT cultivées en HC, ce qui n'est pas le cas pour les KNHs.

- Pour les deux types cellulaires cultivés en HC, le gène ABCD1 présente un profil d'expression très similaire à celui observé lorsque les cellules sont cultivées en LC. Les résultats obtenus démontrent qu'indifféremment du type cellulaire, aucune induction significative de l'expression de ce gène suite à l'ajout de  $\text{Ca}^{2+}$  n'est observée. En revanche, l'expression d'ABCD1 augmente avec le temps d'incubation pour la lignée HaCaT.

- Enfin, l'analyse des profils d'expression d'ADRP permet d'observer que l'augmentation de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  du milieu de culture n'entraîne pas de surexpression de ce gène, quelque soit le type cellulaire. De plus, le profil d'expression obtenu pour les KNHs est à l'opposé de celui obtenu pour la lignée HaCaT : indifféremment de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  du milieu de culture, on observe que l'expression d'ADRP dans des KNHs augmente avec le temps de culture, alors qu'elle diminue dans les cellules HaCaT.

#### **I.3.5.4. FIAF**

Le rôle biologique de FIAF (*fasting induced adipose factor*), est encore mal défini. Il semble impliqué dans le catabolisme lipidique, en inhibant la lipoprotéine lipase (LPL), une enzyme qui catalyse une lipoprotéine en une partie protéique et une partie lipidique. Comme ADRP, FIAF possède dans sa région promotrice un PPRE.

- KNHs

- L'expression génique de FIAF (Figure 57a) dans les KNHs cultivés en LC reste relativement constante pour tous les temps.

En HC, le même profil est observé : l'expression de FIAF reste relativement constante entre les jours 1 et 13.

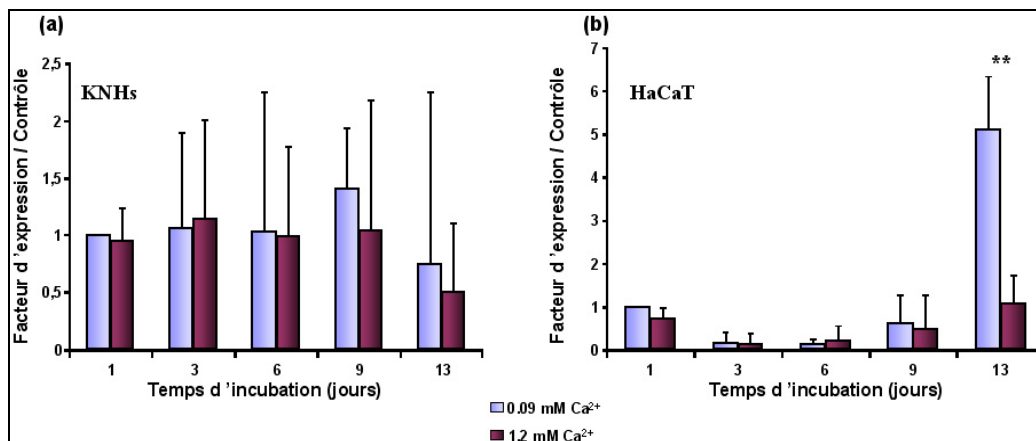
L'augmentation de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire n'influence donc pas l'expression de FIAF. De même, elle ne varie pas de manière significative avec le temps d'incubation.

- HaCaT

- L'analyse de l'expression génique de FIAF (Figure 57b) dans des cellules HaCaT cultivées en LC fait apparaître une diminution significative entre les jours 1 et 6 ( $\times 0,1$ ,  $p < 0,05$ ). Elle augmente entre les jours 6 et 13 ( $\times 51$ ,  $p < 0,001$ ).

En HC, un profil relativement similaire est observé : l'expression de FIAF diminue entre les jours 1 et 3 ( $\times 0,1$ ,  $p < 0,05$ ) puis elle augmente entre les jours 3 et 13 ( $\times 11$ ,  $p < 0,05$ ). Cependant, le taux de transcrits au jour 13 est équivalent à celui du jour 1.

L'augmentation de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  du milieu de culture n'induit donc pas de surexpression significative de FIAF. Au jour 13, on observe même que le taux de transcrits des cellules cultivées en LC est significativement plus important que dans les cellules cultivées en HC ( $\times 5$ ,  $p < 0,01$ ).



**Figure 57 :** Profil d'expression génique de FIAF dans les KNHs (a) et les cellules HaCaT (b).

Les données sont représentatives d'expérimentations distinctes et indépendantes ( $n=7$ ) pour les KNHs et 5 ( $n=5$ ) pour les cellules HaCaT.

- Etude comparative

Pour les deux types cellulaires, l'augmentation de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire n'influence pas de manière significative l'expression génique de FIAF. Cependant, des différences sont observables lorsqu'on compare les deux profils. Dans les KNHs, l'expression de FIAF reste relativement constante avec le temps d'incubation. Néanmoins, dans les cellules HaCaT, on observe d'abord une diminution puis une augmentation de l'expression de ce gène. Cette dernière est d'ailleurs significativement plus importante lorsque les cellules HaCaT sont cultivées en LC.

## **I.4. Expression protéique de marqueurs de différenciation**

Afin de valider les résultats obtenus en RT-PCR semi-quantitative en temps réel, et plus particulièrement ceux concernant l'expression génique de marqueurs « classiques » du processus de différenciation, nous avons également étudié l'expression protéique de trois marqueurs de différenciation (K1, K10 et involucrine) en fonction du temps et de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  du milieu de culture.

### **I.4.1. Kératines K1 et K10**

- *KNHs*

- Pour les KNHs cultivés dans un milieu LC, on observe une faible expression protéique de K1 (Figure 58a), relativement constante à tous les temps d'incubation.

Cette protéine s'exprime plus fortement lorsque les KNHs sont cultivés dans un milieu HC. En effet, en HC, le taux de K1 augmente après 3 jours de culture et reste supérieur pour les temps suivants, comparativement aux KNHs cultivés en LC.

Dans les KNHs, l'augmentation de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  permet donc une expression protéique de K1 plus importante dès le jour 3.

- En ce qui concerne l'expression protéique de K10 (Figure 58a), lorsque les KNHs sont cultivés en LC, une faible expression de la protéine est détectée aux jours 1, 3 et 6. Aux temps suivants, une augmentation de l'expression protéique de K10 est observée.

En HC et comparativement au milieu LC, une augmentation de l'expression de K10 est détectée dans les KNHs au jour 3 ainsi qu'au jour 6. Pour les temps plus tardifs (jours 9 et 13), l'expression protéique de K10 est relativement équivalente entre les deux conditions de culture.

L'augmentation de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  du milieu fait donc apparaître une surexpression protéique de K10 plus précoce dans les KNHs.

- *HaCaT*

- Une augmentation de l'expression protéique de K1 (Figure 58b) est observée à partir du jour 6 dans les cellules HaCaT cultivées en LC. Pour les temps suivants, le taux d'expression de K1 ne varie pas.

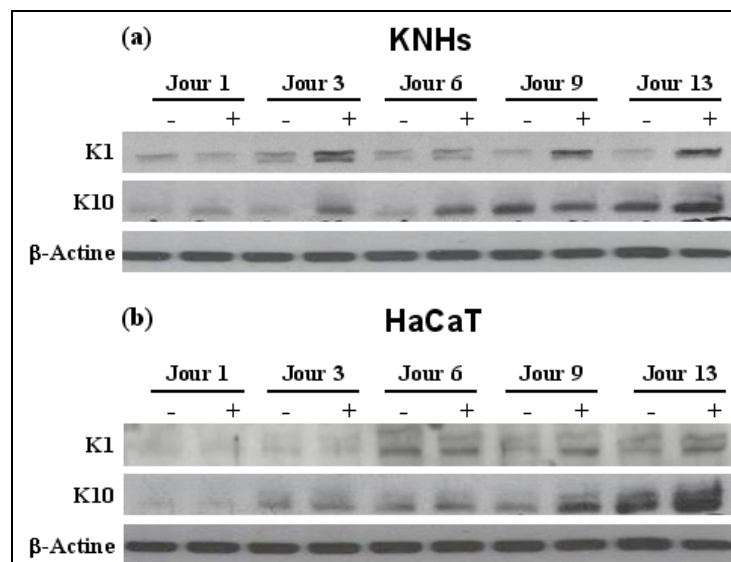
En HC, l'expression de K1 est également détectée au jour 6. En revanche, pour les temps suivants et comparativement aux cellules cultivées en LC, K1 présente un niveau d'expression plus important.

L'augmentation de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  du milieu met donc en évidence une surexpression protéique de K1 aux jours 9 et 13.

- Pour l'expression protéique de K10 (Figure 58b) dans la lignée HaCaT cultivée en LC, on observe tout d'abord une augmentation entre les jours 1 et 3. Aux jours 6 et 9, l'expression de K10 est équivalente à celle observée au jour 3. En revanche, au jour 13, l'expression protéique de K10 est augmentée.

En HC, une importante augmentation de l'expression protéique de K10 entre les jours 6 et 9 est observée dans les cellules HaCaT. Néanmoins, dès le jour 3 et comparativement aux cellules cultivées en LC, l'intensité de la bande représentative de la détection de K10 est plus prononcée dans les cellules cultivées en HC.

L'augmentation de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  du milieu révèle donc une surexpression protéique de K10 aux jours 9 et 13.



**Figure 58** : Profil de l'expression protéique des kératines K1 et K10 dans les KNHs (a) et les cellules HaCaT (b).

Cette figure représente l'analyse par Western Blot des kératines K1 et K10 dans les KNHs (a) et dans la lignée HaCaT (b) cultivés dans un milieu HC (+) ou LC (-) sur une période de 13 jours. La  $\beta$ -actine sert de témoin d'expression entre les différents échantillons. Ces résultats sont représentatifs de 3 expérimentations indépendantes.



- Etude comparative

- Pour les deux types cellulaires, l'augmentation de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  du milieu de culture permet donc une induction plus précoce de l'expression des kératines K1 et K10. Cependant, cette induction est retardée dans les cellules HaCaT, comparativement aux KNHs. En effet, l'expression protéique de K1 et de K10 augmente dès le jour 3 dans les KNHs cultivés en HC, alors que les cellules HaCaT nécessitent 9 jours d'incubation dans ce même milieu de culture pour révéler un taux d'expression protéique relativement équivalent.

#### **I.4.2. Involucrine**

- KNHs

- En LC, l'étude de l'expression protéique de l'involucrine (Figure 59a) montre un taux important de la protéine au jour 1, qui décroît jusqu'au jour 6. Mais à partir du jour 6 et jusqu'au dernier temps d'incubation, cette expression augmente.

En HC, un profil similaire est observé mais avec un taux d'expression plus important, comparativement aux KNHs cultivés en LC.

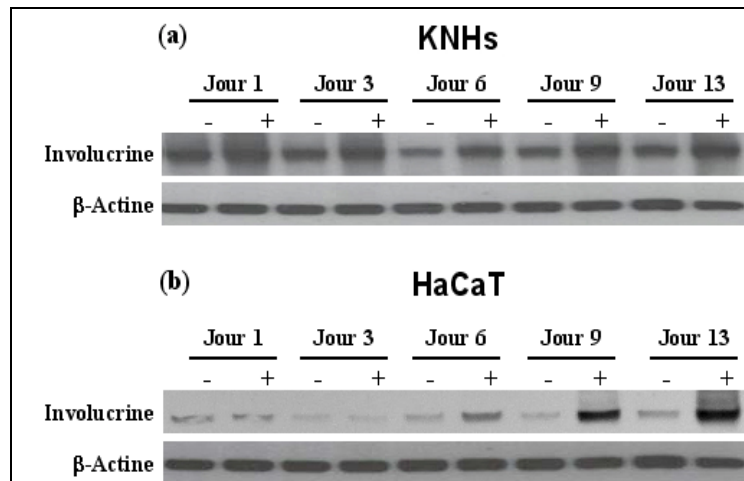
Dans nos conditions expérimentales, l'augmentation de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  du milieu ne met donc pas en évidence de surexpression protéique plus précoce de l'involucrine. Cependant le taux d'involucrine est systématiquement plus important lorsque les KNHs sont cultivés en HC.

- HaCaT

- En LC, l'expression de l'involucrine est détectée dès le jour 1 dans la lignée HaCaT (Figure 59b). Cette expression reste relativement constante jusqu'au jour 9. Ce n'est qu'au dernier temps d'incubation qu'une légère augmentation est observée.

En HC, au jour 1, le taux d'involucrine est relativement faible. C'est également le cas pour le jour 3. En revanche, une augmentation importante est observée à partir du jour 6. Cette augmentation est mise en évidence jusqu'au jour 13.

Le  $\text{Ca}^{2+}$  fait donc apparaître une surexpression de l'involucrine observée à partir du jour 6 et jusqu'au jour 13.



**Figure 59** : Profil de l'expression protéique de l'involucrine dans les KNHs **(a)** et cellules HaCaT **(b)**.

Cette figure représente l'analyse par Western Blot de l'involucrine dans les KNHs **(a)** et dans la lignée HaCaT **(b)** cultivés dans un milieu HC (+) ou LC (-) sur une période de 13 jours. Pour chaque type cellulaire, la  $\beta$ -actine sert de témoin d'expression entre les différents échantillons. Ces résultats sont représentatifs de 3 expérimentations indépendantes.

- Etude comparative

- L'augmentation de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  du milieu de culture fait donc apparaître une induction plus précoce de l'expression de l'involucrine pour les deux types cellulaires. Mais comparativement aux KNHs, cette induction est retardée dans les cellules HaCaT. En effet, l'expression protéique de l'involucrine est systématiquement supérieure à tous les temps lorsque les KNHs sont cultivés en HC, alors qu'il faut 6 jours d'incubation aux cellules HaCaT, dans ces mêmes conditions de culture, pour observer une augmentation de l'expression protéique de l'involucrine.

## **II. Fractionnement par SdFFF de la lignée HaCaT**

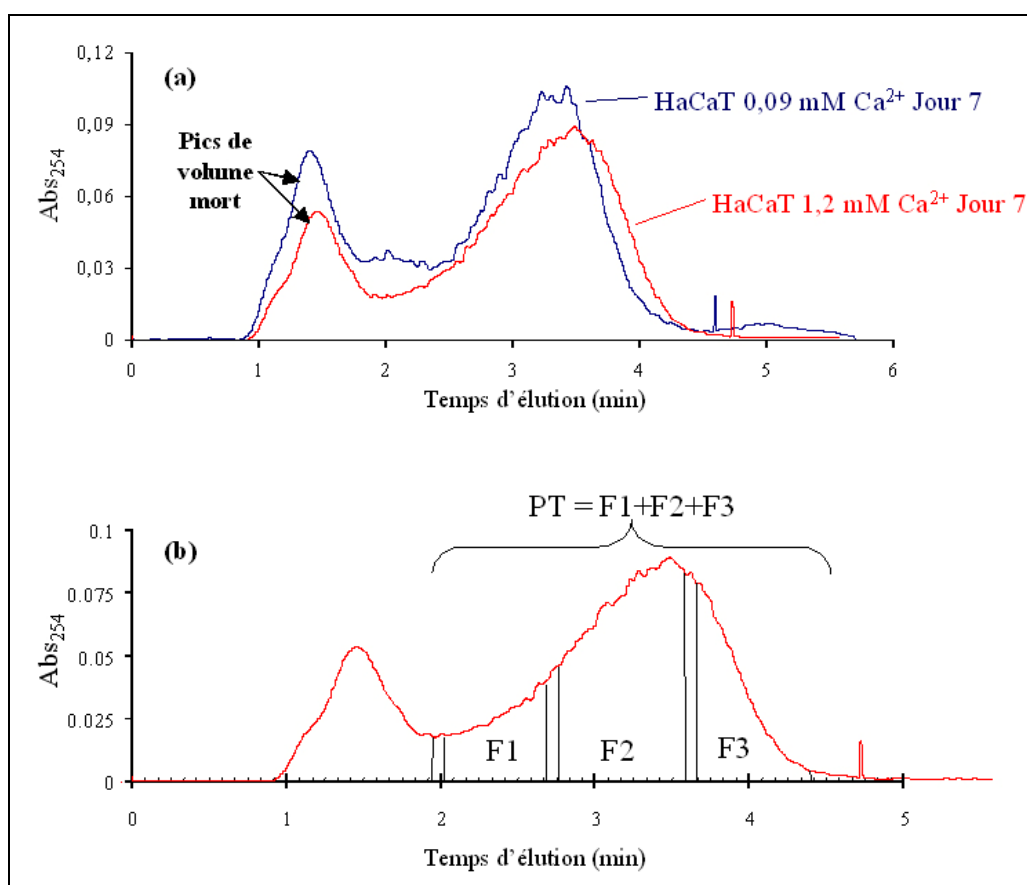
Précédemment, nous avons montré que lorsque les KNHs sont cultivés en HC, la différenciation est induite, accompagnée d'un fort ralentissement de leur activité proliférative. Dans cette étude, nous avons également démontré que la lignée HaCaT, cultivée en HC, et comparativement aux cellules cultivées en LC, a une activité proliférative plus importante et exprime plus fortement les marqueurs de différenciation K1, K10 et involucrine. Cette augmentation de l'activité métabolique des cellules HaCaT en milieu HC ne correspond pas aux résultats attendus pour un processus classique de différenciation kératinocytaire. Pour analyser ce comportement « hyperprolifératif » des cellules HaCaT en milieu HC, nous avons fractionné cette population cellulaire par la technique de SdFFF. Ce fractionnement a pour objectif de mettre en évidence différentes sous-populations, éventuellement des cellules différenciées et des cellules proliférantes.

Pour ces expérimentations, les cellules HaCaT sontensemencées à une densité de 30000 cellules / cm<sup>2</sup>, en flacon de culture de 75 cm<sup>2</sup>. Après 7 jours de culture en milieu LC ou HC, les cellules sont décollées puis concentrées à 1,5×10<sup>6</sup> cellules / ml dans du PBS. Elles sont ensuite triées par SdFFF.

### **II.1. Profil d'élution et fractionnement des cellules HaCaT**

En ce qui concerne les profils d'élution (Figure 60a), une grande similarité entre les cellules cultivées en LC et celles cultivées en HC est mise en évidence. Dans les deux cas, on observe un seul pic correspondant à l'élution des cellules. Néanmoins, un décalage temporel au niveau de l'élution des cellules traitées avec 1,2 mM Ca<sup>2+</sup> est systématiquement retrouvé (Tableau 9).

La collecte des différentes fractions (F1, F2 et F3) est schématisée sur la figure 60b. Les différents temps de collecte pour chaque fraction sont donnés dans le tableau 9. Pour chaque échantillon (LC ou HC), une collecte de pool total (LC-PT et HC-PT) est également effectuée.



**Figure 60** : Profils d'élution **(a)** et collecte **(b)** des différentes fractions.

**(a)** Cette figure schématise les fractogrammes obtenus après élution des cellules HaCaT cultivées avec (rouge) ou sans (bleu) ajout de  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire. **(b)** Profil d'élution des cellules HaCaT cultivées à 1,2 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire et représentation schématisée des fractions F1, F2 et F3.

Echantillons	Temps de collecte
LC-PT	2'00 – 4'00
HC-PT	1'55 - 4'20
F1	1'55 – 2'40
F2	2'45 – 3'35
F3	3'40 – 4'20

**Tableau 9** : Temps de collecte des différentes fractions.

## II.2. Activité proliférative après fractionnement par SdFFF

L'objectif de ces expérimentations était d'observer le profil de l'activité proliférative après fractionnement par SdFFF de la lignée HaCaT cultivée dans un milieu HC.

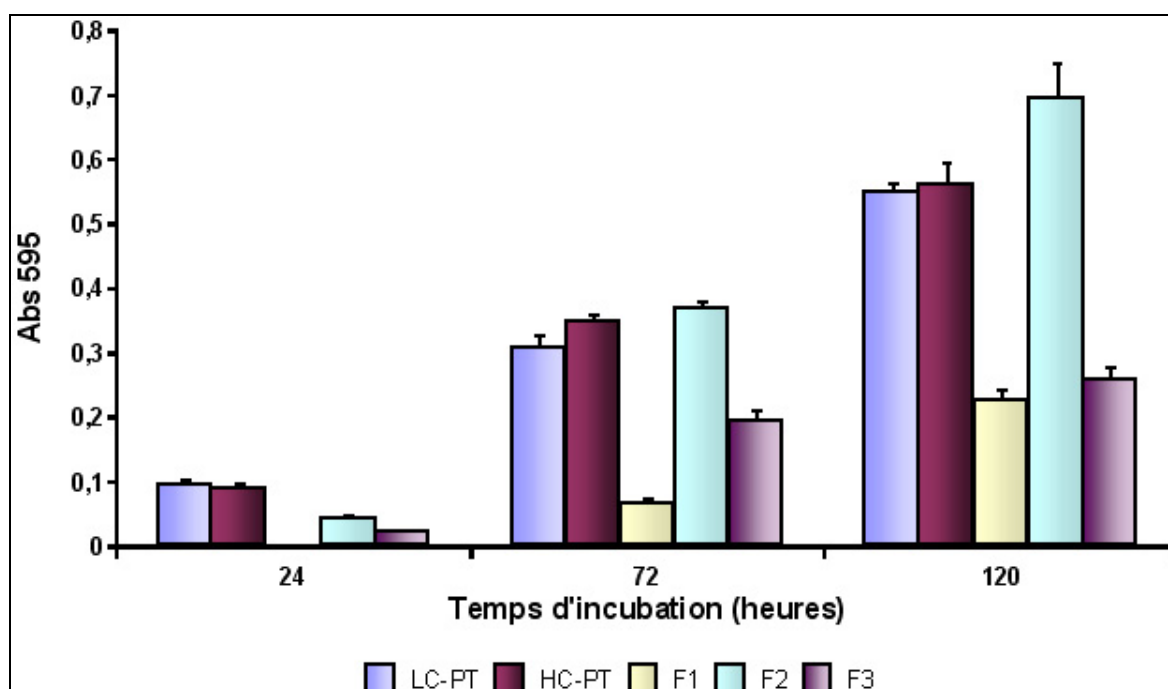
Pour cela, les différentes fractions ainsi que les pools totaux sont comptés par la technique du bleu trypan puis réensemencés en plaque 96 puits à une densité de 3000 cellules / puits. L'activité proliférative est mesurée par la technique du MTT ( $Abs_{550}$ ) à 24h, 72h et 120h après réensemencement (Figure 61).

Les profils des pools totaux LC-PT et HC-PT sont très similaires. Pour ces deux échantillons, le nombre de cellules augmente de façon relativement régulière avec le temps d'incubation.

Le profil obtenu pour la fraction F2 est très similaire à celui des pools totaux à 24h et 48h. En revanche, au bout de 120h après réensemencement, F2 possède une activité proliférative supérieure à ceux des pools totaux.

La fraction F1 ne présente pas d'activité métabolique après 24h ( $Abs_{550}=0,003$ ). Il faut attendre 120h d'incubation pour observer une augmentation de l'activité proliférative de cette fraction ( $Abs_{550}=0,228$ ).

En ce qui concerne la fraction F3, son profil se situe entre ceux de F1 et de F2. En effet, à 24h, l'activité proliférative de F3 est similaire à celle de F1 ( $Abs_{550}=0,022$ ). A 72h, le nombre de cellules de F3 a nettement augmenté ( $Abs_{550}=0,197$ ). Cette augmentation continue après 120h d'incubation ( $Abs_{550}=0,257$ ), mais elle est moins prononcée que celle obtenue pour la fraction F1 entre 72 et 120h. En fait, si l'on compare les profils des fractions F1 et F3, un « pic d'activité proliférative » s'effectue majoritairement entre 72 et 120h pour F1, alors qu'il s'établit plutôt entre 24 et 72h pour F3.



**Figure 61** : Etude de l'activité proliférative de la lignée HaCaT après fractionnement par SdFFF.

L'activité proliférative de la lignée HaCaT après fractionnement par SdFFF est analysée par la technique du MTT. Les cellules ont été réensemencées à raison de 3000 cellules / puits, dans un milieu à 0,09 mM  $\text{Ca}^{2+}$  pour l'échantillon LC-PT et dans un milieu à 1,2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  pour l'échantillon HC-PT et les trois fractions F1, F2 et F3. Les données sont représentatives d'expérimentations indépendantes (n=3).

Le fractionnement par SdFFF de cellules HaCaT cultivées en HC nous a donc permis de mettre en évidence trois sous-populations cellulaires, dont deux, F1 et F3, présentent une activité proliférative moins importante par rapport à la fraction F2.

### **II.3. Expression génique de marqueurs de différenciation (K1, K10, involucrine et TG-1) après fractionnement par SdFFF**

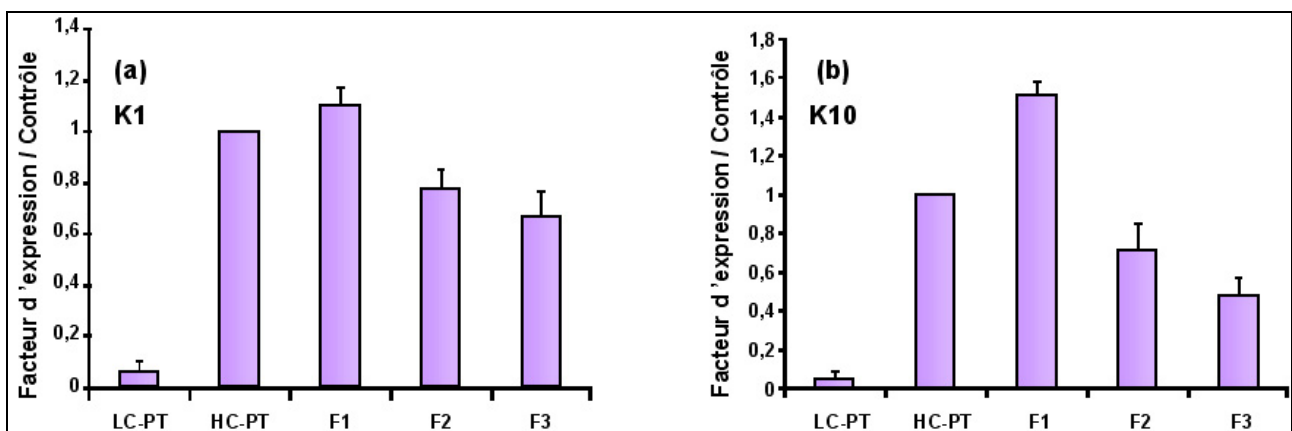
Ici, l'objectif a été d'analyser, sur la lignée HaCaT cultivée en HC, l'expression de marqueurs de différenciation dans chacune des fractions obtenues après fractionnement par SdFFF. Pour cela, des expérimentations de RT-PCR semi-quantitative en temps réel ont été effectuées sur les différents échantillons collectés après fractionnement par SdFFF. Les facteurs d'expression ont été calculés par rapport à la valeur d'expression de l'échantillon HC-PT, qui est donc utilisé dans notre cas comme « taux basal » d'expression toujours égal à 1.

### II.3.1. Expression des kératines K1 et K10

En ce qui concerne l'expression de K1 (Figure 62a), on peut observer que la fraction F1 présente un niveau d'expression de ce marqueur supérieur à HC-PT ( $\times 1,11$  pour F1 contre  $\times 0,77$  pour F2 et  $\times 0,67$  pour F3).

Pour K10 (Figure 62b), le même profil d'expression est observé : F1 possède un taux de transcrite supérieur à HC-PT ( $\times 1,52$  pour F1 contre  $\times 0,72$  et  $0,48$  pour F2 et F3, respectivement).

En revanche, l'expression de ces deux marqueurs dans l'échantillon LC-PT est très inférieure à celle obtenue pour HC-PT ( $\times 0,07$  et  $\times 0,05$  pour K1 et K10, respectivement).



**Figure 62** : Expression génique des kératines K1 (a) et K10 (b) après fractionnement par SdFFF.

Les données sont représentatives de 3 expérimentations distinctes et indépendantes (n=3).

Pour ces deux marqueurs, on a donc un taux de transcrits majoritairement concentré dans la fraction F1.

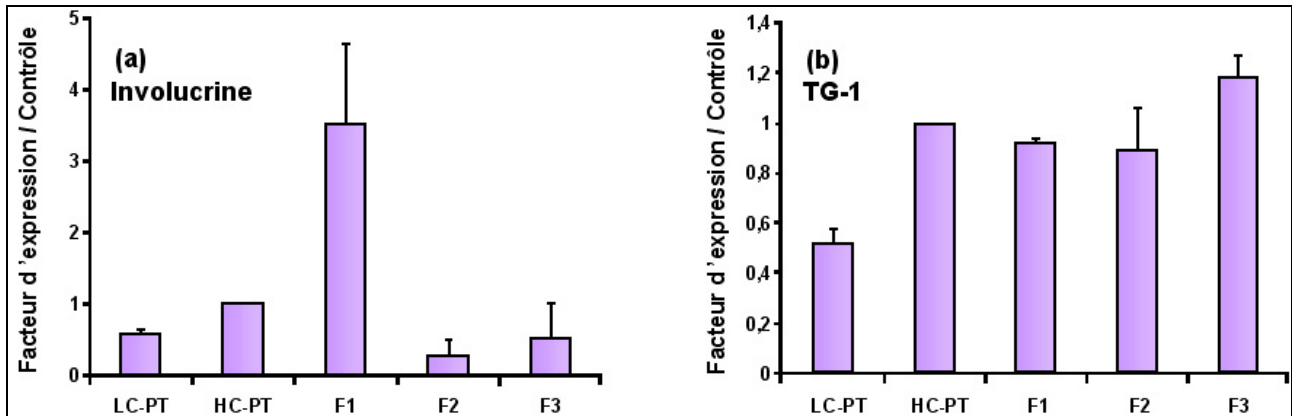
### II.3.2. Expression de l'involucrine et de la transglutaminase-1

Pour l'involucrine (Figure 63a), on observe que l'expression de ce marqueur est très nettement supérieure dans la fraction F1 par rapport à l'échantillon HC-PT ( $\times 3,51$ ). Pour les fractions F2 et F3, le taux de transcrits détecté est inférieur à celui de HC-PT ( $\times 0,27$  et  $\times 0,52$  pour F2 et F3, respectivement).

En ce qui concerne l'expression de la TG-1 (Figure 63b), aucune différence majeure n'est observée entre les différentes fractions, bien que F3 présente un facteur d'expression légèrement plus important par rapport à HC-PT ( $\times 1,18$ ). En revanche, les fractions F1 et F2 présentent un

niveau d'expression légèrement plus faible que celui détectée pour HC-PT ( $\times 0,92$  pour F1 et  $\times 0,89$  pour F2).

Au niveau de l'échantillon LC-PT, l'expression de ces deux marqueurs est inférieure à celle de l'échantillon HC-PT ( $\times 0,82$  et  $\times 0,52$  pour l'involucrine et la TG-1, respectivement).



**Figure 63 :** Expression génique de l'involucrine (a) et de la transglutaminase-1 (b) après SdFFF.

Les données sont représentatives d'expérimentations distinctes et indépendantes (n=3).

La fraction F1 est donc celle où le taux de transcrits d'involucrine est le plus concentré. Cependant, pour la TG-1, aucune différence de taux d'expression entre les différentes fractions n'est observée.

## II.4. Répartition des cellules dans le cycle cellulaire après SdFFF

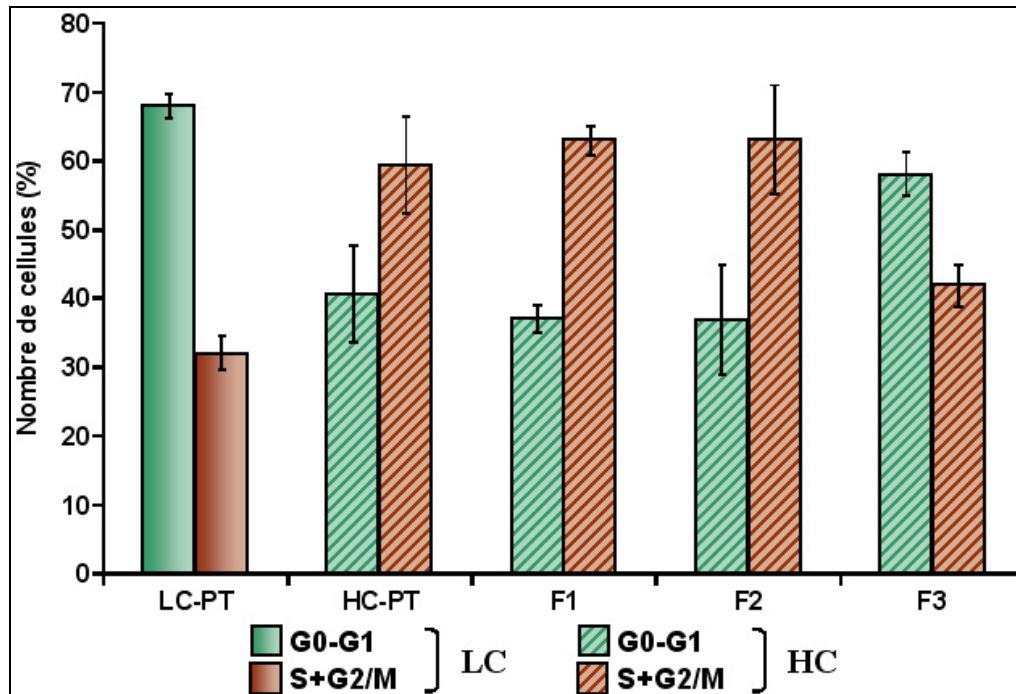
Suite au tri des cellules HaCaT par SdFFF, des expérimentations de cycle cellulaire ont été réalisées, afin d'observer la répartition des cellules dans le cycle cellulaire des différentes fractions (Figure 64).

Au niveau des échantillons LC-PT et HC-PT, la répartition des cellules dans le cycle est très similaire à celle observée précédemment après 6 jours de culture (Figure 48). En effet, on retrouve 68% de la population cellulaire de LC-PT en phase G0-G1 et 32% en S-G2/M (contre 65,6% en G0-G1 et 34,4% dans des cellules HaCaT cultivées en LC au jour 6). En ce qui concerne l'échantillon HC-PT, 41% des cellules sont en G0-G1 et 59% en S-G2/M (contre 46% en G0-G1 et 54% en S-G2/M dans des cellules HaCaT cultivées en HC au jour 6). Le passage des cellules en SdFFF n'affecte donc pas la répartition des cellules HaCaT dans le cycle cellulaire.

Les profils de répartition cellulaire des fractions F1 et F2 sont identiques et sont également très similaires avec celui de HC-PT. Ce n'est pas le cas pour la fraction F3, dans laquelle la



répartition cellulaire est plus importante en G0-G1 (58%), comparativement aux deux autres fractions et au pool total HC-PT.



**Figure 64** : Répartition des cellules HaCaT dans les différentes phases du cycle cellulaire après fractionnement par SdFFF.

Pour ces expérimentations, les cellules HaCaT ont étéensemencées à la même densité ( $3 \times 10^4$  cellules /  $\text{cm}^2$ ) et cultivées dans un milieu LC ( $0,09 \text{ mM Ca}^{2+}$ ) ou HC ( $1,2 \text{ mM Ca}^{2+}$ ) pendant 7 jours. Après fractionnement par SdFFF, la distribution cellulaire a été déterminée par un marquage IP suivi d'une analyse en CMF. Les données sont représentatives d'expérimentations distinctes et indépendantes ( $n=3$ ).

Le pool total HC-PT ainsi que les fractions F1 et F2 ont donc un profil de répartition des cellules dans le cycle cellulaire identique, contrairement à celui observé pour la fraction F3.

## DISCUSSION

Les kératinocytes normaux humains (KNHs), issus de résectats de peau humaine saine, ainsi que les cellules HaCaT, provenant de kératinocytes humains spontanément immortalisés, sont les deux types cellulaires majoritairement utilisés pour l'étude et la compréhension *in vitro* des mécanismes biologiques des kératinocytes humains. Pour ces deux types cellulaires, le processus de différenciation peut être induit en augmentant la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  dans le milieu de culture (Fuchs, 1990 ; Garach-Jehoshua *et al*, 1998). Les mécanismes impliqués dans la prolifération et la différenciation des KNHs *in vitro* ne sont pas encore totalement élucidés. Cela est dû, en partie, à la complexité de leur mise en culture (obtention difficile de résectats de peau humaine, temps de croissance lent et co-culture avec des fibroblastes). Pour ces raisons, la lignée cellulaire HaCaT est quelquefois utilisée en tant que modèle de kératinocytes. Dans les cellules HaCaT, *in vitro*, on retrouve une certaine organisation épidermique (Schoop *et al*, 1999) : ces cellules sont capables de proliférer et de se différencier (Boukamp *et al*, 1988). Il a également été démontré que leur transplantation sur une souris nude se traduit par la formation d'un épiderme (Breitkreutz *et al*, 1998). Cependant, le processus de différenciation kératinocytaire implique un ensemble complexe d'évènements caractérisés notamment par une balance très fine entre la prolifération et la différenciation. Du fait de leur immortalisation, nous avons cherché à savoir si les cellules HaCaT pouvaient être réellement considérées comme un modèle alternatif aux KNHs pour l'étude *in vitro* du passage d'un état prolifératif vers un état différencié. Dans notre étude, sur les deux modèles cellulaires, KNHs et HaCaT, nous avons induit le processus de différenciation en augmentant la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le milieu de culture. Dans la littérature, il existe une très grande variabilité des conditions employées pour la culture des KNHs et des cellules HaCaT. C'est pourquoi, pour pouvoir comparer le comportement des deux types cellulaires, nous avons fait le choix de mener nos expérimentations en utilisant des conditions de culture strictement identiques.

Pour cette étude, nous nous sommes intéressés, dans un premier temps, à l'effet du  $\text{Ca}^{2+}$  sur la prolifération, les changements morphologiques et la répartition dans le cycle cellulaire. Dans un second temps, nous avons comparé les profils d'expression génique et protéique de plusieurs marqueurs de différenciation. Les profils d'expression génique des isoformes PPARs, de gènes impliqués dans le métabolisme lipidique, de la kératine K5 et de p21 ont également été effectués. Enfin, dans un troisième temps, nous avons effectué un fractionnement des cellules HaCaT cultivées dans un milieu HC par la technique de SdFFF, dans le but de séparer les cellules

différenciées, qui ne prolifèrent plus, des cellules non différenciées, qui maintiennent une activité proliférative.

### **Prolifération, changements morphologiques et répartition dans le cycle cellulaire**

Cultivés dans un milieu LC ( $<0,1$  mM  $\text{Ca}^{2+}$ ), les KNHs prolifèrent sans se stratifier, les contacts intercellulaires sont peu nombreux et la formation des desmosomes n'est pas induite (Watt *et al*, 1984). Ces changements morphologiques observables en microscopie à contraste de phase ont été, en partie, confirmés par nos observations : en LC, les KNHs prolifèrent en « monocouche » et atteignent la confluence au jour 6. En revanche, lorsqu'ils sont cultivés en HC (1,2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ), les KNHs n'atteignent jamais un état de confluence. Dans ces conditions de culture, certains changements morphologiques sont observés : augmentation des contacts intercellulaires ou encore mise en place d'une organisation épidermique représentée par une structure en forme de « feuillets stratifiés », démontrant l'effet du  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire sur l'adhésion intercellulaire. De plus, la prolifération des KNHs est très nettement diminuée, ce qui est en accord avec le processus de différenciation. En effet, l'augmentation de la concentration extracellulaire en  $\text{Ca}^{2+}$  peut initier la différenciation terminale et diminuer la prolifération des KNHs (Kolly *et al*, 2005). Contrairement à des travaux qui démontrent que la différenciation kératinocytaire est intrinsèquement liée à un arrêt des cellules en phase G0-G1 (Missero *et al*, 1996), nous n'avons observé aucun changement dans la répartition des KNHs dans les différentes phases du cycle cellulaire. Dans nos expérimentations, 75% des cellules cultivées en LC sont en phase G0-G1 dès le jour 3. Ce pourcentage, déjà très important, pourrait expliquer pourquoi nous n'avons pas pu observer une augmentation significative lorsque les KNHs sont cultivés en HC.

Lorsque les cellules HaCaT sont cultivées dans un milieu LC, le profil de prolifération est similaire à celui observé pour les KNHs dans les mêmes conditions. Les cellules atteignent la confluence à partir du jour 6 et 65,6% d'entre elles sont en phases G0-G1. En HC, bien que l'augmentation de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire induise des changements morphologiques comparables à ceux observés pour les KNHs dans les mêmes conditions, les cellules HaCaT ont un taux de prolifération supérieur à celui observé en LC. Cela s'observe très nettement à partir du jour 6. En HC, la majorité des cellules sont en phase S/G2-M tout au long de la cinétique, signifiant une population majoritairement proliférante.

Bien que le taux de prolifération plus important des cellules HaCaT cultivées en HC soit en contradiction avec un processus de différenciation, des observations similaires ont déjà été rapportées. Dans cette étude, les deux types cellulaires, KNHs et HaCaT, étaient également cultivés dans des conditions strictement identiques et relativement proches de celles que nous avons utilisées (Walker *et al*, 2006). D'autres travaux ont décrit ce phénomène « d'hyperprolifération », en particulier dans des kératinocytes d'origine canine : le taux de prolifération en HC (1,8 mM Ca<sup>2+</sup>) était supérieur à celui observé pour des kératinocytes canins cultivés en LC (0,06 mM Ca<sup>2+</sup>) (Kolly *et al*, 2005). L'hyperprolifération des cellules HaCaT cultivées en HC est donc corrélée avec l'augmentation de la concentration en Ca<sup>2+</sup> du milieu de culture. En effet, il a été démontré que l'exposition de KNHs à des concentrations physiologiques de Ca<sup>2+</sup> (entre 1 et 1,5 mM) induisait une augmentation de la concentration du calcium intracellulaire (Ca<sub>i</sub>) et l'activation de S100C/A11, un membre de la famille des protéines S100 qui fixent le Ca<sup>2+</sup>. Cette activation est à l'origine de toute une cascade d'évènements moléculaires qui résultent au final à l'induction de p21 et donc au ralentissement de la prolifération cellulaire. En revanche, pour obtenir le même effet sur les cellules HaCaT, une concentration en Ca<sup>2+</sup> extracellulaire comprise entre 5 et 10 mM est nécessaire (contre 1,2 mM dans nos expérimentations) (Sakaguchi *et al*, 2003). Cela pourrait suggérer que la lignée HaCaT, durant le processus de transformation spontanée qui a entraîné son immortalisation, aurait modifié sa réponse au Ca<sup>2+</sup> extracellulaire. En conséquence, cette lignée serait devenue beaucoup moins sensible au Ca<sup>2+</sup>, qui, habituellement, provoque une diminution de la prolifération lors de la mise en place du processus de différenciation kératinocytaire.

### **Expression des marqueurs de différenciation**

*In vivo*, l'expression des kératines K1 et K10, marqueurs de la différenciation kératinocytaire, est initiée dès la première couche suprabasale de la *stratum spinosum* (Schweizer and Winter, 1983 ; Eichner *et al*, 1986). Elles sont ainsi qualifiées de marqueurs de différenciation précoces. De plus, ces kératines ont été décrites comme étant fortement impliquées dans la régulation complexe et très coordonnée du programme génique mis en place dans les processus de prolifération et de différenciation kératinocytaire (Paramio *et al*, 1999 ; Pivarcsi *et al*, 2001). En revanche, l'expression de l'involucrine débute dans les couches supérieures du *stratum spinosum* avant d'être maximale dans les kératinocytes du *stratum granulosum* (Eckert and Green, 1986), lui conférant ainsi un statut de marqueur de différenciation plus tardif, comparativement à K1 et K10. La filaggrine est également considérée comme un marqueur tardif de la différenciation

kératinocytaire. En effet, elle est tout d'abord synthétisée sous la forme d'un précurseur, la profilaggrine, dont l'expression s'effectue principalement au niveau du *stratum granulosum* pour former, en partie, les granules de kératohyaline (Fleckman *et al*, 1985). La transglutaminase-1 (TG-1) est une enzyme dont l'activité est indispensable à la mise en place de l'enveloppe cornée. Sa localisation *in vitro* est majoritaire dans les couches les plus différenciées de l'épiderme (Thacher and Rice, 1985). Elle peut donc être également considérée comme un marqueur tardif de la différenciation kératinocytaire. *In vitro*, l'expression de ces cinq marqueurs « classiques » de la différenciation kératinocytaire est très finement régulée par l'augmentation de la concentration en  $Ca^{2+}$  extracellulaire du milieu de culture.

Dans nos expérimentations, lorsque les KNHs sont cultivés en LC, les ARNm des kératines K1 et K10, de l'involucrine, de la filaggrine et de la TG-1 sont détectés au jour 1, ce qui leur confère un « taux d'expression basal » dès le premier temps de notre cinétique. Une augmentation progressive de leur expression génique est observée avec le temps. Globalement, c'est au jour 6, lorsque le tapis cellulaire atteint la confluence, que l'augmentation de l'expression génique des marqueurs de différenciation étudiés est la plus prononcée. De même, l'augmentation de l'expression protéique de K10 est clairement mise en évidence au jour 9, bien qu'elle présente un retard comparativement à son expression génique. En revanche, l'expression protéique de l'involucrine est mise en évidence dès le jour 1 dans des KNHs cultivés en LC. Ces résultats sont en accord avec des études antérieures, qui ont démontré que la confluence, caractérisée par une forte densité cellulaire et un recouvrement total du support de culture, joue un rôle important dans l'engagement des kératinocytes dans le processus de différenciation. En effet, l'augmentation de l'expression de marqueurs précoces de la différenciation kératinocytaire, tels que K1 et K10, est initiée lorsque la densité cellulaire des KNHs est suffisante pour atteindre la confluence (Poumay and Pittelkow, 1995 ; Poumay *et al*, 1999 ; Kolly *et al*, 2005). L'involucrine, marqueur tardif de la différenciation, est mise en évidence à post-confluence dans les KNHs (Poumay *et al*, 1999 ; Smits *et al*, 2000). Cependant, la prolifération en « monocouche » des KNHs cultivés dans un milieu LC n'empêche pas l'expression protéique de l'involucrine (Watt, 1984), ce qui suggère également que ce marqueur s'exprime selon une disposition en « mosaïque », c'est-à-dire que les cellules qui l'expriment sont juxtaposées de façon hétérogène.

Lorsque les KNHs sont cultivés en HC, les profils d'expression génique des kératines K1, K10, de l'involucrine, de la filaggrine et de la TG-1 montrent un taux transcriptionnel plus important comparativement aux KNHs cultivés en LC. Pour chacun de ces marqueurs, l'induction

de leur expression génique est globalement significative aux temps précoces de la cinétique (jours 1 et / ou 3). De plus, les profils protéiques observés pour les trois marqueurs que sont les kératines K1, K10 et l'involucrine, corrélient avec l'induction de l'expression de leurs ARNm respectifs, conformément à la mise en place d'un processus de différenciation kératinocytaire induit par addition de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Pour les cellules HaCaT cultivées en LC, il est tout d'abord important de noter que le « taux d'expression basal » des ARNm des kératines K1 et K10 n'est observé qu'à partir du jour 3. Pour les kératines K1 et K10, l'involucrine, et la TG-1, leur expression génique augmente significativement lorsque les cellules atteignent la confluence (à partir du jour 6). En revanche, la post-confluence est nécessaire pour observer une augmentation significative de l'expression de la filaggrine (à partir du jour 9). L'expression protéique observé pour K10 et l'involucrine est en accord avec l'augmentation de leur expression génique respective. Ces observations mettent également en évidence le rôle important de la confluence pour initier le processus de différenciation *in vitro* dans cette lignée. Des études antérieures ont rapportées que les cellules HaCaT, à post-confluence, exposent un phénotype de kératinocytes différenciés. Dans ces conditions, ces cellules expriment des gènes marqueurs du processus de différenciation localisés dans les couches suprabasales de l'épiderme, tels que K1, K10, l'involucrine ou encore la transglutaminase (Ryle *et al*, 1989 ; Garach-Jehoshua *et al*, 1998). Des études ultrastructurales ont démontré également que les cellules HaCaT, à confluence, forment des desmosomes « hyper-adhésifs » indépendamment de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire (Kimura *et al*, 2007).

Cultivées en HC, l'augmentation de l'expression des ARNm des kératines K1, K10, de l'involucrine, de la filaggrine et de la TG-1 dans les cellules HaCaT, est retardée comparativement aux KNHs (2, 5, 8 et 5 jours de retard respectivement pour les kératines, l'involucrine, la filaggrine et la TG-1). Les expérimentations de Western blot mettent en évidence une expression protéique de K1 au jour 6, sans augmentation de son expression pour les temps suivants. Néanmoins son taux d'expression reste supérieur à celui observé dans les cellules HaCaT cultivées en LC. En revanche, l'augmentation de l'expression protéique de K10 s'effectue majoritairement entre les jours 9 et 13 : cette augmentation corrèle avec une forte densité cellulaire. De même, l'augmentation de l'expression protéique de l'involucrine est observée à partir du jour 6 et est en accord avec l'augmentation de son expression génique. Ce phénomène de retard dans l'expression de marqueurs de différenciation a déjà été mentionné dans la littérature. En effet, des travaux de transplantation de greffons de KNHs et / ou de cellules HaCaT sur des souris nude, ont permis de mettre en évidence

que l'expression de certains marqueurs de différenciation était plus tardive pour les souris nude ayant reçu un greffon de cellules HaCaT (Breitkreutz *et al*, 1997 ; Breitkreutz *et al*, 1998).

Pour les deux types cellulaires, indépendamment de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  dans le milieu, nous avons remarqué une augmentation de l'expression génique de K1 avec le temps de culture, tandis que son expression protéique reste relativement stable à partir du moment où elle s'exprime. Dans nos expérimentations, la présence d'EGF à une dose physiologique (1,5 ng/ml) dans le milieu de culture pourrait affecter la régulation de ce marqueur. En effet, une étude antérieure rapporte qu'une importante concentration en EGF (10 ng/ml) est impliquée dans la diminution de l'expression des kératines K1 et K10 à confluence (Poumay and Pittelkow, 1995). Par ailleurs, en présence de 2 mM de  $\text{Ca}^{2+}$ , la différenciation kératinocytaire est favorisée tant que la concentration d'EGF est relativement faible (0,1 ng/ml), ce qui indique qu'un équilibre très fin entre l'EGF et le  $\text{Ca}^{2+}$  est à l'origine du choix des kératinocytes à continuer de proliférer ou à entrer dans un programme de différenciation (Wille *et al*, 1984). Cela pourrait donc en partie expliquer pourquoi l'expression protéique de K1 n'augmente pas de manière régulière dans nos conditions expérimentales.

### **Expression des isoformes PPARs**

Les PPARs sont des facteurs de transcription dont les trois isoformes (PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$  et PPAR $\gamma$ ) sont exprimées dans les KNHs. Des travaux antérieurs ont permis de mettre en évidence que sur les trois isoformes PPARs, deux présentent une expression différentielle au cours du processus de différenciation kératinocytaire. En effet, il a été démontré que lorsque la différenciation est induite dans des KNHs par augmentation de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire, l'expression génique de PPAR $\alpha$  et de PPAR $\gamma$  augmente ( $\times 2,5$  et  $\times 8$  respectivement, après 4 jours de culture en conditions HC), tandis que celle de PPAR $\beta/\delta$  reste constante (Rivier *et al*, 1998). Il est important de préciser que pour ces travaux, les KNHs ont été cultivés selon le modèle de Rheinwald et Green, qui s'avère être relativement éloigné de notre modèle expérimental. En outre, il a été démontré que l'activation des PPARs par un agoniste permet la mise en place du processus de différenciation kératinocytaire. Par exemple, l'activité pro-différenciatrice de PPAR $\beta/\delta$  a été mise en évidence suite à un traitement de KNHs avec un ligand non sélectif des PPARs, l'acide tétradécylthioacétique, ainsi qu'avec du L165041, un ligand spécifique de PPAR $\beta/\delta$

(Westergaard *et al*, 2001). De même, dans un modèle de peau reconstruite, l'activation de PPAR $\alpha$  avec un ligand sélectif, le Wy-14643, entraîne une augmentation de la synthèse des céramides, de dérivés du cholestérol et de l'activité d'enzymes impliquées dans leur métabolisme respectif. Cette activation spécifique de PPAR $\alpha$  entraîne également l'augmentation de l'expression génique d'enzymes impliquées dans le métabolisme lipidique, caractéristique de la mise en place de la fonction barrière épidermique et donc de la différenciation kératinocytaire (Rivier *et al*, 2000). Par ailleurs, d'autres études ont démontré que l'addition simultanée de L165041 et de BRL49653, respectivement ligands sélectifs de PPAR $\beta/\delta$  et de PPAR $\gamma$ , induit de manière synergique l'expression de l'involucrine (Westergaard *et al*, 2001) et ont donc un effet synergique sur la différenciation des kératinocytes humains (Wahli, 2002). Ces résultats montrent qu'il existe un lien étroit entre le rôle des PPARs et la différenciation kératinocytaire.

Nos résultats présentent une certaine concordance avec ceux obtenus par Rivier *et al*.. En effet, nous avons observé une augmentation significative de l'expression génique de PPAR $\gamma$  dès le jour 3 et pour tous les temps suivants dans les KNHs cultivés en HC. Ce résultat semble confirmer l'implication prépondérante de PPAR $\gamma$  dans le processus de différenciation des KNHs. En ce qui concerne l'expression génique de PPAR $\alpha$  et PPAR $\beta/\delta$ , celle-ci reste relativement constante au cours du temps, indépendamment de la concentration en Ca<sup>2+</sup>.

En ce qui concerne les cellules HaCaT, plusieurs études mentionnant l'implication des PPARs dans la prolifération, la différenciation ou encore la survie cellulaire ont également été effectuées. Certaines rapportent que des molécules naturelles, telles que l'acide oléanolique ou encore l'acide ursolique induisent la différenciation des cellules HaCaT *via* PPAR $\alpha$  (Lee *et al*, 2006 ; Lim *et al*, 2007). En revanche, le rôle de PPAR $\beta/\delta$  est assez controversé dans la littérature. Une majorité d'auteurs considère que l'activation de PPAR $\beta/\delta$  inhibe la prolifération cellulaire et induit le processus de différenciation (Westergaard *et al*, 2001 ; Kim *et al*, 2006 ; Borland *et al*, 2008). Une autre étude rapporte que l'activation *in vivo* de PPAR $\beta/\delta$  permet la mise en place du processus de différenciation, sans entraîner d'effets anti-prolifératifs ou pro-apoptotiques (Schmuth *et al*, 2004). Il a également été démontré que l'activation de PPAR $\beta/\delta$  par l'acide rétinoïque entraîne la survie des cellules HaCaT, en induisant l'expression de PDK1 (*3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1*). Cette kinase joue un rôle crucial dans l'activation de Akt, protéine impliquée dans la voie de la survie cellulaire. L'induction de PDK1 par l'acide rétinoïque *via* PPAR $\beta/\delta$  permettrait donc la mise en place de la voie de signalisation anti-apoptotique (Shaw *et al*, 2003). Une autre étude rapporte que l'effet de l'acide rétinoïque sur la prolifération cellulaire est dépendant du type de récepteur activé : lorsque l'acide rétinoïque se fixe au RAR *via* CRABP-II, il y a inhibition de la



prolifération. En revanche, la fixation de l'acide rétinoïque à PPAR $\beta/\delta$  via FABP-5 génère un stimulus prolifératif (Schug *et al.*, 2007). Cependant, ces observations ont été récemment controversées (Rieck *et al.*, 2008). En effet, dans cette étude, les auteurs mettent en évidence que l'acide rétinoïque ne fonctionne pas comme un agoniste de PPAR $\beta/\delta$ . D'après Rieck *et al.*, les effets de l'acide rétinoïque qu'annoncent Schug *et al.*, reflètent plus probablement un mécanisme non caractérisé et moins direct. Enfin, une autre étude récente met en évidence que l'EGF induit l'expression transcriptionnelle et protéique de PPAR $\beta/\delta$ , d'une manière temps et dose dépendants, en plus d'augmenter significativement l'activité de liaison de PPAR $\beta/\delta$  à ses gènes cibles. Cela démontre l'implication de cette isoforme dans le mécanisme de prolifération cellulaire (Liang *et al.*, 2008).

Dans notre étude sur les cellules HaCaT cultivées en LC, nous avons observé que l'expression génique de PPAR $\alpha$  et de PPAR $\beta/\delta$  augmente lorsque les cellules arrivent à post-confluence. En revanche, l'augmentation de la concentration en Ca<sup>2+</sup> n'a aucun effet significatif sur l'expression génique de ces deux isoformes. Indépendamment de la concentration en Ca<sup>2+</sup>, l'expression de PPAR $\gamma$  diminue, contrairement au profil d'expression observé dans les KNHs. Curieusement, le profil d'expression des trois isoformes PPARs que nous observons dans les cellules HaCaT présente de fortes homologues au profil d'expression des PPARs dans un épiderme atteint de Psoriasis, une maladie de peau caractérisée par une hyperprolifération épidermique et une différenciation anormale des kératinocytes. En effet, dans l'épiderme psoriasique, l'expression de PPAR $\beta/\delta$  augmente, tandis que celle des isoformes  $\alpha$  et  $\gamma$  diminuent (Rivier *et al.*, 1998 ; Ellis *et al.*, 2000). Nos résultats montrent que les isoformes PPAR $\beta/\delta$  et PPAR $\gamma$  présentent donc un profil d'expression génique relativement similaire avec un épiderme psoriasique. Cela laisse suggérer que le phénomène d'hyperprolifération observé dans la lignée cellulaire HaCaT pourrait impliquer la modulation de l'expression des isoformes  $\beta/\delta$  et  $\gamma$ , ou encore la régulation des gènes ayant un PPRE spécifique de ces deux facteurs de transcription.

### **Expression de gènes impliqués dans le métabolisme lipidique**

Le processus de différenciation kératinocytaire est accompagné de la mise en place d'un métabolisme lipidique complexe et finement régulé. Dans la formation de la couche cornée, les lipides synthétisés « entourant » les cornéocytes sont imagés par un modèle de briques et de mortier, où ces lipides forment le mortier et les cellules les briques (Nemes and Steinert, 1999). Des

travaux antérieurs rapportent qu'aucune différence n'a été observée entre des KNHs et la lignée HaCaT en ce qui concerne la synthèse et la composition lipidique *in vitro*. Plus précisément, ces travaux mettent en évidence une forte similarité de la composition en lipides et en acides gras, ou encore une distribution équivalente des lipides en fonction de la densité cellulaire et / ou de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  dans le milieu de culture (LC = 0,06 mM et HC = 1,26 mM). En revanche, une fois à confluence, les deux types cellulaires présentent des différences au niveau du métabolisme du cholestérol (Schurer *et al*, 1993). Dans notre étude, nous avons suivi le profil d'expression de plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme lipidique afin de les comparer entre les deux types cellulaires.

Dans nos expérimentations, pour les deux types cellulaires cultivés en LC, la confluence permet une augmentation significative de l'expression génique de DEGS2. En revanche, en HC, elle est retardée dans les cellules HaCaT, comparativement aux KNHs : DEGS2 est surexprimé dès le jour 1 dans les KNHs, tandis qu'il n'est significativement surexprimé qu'au jour 9 dans les cellules HaCaT. Comparativement aux KNHs et hormis le retard très prononcé (8 jours) dans l'induction de l'expression de ce gène, le profil de régulation génique de DEGS2 dans la lignée HaCaT est similaire à un profil d'expression d'un marqueur de différenciation classique : la confluence en LC et le  $\text{Ca}^{2+}$  induisent une augmentation de l'expression de DEGS2. Après validation de l'expression protéique mais aussi de l'activité enzymatique de DEGS2, ce gène pourrait donc être utilisé en tant que marqueur de différenciation kératinocytaire dans notre modèle.

La comparaison de l'expression de gènes impliqués dans le transport lipidique et notamment les transporteurs de la famille ABC entre les KNHs et la lignée HaCaT est bien documentée. La superfamille des transporteurs ABC utilisent comme source d'énergie l'hydrolyse de l'ATP afin de permettre le passage de composés divers à travers les membranes cellulaires. Chaque transporteur ABC assure donc le transport transmembranaire d'une variété bien précise de substrats. Une étude rapporte que 31 gènes codant pour des transporteurs ABC sont exprimés dans les KNHs ainsi que dans la lignée HaCaT, cultivés dans des conditions relativement équivalentes à notre milieu LC (Kielar *et al*, 2003). Un total de 21 gènes transporteurs ABC ont ensuite été identifiés comme étant exprimés de manière constitutive, c'est-à-dire sans montrer de régulation au cours du processus de différenciation. Dans cette étude, il a également été démontré que l'expression d'ABCD1 diminue avec la mise en place du processus de différenciation, tandis que ABCG1 a été rapporté comme étant surexprimé lors de la différenciation induite par augmentation de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$

dans les KNHs et les cellules HaCaT. De même, le gène FATP4, impliqué dans le transport lipidique, a également été rapporté comme étant surexprimé dans les KNHs lorsque la différenciation est induite par l'augmentation de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire (Kielar *et al.*, 2003). La modulation de l'expression de ces gènes suggèrent qu'ils sont, d'une certaine façon, impliqués dans le trafic lipidique mis en place pendant la différenciation kératinocytaire.

Dans nos expérimentations, l'expression d'ABCD1 dans les KNHs reste relativement constante tout au long de la cinétique, indépendamment de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$ . Dans les cellules HaCaT cultivées en LC, l'expression d'ABCD1 augmente de manière régulière tout au long de la cinétique. En HC, l'expression d'ABCD1 augmente jusqu'au jour 9 puis atteint un pallier. Nos résultats sont en contradiction avec ceux obtenus par Kielar *et al.*. En effet, ces derniers mettent en évidence une diminution de l'expression de ce transporteur dans les deux types cellulaires, lorsque la différenciation est induite par ajout de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le milieu. En ce qui concerne ABCG1, Kielar *et al.* observent une augmentation de l'expression de ce gène à partir de 8 jours de culture en présence de 1,26 mM de  $\text{Ca}^{2+}$ . Il paraît important de noter que dans leurs travaux, les cellules sont cultivées uniquement en présence de  $\text{Ca}^{2+}$  et les auteurs comparent l'expression génique au cours du temps. Dans notre cinétique, l'expression d'ABCG1 dans les KNHs cultivés en LC augmente à partir du jour 6, lorsque les cellules atteignent la confluence. En HC, l'expression d'ABCG1 augmente également à partir du jour 6 et est similaire à celle observée en LC. Dans les cellules HaCaT, l'expression d'ABCG1 augmente significativement à partir du jour 9 mais indépendamment de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$ . Nos résultats sont donc en accord avec ceux obtenus par Kielar *et al.*, pour lesquels l'expression d'ABCG1 augmente avec le temps de culture, lorsque les deux types cellulaires sont cultivés en HC. Néanmoins, nos résultats montrent que lorsque les deux types cellulaires sont cultivés en LC, la confluence permet également l'augmentation de l'expression de ce gène. En ce qui concerne FATP4, les auteurs ne mentionnent pas le temps d'incubation nécessaire afin d'induire sa surexpression. Dans leurs travaux, la surexpression de FATP4 en présence de  $\text{Ca}^{2+}$  est rapportée seulement pour les KNHs (Kielar *et al.*, 2003). Dans nos expérimentations, l'expression de ce gène augmente dans les KNHs cultivés en LC, lorsque la densité cellulaire est suffisante pour atteindre la post-confluence. En HC, nous observons une augmentation significative de FATP4 au jour 1. Dans les cellules HaCaT cultivées en LC, la confluence n'induit pas de surexpression significative de ce gène. En HC, une induction significative de FATP4 est observée au jour 1, mais également aux jours 9 et 13. FATP4 ne présente donc pas un profil d'expression similaire entre les deux types cellulaires et ne se comporte pas comme un marqueur classique de différenciation kératinocytaire dans les cellules HaCaT, contrairement aux KNHs. Néanmoins, nos résultats ainsi que ceux de Kielar *et al.*, mettent en

évidence une augmentation de l'expression d'ABCG1 et de FATP4, ce qui suggère qu'ils participent potentiellement dans la réorganisation lipidique au cours de la différenciation kératinocytaire.

Les gènes ADRP et FIAF, impliqués dans le métabolisme lipidique, possèdent dans leur région promotrice un PPRE. Il a été démontré que l'activation de PPAR $\beta/\delta$  *in vitro* entraîne également une surexpression de ces deux gènes en plus de stimuler le processus de différenciation kératinocytaire (Schmuth *et al*, 2004). C'est pourquoi notre attention s'est portée sur le profil d'expression génique de ces deux gènes dans notre modèle de différenciation.

En ce qui concerne les KNHs cultivés en milieu LC, l'expression génique d'ADRP augmente avec le temps de culture et donc avec la densité cellulaire. En milieu HC et par rapport aux résultats observés en LC, il n'y a pas de modification dans l'expression d'ADRP. Pour les cellules HaCaT cultivées en milieu LC ou HC, l'expression génique d'ADRP est similaire et diminue avec le temps. Dans cette lignée, l'évolution de l'expression d'ADRP est tout à fait comparable à celle observée pour PPAR $\gamma$ . Plusieurs études ont mentionné que l'activation de PPAR $\gamma$  par un ligand spécifique, tel que la rosiglitazone, entraînait une surexpression d'ADRP dans des types cellulaires, tels que des hépatocytes humains ou encore des fibroblastes pulmonaires de rat. Dans ces types cellulaires, la surexpression d'ADRP est donc induite *via* l'activation de PPAR $\gamma$  (Motomura *et al*, 2006 ; Rehan *et al*, 2006). Ces résultats ainsi que ceux que nous avons obtenu avec les cellules HaCaT semblent suggérer qu'il existe un lien étroit entre l'expression génique de PPAR $\gamma$  et celle d'ADRP.

En ce qui concerne l'expression du gène FIAF, une étude rapporte que l'activation *in vitro* de PPAR $\beta/\delta$  permet l'induction de l'expression de ce gène dans les KNHs (Schmuth *et al*, 2004). Dans notre modèle expérimental, l'expression de FIAF reste relativement constante dans les KNHs, indépendamment du temps de culture et de la concentration en Ca<sup>2+</sup>. L'induction de la différenciation *in vitro* *via* l'addition de Ca<sup>2+</sup> ou *via* une forte densité cellulaire n'est donc pas un stimulus suffisant pour induire l'expression de FIAF dans les KNHs. Pour la lignée HaCaT, l'expression de FIAF augmente uniquement dans les cellules cultivées en LC au jour 13, c'est-à-dire lorsque les cellules sont à post-confluence, en corrélation avec l'expression maximale de PPAR $\beta/\delta$  dans les mêmes conditions.

## Expression de K5 et de p21

La kératine K5, de même que K14, sont des marqueurs spécifiques de la couche basale de l'épiderme car elles ne s'expriment que dans les kératinocytes qui composent cette couche. Au fur et à mesure que les kératinocytes de la couche basale se divisent et entrent dans la composition de la couche épineuse, l'expression de la paire K5/K14 est éteinte en faveur des kératines K1 et K10 (Moll *et al.*, 1982). *In vitro*, l'induction de la différenciation kératinocytaire ne provoque pas de modulation de l'expression des kératines K5 et K14 (Hawker *et al.*, 2007). En ce qui concerne les cellules HaCaT, il n'existe aucune étude rapportant le profil d'expression de K5 et K14 lors de la mise en place du processus de différenciation induit par l'augmentation de la concentration en  $Ca^{2+}$ . Néanmoins, il a été démontré que lorsque ces cellules sont cultivées continuellement dans un milieu LC, l'expression de K5 augmente au fur et à mesure des passages (Kee and Steinert, 2001).

Dans notre modèle expérimental, l'expression de K5 dans les KNHs reste constante, indépendamment de la concentration en  $Ca^{2+}$  et du temps de culture : nos résultats confirment donc bien ceux obtenus par Hawker *et al.*, qui n'observent également pas de variation de l'expression de K5 dans leur modèle de différenciation. En revanche, dans les cellules HaCaT cultivées en LC, l'expression de K5 augmente lorsque la densité cellulaire atteint la confluence. De même, en HC, l'augmentation de K5 se produit à partir du jour 6. K5 ne présente donc pas un profil d'expression similaire dans les deux types cellulaires. Dans les cellules HaCaT, l'augmentation de l'expression de K5 ne peut pas être directement liée à son hyperprolifération, car ce phénomène est spécifique de leur culture en milieu HC. En revanche, la surexpression de K5 s'effectue lorsque les cellules en LC atteignent la confluence, mais aussi à partir du jour 6 en HC. Cela suggère que cette surexpression pourrait être corrélée, au moins d'un point de vue temporel, avec la mise en place du processus de différenciation de ces cellules.

Le processus de différenciation terminale est couplé avec la sortie des cellules du cycle cellulaire. Ce phénomène est associé avec l'augmentation de l'expression de p21 dans une grande variété de tissus *in vivo*, mais également dans plusieurs systèmes de différenciation bien définis *in vitro*. L'expression génique de p21 est régulée par p53, mais aussi par d'autres voies p53-indépendantes. Par exemple, certains facteurs de croissance ont été rapportés comme pouvant induire l'expression de p21 *via* une voie de signalisation p53-indépendante (Michieli *et al.*, 1994). Une étude antérieure a également démontré qu'une augmentation de l'expression de p21 avait lieu

dans les KNHs ainsi que dans les cellules HaCaT, cultivés en conditions HC et / ou en présence de TPA (Todd and Reynolds, 1998). Dans les cellules HaCaT, l'augmentation de l'expression de p21 après un traitement avec du TGF- $\beta$  induit l'arrêt du cycle cellulaire mais pas la différenciation. Ces données suggèrent que l'induction de p21 n'est pas suffisante pour engendrer un processus de différenciation (Datto *et al*, 1995). De plus, les mutations sur les deux allèles de p53 rendent impossible l'activation de p21 *via* p53, ce qui indique également que l'induction de p21 par le TGF $\beta$  s'effectue *via* une voie p53-indépendante (Datto *et al*, 1995).

Dans notre modèle expérimental, pour les deux types cellulaires cultivés en LC, l'expression génique de p21 augmente significativement avec la post-confluence. Suite à l'addition de Ca<sup>2+</sup>, l'expression génique de p21 est induite précocement dans les KNHs (dès le jour 1 jusqu'au jour 9 inclus). Elle est beaucoup plus tardive pour les cellules HaCaT (jour 9). L'expression génique de p21 présente donc une forte similarité avec les profils d'expression observés pour les marqueurs de différenciation classiques, qui se traduit par une augmentation due à une importante densité cellulaire lorsque les cellules sont cultivées en LC, mais aussi par une augmentation plus précoce lorsque les cellules sont cultivées en HC.

### **Fractionnement par SdFFF**

Nous avons trié les cellules HaCaT, dont le processus de différenciation a été induit par ajout de Ca<sup>2+</sup>, au moyen d'une technique innovante, la «*sedimentation field flow fractionation*» (SdFFF). Cette technique, développée à l'origine pour la séparation de particules, a été adaptée à la séparation d'espèces cellulaires. Elle a notamment permis de trier des cellules HEL, une lignée érythroleucémique humaine, durant le processus de différenciation mégacaryocytaire induit par la diosgénine, un stéroïde végétal. En SdFFF, cette différenciation entraîne la diminution du temps de rétention des cellules différenciées, visible par un décalage vers la gauche du pic d'élution des cellules traitées par rapport au pic témoin (Leger *et al*, 2004 ; Leger *et al*, 2007).

Dans nos expérimentations, les cellules HaCaT ont été cultivées pendant 7 jours en LC et / ou HC avant d'être passées en SdFFF. Dans les deux cas, un seul pic d'élution est observé, avec un léger décalage vers la droite pour les cellules cultivées en HC. Ce décalage peut s'interpréter comme un temps de rétention légèrement plus long pour les cellules cultivées en HC. En mode inertiel, ce qui est le cas dans nos expérimentations, le passage des cellules en SdFFF implique que le temps de rétention des cellules dépend de leur taille, de leur densité, de leur forme et de leur déformabilité. En effet, si l'on applique un champ gravitationnel et une vitesse de circulation de la

phase mobile constants, les particules les plus volumineuses ou les moins denses seront éluées en premier (Battu *et al.*, 2002). Dans notre cas, les cellules issues de l'échantillon HC-PT pourraient donc, d'un point de vue morphologique, être moins volumineuses et plus denses que les cellules LC-PT.

Dans les conditions HC, la collecte et le comptage des fractions en sortie de SdFFF ont montré que F1, F2 et F3 représentent respectivement 10%, 65% et 25% de la population cellulaire totale récoltée. Chaque fraction a été réensemencée à la même densité dans du milieu HC, de même que l'échantillon LC en milieu LC. Des expérimentations de prolifération et de viabilité cellulaire par la technique du MTT nous ont permis de constater que les fractions F3 mais surtout F1, ont un taux de prolifération très inférieur par rapport à la fraction F2, dont le profil de prolifération est identique à celui de HC-PT. Ces résultats semblent montrer que ce sont les cellules contenues dans la fraction F2 qui assurent la prolifération des cellules HaCaT cultivées en HC.

Nous avons également analysé, par RT-PCR semi-quantitative en temps réel, l'expression de 4 marqueurs de différenciation (K1, K10, involucrine et TG-1) dans chaque fraction. Aucune différence d'expression de TG-1 n'a été observée entre les trois fractions. Bien que l'expression de TG-1 soit plus importante dans l'échantillon HC-PT ( $\times 2$ ) comparativement à LC-PT, la quantité relative du taux de transcrits de TG-1 en HC-PT est équivalente à celle des 3 fractions. En revanche, une expression plus importante des marqueurs K1, K10 et surtout de l'involucrine est observée dans la fraction F1.

Dans la fraction F1, les cellules ont donc un taux de prolifération inférieur mais aussi une expression des marqueurs de différenciation plus importante comparativement aux fractions F2 et F3. D'après ces résultats, on peut donc envisager que la fraction F1 est composée majoritairement de cellules HaCaT différenciées. Afin de vérifier cette hypothèse, pour chaque fraction, nous avons effectué des expérimentations sur la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire. Les résultats obtenus n'indiquent pas d'accumulation de cellules en G0-G1 pour la fraction F1 (37% en G0-G1 et 63% en S/G2-M). Ces cellules sont donc probablement bloquées au niveau d'un point de contrôle du cycle cellulaire. Pour la fraction F2, la répartition cellulaire est équivalente à celle observée en F1. Cependant, les cellules contenues dans la fraction F2 prolifèrent normalement, leur profil de prolifération étant semblable à celui de HC-PT. Enfin, c'est au niveau de la fraction F3 que le pourcentage de cellules en phases G0-G1 est la plus importante (58% en G0-G1 et 42% en S/G2-M). Ces résultats de cycle cellulaire nous permettent donc de constater que les cellules contenues dans fraction F1, bien que présentant des caractères classiques de la

différenciation kératinocytaire (ralentissement de la prolifération et augmentation de l'expression de marqueurs de différenciation) ne s'accumulent pas en G0-G1.

Dans ce travail, nous avons donc étudié le comportement des KNHs et de la lignée HaCaT au cours d'une cinétique de différenciation induite par augmentation de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire, basée sur 13 jours et en utilisant des conditions de culture strictement similaires pour les deux types cellulaires. Nos résultats sont en accord avec plusieurs études antérieures mentionnant des similarités entre les KNHs et la lignée HaCaT telles que l'augmentation de l'expression génique de marqueurs de la différenciation kératinocytaire avec la confluence. Nous avons aussi mis en évidence des différences entre ces deux types cellulaires, principalement en ce qui concerne leur entrée dans le processus de différenciation terminale induite par ajout de  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire, en démontrant une sensibilité moindre pour la lignée HaCaT en réponse au  $\text{Ca}^{2+}$ . En effet, nos résultats mettent en évidence que les cellules HaCaT, malgré l'augmentation de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  du milieu de culture, continuent de proliférer de manière importante. Ce phénomène s'accompagne également d'un retard dans l'augmentation de l'expression des marqueurs de différenciation, comparativement aux KNHs, mais également pour certains gènes impliqués dans le métabolisme lipidique tels que DEGS2, ABCG1 ou encore FATP4, mais aussi pour p21. Nos résultats mettent également en évidence des différences au niveau du profil d'expression des PPARs entre les deux types cellulaires. En effet, l'expression de l'isoforme  $\gamma$  est significativement induite par le  $\text{Ca}^{2+}$  dès le jour 3 dans les KNHs, tandis qu'elle diminue dans les cellules HaCaT, indépendamment de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  du milieu de culture. Il en est de même pour l'expression du gène ADRP pour lequel il a été démontré que son expression est induite suite à l'activation de PPAR $\gamma$  dans plusieurs types cellulaires (Motomura *et al*, 2006 ; Rehan *et al*, 2006). La kérarine K5 présente aussi un profil d'expression différent entre les deux types cellulaires : elle reste stable dans les KNHs tandis qu'elle augmente dans les cellules HaCaT. Enfin, bien que des expérimentation complémentaires soient nécessaires, nos travaux de fractionnement par SdFFF montrent que la séparation d'une population de cellules différenciées au moyen de cette technique est envisageable.



## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Plusieurs maladies de peau, telles que le psoriasis ou l'ichtyose vulgaire, mais aussi le vieillissement cutané, sont étroitement liés aux dérèglements des processus de prolifération et de différenciation épidermique. Il en est de même pour les carcinomes cutanés. C'est pourquoi l'exploration et la compréhension des mécanismes de prolifération et de différenciation kératinocytaire *in vitro* sont donc primordiaux afin de proposer, à long terme, de nouveaux traitements. Dans cette perspective, nous avons comparé, pour la première fois, la mise en place du processus de différenciation kératinocytaire *in vitro*, induit par l'augmentation de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire, au cours d'une cinétique de 13 jours, entre les KNHs et la lignée cellulaire HaCaT. Pour cela, les deux types cellulaires ont été cultivés dans des conditions strictement identiques.

Nos résultats ont démontré que la lignée HaCaT présente globalement une sensibilité moindre à la mise en place du processus de différenciation induit par le  $\text{Ca}^{2+}$ , par rapport aux KNHs. Cela se traduit principalement par un retard dans l'expression de marqueurs classiques du processus de différenciation (K1, K10, involucrine, filaggrine, TG-1). Nous avons également constaté ce retard pour p21 et DEGS2, gènes respectivement impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire et le métabolisme lipidique. D'autres gènes, décrits comme étant plus ou moins impliqués dans les processus de prolifération et de différenciation, présentent également une modulation d'expression différente entre les deux types cellulaires. C'est le cas d'ADRP, impliqué dans le métabolisme lipidique, et de PPAR $\gamma$ , une isoforme de la famille des facteurs de transcription PPARs. Nous avons également remarqué que le profil d'expression génique des trois isoformes PPARs dans la lignée HaCaT présente des similarités avec celui décrit dans un épiderme psoriasique. Nous avons également observé que la lignée HaCaT prolifère de façon plus importante lorsqu'elle est cultivée en présence de  $\text{Ca}^{2+}$ . Dans notre modèle, l'expression de K5, un marqueur de la couche basale et donc spécifique des cellules proliférantes, augmente indépendamment de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  dans les cellules HaCaT. L'immortalisation des cellules HaCaT est probablement à l'origine de toutes ces modulations que nous avons observées dans ce travail. Enfin, nos travaux de fractionnement par SdFFF nous ont permis de séparer les cellules différenciées des cellules non différenciées à partir d'un pool total cultivé en HC. En tant que perspective à court terme, il serait donc judicieux de trier les cellules HaCaT cultivées à confluence dans un milieu LC, afin de comparer la confluence et le  $\text{Ca}^{2+}$  en tant qu'inducteurs de la différenciation de ces cellules

*in vitro*. Des expérimentations de tri de KNHs peuvent également être envisagées, afin de comparer, dans un premier temps, les profils d'éluion de ces cellules en fonction de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  du milieu de culture, puis dans un second temps, de comparer le rendement de fractionnement en cellules différenciées par rapport aux résultats obtenus pour la lignée HaCaT. Cela permettrait probablement d'apporter des éléments supplémentaires visant à affirmer que les cellules HaCaT sont moins sensibles que les KNHs au  $\text{Ca}^{2+}$  et à ses effets pour la mise en place de la différenciation kératinocytaire.

Des travaux complémentaires sont encore nécessaires afin d'élucider la balance existante entre la prolifération et la différenciation au sein de la lignée HaCaT. Différents facteurs, tels que les rétinoïdes, la voie de la protéine kinase C (PKC) ou encore le récepteur au  $\text{Ca}^{2+}$  (CaR), peuvent influencer sur la régulation des mécanismes kératinocytaires. Par exemple, au cours de la kératinisation, l'acide rétinoïque présent dans le milieu de culture peut affecter non seulement l'expression des kératines ainsi que d'autres marqueurs de différenciation, mais également certaines modifications post-traductionnelles (Breitkreutz *et al*, 1993). *In vitro*, la maturation de la profilaggrine en filaggrine dans les KNHs implique la suppression de l'acide rétinoïque contenu dans le sérum ajouté au milieu de culture (Asselineau *et al*, 1990). De plus, une différence dans le catabolisme des rétinoïdes a déjà été mentionnée entre les KNHs et la lignée cellulaire HaCaT (Schroeder and Zouboulis, 2007). Par conséquent, le type de milieu de culture employé est très important dans ce type d'étude. Une autre caractéristique qui pourrait expliquer le comportement prolifératif des cellules HaCaT en milieu HC impliquerait la voie des PKCs. Les KNHs et la lignée HaCaT expriment plusieurs isoformes de PKCs, impliquées dans la régulation de la prolifération et de la différenciation, bien que des différences au niveau des patterns d'expression des isoformes de PKCs aient été mises en évidence entre ces deux types cellulaires (Papp *et al*, 2003). Récemment, des études ont suggéré que le pattern d'isoenzymes PKCs dans les cellules HaCaT était étroitement lié avec le stade de prolifération et / ou de différenciation. L'altération du transport intracellulaire du  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{Ca}_i$ ) pourrait être un facteur clé dans ce système (Gonczi *et al*, 2007b). Une autre étude conforte cette dernière hypothèse : elle rapporte qu'une augmentation du  $\text{Ca}_i$  a été mise en évidence après un stress hypotonique effectué sur les cellules HaCaT cultivées en présence de 1,8 mM de  $\text{Ca}^{2+}$ . Dans ces conditions, une altération du potentiel membranaire des cellules est observée. L'augmentation du  $\text{Ca}_i$  provoque une hyperprolifération des cellules HaCaT, directement liée avec la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  du milieu de culture. Cependant, les auteurs suggèrent que dans ce cas, l'augmentation du  $\text{Ca}_i$  ne serait pas directement liée aux PKCs (Gonczi *et al*, 2007a). Le récepteur

au calcium (CaR), largement étudié dans les KNHs, a été décrit comme jouant un rôle primordial dans la différenciation kératinocytaire (Tu *et al*, 2004 ; Tu *et al*, 2007). Les kératinocytes dépourvus de CaR présentent une signalisation calcique défectueuse, ce qui peut influencer sur l'expression de gènes ou changer la modification post-traductionnelle de protéines cibles critiques et / ou indispensables pour la mise en place de la différenciation kératinocytaire. Curieusement, aucune étude portant sur la caractérisation de ce récepteur dans les cellules HaCaT n'a été effectuée.

En conclusion, nous pouvons dire que de nouvelles données sont requises dans le but de mieux appréhender les interactions existantes entre les divers mécanismes impliqués dans la régulation de la prolifération kératinocytaire et la mise en place du processus de différenciation terminale. Ce travail aura permis de démontrer que les cellules HaCaT conservent certaines caractéristiques de différenciation kératinocytaire *in vitro*, notamment la capacité à exprimer des marqueurs classiques de la différenciation, résultant soit de la confluence, soit de l'augmentation de la concentration en  $Ca^{2+}$ . Pour ces diverses raisons, et principalement pour l'étude de la modulation de l'expression des kératines K1, K10 et de l'involucrine, la lignée HaCaT peut malgré tout être utilisée comme un modèle de différenciation kératinocytaire *in vitro*.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Agarwal C, Efimova T, Welter J F, Crish J F, and Eckert R L.** CCAAT/enhancer-binding proteins. A role in regulation of human involucrin promoter response to phorbol ester. *J Biol Chem.* 1999 ; 274 : 6190-6194.
2. **Alonso L and Fuchs E.** Stem cells of the skin epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 ; 100 Suppl 1 : 11830-11835.
3. **Andreoli J M, Jang S I, Chung E, Coticchia C M, Steinert P M, and Markova N G.** The expression of a novel, epithelium-specific ets transcription factor is restricted to the most differentiated layers in the epidermis. *Nucleic Acids Res.* 1997 ; 25 : 4287-4295.
4. **Assefa Z, Vantieghem A, Garmyn M, Declercq W, Vandenabeele P, Vandenheede J R, Bouillon R, Merlevede W, and Agostinis P.** p38 mitogen-activated protein kinase regulates a novel, caspase-independent pathway for the mitochondrial cytochrome c release in ultraviolet B radiation-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 2000 ; 275 : 21416-21421.
5. **Asselineau D, Dale B A, and Bernard B A.** Filaggrin production by cultured human epidermal keratinocytes and its regulation by retinoic acid. *Differentiation.* 1990 ; 45 : 221-229.
6. **Astrom A, Pettersson U, Chambon P, and Voorhees J J.** Retinoic acid induction of human cellular retinoic acid-binding protein-II gene transcription is mediated by retinoic acid receptor-retinoid X receptor heterodimers bound to one far upstream retinoic acid-responsive element with 5-base pair spacing. *J Biol Chem.* 1994 ; 269 : 22334-22339.
7. **Astrom A, Tavakkol A, Pettersson U, Cromie M, Elder J T, and Voorhees J J.** Molecular cloning of two human cellular retinoic acid-binding proteins (CRABP). Retinoic acid-induced expression of CRABP-II but not CRABP-I in adult human skin *in vivo* and in skin fibroblasts *in vitro*. *J Biol Chem.* 1991 ; 266 : 17662-17666.
8. **Bang B, Gniadecki R, Larsen J K, Baadsgaard O, and Skov L.** *In vivo* UVB irradiation induces clustering of Fas (CD95) on human epidermal cells. *Exp Dermatol.* 2003 ; 12 : 791-798.
9. **Banks E B, Crish J F, Welter J F, and Eckert R L.** Characterization of human involucrin promoter distal regulatory region transcriptional activator elements-a role for Sp1 and AP1 binding sites. *Biochem J.* 1998 ; 331 (Pt 1) : 61-68.
10. **Banks-Schlegel S P and Howley P M.** Differentiation of human epidermal cells transformed by SV40. *J Cell Biol.* 1983 ; 96 : 330-337.
11. **Bartek J and Lukas J.** Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer Cell.* 2003 ; 3 : 421-429.

12. **Battu S, Cook-Moreau J, and Cardot P J.** Sedimentation field-flow fractionation: methodological basis and applications for cell sorting. *J Liq Chromatogr Relat Technol.* 2002 ; 25 : 2193-2210.
13. **Beck B, Lehen'kyi V, Roudbaraki M, Flourakis M, Charveron M, Bordat P, Polakowska R, Prevarskaya N, and Skryma R.** TRPC channels determine human keratinocyte differentiation: new insight into basal cell carcinoma. *Cell Calcium.* 2008 ; 43 : 492-505.
14. **Bektas M, Dullin Y, Wieder T, Kolter T, Sandhoff K, Brossmer R, Ihrig P, Orfanos C E, and Geilen C C.** Induction of apoptosis by synthetic ceramide analogues in the human keratinocyte cell line HaCaT. *Exp Dermatol.* 1998 ; 7 : 342-349.
15. **Benassi L, Ottani D, Fantini F, Marconi A, Chiodino C, Giannetti A, and Pincelli C.** 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>, transforming growth factor beta<sub>1</sub>, calcium, and ultraviolet B radiation induce apoptosis in cultured human keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 1997 ; 109 : 276-282.
16. **Berridge M J.** The versatility and complexity of calcium signalling. *Novartis Found Symp.* 2001 ; 239 : 52-64.
17. **Bickenbach J R.** Identification and behavior of label-retaining cells in oral mucosa and skin. *J Dent Res.* 1981 ; 60 Spec No C : 1611-1620.
18. **Bikle D D.** Vitamin D regulated keratinocyte differentiation. *J Cell Biochem.* 2004 ; 92 : 436-444.
19. **Bikle D D, Ng D, Oda Y, Hanley K, Feingold K, and Xie Z.** The vitamin D response element of the involucrin gene mediates its regulation by 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *J Invest Dermatol.* 2002 ; 119 : 1109-1113.
20. **Bikle D D, Oda Y, and Xie Z.** Calcium and 1,25(OH)<sub>2</sub>D: interacting drivers of epidermal differentiation. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2004 ; 89-90 : 355-360.
21. **Bikle D D, Pillai S, Gee E, and Hincenbergs M.** Regulation of 1,25-dihydroxyvitamin D production in human keratinocytes by interferon-gamma. *Endocrinology.* 1989 ; 124 : 655-660.
22. **Bill H M, Knudsen B, Moores S L, Muthuswamy S K, Rao V R, Brugge J S, and Miranti C K.** Epidermal growth factor receptor-dependent regulation of integrin-mediated signaling and cell cycle entry in epithelial cells. *Mol Cell Biol.* 2004 ; 24 : 8586-8599.
23. **Bohnert A, Hornung J, Mackenzie I C, and Fusenig N E.** Epithelial-mesenchymal interactions control basement membrane production and differentiation in cultured and transplanted mouse keratinocytes. *Cell Tissue Res.* 1986 ; 244 : 413-429.
24. **Borland M G, Foreman J E, Girroir E E, Zolfaghari R, Sharma A K, Amin S, Gonzalez F J, Ross A C, and Peters J M.** Ligand activation of peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta inhibits cell proliferation in human HaCaT keratinocytes. *Mol Pharmacol.* 2008 ; 74 : 1429-1442.

25. **Borradori L and Sonnenberg A.** Structure and function of hemidesmosomes: more than simple adhesion complexes. *J Invest Dermatol.* 1999 ; 112 : 411-418.
26. **Boukamp P, Petrussevska R T, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, and Fusenig N E.** Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol.* 1988 ; 106 : 761-771.
27. **Boukamp P, Popp S, Altmeyer S, Hulsen A, Fasching C, Cremer T, and Fusenig N E.** Sustained nontumorigenic phenotype correlates with a largely stable chromosome content during long-term culture of the human keratinocyte line HaCaT. *Genes Chromosomes Cancer.* 1997 ; 19 : 201-214.
28. **Boukamp P, Rupniak H T, and Fusenig N E.** Environmental modulation of the expression of differentiation and malignancy in six human squamous cell carcinoma cell lines. *Cancer Res.* 1985 ; 45 : 5582-5592.
29. **Boukamp P, Stanbridge E J, Foo D Y, Cerutti P A, and Fusenig N E.** c-Ha-ras oncogene expression in immortalized human keratinocytes (HaCaT) alters growth potential *in vivo* but lacks correlation with malignancy. *Cancer Res.* 1990 ; 50 : 2840-2847.
30. **Bouwstra J A, Gooris G S, Dubbelaar F E, and Ponc M.** Cholesterol sulfate and calcium affect stratum corneum lipid organization over a wide temperature range. *J Lipid Res.* 1999 ; 40 : 2303-2312.
31. **Boyce S T and Ham R G.** Calcium-regulated differentiation of normal human epidermal keratinocytes in chemically defined clonal culture and serum-free serial culture. *J Invest Dermatol.* 1983 ; 81 : 33s-40s.
32. **Bradford M M.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976 ; 72 : 248-254.
33. **Braga V M, Hodivala K J, and Watt F M.** Calcium-induced changes in distribution and solubility of cadherins, integrins and their associated cytoplasmic proteins in human keratinocytes. *Cell Adhes Commun.* 1995 ; 3 : 201-215.
34. **Breitkreutz D, Hornung J, Pohlmann J, Brown-Bierman L, Bohnert A, Bowden P E, and Fusenig N E.** Environmental induction of differentiation-specific keratins in malignant mouse keratinocyte lines. *Eur J Cell Biol.* 1986 ; 42 : 255-267.
35. **Breitkreutz D, Schoop V M, Mirancea N, Baur M, Stark H J, and Fusenig N E.** Epidermal differentiation and basement membrane formation by HaCaT cells in surface transplants. *Eur J Cell Biol.* 1998 ; 75 : 273-286.
36. **Breitkreutz D, Stark H J, Mirancea N, Tomakidi P, Steinbauer H, and Fusenig N E.** Integrin and basement membrane normalization in mouse grafts of human keratinocytes--implications for epidermal homeostasis. *Differentiation.* 1997 ; 61 : 195-209.
37. **Breitkreutz D, Stark H J, Plein P, Baur M, and Fusenig N E.** Differential modulation of epidermal keratinization in immortalized (HaCaT) and tumorigenic human skin keratinocytes (HaCaT-ras) by retinoic acid and extracellular Ca<sup>2+</sup>. *Differentiation.* 1993 ; 54 : 201-217.

38. **Broome A M, Ryan D, and Eckert R L.** S100 protein subcellular localization during epidermal differentiation and psoriasis. *J Histochem Cytochem.* 2003 ; 51 : 675-685.
39. **Brown K W and Parkinson E K.** Extracellular matrix components produced by SV40-transformed human epidermal keratinocytes. *Int J Cancer.* 1984 ; 33 : 257-263.
40. **Buchau A S, Hassan M, Kukova G, Lewerenz V, Kellermann S, Wurthner J U, Wolf R, Walz M, Gallo R L, and Ruzicka T.** S100A15, an antimicrobial protein of the skin: regulation by *E. coli* through Toll-like receptor 4. *J Invest Dermatol.* 2007 ; 127 : 2596-2604.
41. **Cabodi S, Moro L, Bergatto E, Boeri E E, Di S P, Turco E, Tarone G, and Defilippi P.** Integrin regulation of epidermal growth factor (EGF) receptor and of EGF-dependent responses. *Biochem Soc Trans.* 2004 ; 32 : 438-442.
42. **Cabral A, Sayin A, De Winter S., Fischer D F, Pavel S, and Backendorf C.** SPRR4, a novel cornified envelope precursor: UV-dependent epidermal expression and selective incorporation into fragile envelopes. *J Cell Sci.* 2001a ; 114 : 3837-3843.
43. **Cabral A, Voskamp P, Cleton-Jansen A M, South A, Nizetic D, and Backendorf C.** Structural organization and regulation of the small proline-rich family of cornified envelope precursors suggest a role in adaptive barrier function. *J Biol Chem.* 2001b ; 276 : 19231-19237.
44. **Candi E, Melino G, Mei G, Tarcsa E, Chung S I, Marekov L N, and Steinert P M.** Biochemical, structural, and transglutaminase substrate properties of human loricrin, the major epidermal cornified cell envelope protein. *J Biol Chem.* 1995 ; 270 : 26382-26390.
45. **Candi E, Oddi S, Paradisi A, Terrinoni A, Ranalli M, Teofoli P, Citro G, Scarpato S, Puddu P, and Melino G.** Expression of transglutaminase 5 in normal and pathologic human epidermis. *J Invest Dermatol.* 2002 ; 119 : 670-677.
46. **Candi E, Oddi S, Terrinoni A, Paradisi A, Ranalli M, Finazzi-Agro A, and Melino G.** Transglutaminase 5 cross-links loricrin, involucrin, and small proline-rich proteins *in vitro*. *J Biol Chem.* 2001 ; 276 : 35014-35023.
47. **Candi E, Paradisi A, Terrinoni A, Pietroni V, Oddi S, Cadot B, Jogini V, Meiyappan M, Clardy J, Finazzi-Agro A, and Melino G.** Transglutaminase 5 is regulated by guanine-adenine nucleotides. *Biochem J.* 2004 ; 381 : 313-319.
48. **Candi E, Schmidt R, and Melino G.** The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005 ; 6 : 328-340.
49. **Candi E, Tarcsa E, Digiovanna J J, Compton J G, Elias P M, Marekov L N, and Steinert P M.** A highly conserved lysine residue on the head domain of type II keratins is essential for the attachment of keratin intermediate filaments to the cornified cell envelope through isopeptide crosslinking by transglutaminases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 ; 95 : 2067-2072.
50. **Candi E, Tarcsa E, Idler W W, Kartasova T, Marekov L N, and Steinert P M.** Transglutaminase cross-linking properties of the small proline-rich 1 family of cornified cell envelope proteins. Integration with loricrin. *J Biol Chem.* 1999 ; 274 : 7226-7237.

51. **Canguilhem B, Pradines A, Baudouin C, Boby C, Lajoie-Mazenc I, Charveron M, and Favre G.** RhoB protects human keratinocytes from UVB-induced apoptosis through epidermal growth factor receptor signaling. *J Biol Chem.* 2005 ; 280 : 43257-43263.
52. **Carroll D K, Carroll J S, Leong C O, Cheng F, Brown M, Mills A A, Brugge J S, and Ellisen L W.** p63 regulates an adhesion programme and cell survival in epithelial cells. *Nat Cell Biol.* 2006 ; 8 : 551-561.
53. **Chehab N H, Malikzay A, Stavridi E S, and Halazonetis T D.** Phosphorylation of Ser-20 mediates stabilization of human p53 in response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 ; 96 : 13777-13782.
54. **Cook P W, Mattox P A, Keeble W W, Pittelkow M R, Plowman G D, Shoyab M, Adelman J P, and Shipley G D.** A heparin sulfate-regulated human keratinocyte autocrine factor is similar or identical to amphiregulin. *Mol Cell Biol.* 1991a ; 11 : 2547-2557.
55. **Cook P W, Pittelkow M R, and Shipley G D.** Growth factor-independent proliferation of normal human neonatal keratinocytes: production of autocrine- and paracrine-acting mitogenic factors. *J Cell Physiol.* 1991b ; 146 : 277-289.
56. **Cotsarelis G, Sun T T, and Lavker R M.** Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis. *Cell.* 1990 ; 61 : 1329-1337.
57. **Coulombe P A.** Wound epithelialization: accelerating the pace of discovery. *J Invest Dermatol.* 2003 ; 121 : 219-230.
58. **Crish J F, Bone F, Banks E B, and Eckert R L.** The human involucrin gene contains spatially distinct regulatory elements that regulate expression during early versus late epidermal differentiation. *Oncogene.* 2002 ; 21 : 738-747.
59. **Crish J F and Eckert R L.** Synergistic activation of human involucrin gene expression by Fra-1 and p300-evidence for the presence of a multiprotein complex. *J Invest Dermatol.* 2008 ; 128 : 530-541.
60. **Crowe D L.** Retinoic acid mediates post-transcriptional regulation of keratin 19 mRNA levels. *J Cell Sci.* 1993 ; 106 ( Pt 1) : 183-188.
61. **Dale B A, Scofield J A, Hennings H, Stanley J R, and Yuspa S H.** Identification of filaggrin in cultured mouse keratinocytes and its regulation by calcium. *J Invest Dermatol.* 1983 ; 81 : 90s-95s.
62. **Datto M B, Li Y, Panus J F, Howe D J, Xiong Y, and Wang X F.** Transforming growth factor beta induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 ; 92 : 5545-5549.
63. **Davison T S, Vagner C, Kaghad M, Ayed A, Caput D, and Arrowsmith C H.** p73 and p63 are homotetramers capable of weak heterotypic interactions with each other but not with p53. *J Biol Chem.* 1999 ; 274 : 18709-18714.
64. **Denecker G, Hoste E, Gilbert B, Hochepped T, Ovaere P, Lippens S, Van den B C, Van D P, D'Herde K, Hachem J P, Borgonie G, Presland R B, Schoonjans L, Libert C,**



- Vandekerckhove J, Gevaert K, Vandenabeele P, and Declercq W.** Caspase-14 protects against epidermal UVB photodamage and water loss. *Nat Cell Biol.* 2007 ; 9 : 666-674.
65. **Di W L, Rugg E L, Leigh I M, and Kelsell D P.** Multiple epidermal connexins are expressed in different keratinocyte subpopulations including connexin 31. *J Invest Dermatol.* 2001 ; 117 : 958-964.
66. **Di-Poi N, Tan N S, Michalik L, Wahli W, and Desvergne B.** Antiapoptotic role of PPARbeta in keratinocytes via transcriptional control of the Akt1 signaling pathway. *Mol Cell.* 2002 ; 10 : 721-733.
67. **Durocher D and Jackson S P.** DNA-PK, ATM and ATR as sensors of DNA damage: variations on a theme? *Curr Opin Cell Biol.* 2001 ; 13 : 225-231.
68. **Eckert R L, Broome A M, Ruse M, Robinson N, Ryan D, and Lee K.** S100 proteins in the epidermis. *J Invest Dermatol.* 2004a ; 123 : 23-33.
69. **Eckert R L, Crish J F, Banks E B, and Welter J F.** The epidermis: genes on - genes off. *J Invest Dermatol.* 1997 ; 109 : 501-509.
70. **Eckert R L, Crish J F, Efimova T, Dashti S R, Deucher A, Bone F, Adhikary G, Huang G, Gopalakrishnan R, and Balasubramanian S.** Regulation of involucrin gene expression. *J Invest Dermatol.* 2004b ; 123 : 13-22.
71. **Eckert R L and Green H.** Structure and evolution of the human involucrin gene. *Cell.* 1986 ; 46 : 583-589.
72. **Egberts F, Heinrich M, Jensen J M, Winoto-Morbach S, Pfeiffer S, Wickel M, Schunck M, Steude J, Saftig P, Proksch E, and Schutze S.** Cathepsin D is involved in the regulation of transglutaminase 1 and epidermal differentiation. *J Cell Sci.* 2004 ; 117 : 2295-2307.
73. **Eichner R, Sun T T, and Aebi U.** The role of keratin subfamilies and keratin pairs in the formation of human epidermal intermediate filaments. *J Cell Biol.* 1986 ; 102 : 1767-1777.
74. **el-Deiry W S, Tokino T, Velculescu V E, Levy D B, Parsons R, Trent J M, Lin D, Mercer W E, Kinzler K W, and Vogelstein B.** WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell.* 1993 ; 75 : 817-825.
75. **Elder J T, Astrom A, Pettersson U, Tavakkol A, Griffiths C E, Krust A, Kastner P, Chambon P, and Voorhees J J.** Differential regulation of retinoic acid receptors and binding proteins in human skin. *J Invest Dermatol.* 1992 ; 98 : 673-679.
76. **Elias P M.** Epidermal lipids, barrier function, and desquamation. *J Invest Dermatol.* 1983 ; 80 Suppl : 44s-49s.
77. **Elias P M, Ahn S K, Denda M, Brown B E, Crumrine D, Kimutai L K, Komuves L, Lee S H, and Feingold K R.** Modulations in epidermal calcium regulate the expression of differentiation-specific markers. *J Invest Dermatol.* 2002 ; 119 : 1128-1136.
78. **Ellis C N, Varani J, Fisher G J, Zeigler M E, Pershadsingh H A, Benson S C, Chi Y, and Kurtz T W.** Troglitazone improves psoriasis and normalizes models of proliferative

- skin disease: ligands for peroxisome proliferator-activated receptor-gamma inhibit keratinocyte proliferation. *Arch Dermatol.* 2000 ; 136 : 609-616.
79. **Fischer D F and Backendorf C.** Identification of regulatory elements by gene family footprinting and *in vivo* analysis. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2007 ; 104 : 37-64.
  80. **Fischer D F, Gibbs S, van de P P, and Backendorf C.** Interdependent transcription control elements regulate the expression of the *SPRR2A* gene during keratinocyte terminal differentiation. *Mol Cell Biol.* 1996 ; 16 : 5365-5374.
  81. **Fischer D F, Sark M W, Lehtola M M, Gibbs S, van de P P, and Backendorf C.** Structure and evolution of the human *SPRR3* gene: implications for function and regulation. *Genomics.* 1999 ; 55 : 88-99.
  82. **Fisher C, Blumenberg M, and Tomic-Canic M.** Retinoid receptors and keratinocytes. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1995 ; 6 : 284-301.
  83. **Fisher G J and Voorhees J J.** Molecular mechanisms of retinoid actions in skin. *FASEB J.* 1996 ; 10 : 1002-1013.
  84. **Fleckman P, Dale B A, and Holbrook K A.** Profilaggrin, a high-molecular-weight precursor of filaggrin in human epidermis and cultured keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 1985 ; 85 : 507-512.
  85. **Fu Y C, Jin X P, Wei S M, Lin H F, and Kacew S.** Ultraviolet radiation and reactive oxygen generation as inducers of keratinocyte apoptosis: protective role of tea polyphenols. *J Toxicol Environ Health A.* 2000 ; 61 : 177-188.
  86. **Fuchs E.** Epidermal differentiation: the bare essentials. *J Cell Biol.* 1990 ; 111 : 2807-2814.
  87. **Fusenig N E and Boukamp P.** Multiple stages and genetic alterations in immortalization, malignant transformation, and tumor progression of human skin keratinocytes. *Mol Carcinog.* 1998 ; 23 : 144-158.
  88. **Fusenig N E, Dzarlieva-Petrusevska R T, and Breitkreutz D.** Phenotypic and cytogenetic characteristics of different stages during spontaneous transformation of mouse keratinocytes *in vitro*. *Carcinog Compr Surv.* 1985 ; 9 : 293-326.
  89. **Gaiddon C, Lokshin M, Ahn J, Zhang T, and Prives C.** A subset of tumor-derived mutant forms of p53 down-regulate p63 and p73 through a direct interaction with the p53 core domain. *Mol Cell Biol.* 2001 ; 21 : 1874-1887.
  90. **Gandarillas A, Goldsmith L A, Gschmeissner S, Leigh I M, and Watt F M.** Evidence that apoptosis and terminal differentiation of epidermal keratinocytes are distinct processes. *Exp Dermatol.* 1999 ; 8 : 71-79.
  91. **Garach-Jehoshua O, Ravid A, Liberman U A, Reichrath J, Glaser T, and Koren R.** Upregulation of the calcium-dependent protease, calpain, during keratinocyte differentiation. *Br J Dermatol.* 1998 ; 139 : 950-957.

92. **Geilen C C, Bektas M, Wieder T, Kodelja V, Goerdts S, and Orfanos C E.** 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 induces sphingomyelin hydrolysis in HaCaT cells via tumor necrosis factor alpha. *J Biol Chem.* 1997 ; 272 : 8997-9001.
93. **Geilen C C, Bektas M, Wieder T, and Orfanos C E.** The vitamin D3 analogue, calcipotriol, induces sphingomyelin hydrolysis in human keratinocytes. *FEBS Lett.* 1996 ; 378 : 88-92.
94. **Gerke V, Creutz C E, and Moss S E.** Annexins: linking Ca<sup>2+</sup> signalling to membrane dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005 ; 6 : 449-461.
95. **Gerke V and Moss S E.** Annexins: from structure to function. *Physiol Rev.* 2002 ; 82 : 331-371.
96. **Gibbs S, Fijneman R, Wiegant J, van Kessel A G, van de P P, and Backendorf C.** Molecular characterization and evolution of the SPRR family of keratinocyte differentiation markers encoding small proline-rich proteins. *Genomics.* 1993 ; 16 : 630-637.
97. **Gibson D F, Ratnam A V, and Bikle D D.** Evidence for separate control mechanisms at the message, protein, and enzyme activation levels for transglutaminase during calcium-induced differentiation of normal and transformed human keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 1996 ; 106 : 154-161.
98. **Gniadecki R, Hansen M, and Wulf H C.** Two pathways for induction of apoptosis by ultraviolet radiation in cultured human keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 1997 ; 109 : 163-169.
99. **Gonczi M, Szentandrassy N, Fulop L, Telek A, Szigeti G P, Magyar J, Biro T, Nanasi P P, and Csernoch L.** Hypotonic stress influence the membrane potential and alter the proliferation of keratinocytes *in vitro*. *Exp Dermatol.* 2007a ; 16 : 302-310.
100. **Gonczi M, Telek A, Czifra G, Balogh A, Blumberg P M, Biro T, and Csernoch L.** Altered calcium handling following the recombinant overexpression of protein kinase C isoforms in HaCaT cells. *Exp Dermatol.* 2007b ;
101. **Grandori C, Cowley S M, James L P, and Eisenman R N.** The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2000 ; 16 : 653-699.
102. **Green K J and Simpson C L.** Desmosomes: new perspectives on a classic. *J Invest Dermatol.* 2007 ; 127 : 2499-2515.
103. **Grenard P, Bates M K, and Aeschlimann D.** Evolution of transglutaminase genes: identification of a transglutaminase gene cluster on human chromosome 15q15. Structure of the gene encoding transglutaminase X and a novel gene family member, transglutaminase Z. *J Biol Chem.* 2001 ; 276 : 33066-33078.
104. **Griffiths C E, Rosenthal D S, Reddy A P, Elder J T, Astrom A, Leach K, Wang T S, Finkel L J, Yuspa S H, and Voorhees J J.** Short-term retinoic acid treatment increases *in vivo*, but decreases *in vitro*, epidermal transglutaminase-K enzyme activity and immunoreactivity. *J Invest Dermatol.* 1992 ; 99 : 283-288.

105. **Grimbaldeston M A, Geczy C L, Tedla N, Finlay-Jones J J, and Hart P H.** S100A8 induction in keratinocytes by ultraviolet A irradiation is dependent on reactive oxygen intermediates. *J Invest Dermatol.* 2003 ; 121 : 1168-1174.
106. **Hagens G, Masouye I, Augsburger E, Hotz R, Saurat J H, and Siegenthaler G.** Calcium-binding protein S100A7 and epidermal-type fatty acid-binding protein are associated in the cytosol of human keratinocytes. *Biochem J.* 1999 ; 339 ( Pt 2) : 419-427.
107. **Hanley K, Jiang Y, He S S, Friedman M, Elias P M, Bikle D D, Williams M L, and Feingold K R.** Keratinocyte differentiation is stimulated by activators of the nuclear hormone receptor PPARalpha. *J Invest Dermatol.* 1998 ; 110 : 368-375.
108. **Harmand P O, Duval R, Liagre B, Jayat-Vignoles C, Beneytout J L, Delage C, and Simon A.** Ursolic acid induces apoptosis through caspase-3 activation and cell cycle arrest in HaCat cells. *Int J Oncol.* 2003 ; 23 : 105-112.
109. **Hashimoto K.** Regulation of keratinocyte function by growth factors. *J Dermatol Sci.* 2000 ; 24 Suppl 1 : S46-S50.
110. **Hashimoto K, Higashiyama S, Asada H, Hashimura E, Kobayashi T, Sudo K, Nakagawa T, Damm D, Yoshikawa K, and Taniguchi N.** Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor is an autocrine growth factor for human keratinocytes. *J Biol Chem.* 1994 ; 269 : 20060-20066.
111. **Haugen J D, Pittelkow M R, Zinsmeister A R, and Kumar R.** 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits normal human keratinocyte growth by increasing transforming growth factor beta 2 release. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996 ; 229 : 618-623.
112. **Hawker N P, Pennypacker S D, Chang S M, and Bikle D D.** Regulation of human epidermal keratinocyte differentiation by the vitamin D receptor and its coactivators DRIP205, SRC2, and SRC3. *J Invest Dermatol.* 2007 ; 127 : 874-880.
113. **Helledie T, Grontved L, Jensen S S, Küllerich P, Rietveld L, Albrektsen T, Boysen M S, Nohr J, Larsen L K, Fleckner J, Stunnenberg H G, Kristiansen K, and Mandrup S.** The gene encoding the Acyl-CoA-binding protein is activated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma through an intronic response element functionally conserved between humans and rodents. *J Biol Chem.* 2002 ; 277 : 26821-26830.
114. **Hennings H and Holbrook K A.** Calcium regulation of cell-cell contact and differentiation of epidermal cells in culture. An ultrastructural study. *Exp Cell Res.* 1983 ; 143 : 127-142.
115. **Hennings H, Michael D, Cheng C, Steinert P, Holbrook K, and Yuspa S H.** Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture. *Cell.* 1980 ; 19 : 245-254.
116. **Hennings H, Steinert P, and Buxman M M.** Calcium induction of transglutaminase and the formation of epsilon(gamma-glutamyl) lysine cross-links in cultured mouse epidermal cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1981 ; 102 : 739-745.

117. **Higuchi K, Kawashima M, Takagi Y, Kondo H, Yada Y, Ichikawa Y, and Imokawa G.** Sphingosylphosphorylcholine is an activator of transglutaminase activity in human keratinocytes. *J Lipid Res.* 2001 ; 42 : 1562-1570.
118. **Hitomi K.** Transglutaminases in skin epidermis. *Eur J Dermatol.* 2005 ; 15 : 313-319.
119. **Hitomi K, Presland R B, Nakayama T, Fleckman P, Dale B A, and Maki M.** Analysis of epidermal-type transglutaminase (transglutaminase 3) in human stratified epithelia and cultured keratinocytes using monoclonal antibodies. *J Dermatol Sci.* 2003 ; 32 : 95-103.
120. **Hockenbery D M, Zutter M, Hickey W, Nahm M, and Korsmeyer S J.** BCL2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 ; 88 : 6961-6965.
121. **Hohl D, Lichti U, Breitskreutz D, Steinert P M, and Roop D R.** Transcription of the human loricrin gene *in vitro* is induced by calcium and cell density and suppressed by retinoic acid. *J Invest Dermatol.* 1991a ; 96 : 414-418.
122. **Hohl D, Mehrel T, Lichti U, Turner M L, Roop D R, and Steinert P M.** Characterization of human loricrin. Structure and function of a new class of epidermal cell envelope proteins. *J Biol Chem.* 1991b ; 266 : 6626-6636.
123. **Houben E, De P K, and Rogiers V.** A keratinocyte's course of life. *Skin Pharmacol Physiol.* 2007 ; 20 : 122-132.
124. **Huber M, Siegenthaler G, Mirancea N, Marenholz I, Nizetic D, Breitskreutz D, Mischke D, and Hohl D.** Isolation and characterization of human repetin, a member of the fused gene family of the epidermal differentiation complex. *J Invest Dermatol.* 2005 ; 124 : 998-1007.
125. **Huff C A, Yuspa S H, and Rosenthal D.** Identification of control elements 3' to the human keratin 1 gene that regulate cell type and differentiation-specific expression. *J Biol Chem.* 1993 ; 268 : 377-384.
126. **Hynes R O.** Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell.* 1992 ; 69 : 11-25.
127. **Ihrle R A, Marques M R, Nguyen B T, Horner J S, Papazoglu C, Bronson R T, Mills A A, and Attardi L D.** Perp is a p63-regulated gene essential for epithelial integrity. *Cell.* 2005 ; 120 : 843-856.
128. **Iizuka R, Chiba K, and Imajoh-Ohmi S.** A novel approach for the detection of proteolytically activated transglutaminase 1 in epidermis using cleavage site-directed antibodies. *J Invest Dermatol.* 2003 ; 121 : 457-464.
129. **Irie K, Shimizu K, Sakisaka T, Ikeda W, and Takai Y.** Roles and modes of action of nectins in cell-cell adhesion. *Semin Cell Dev Biol.* 2004 ; 15 : 643-656.
130. **Ishida-Yamamoto A, Hashimoto Y, Manabe M, O'Guin W M, Dale B A, and Iizuka H.** Distinctive expression of filaggrin and trichohyalin during various pathways of epithelial differentiation. *Br J Dermatol.* 1997 ; 137 : 9-16.

131. **Ishida-Yamamoto A, Tanaka H, Nakane H, Takahashi H, Hashimoto Y, and Iizuka H.** Programmed cell death in normal epidermis and loricrin keratoderma. Multiple functions of profilaggrin in keratinization. *J Invest Dermatol Symp Proc.* 1999 ; 4 : 145-149.
132. **Jang S I, Karaman-Jurukovska N, Morasso M I, Steinert P M, and Markova N G.** Complex interactions between epidermal POU domain and activator protein 1 transcription factors regulate the expression of the profilaggrin gene in normal human epidermal keratinocytes. *J Biol Chem.* 2000 ; 275 : 15295-15304.
133. **Jang S I and Steinert P M.** Loricrin expression in cultured human keratinocytes is controlled by a complex interplay between transcription factors of the Sp1, CREB, AP1, and AP2 families. *J Biol Chem.* 2002 ; 277 : 42268-42279.
134. **Jang S I, Steinert P M, and Markova N G.** Activator protein 1 activity is involved in the regulation of the cell type-specific expression from the proximal promoter of the human profilaggrin gene. *J Biol Chem.* 1996 ; 271 : 24105-24114.
135. **Jensen U B, Lowell S, and Watt F M.** The spatial relationship between stem cells and their progeny in the basal layer of human epidermis: a new view based on whole-mount labelling and lineage analysis. *Development.* 1999 ; 126 : 2409-2418.
136. **Jhappan C, Yusufzai T M, Anderson S, Anver M R, and Merlino G.** The p53 response to DNA damage *in vivo* is independent of DNA-dependent protein kinase. *Mol Cell Biol.* 2000 ; 20 : 4075-4083.
137. **Jinquan T, Vorum H, Larsen C G, Madsen P, Rasmussen H H, Gesser B, Etzerodt M, Honore B, Celis J E, and Thestrup-Pedersen K.** Psoriasin: a novel chemotactic protein. *J Invest Dermatol.* 1996 ; 107 : 5-10.
138. **Jones P H, Harper S, and Watt F M.** Stem cell patterning and fate in human epidermis. *Cell.* 1995 ; 80 : 83-93.
139. **Kanitakis J.** Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur J Dermatol.* 2002 ; 12 : 390-399.
140. **Kartasova T and van de Putte P.** Isolation, characterization, and UV-stimulated expression of two families of genes encoding polypeptides of related structure in human epidermal keratinocytes. *Mol Cell Biol.* 1988 ; 8 : 2195-2203.
141. **Kartasova T, van Muijen G N, van Pelt-Heerschap H, and van de Putte P.** Novel protein in human epidermal keratinocytes: regulation of expression during differentiation. *Mol Cell Biol.* 1988 ; 8 : 2204-2210.
142. **Kawabe S, Ikuta T, Ohba M, Chida K, Ueda E, Yamanishi K, and Kuroki T.** Cholesterol sulfate activates transcription of transglutaminase 1 gene in normal human keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 1998 ; 111 : 1098-1102.
143. **Kee S H and Steinert P M.** Microtubule disruption in keratinocytes induces cell-cell adhesion through activation of endogenous E-cadherin. *Mol Biol Cell.* 2001 ; 12 : 1983-1993.

144. **Kielar D, Kaminski W E, Liebisch G, Piehler A, Wenzel J J, Mohle C, Heimerl S, Langmann T, Friedrich S O, Bottcher A, Barlage S, Drobnik W, and Schmitz G.** Adenosine triphosphate binding cassette (ABC) transporters are expressed and regulated during terminal keratinocyte differentiation: a potential role for ABCA7 in epidermal lipid reorganization. *J Invest Dermatol.* 2003 ; 121 : 465-474.
145. **Kim C D, Seo E Y, Sung Y H, Kim H W, Seo Y J, Park J K, and Lee J H.** Characterization of Ets-binding sequence of human transglutaminase 3 gene promoter. *Exp Dermatol.* 2004 ; 13 : 529-534.
146. **Kim D J, Bility M T, Billin A N, Willson T M, Gonzalez F J, and Peters J M.** PPARbeta/delta selectively induces differentiation and inhibits cell proliferation. *Cell Death Differ.* 2006 ; 13 : 53-60.
147. **Kim S Y and Bae C D.** Calpain inhibitors reduce the cornified cell envelope formation by inhibiting proteolytic processing of transglutaminase 1. *Exp Mol Med.* 1998 ; 30 : 257-262.
148. **Kim S Y, Chung S I, and Steinert P M.** Highly active soluble processed forms of the transglutaminase 1 enzyme in epidermal keratinocytes. *J Biol Chem.* 1995 ; 270 : 18026-18035.
149. **Kimura T E, Merritt A J, and Garrod D R.** Calcium-independent desmosomes of keratinocytes are hyper-adhesive. *J Invest Dermatol.* 2007 ; 127 : 775-781.
150. **Kolly C, Suter M M, and Muller E J.** Proliferation, cell cycle exit, and onset of terminal differentiation in cultured keratinocytes: pre-programmed pathways in control of C-Myc and Notch1 prevail over extracellular calcium signals. *J Invest Dermatol.* 2005 ; 124 : 1014-1025.
151. **Koster M I, Huntzinger K A, and Roop D R.** Epidermal differentiation: transgenic/knockout mouse models reveal genes involved in stem cell fate decisions and commitment to differentiation. *J Invest Dermatol Symp Proc.* 2002 ; 7 : 41-45.
152. **Koster M I, Kim S, Mills A A, DeMayo F J, and Roop D R.** p63 is the molecular switch for initiation of an epithelial stratification program. *Genes Dev.* 2004 ; 18 : 126-131.
153. **Krajewski S, Krajewska M, and Reed J C.** Immunohistochemical analysis of *in vivo* patterns of Bak expression, a proapoptotic member of the Bcl-2 protein family. *Cancer Res.* 1996 ; 56 : 2849-2855.
154. **Kurata S, Okuyama T, Osada M, Watanabe T, Tomimori Y, Sato S, Iwai A, Tsuji T, Ikawa Y, and Katoh I.** p51/p63 Controls subunit alpha3 of the major epidermis integrin anchoring the stem cells to the niche. *J Biol Chem.* 2004 ; 279 : 50069-50077.
155. **Kuwabara I, Kuwabara Y, Yang R Y, Schuler M, Green D R, Zuraw B L, Hsu D K, and Liu F T.** Galectin-7 (PIG1) exhibits pro-apoptotic function through JNK activation and mitochondrial cytochrome c release. *J Biol Chem.* 2002 ; 277 : 3487-3497.
156. **Ladd P A, Du L, Capdevila J H, Mernaugh R, and Keeney D S.** Epoxyeicosatrienoic acids activate transglutaminases *in situ* and induce cornification of epidermal keratinocytes. *J Biol Chem.* 2003 ; 278 : 35184-35192.

157. **Lallemand C, Bayat-Sarmadi M, Blanchard B, and Tovey M G.** Identification of a novel transcriptional regulatory element common to the p53 and interferon regulatory factor 1 genes. *J Biol Chem.* 1997 ; 272 : 29801-29809.
158. **Lallemand C, Palmieri M, Blanchard B, Meritet J F, and Tovey M G.** GAAP-1: a transcriptional activator of p53 and IRF-1 possesses pro-apoptotic activity. *EMBO Rep.* 2002 ; 3 : 153-158.
159. **Langlois S, Maher A C, Manias J L, Shao Q, Kidder G M, and Laird D W.** Connexin levels regulate keratinocyte differentiation in the epidermis. *J Biol Chem.* 2007 ;
160. **Lechler T and Fuchs E.** Asymmetric cell divisions promote stratification and differentiation of mammalian skin. *Nature.* 2005 ; 437 : 275-280.
161. **Lee H K, Nam G W, Kim S H, and Lee S H.** Phytocomponents of triterpenoids, oleanolic acid and ursolic acid, regulated differently the processing of epidermal keratinocytes via PPAR-alpha pathway. *Exp Dermatol.* 2006 ; 15 : 66-73.
162. **Lee J H, Jang S I, Yang J M, Markova N G, and Steinert P M.** The proximal promoter of the human transglutaminase 3 gene. Stratified squamous epithelial-specific expression in cultured cells is mediated by binding of Sp1 and ets transcription factors to a proximal promoter element. *J Biol Chem.* 1996 ; 271 : 4561-4568.
163. **Lee J K, Kim J H, Nam K T, and Lee S H.** Molecular events associated with apoptosis and proliferation induced by ultraviolet-B radiation in the skin of hairless mice. *J Dermatol Sci.* 2003 ; 32 : 171-179.
164. **Lee S C, Kim I G, Marekov L N, O'Keefe E J, Parry D A, and Steinert P M.** The structure of human trichohyalin. Potential multiple roles as a functional EF-hand-like calcium-binding protein, a cornified cell envelope precursor, and an intermediate filament-associated (cross-linking) protein. *J Biol Chem.* 1993 ; 268 : 12164-12176.
165. **Leger D Y, Battu S, Liagre B, Cardot P J, and Beneytout J L.** Sedimentation field flow fractionation to study human erythroleukemia cell megakaryocytic differentiation after short period diosgenin induction. *J Chromatogr A.* 2007 ; 1157 : 309-320.
166. **Leger D Y, Liagre B, Cardot P J, Beneytout J L, and Battu S.** Diosgenin dose-dependent apoptosis and differentiation induction in human erythroleukemia cell line and sedimentation field-flow fractionation monitoring. *Anal Biochem.* 2004 ; 335 : 267-278.
167. **Lehen'kyi V, Beck B, Polakowska R, Charveron M, Bordat P, Skryma R, and Prevarskaya N.** TRPV6 is a Ca<sup>2+</sup> entry channel essential for Ca<sup>2+</sup>-induced differentiation of human keratinocytes. *J Biol Chem.* 2007 ; 282 : 22582-22591.
168. **Lehman T A, Modali R, Boukamp P, Stanek J, Bennett W P, Welsh J A, Metcalf R A, Stampfer M R, Fusenig N, and Rogan E M.** p53 mutations in human immortalized epithelial cell lines. *Carcinogenesis.* 1993 ; 14 : 833-839.
169. **Lewis J E, Jensen P J, and Wheelock M J.** Cadherin function is required for human keratinocytes to assemble desmosomes and stratify in response to calcium. *J Invest Dermatol.* 1994 ; 102 : 870-877.



170. **Li W, Henry G, Fan J, Bandyopadhyay B, Pang K, Garner W, Chen M, and Woodley D T.** Signals that initiate, augment, and provide directionality for human keratinocyte motility. *J Invest Dermatol.* 2004 ; 123 : 622-633.
171. **Li Y, Fan J, Chen M, Li W, and Woodley D T.** Transforming growth factor-alpha: a major human serum factor that promotes human keratinocyte migration. *J Invest Dermatol.* 2006 ; 126 : 2096-2105.
172. **Liang P, Jiang B, Yang X, Xiao X, Huang X, Long J, Zhang P, Zhang M, Xiao M, Xie T, and Huang X.** The role of peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta in epidermal growth factor-induced HaCaT cell proliferation. *Exp Cell Res.* 2008 ; 314 : 3142-3151.
173. **Liew F M and Yamanishi K.** Regulation of transglutaminase 1 gene expression by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate, dexamethasone, and retinoic acid in cultured human keratinocytes. *Exp Cell Res.* 1992 ; 202 : 310-315.
174. **Lim S W, Hong S P, Jeong S W, Kim B, Bak H, Ryoo H C, Lee S H, and Ahn S K.** Simultaneous effect of ursolic acid and oleanolic acid on epidermal permeability barrier function and epidermal keratinocyte differentiation via peroxisome proliferator-activated receptor-alpha. *J Dermatol.* 2007 ; 34 : 625-634.
175. **Lippens S, Denecker G, Ovaere P, Vandenabeele P, and Declercq W.** Death penalty for keratinocytes: apoptosis versus cornification. *Cell Death Differ.* 2005 ; 12 Suppl 2 : 1497-1508.
176. **Liu M, Dhanwada K R, Birt D F, Hecht S, and Pelling J C.** Increase in p53 protein half-life in mouse keratinocytes following UV-B irradiation. *Carcinogenesis.* 1994 ; 15 : 1089-1092.
177. **Lyle S, Christofidou-Solomidou M, Liu Y, Elder D E, Albelda S, and Cotsarelis G.** The C8/144B monoclonal antibody recognizes cytokeratin 15 and defines the location of human hair follicle stem cells. *J Cell Sci.* 1998 ; 111 ( Pt 21) : 3179-3188.
178. **Maceyka M, Payne S G, Milstien S, and Spiegel S.** Sphingosine kinase, sphingosine-1-phosphate, and apoptosis. *Biochim Biophys Acta.* 2002 ; 1585 : 193-201.
179. **MacNeil S.** Progress and opportunities for tissue-engineered skin. *Nature.* 2007 ; 445 : 874-880.
180. **Magnaldo T, Bernerd F, Asselineau D, and Darmon M.** Expression of loricrin is negatively controlled by retinoic acid in human epidermis reconstructed *in vitro*. *Differentiation.* 1992 ; 49 : 39-46.
181. **Mailand N, Falck J, Lukas C, Syljuasen R G, Welcker M, Bartek J, and Lukas J.** Rapid destruction of human Cdc25A in response to DNA damage. *Science.* 2000 ; 288 : 1425-1429.
182. **Manitz M P, Horst B, Seeliger S, Strey A, Skryabin B V, Gunzer M, Frings W, Schonlau F, Roth J, Sorg C, and Nacken W.** Loss of S100A9 (MRP14) results in reduced interleukin-8-induced CD11b surface expression, a polarized microfilament system, and

- diminished responsiveness to chemoattractants *in vitro*. Mol Cell Biol. 2003 ; 23 : 1034-1043.
183. **Manohar A, Shome S G, Lamar J, Stirling L, Iyer V, Pumiglia K, and DiPersio C M.** Alpha 3 beta 1 integrin promotes keratinocyte cell survival through activation of a MEK/ERK signaling pathway. J Cell Sci. 2004 ; 117 : 4043-4054.
  184. **Mao-Qiang M, Feingold K R, Jain M, and Elias P M.** Extracellular processing of phospholipids is required for permeability barrier homeostasis. J Lipid Res. 1995 ; 36 : 1925-1935.
  185. **Marikovsky M, Breuing K, Liu P Y, Eriksson E, Higashiyama S, Farber P, Abraham J, and Klagsbrun M.** Appearance of heparin-binding EGF-like growth factor in wound fluid as a response to injury. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993 ; 90 : 3889-3893.
  186. **Marionnet C, Bernerd F, Dumas A, Verrecchia F, Mollier K, Compan D, Bernard B, Lahfa M, Leclaire J, Medaisko C, Mehul B, Seite S, Mauviel A, and Dubertret L.** Modulation of gene expression induced in human epidermis by environmental stress *in vivo*. J Invest Dermatol. 2003 ; 121 : 1447-1458.
  187. **Mariotti A, Kedeshian P A, Dans M, Curatola A M, Gagnoux-Palacios L, and Giancotti F G.** EGF-R signaling through Fyn kinase disrupts the function of integrin alpha6beta4 at hemidesmosomes: role in epithelial cell migration and carcinoma invasion. J Cell Biol. 2001 ; 155 : 447-458.
  188. **Markova N G, Marekov L N, Chipev C C, Gan S Q, Idler W W, and Steinert P M.** Profilaggrin is a major epidermal calcium-binding protein. Mol Cell Biol. 1993 ; 13 : 613-625.
  189. **Marshall D, Hardman M J, Nield K M, and Byrne C.** Differentially expressed late constituents of the epidermal cornified envelope. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 ; 98 : 13031-13036.
  190. **Martinsson H, Yhr M, and Enerback C.** Expression patterns of S100A7 (psoriasin) and S100A9 (calgranulin-B) in keratinocyte differentiation. Exp Dermatol. 2005 ; 14 : 161-168.
  191. **Mascia F, Mariani V, Girolomoni G, and Pastore S.** Blockade of the EGF receptor induces a deranged chemokine expression in keratinocytes leading to enhanced skin inflammation. Am J Pathol. 2003 ; 163 : 303-312.
  192. **Matsuura H, Adachi H, Smart R C, Xu X, Arata J, and Jetten A M.** Correlation between expression of peroxisome proliferator-activated receptor beta and squamous differentiation in epidermal and tracheobronchial epithelial cells. Mol Cell Endocrinol. 1999 ; 147 : 85-92.
  193. **Mauro T, Bench G, Sidderas-Haddad E, Feingold K, Elias P, and Cullander C.** Acute barrier perturbation abolishes the Ca<sup>2+</sup> and K<sup>+</sup> gradients in murine epidermis: quantitative measurement using PIXE. J Invest Dermatol. 1998 ; 111 : 1198-1201.
  194. **Mauro T M, Isseroff R R, Lasarow R, and Pappone P A.** Ion channels are linked to differentiation in keratinocytes. J Membr Biol. 1993 ; 132 : 201-209.

195. **Melino G, Lu X, Gasco M, Crook T, and Knight R A.** Functional regulation of p73 and p63: development and cancer. *Trends Biochem Sci.* 2003 ; 28 : 663-670.
196. **Menon G K, Ghadially R, Williams M L, and Elias P M.** Lamellar bodies as delivery systems of hydrolytic enzymes: implications for normal and abnormal desquamation. *Br J Dermatol.* 1992 ; 126 : 337-345.
197. **Menon G K, Grayson S, and Elias P M.** Ionic calcium reservoirs in mammalian epidermis: ultrastructural localization by ion-capture cytochemistry. *J Invest Dermatol.* 1985 ; 84 : 508-512.
198. **Mese G, Richard G, and White T W.** Gap junctions: basic structure and function. *J Invest Dermatol.* 2007 ; 127 : 2516-2524.
199. **Michel M, Torok N, Godbout M J, Lussier M, Gaudreau P, Royal A, and Germain L.** Keratin 19 as a biochemical marker of skin stem cells *in vivo* and *in vitro*: keratin 19 expressing cells are differentially localized in function of anatomic sites, and their number varies with donor age and culture stage. *J Cell Sci.* 1996 ; 109 ( Pt 5) : 1017-1028.
200. **Michel S, Reichert U, Isnard J L, Shroot B, and Schmidt R.** Retinoic acid controls expression of epidermal transglutaminase at the pre-translational level. *FEBS Lett.* 1989 ; 258 : 35-38.
201. **Michieli P, Chetid M, Lin D, Pierce J H, Mercer W E, and Givol D.** Induction of WAF1/CIP1 by a p53-independent pathway. *Cancer Res.* 1994 ; 54 : 3391-3395.
202. **Missero C, Di C F, Kiyokawa H, Koff A, and Dotto G P.** The absence of p21Cip1/WAF1 alters keratinocyte growth and differentiation and promotes ras-tumor progression. *Genes Dev.* 1996 ; 10 : 3065-3075.
203. **Mizutani Y, Kihara A, and Igarashi Y.** Identification of the human sphingolipid C4-hydroxylase, hDES2, and its up-regulation during keratinocyte differentiation. *FEBS Lett.* 2004 ; 563 : 93-97.
204. **Moll R, Franke W W, Schiller D L, Geiger B, and Krepler R.** The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell.* 1982 ; 31 : 11-24.
205. **Montell C, Birnbaumer L, and Flockerzi V.** The TRP channels, a remarkably functional family. *Cell.* 2002 ; 108 : 595-598.
206. **Morse L, Chen D, Franklin D, Xiong Y, and Chen-Kiang S.** Induction of cell cycle arrest and B cell terminal differentiation by CDK inhibitor p18(INK4c) and IL-6. *Immunity.* 1997 ; 6 : 47-56.
207. **Mosmann T.** Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983 ; 65 : 55-63.
208. **Motomura W, Inoue M, Ohtake T, Takahashi N, Nagamine M, Tanno S, Kohgo Y, and Okumura T.** Up-regulation of ADRP in fatty liver in human and liver steatosis in mice fed with high fat diet. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 ; 340 : 1111-1118.

209. **Nachat R, Mechin M C, Takahara H, Chavanas S, Charveron M, Serre G, and Simon M.** Peptidylarginine deiminase isoforms 1-3 are expressed in the epidermis and involved in the deimination of K1 and filaggrin. *J Invest Dermatol.* 2005 ; 124 : 384-393.
210. **Navarro J M, Casatorres J, and Jorcano J L.** Elements controlling the expression and induction of the skin hyperproliferation-associated keratin K6. *J Biol Chem.* 1995 ; 270 : 21362-21367.
211. **Nemes Z, Demeny M, Marekov L N, Fesus L, and Steinert P M.** Cholesterol 3-sulfate interferes with cornified envelope assembly by diverting transglutaminase 1 activity from the formation of cross-links and esters to the hydrolysis of glutamine. *J Biol Chem.* 2000 ; 275 : 2636-2646.
212. **Nemes Z, Marekov L N, Fesus L, and Steinert P M.** A novel function for transglutaminase 1: attachment of long-chain omega-hydroxyceramides to involucrin by ester bond formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 ; 96 : 8402-8407.
213. **Nemes Z and Steinert P M.** Bricks and mortar of the epidermal barrier. *Exp Mol Med.* 1999 ; 31 : 5-19.
214. **Ng D C, Shafae S, Lee D, and Bikle D D.** Requirement of an AP-1 site in the calcium response region of the involucrin promoter. *J Biol Chem.* 2000 ; 275 : 24080-24088.
215. **Nickoloff B J, Qin J Z, Chaturvedi V, Bacon P, Panella J, and Denning M F.** Life and death signaling pathways contributing to skin cancer. *J Invest Dermatol Symp Proc.* 2002 ; 7 : 27-35.
216. **Nicotera P and Melino G.** Caspase-14 and epidermis maturation. *Nat Cell Biol.* 2007 ; 9 : 621-622.
217. **Niessen C M.** Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function 1. *J Invest Dermatol.* 2007 ; 127 : 2525-2532.
218. **Nievers M G, Schaapveld R Q, and Sonnenberg A.** Biology and function of hemidesmosomes. *Matrix Biol.* 1999 ; 18 : 5-17.
219. **Oda Y, Ishikawa M H, Hawker N P, Yun Q C, and Bikle D D.** Differential role of two VDR coactivators, DRIP205 and SRC-3, in keratinocyte proliferation and differentiation. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2007 ; 103 : 776-780.
220. **Oda Y, Tu C L, Chang W, Crumrine D, Komuves L, Mauro T, Elias P M, and Bikle D D.** The calcium sensing receptor and its alternatively spliced form in murine epidermal differentiation. *J Biol Chem.* 2000 ; 275 : 1183-1190.
221. **Oh I H and Reddy E P.** The myb gene family in cell growth, differentiation and apoptosis. *Oncogene.* 1999 ; 18 : 3017-3033.
222. **Papp H, Czifra G, Lazar J, Gonczi M, Csernoch L, Kovacs L, and Biro T.** Protein kinase C isozymes regulate proliferation and high cell density-mediated differentiation in HaCaT keratinocytes. *Exp Dermatol.* 2003 ; 12 : 811-824.

223. **Paramio J M, Casanova M L, Segrelles C, Mittnacht S, Lane E B, and Jorcano J L.** Modulation of cell proliferation by cytokeratins K10 and K16. *Mol Cell Biol.* 1999 ; 19 : 3086-3094.
224. **Pastore S, Mascia F, Mariani V, and Girolomoni G.** The epidermal growth factor receptor system in skin repair and inflammation. *J Invest Dermatol.* 2008 ; 128 : 1365-1374.
225. **Pearson D J, Dale B A, and Presland R B.** Functional analysis of the profilaggrin N-terminal peptide: identification of domains that regulate nuclear and cytoplasmic distribution. *J Invest Dermatol.* 2002 ; 119 : 661-669.
226. **Pearson D J, Nirunsuksiri W, Rehemtulla A, Lewis S P, Presland R B, and Dale B A.** Proprotein convertase expression and localization in epidermis: evidence for multiple roles and substrates. *Exp Dermatol.* 2001 ; 10 : 193-203.
227. **Pellegrini G, Dellambra E, Golisano O, Martinelli E, Fantozzi I, Bondanza S, Ponzin D, McKeon F, and De L M.** p63 identifies keratinocyte stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 ; 98 : 3156-3161.
228. **Peters J M, Lee S S, Li W, Ward J M, Gavrilova O, Everett C, Reitman M L, Hudson L D, and Gonzalez F J.** Growth, adipose, brain, and skin alterations resulting from targeted disruption of the mouse peroxisome proliferator-activated receptor beta(delta). *Mol Cell Biol.* 2000 ; 20 : 5119-5128.
229. **Phillips M A, Jessen B A, Lu Y, Qin Q, Stevens M E, and Rice R H.** A distal region of the human TGM1 promoter is required for expression in transgenic mice and cultured keratinocytes. *BMC Dermatol.* 2004 ; 4 : 2-
230. **Pilcher B K, Dumin J, Schwartz M J, Mast B A, Schultz G S, Parks W C, and Welgus H G.** Keratinocyte collagenase-1 expression requires an epidermal growth factor receptor autocrine mechanism. *J Biol Chem.* 1999 ; 274 : 10372-10381.
231. **Pilcher B K, Dumin J A, Sudbeck B D, Krane S M, Welgus H G, and Parks W C.** The activity of collagenase-1 is required for keratinocyte migration on a type I collagen matrix. *J Cell Biol.* 1997 ; 137 : 1445-1457.
232. **Pillai S and Bikle D D.** Adenosine triphosphate stimulates phosphoinositide metabolism, mobilizes intracellular calcium, and inhibits terminal differentiation of human epidermal keratinocytes. *J Clin Invest.* 1992 ; 90 : 42-51.
233. **Pillai S, Bikle D D, Mancianti M L, Cline P, and Hincenbergs M.** Calcium regulation of growth and differentiation of normal human keratinocytes: modulation of differentiation competence by stages of growth and extracellular calcium. *J Cell Physiol.* 1990 ; 143 : 294-302.
234. **Pittelkow M R, Cook P W, Shipley G D, Derynck R, and Coffey R J, Jr.** Autonomous growth of human keratinocytes requires epidermal growth factor receptor occupancy. *Cell Growth Differ.* 1993 ; 4 : 513-521.
235. **Pivarcsi A, Szell M, Kemeny L, Dobozy A, and Bata-Csorgo Z.** Serum factors regulate the expression of the proliferation-related genes alpha5 integrin and keratin 1, but not keratin 10, in HaCaT keratinocytes. *Arch Dermatol Res.* 2001 ; 293 : 206-213.

236. **Ponec M, Weerheim A, Kempenaar J, Mulder A, Gooris G S, Bouwstra J, and Mommaas A M.** The formation of competent barrier lipids in reconstructed human epidermis requires the presence of vitamin C. *J Invest Dermatol.* 1997 ; 109 : 348-355.
237. **Porter R M and Lane E B.** Phenotypes, genotypes and their contribution to understanding keratin function. *Trends Genet.* 2003 ; 19 : 278-285.
238. **Poumay Y, Herphelin F, Smits P, De P, I, and Pittelkow M R.** High-cell-density phorbol ester and retinoic acid upregulate involucrin and downregulate suprabasal keratin 10 in autocrine cultures of human epidermal keratinocytes. *Mol Cell Biol Res Commun.* 1999 ; 2 : 138-144.
239. **Poumay Y and Pittelkow M R.** Cell density and culture factors regulate keratinocyte commitment to differentiation and expression of suprabasal K1/K10 keratins. *J Invest Dermatol.* 1995 ; 104 : 271-276.
240. **Powell T J, Ben-Bassat H, Klein B Y, Chen H, Shenoy N, McCollough J, Narog B, Gazit A, Harzstark Z, Chaouat M, Levitzki R, Tang C, McMahon J, Shawver L, and Levitzki A.** Growth inhibition of psoriatic keratinocytes by quinazoline tyrosine kinase inhibitors. *Br J Dermatol.* 1999 ; 141 : 802-810.
241. **Presland R B, Bassuk J A, Kimball J R, and Dale B A.** Characterization of two distinct calcium-binding sites in the amino-terminus of human profilaggrin. *J Invest Dermatol.* 1995 ; 104 : 218-223.
242. **Presland R B, Haydock P V, Fleckman P, Nirunsuksiri W, and Dale B A.** Characterization of the human epidermal profilaggrin gene. Genomic organization and identification of an S-100-like calcium binding domain at the amino terminus. *J Biol Chem.* 1992 ; 267 : 23772-23781.
243. **Presland R B, Kuechle M K, Lewis S P, Fleckman P, and Dale B A.** Regulated expression of human filaggrin in keratinocytes results in cytoskeletal disruption, loss of cell-cell adhesion, and cell cycle arrest. *Exp Cell Res.* 2001a ; 270 : 199-213.
244. **Presland R B, Tomic-Canic M, Lewis S P, and Dale B A.** Regulation of human profilaggrin promoter activity in cultured epithelial cells by retinoic acid and glucocorticoids. *J Dermatol Sci.* 2001b ; 27 : 192-205.
245. **Prunieras M, Regnier M, and Woodley D.** Methods for cultivation of keratinocytes with an air-liquid interface. *J Invest Dermatol.* 1983 ; 81 : 28s-33s.
246. **Radoja N, Diaz D V, Minars T J, Freedberg I M, Blumenberg M, and Tomic-Canic M.** Specific organization of the negative response elements for retinoic acid and thyroid hormone receptors in keratin gene family. *J Invest Dermatol.* 1997 ; 109 : 566-572.
247. **Raj D, Brash D E, and Grossman D.** Keratinocyte apoptosis in epidermal development and disease. *J Invest Dermatol.* 2006 ; 126 : 243-257.
248. **Rathmell W K, Kaufmann W K, Hurt J C, Byrd L L, and Chu G.** DNA-dependent protein kinase is not required for accumulation of p53 or cell cycle arrest after DNA damage. *Cancer Res.* 1997 ; 57 : 68-74.

249. **Ratnam A V, Bikle D D, and Cho J K.** 1,25 dihydroxyvitamin D3 enhances the calcium response of keratinocytes. *J Cell Physiol.* 1999 ; 178 : 188-196.
250. **Rehan V K, Wang Y, Patel S, Santos J, and Torday J S.** Rosiglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist, prevents hyperoxia-induced neonatal rat lung injury *in vivo*. *Pediatr Pulmonol.* 2006 ; 41 : 558-569.
251. **Resing K A, Thulin C, Whiting K, al-Alawi N, and Mostad S.** Characterization of profilaggrin endoproteinase 1. A regulated cytoplasmic endoproteinase of epidermis. *J Biol Chem.* 1995 ; 270 : 28193-28198.
252. **Rety S, Osterloh D, Arie J P, Tabaries S, Seeman J, Russo-Marie F, Gerke V, and Lewit-Bentley A.** Structural basis of the Ca<sup>2+</sup>-dependent association between S100C (S100A11) and its target, the N-terminal part of annexin I. *Structure.* 2000 ; 8 : 175-184.
253. **Reynisdottir I and Massague J.** The subcellular locations of p15(Ink4b) and p27(Kip1) coordinate their inhibitory interactions with cdk4 and cdk2. *Genes Dev.* 1997 ; 11 : 492-503.
254. **Rheinwald J G and Beckett M A.** Defective terminal differentiation in culture as a consistent and selectable character of malignant human keratinocytes. *Cell.* 1980 ; 22 : 629-632.
255. **Rheinwald J G and Green H.** Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell.* 1975 ; 6 : 331-343.
256. **Rice R H and Green H.** Presence in human epidermal cells of a soluble protein precursor of the cross-linked envelope: activation of the cross-linking by calcium ions. *Cell.* 1979 ; 18 : 681-694.
257. **Rieck M, Meissner W, Ries S, Muller-Brusselbach S, and Muller R.** Ligand-mediated regulation of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) beta/delta: a comparative analysis of PPAR-selective agonists and all-trans retinoic acid. *Mol Pharmacol.* 2008 ; 74 : 1269-1277.
258. **Rittie L, Varani J, Kang S, Voorhees J J, and Fisher G J.** Retinoid-induced epidermal hyperplasia is mediated by epidermal growth factor receptor activation *via* specific induction of its ligands heparin-binding EGF and amphiregulin in human skin *in vivo*. *J Invest Dermatol.* 2006 ; 126 : 732-739.
259. **Rival Y, Beneteau N, Chapuis V, Taillandier T, Lestienne F, Dupont-Passelaigue E, Patoiseau J F, Colpaert F C, and Junquero D.** Cardiovascular drugs inhibit MMP-9 activity from human THP-1 macrophages. *DNA Cell Biol.* 2004 ; 23 : 283-292.
260. **Rivier M, Castiel I, Safonova I, Ailhaud G, and Michel S.** Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha enhances lipid metabolism in a skin equivalent model. *J Invest Dermatol.* 2000 ; 114 : 681-687.
261. **Rivier M, Safonova I, Lebrun P, Griffiths C E, Ailhaud G, and Michel S.** Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptor subtypes during the differentiation of human keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 1998 ; 111 : 1116-1121.

262. **Robinson N A, Lopic S, Welter J F, and Eckert R L.** S100A11, S100A10, annexin I, desmosomal proteins, small proline-rich proteins, plasminogen activator inhibitor-2, and involucrin are components of the cornified envelope of cultured human epidermal keratinocytes. *J Biol Chem.* 1997 ; 272 : 12035-12046.
263. **Robitaille H, Proulx R, Robitaille K, Blouin R, and Germain L.** The mitogen-activated protein kinase kinase kinase dual leucine zipper-bearing kinase (DLK) acts as a key regulator of keratinocyte terminal differentiation. *J Biol Chem.* 2005 ; 280 : 12732-12741.
264. **Rosdy M and Clauss L C.** Terminal epidermal differentiation of human keratinocytes grown in chemically defined medium on inert filter substrates at the air-liquid interface. *J Invest Dermatol.* 1990 ; 95 : 409-414.
265. **Rosenberger S, Thorey I S, Werner S, and Boukamp P.** A novel regulator of telomerase. S100A8 mediates differentiation-dependent and calcium-induced inhibition of telomerase activity in the human epidermal keratinocyte line HaCaT. *J Biol Chem.* 2007 ; 282 : 6126-6135.
266. **Rossi A, Catani M V, Candi E, Bernassola F, Puddu P, and Melino G.** Nitric oxide inhibits cornified envelope formation in human keratinocytes by inactivating transglutaminases and activating protein 1. *J Invest Dermatol.* 2000 ; 115 : 731-739.
267. **Rossi A, Jang S I, Ceci R, Steinert P M, and Markova N G.** Effect of AP1 transcription factors on the regulation of transcription in normal human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 1998 ; 110 : 34-40.
268. **Rufini A, Vilbois F, Paradisi A, Oddi S, Tartaglione R, Leta A, Bagetta G, Guerrieri P, Finazzi-Agro' A, Melino G, and Candi E.** Transglutaminase 5 is acetylated at the N-terminal end. *Amino Acids.* 2004 ; 26 : 425-430.
269. **Ryle C M, Breitreutz D, Stark H J, Leigh I M, Steinert P M, Roop D, and Fusenig N E.** Density-dependent modulation of synthesis of keratins 1 and 10 in the human keratinocyte line HACAT and in ras-transfected tumorigenic clones. *Differentiation.* 1989 ; 40 : 42-54.
270. **Sakaguchi M, Miyazaki M, Takaishi M, Sakaguchi Y, Makino E, Kataoka N, Yamada H, Namba M, and Huh N H.** S100C/A11 is a key mediator of Ca<sup>2+</sup>-induced growth inhibition of human epidermal keratinocytes. *J Cell Biol.* 2003 ; 163 : 825-835.
271. **Sangfelt O, Erickson S, Einhorn S, and Grander D.** Induction of Cip/Kip and Ink4 cyclin dependent kinase inhibitors by interferon-alpha in hematopoietic cell lines. *Oncogene.* 1997 ; 14 : 415-423.
272. **Sark M W, Fischer D F, de M E, van de P P, and Backendorf C.** AP-1 and ets transcription factors regulate the expression of the human SPRR1A keratinocyte terminal differentiation marker. *J Biol Chem.* 1998 ; 273 : 24683-24692.
273. **Sayama K, Hanakawa Y, Shirakata Y, Yamasaki K, Sawada Y, Sun L, Yamanishi K, Ichijo H, and Hashimoto K.** Apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) is an intracellular inducer of keratinocyte differentiation. *J Biol Chem.* 2001 ; 276 : 999-1004.



274. **Schmuth M, Haqq C M, Cairns W J, Holder J C, Dorsam S, Chang S, Lau P, Fowler A J, Chuang G, Moser A H, Brown B E, Mao-Qiang M, Uchida Y, Schoonjans K, Auwerx J, Chambon P, Willson T M, Elias P M, and Feingold K R.** Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-beta/delta stimulates differentiation and lipid accumulation in keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 2004 ; 122 : 971-983.
275. **Schon M and Rheinwald J G.** A limited role for retinoic acid and retinoic acid receptors RAR alpha and RAR beta in regulating keratin 19 expression and keratinization in oral and epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 1996 ; 107 : 428-438.
276. **Schoop V M, Mirancea N, and Fusenig N E.** Epidermal organization and differentiation of HaCaT keratinocytes in organotypic coculture with human dermal fibroblasts 2. *J Invest Dermatol.* 1999 ; 112 : 343-353.
277. **Schroeder M and Zouboulis C C.** All-trans-retinoic acid and 13-cis-retinoic acid: pharmacokinetics and biological activity in different cell culture models of human keratinocytes. *Horm Metab Res.* 2007 ; 39 : 136-140.
278. **Schug T T, Berry D C, Shaw N S, Travis S N, and Noy N.** Opposing effects of retinoic acid on cell growth result from alternate activation of two different nuclear receptors. *Cell.* 2007 ; 129 : 723-733.
279. **Schurer N, Kohne A, Schliep V, Barlag K, and Goerz G.** Lipid composition and synthesis of HaCaT cells, an immortalized human keratinocyte line, in comparison with normal human adult keratinocytes. *Exp Dermatol.* 1993 ; 2 : 179-185.
280. **Schurer N Y.** Implementation of fatty acid carriers to skin irritation and the epidermal barrier. *Contact Dermatitis.* 2002 ; 47 : 199-205.
281. **Schurer N Y, Rippke F, Vogelsang K, Schliep V, and Ruzicka T.** Fatty acid uptake by cultured human keratinocytes grown in medium deficient in or supplemented with essential fatty acids. *Arch Dermatol Res.* 1999 ; 291 : 47-53.
282. **Schweizer J and Winter H.** Keratin biosynthesis in normal mouse epithelia and in squamous cell carcinomas. mRNA-dependent alterations of the primary structure of distinct keratin subunits in tumors. *J Biol Chem.* 1983 ; 258 : 13268-13272.
283. **Selvanayagam P, Lei G, Bell T, Ram S, Brysk H, Rajaraman S, and Brysk M M.** Desquamin is an epidermal ribonuclease. *J Cell Biochem.* 1998 ; 68 : 74-82.
284. **Sharpe G R, Fisher C, Gillespie J I, and Greenwell J R.** Growth and differentiation stimuli induce different and distinct increases in intracellular free calcium in human keratinocytes. *Arch Dermatol Res.* 1993 ; 284 : 445-450.
285. **Shaw N, Elholm M, and Noy N.** Retinoic acid is a high affinity selective ligand for the peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta. *J Biol Chem.* 2003 ; 278 : 41589-41592.
286. **Shirakata Y, Komurasaki T, Toyoda H, Hanakawa Y, Yamasaki K, Tokumaru S, Sayama K, and Hashimoto K.** Epiregulin, a novel member of the epidermal growth factor family, is an autocrine growth factor in normal human keratinocytes. *J Biol Chem.* 2000 ; 275 : 5748-5753.

287. **Simon M, Haftek M, Sebbag M, Montezin M, Girbal-Neuhauser E, Schmitt D, and Serre G.** Evidence that filaggrin is a component of cornified cell envelopes in human plantar epidermis. *Biochem J.* 1996 ; 317 ( Pt 1) : 173-177.
288. **Sitailo L A, Tibudan S S, and Denning M F.** Activation of caspase-9 is required for UV-induced apoptosis of human keratinocytes. *J Biol Chem.* 2002 ; 277 : 19346-19352.
289. **Smits P, Poumay Y, Karperien M, Tylzanowski P, Wauters J, Huylebroeck D, Ponc M, and Merregaert J.** Differentiation-dependent alternative splicing and expression of the extracellular matrix protein 1 gene in human keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 2000 ; 114 : 718-724.
290. **Steinberg M L and Defendi V.** Altered pattern of growth and differentiation in human keratinocytes infected by simian virus 40. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979 ; 76 : 801-805.
291. **Steinberg M L and Defendi V.** Transformation and immortalization of human keratinocytes by SV40. *J Invest Dermatol.* 1983 ; 81 : 131s-136s.
292. **Steinert P M, Cantieri J S, Teller D C, Lonsdale-Eccles J D, and Dale B A.** Characterization of a class of cationic proteins that specifically interact with intermediate filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981 ; 78 : 4097-4101.
293. **Steinert P M, Chung S I, and Kim S Y.** Inactive zymogen and highly active proteolytically processed membrane-bound forms of the transglutaminase 1 enzyme in human epidermal keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996 ; 221 : 101-106.
294. **Steinert P M and Marekov L N.** The proteins elafin, filaggrin, keratin intermediate filaments, loricrin, and small proline-rich proteins 1 and 2 are isodipeptide cross-linked components of the human epidermal cornified cell envelope. *J Biol Chem.* 1995 ; 270 : 17702-17711.
295. **Steinert P M and Marekov L N.** Direct evidence that involucrin is a major early isopeptide cross-linked component of the keratinocyte cornified cell envelope. *J Biol Chem.* 1997 ; 272 : 2021-2030.
296. **Stephens P, Grenard P, Aeschlimann P, Langley M, Blain E, Errington R, Kipling D, Thomas D, and Aeschlimann D.** Crosslinking and G-protein functions of transglutaminase 2 contribute differentially to fibroblast wound healing responses. *J Cell Sci.* 2004 ; 117 : 3389-3403.
297. **Steven A C, Bisher M E, Roop D R, and Steinert P M.** Biosynthetic pathways of filaggrin and loricrin--two major proteins expressed by terminally differentiated epidermal keratinocytes. *J Struct Biol.* 1990 ; 104 : 150-162.
298. **Stoll S W and Elder J T.** Retinoid regulation of heparin-binding EGF-like growth factor gene expression in human keratinocytes and skin. *Exp Dermatol.* 1998 ; 7 : 391-397.
299. **Sturniolo M T, Dashti S R, Deucher A, Rorke E A, Broome A M, Chandraratna R A, Keepers T, and Eckert R L.** A novel tumor suppressor protein promotes keratinocyte terminal differentiation via activation of type I transglutaminase. *J Biol Chem.* 2003 ; 278 : 48066-48073.

300. **Su M J, Bikle D D, Mancianti M L, and Pillai S.** 1,25-Dihydroxyvitamin D3 potentiates the keratinocyte response to calcium. *J Biol Chem.* 1994a ; 269 : 14723-14729.
301. **Su M J, Bikle D D, Mancianti M L, and Pillai S.** 1,25-Dihydroxyvitamin D3 potentiates the keratinocyte response to calcium. *J Biol Chem.* 1994b ; 269 : 14723-14729.
302. **Suzuki A, Kawano H, Hayashida M, Hayasaki Y, Tsutomi Y, and Akahane K.** Procaspase 3/p21 complex formation to resist fas-mediated cell death is initiated as a result of the phosphorylation of p21 by protein kinase A. *Cell Death Differ.* 2000 ; 7 : 721-728.
303. **Suzuki A, Tsutomi Y, Miura M, and Akahane K.** Caspase 3 inactivation to suppress Fas-mediated apoptosis: identification of binding domain with p21 and ILP and inactivation machinery by p21. *Oncogene.* 1999 ; 18 : 1239-1244.
304. **Symington B E, Takada Y, and Carter W G.** Interaction of integrins alpha 3 beta 1 and alpha 2 beta 1: potential role in keratinocyte intercellular adhesion. *J Cell Biol.* 1993 ; 120 : 523-535.
305. **Takai H, Naka K, Okada Y, Watanabe M, Harada N, Saito S, Anderson C W, Appella E, Nakanishi M, Suzuki H, Nagashima K, Sawa H, Ikeda K, and Motoyama N.** Chk2-deficient mice exhibit radioresistance and defective p53-mediated transcription. *EMBO J.* 2002 ; 21 : 5195-5205.
306. **Taylor G, Lehrer M S, Jensen P J, Sun T T, and Lavker R M.** Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis. *Cell.* 2000 ; 102 : 451-461.
307. **Taylor W R and Stark G R.** Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene.* 2001 ; 20 : 1803-1815.
308. **Thacher S M and Rice R H.** Keratinocyte-specific transglutaminase of cultured human epidermal cells: relation to cross-linked envelope formation and terminal differentiation. *Cell.* 1985 ; 40 : 685-695.
309. **Thorey I S, Roth J, Regenbogen J, Halle J P, Bittner M, Vogl T, Kaesler S, Bugnon P, Reitmaier B, Durka S, Graf A, Wockner M, Rieger N, Konstantinow A, Wolf E, Goppelt A, and Werner S.** The Ca<sup>2+</sup>-binding proteins S100A8 and S100A9 are encoded by novel injury-regulated genes. *J Biol Chem.* 2001 ; 276 : 35818-35825.
310. **Tobin D J.** Biochemistry of human skin--our brain on the outside. *Chem Soc Rev.* 2006 ; 35 : 52-67.
311. **Todd C and Reynolds N J.** Up-regulation of p21WAF1 by phorbol ester and calcium in human keratinocytes through a protein kinase C-dependent pathway. *Am J Pathol.* 1998 ; 153 : 39-45.
312. **Tokumar S, Higashiyama S, Endo T, Nakagawa T, Miyagawa J I, Yamamori K, Hanakawa Y, Ohmoto H, Yoshino K, Shirakata Y, Matsuzawa Y, Hashimoto K, and Taniguchi N.** Ectodomain shedding of epidermal growth factor receptor ligands is required for keratinocyte migration in cutaneous wound healing. *J Cell Biol.* 2000 ; 151 : 209-220.

313. **Tomic-Canic M, Day D, Samuels H H, Freedberg I M, and Blumenberg M.** Novel regulation of keratin gene expression by thyroid hormone and retinoid receptors. *J Biol Chem.* 1996 ; 271 : 1416-1423.
314. **Truong A B, Kretz M, Ridky T W, Kimmel R, and Khavari P A.** p63 regulates proliferation and differentiation of developmentally mature keratinocytes. *Genes Dev.* 2006 ; 20 : 3185-3197.
315. **Tu C L, Chang W, and Bikle D D.** The extracellular calcium-sensing receptor is required for calcium-induced differentiation in human keratinocytes. *J Biol Chem.* 2001 ; 276 : 41079-41085.
316. **Tu C L, Chang W, and Bikle D D.** Phospholipase cgamma1 is required for activation of store-operated channels in human keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 2005 ; 124 : 187-197.
317. **Tu C L, Chang W, and Bikle D D.** The role of the calcium sensing receptor in regulating intracellular calcium handling in human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 2007 ; 127 : 1074-1083.
318. **Tu C L, Chang W, Xie Z, and Bikle D D.** Inactivation of the Calcium Sensing Receptor Inhibits E-cadherin-mediated Cell-Cell Adhesion and Calcium-induced Differentiation in Human Epidermal Keratinocytes. *J Biol Chem.* 2008 ; 283 : 3519-3528.
319. **Tu C L, Oda Y, Komuves L, and Bikle D D.** The role of the calcium-sensing receptor in epidermal differentiation. *Cell Calcium.* 2004 ; 35 : 265-273.
320. **Uchida Y, Nardo A D, Collins V, Elias P M, and Holleran W M.** De novo ceramide synthesis participates in the ultraviolet B irradiation-induced apoptosis in undifferentiated cultured human keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 2003 ; 120 : 662-669.
321. **Van L A, Van K S, Lippens S, Declercq W, Vandenabeele P, Janssens S, Vandenheede J R, Garmyn M, and Agostinis P.** Activation of p38 MAPK is required for Bax translocation to mitochondria, cytochrome c release and apoptosis induced by UVB irradiation in human keratinocytes. *FASEB J.* 2004 ; 18 : 1946-1948.
322. **Vandesompele J, De P K, Pattyn F, Poppe B, Van R N, De P A, and Speleman F.** Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002 ; 3 : research0034.1-research0034.11.
323. **Varanasi U, Chu R, Huang Q, Castellon R, Yeldandi A V, and Reddy J K.** Identification of a peroxisome proliferator-responsive element upstream of the human peroxisomal fatty acyl coenzyme A oxidase gene. *J Biol Chem.* 1996 ; 271 : 2147-2155.
324. **Vielhaber G, Pfeiffer S, Brade L, Lindner B, Goldmann T, Vollmer E, Hintze U, Wittern K P, and Wepf R.** Localization of ceramide and glucosylceramide in human epidermis by immunogold electron microscopy. *J Invest Dermatol.* 2001 ; 117 : 1126-1136.
325. **Vigano M A, Lamartine J, Testoni B, Merico D, Alotto D, Castagnoli C, Robert A, Candi E, Melino G, Gidrol X, and Mantovani R.** New p63 targets in keratinocytes identified by a genome-wide approach. *EMBO J.* 2006 ; 25 : 5105-5116.

326. **Vignais M L.** [Cellular signaling in response to TGFbeta: the paradox of a factor that blocks cell proliferation and enhances metastasis]. *Bull Cancer.* 1999 ; 86 : 903-910.
327. **Wahli W.** Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): from metabolic control to epidermal wound healing. *Swiss Med Wkly.* 2002 ; 132 : 83-91.
328. **Wakita H, Tokura Y, Yagi H, Nishimura K, Furukawa F, and Takigawa M.** Keratinocyte differentiation is induced by cell-permeant ceramides and its proliferation is promoted by sphingosine. *Arch Dermatol Res.* 1994 ; 286 : 350-354.
329. **Walker D, Sun T, MacNeil S, and Smallwood R.** Modeling the effect of exogenous calcium on keratinocyte and HaCat cell proliferation and differentiation using an agent-based computational paradigm. *Tissue Eng.* 2006 ; 12 : 2301-2309.
330. **Wang S, Guo M, Ouyang H, Li X, Cordon-Cardo C, Kurimasa A, Chen D J, Fuks Z, Ling C C, and Li G C.** The catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase selectively regulates p53-dependent apoptosis but not cell-cycle arrest. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000a ; 97 : 1584-1588.
331. **Wang X, McCullough K D, Franke T F, and Holbrook N J.** Epidermal growth factor receptor-dependent Akt activation by oxidative stress enhances cell survival. *J Biol Chem.* 2000b ; 275 : 14624-14631.
332. **Watt F M.** Selective migration of terminally differentiating cells from the basal layer of cultured human epidermis. *J Cell Biol.* 1984 ; 98 : 16-21.
333. **Watt F M, Matthey D L, and Garrod D R.** Calcium-induced reorganization of desmosomal components in cultured human keratinocytes. *J Cell Biol.* 1984 ; 99 : 2211-2215.
334. **Weerheim A and Ponec M.** Determination of stratum corneum lipid profile by tape stripping in combination with high-performance thin-layer chromatography. *Arch Dermatol Res.* 2001 ; 293 : 191-199.
335. **Wegner M, Drolet D W, and Rosenfeld M G.** POU-domain proteins: structure and function of developmental regulators. *Curr Opin Cell Biol.* 1993 ; 5 : 488-498.
336. **Wehrle-Haller B and Imhof B.** The inner lives of focal adhesions. *Trends Cell Biol.* 2002 ; 12 : 382-389.
337. **Weinberg W C and Denning M F.** P21Waf1 control of epithelial cell cycle and cell fate. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2002 ; 13 : 453-464.
338. **Weisfelner M E and Gottlieb A B.** The role of apoptosis in human epidermal keratinocytes. *J Drugs Dermatol.* 2003 ; 2 : 385-391.
339. **Welter J F, Gali H, Crish J F, and Eckert R L.** Regulation of human involucrin promoter activity by POU domain proteins. *J Biol Chem.* 1996 ; 271 : 14727-14733.
340. **Westergaard M, Henningsen J, Svendsen M L, Johansen C, Jensen U B, Schroder H D, Kratchmarova I, Berge R K, Iversen L, Bolund L, Kragballe K, and Kristiansen K.** Modulation of keratinocyte gene expression and differentiation by PPAR-selective ligands and tetradecylthioacetic acid. *J Invest Dermatol.* 2001 ; 116 : 702-712.

341. **Westfall M D, Mays D J, Sniezek J C, and Pietenpol J A.** The Delta Np63 alpha phosphoprotein binds the p21 and 14-3-3 sigma promoters *in vivo* and has transcriptional repressor activity that is reduced by Hay-Wells syndrome-derived mutations. *Mol Cell Biol.* 2003 ; 23 : 2264-2276.
342. **Wille JJ Jr, Pittelkow M R, Shipley G D, and Scott R E.** Integrated control of growth and differentiation of normal human prokeratinocytes cultured in serum-free medium: clonal analyses, growth kinetics, and cell cycle studies. *J Cell Physiol.* 1984 ; 121 : 31-44.
343. **Wolf R, Lewerenz V, Buchau A S, Walz M, and Ruzicka T.** Human S100A15 splice variants are differentially expressed in inflammatory skin diseases and regulated through Th1 cytokines and calcium. *Exp Dermatol.* 2007 ; 16 : 685-691.
344. **Woodcock-Mitchell J, Eichner R, Nelson W G, and Sun T T.** Immunolocalization of keratin polypeptides in human epidermis using monoclonal antibodies. *J Cell Biol.* 1982 ; 95 : 580-588.
345. **Xie Z and Bikle D D.** Cloning of the human phospholipase C-gamma1 promoter and identification of a DR6-type vitamin D-responsive element. *J Biol Chem.* 1997 ; 272 : 6573-6577.
346. **Xie Z, Singleton P A, Bourguignon L Y, and Bikle D D.** Calcium-induced human keratinocyte differentiation requires src- and fyn-mediated phosphatidylinositol 3-kinase-dependent activation of phospholipase C-gamma1. *Mol Biol Cell.* 2005 ; 16 : 3236-3246.
347. **Xu Y, Shao Y, Voorhees J J, and Fisher G J.** Oxidative inhibition of receptor-type protein-tyrosine phosphatase kappa by ultraviolet irradiation activates epidermal growth factor receptor in human keratinocytes. *J Biol Chem.* 2006 ; 281 : 27389-27397.
348. **Xu Y, Tan L J, Grachtchouk V, Voorhees J J, and Fisher G J.** Receptor-type protein-tyrosine phosphatase-kappa regulates epidermal growth factor receptor function. *J Biol Chem.* 2005 ; 280 : 42694-42700.
349. **Yaffe M B, Beegen H, and Eckert R L.** Biophysical characterization of involucrin reveals a molecule ideally suited to function as an intermolecular cross-bridge of the keratinocyte cornified envelope. *J Biol Chem.* 1992 ; 267 : 12233-12238.
350. **Yamazaki M, Ishidoh K, Suga Y, Saido T C, Kawashima S, Suzuki K, Kominami E, and Ogawa H.** Cytoplasmic processing of human profilaggrin by active mu-calpain. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997 ; 235 : 652-656.
351. **Yu J and Zhang L.** The transcriptional targets of p53 in apoptosis control. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 ; 331 : 851-858.
352. **Yuspa S H, Kilkenny A E, Steinert P M, and Roop D R.** Expression of murine epidermal differentiation markers is tightly regulated by restricted extracellular calcium concentrations *in vitro*. *J Cell Biol.* 1989 ; 109 : 1207-1217.
353. **Zeeuwen P L.** Epidermal differentiation: the role of proteases and their inhibitors. *Eur J Cell Biol.* 2004 ; 83 : 761-773.

354. **Zeeuwen P L, Hendriks W, de Jong W W, and Schalkwijk J.** Identification and sequence analysis of two new members of the SKALP/elafin and SPAI-2 gene family. Biochemical properties of the transglutaminase substrate motif and suggestions for a new nomenclature. *J Biol Chem.* 1997 ; 272 : 20471-20478.
355. **Zehnder D, Bland R, Williams M C, McNinch R W, Howie A J, Stewart P M, and Hewison M.** Extrarenal expression of 25-hydroxyvitamin d(3)-1 alpha-hydroxylase. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001 ; 86 : 888-894.
356. **Zhang T, Woods T L, and Elder J T.** Differential responses of S100A2 to oxidative stress and increased intracellular calcium in normal, immortalized, and malignant human keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 2002 ; 119 : 1196-1201.
357. **Zhang Y, Fujita N, and Tsuruo T.** Caspase-mediated cleavage of p21Waf1/Cip1 converts cancer cells from growth arrest to undergoing apoptosis. *Oncogene.* 1999 ; 18 : 1131-1138.
358. **Zhu A J, Haase I, and Watt F M.** Signaling via beta1 integrins and mitogen-activated protein kinase determines human epidermal stem cell fate *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 ; 96 : 6728-6733.
359. **Zocchi L, Terrinoni A, Candi E, Ahvazi B, Bagetta G, Corasaniti M T, Lena A M, and Melino G.** Identification of transglutaminase 3 splicing isoforms. *J Invest Dermatol.* 2007 ; 127 : 1791-1794.

## ABBREVIATIONS

1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> : Forme active de la vitamine D<sub>3</sub>

### A

ABCB1 : ATP-Binding Cassette, subfamily B, member 1  
ABCD1 : ATP-Binding Cassette, subfamily D, member 1  
ABCG1 : ATP-Binding Cassette, subfamily G, member 1  
ACBP : Acyl-CoA-Binding Protein  
ACOX : Acyl-CoA Oxidase  
ADN : Acide Désoxyribonucléique  
ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire  
ADNg : ADN génomique  
ADRP : Adipose Differentiation-Related Protein  
AIF : Apoptosis-Inducing Factor  
AP1 : Activator Protein 1  
ARN : acide ribonucléique  
ARNm : ARN messenger  
ASK1 : Apoptosis Signal-Regulating Kinase-1  
ATM : Ataxia-Telangiectasia Mutated  
ATP : Adénosine Tri-Phosphate  
ATR : Ataxia-Telangiectasia-Like and Rad3 Homolog

### B

BLAST : Basic Local Alignment Search Tool  
BMP : Bone Morphogenic Protein  
BPE : Bovin Pituitary Extract  
BTM : Basal Transcription Machinery  
BR : Basic Region  
BrdU : 5-Bromo-2'-désoxyuridine  
BSA : Bovine Serum Albumine

### C

Ca<sub>i</sub> : Concentration intracellulaire en Ca<sup>2+</sup>  
Ca<sub>0</sub> : Concentration Extracellulaire en Ca<sup>2+</sup> (Ca<sub>0</sub> > 1mM)  
CaR : Calcium Receptor  
CaRalt : CaR alternative  
CaRE : Calcium Responsive Element  
CASPASE : Cysteine Aspartic Acid-Specific Protease  
CBP : cAMP Response Element-Binding Protein  
CCE : Capacitative Ca<sup>2+</sup> Entry  
Cdk : Cyclin-Dependent Kinases  
Chk : Checkpoint Kinase  
Chr : Chromosome (p=bras court, q=bras long)  
CKIs : Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors



CoA: Coenzyme-A  
CRABPs : Cellular RA-Binding Proteins  
CRBPs : Cellular Retinol-Binding Proteins  
CRE : cAMP Responsive Element  
CREB : cAMP Responsive Element Binding Protein  
Cx : Connexine

## **D**

DEGS2 : Degenerative Spermatocyte, drosophila, homolog of, 2  
DNA-PK : DNA-Dependant Protein Kinase  
DLK :Dual Leucine Zipper-Bearing Kinase  
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium  
DP : Desmoplakine  
Dsc : Desmocolline  
DSG : Desmogl ine  
DR-4 : Death Receptor-4  
DRIP : VDR-Interacting Protein  
DRR : Distal-Regulatory Region

## **E**

EDC : Epidermal Differentiation Complex  
EDTA : Ethylene-Diaminetetraacetic Acid  
EET : Epoxyeicosatrienoic acid  
E-FABP : Epidermal Fatty Acid Binding Protein  
EGF : Epidermal Growth Factor  
EGFr : EGF-recombinant  
ELISA : Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay  
ERKs : Extracellular Signal-Regulated Kinases  
EtOH: Ethanol  
Ets : E26 Transformation Specific ou E Twenty-Six

## **F**

Fas-L : Fas-Ligand  
FABPs : Fatty Acid Binding Proteins  
FABP-PM : FABP-Plasma Membrane  
FATP4 : Fatty Acid Transporter member 4  
FFF : Field Flow Fractionation  
FIAF : Fasting Induced Adipose Factor  
FLG : Filaggrin gene  
FSC : Forward Scatter

## **G**

GAAP-1 : Gatekeeper of Apoptosis Activating Proteins  
GTP : Guanosine Triphosphate

## **H**

HBSS : Hank's Balanced Salt Solution

HC-KSFM : High Calcium-KSFM

HDAC : Histone-Désacétylase

## **I**

IAPs : Inhibitor of Apoptosis Proteins

IFN : Interferon

I $\kappa$ B : Kappa B Inhibitor

INR : Initiator

IP : Iodure de Propidium

IP<sub>3</sub> : Inositol Tri-Phosphate

IP<sub>3</sub>R : Inositol Tri-Phosphate Receptor

IPCS : IRF-1 p53 Common Sequence

IRF-1 : Interferon Regulatory Factor

## **J**

JAMs : Junctional Adhesion Molecules

## **K**

K : Kératine

Kb : Kilo bases

Kda : Kilo Dalton

KNHs : Kératinocytes Normaux Humains

KLF : Krüpper-Like Zinc-Finger Factor

KO : Knock Out

KSFM : Keratinocyte Serum Free Medium

KSR-1 : Keratinocyte Specific Reppressor-1

KSSE : Keratinocyte-Specific Silencer Element

## **L**

LC-KSFM : Low Calcium-KSFM

LRC : Label Retaining Cells

## **M**

MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase

MMPs : Matrix Metalloproteinases

MTT : 3-(4,5-Diméthylthiazol-2-yl)-2,5-Diphényl Tétrazolium Bromide

## **N**

NFI : Nuclear Factor I

NF- $\kappa$ B : Nuclear Factor-Kappa B

NLS : Nuclear Localization Sequence  
NMF : Natural Moisturizing Factor (facteur naturel d'hydratation)  
NO : Nitric Oxyd

## **O**

## **P**

PAD : Peptidyl-Arginine Désiminase  
PBS : Phosphate Buffered Saline  
PCNA : Proliferating Cell Nuclear Antigen  
PDK1 : 3-Phosphoinositide-Dependent Protein Kinase 1  
Pg : Plakoglobine  
PI3K : Phosphatidylinositol 3-Kinase  
PKC : Protein Kinase C  
PKP : Plakophiline  
PLC: Phospholipase C  
POU : Pit-1 Oct-1 Unc86  
PPARs : Peroxysome Proliferator-Activated Receptors  
PPRE : Peroxysome Proliferator Responsive Element  
PRb : Retinoblastoma Protein  
PRR : Proximal-Regulatory Region  
PVDF : Polyvinylidene Fluoride

## **Q**

## **R**

RA : retinoic acid  
RAGE : Receptor for Advanced Glycation Endproducts  
RAR : Retinoic Acid Receptor  
RARE : Retinoic Acid Response Element  
RCPG : Récepteurs Couplés aux Protéines G  
RE : Réticulum Endoplasmique  
rEGF : recombinant Epidermal Growth Factor  
ROS : Reactive Oxygen Species  
Rpm : Rotation Par Minute  
RT-PCR : Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction  
RTPTP: Receptor-Type Protein-Tyrosine Phosphatase  
RXR : Retinoid X Receptor

## **S**

SC: Sulfate de Cholestérol  
SdFFF : Sedimentation Field Flow Fractionation  
SDS :Sodium Dodecyl Sulfate  
SDS-PAGE : SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis  
SiRNA : Small Interfering RNA  
SKALP : Skin-Derived Antileuko-Proteinase)

SOCs : Store-Operated Channels  
SPC : Sphingosylphosphorylcholine  
SPCA1 : Secretory Pathway Ca<sup>2+</sup>-ATPase  
SPRs: Small Proline-Rich proteins  
SRC : Steroid Receptor Coactivator  
SSC : Side Scatter  
SV40: Virus Simièsque 40  
SVF: S rum de Veau F etal

## **T**

T A : Temp rature Ambiante  
TAFs : Transcriptional Activation Factors  
TBP : TATA Binding Protein  
TCHY : trichohyalin gene  
TFII : Transcription Factor II  
TG: Transglutaminase  
TGF : Transforming Growth Factor  
TNF : Tumor Necrosis Factor  
TNFR-1 : TNF Receptor-1  
TPA : 12-O-Tetradecanoylphorbol 13-Acetate  
TRP : Transient Receptor Potential  
TRPV6 : TRP sous-famille V membre 6  
TRAFs : TNF-R Associated Factors  
TRAIL : TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand  
TUNEL : Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick End Labelling

## **U**

USF : Upstream Stimulatory Factor  
UV : Ultraviolet  
URR : Upstream-Regulatory Region

## **V**

VDR : Vitamin D Receptor  
VDRE : Vitamin D Responsive Element

## **W**

## **X**

## **Y**

## **Z**

ZOs : Zonula occudens proteins

# LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Représentation schématique de la peau normale humaine.....	11
Figure 2 : Représentation schématique de la jonction dermo-épidermique.....	15
Figure 3 : Représentation schématique d'un hémidesmosome.....	16
Figure 4 : Structure de l'épiderme.....	18
Figure 5 : Structure d'une molécule de kératine et localisation dans l'épiderme.....	20
Figure 6 : Représentation schématique de la structure d'une jonction imperméable.....	23
Figure 7 : Jonctions communicantes et expression des connexines.....	24
Figure 8 : Modèle moléculaire de desmosome.....	26
Figure 9 : Représentation schématique d'une jonction <i>adherens</i> .....	27
Figure 10 : Cellules souches épidermiques.....	29
Figure 11 : Modifications biochimiques des kératinocytes conduisant à la cornification.....	35
Figure 12 : Le complexe basal de transcription.....	37
Figure 16 : Schéma du gène de l'involucrine.....	39
Figure 17 : Coopération du DRR et du PRR dans l'expression de l'involucrine.....	40
Figure 18 : Modèle de régulation du gène de la loricrine.....	42
Figure 19 : Représentation schématique de la structure secondaire de la loricrine.....	43
Figure 20 : Cartographie du locus SPR.....	44
Figure 21 : Modèle de régulation de l'activité promotrice du gène FLG.....	48
Figure 22 : Modèle schématique de la trichohyaline.....	50
Figure 23 : Représentation schématique du motif en main EF.....	51
Figure 24 : Représentation schématique de la structure d'une protéine S100.....	52
Figure 25 : Modèle d'interaction Protéines S100 / Protéines cibles.....	53
Figure 26 : Mode d'action des transglutaminases.....	58
Figure 27 : Illustration schématique de la génération intracellulaire des précurseurs lipidiques, de leur séquestration dans les corps lamellaires et de la mise en place de la matrice lipidique extracellulaire au niveau de la couche cornée. AG = acide gras.....	62
Figure 28 : Représentation schématique simplifiée des étapes du cycle cellulaire.....	66
Figure 29 : Schéma métabolique de la complexité du cycle cellulaire.....	74
Figure 30 : Voies et mécanismes généraux du processus apoptotique.....	75
Figure 31 : Voies antiapoptotiques (de survie) dans le kératinocyte.....	78
Figure 32 : Schématisation des programmes génétiques du développement épidermique.....	80
Figure 33 : Changements morphologiques et biochimiques pendant les processus de différenciation et / ou d'apoptose.....	83
Figure 34 : Représentation schématique des protéines p53, p63 et p73.....	84
Figure 35 : Structure schématique du gène et des six isoformes de p63.....	86

Figure 36 : Modèle de la signalisation calcique kératinocytaire. ....	92
Figure 37 : Métabolisme de la vitamine D <sub>3</sub> . ....	95
Figure 38 : Régulation de la différenciation par la vitamine D <sub>3</sub> . ....	97
Figure 39 : Mécanismes d'activation de EGFR dans les kératinocytes. ....	103
Figure 40 : Représentation schématique de la voie de signalisation induite par le TGF- $\beta$ . ....	107
Figure 41 : Représentation théorique de la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire en fonction de leur contenu en ADN. ....	121
Figure 42 : Courbes de fusion et d'amplification d'une PCR en temps réel. ....	125
Figure 43 : Schéma du canal de SdFFF. ....	132
Figure 44 : Principe d'élution des cellules en SdFFF. ....	133
Figure 45 : Fractogramme représentatif de l'élution de cellules HaCaT. ....	133
Figure 46 : Etude de l'activité proliférative des KNHs (a) et de la lignée HaCaT (b). ....	138
Figure 47 : Changements morphologiques des KNHs et des cellules HaCaT. ....	139
Figure 48 : Effet du Ca <sup>2+</sup> sur la répartition des KNHs (a) et des cellules HaCaT (b) dans les différentes phases du cycle cellulaire. ....	141
Figure 49 : Profil d'expression génique des kératines K1, K10 et de l'involucrine dans les KNHs (a, b et c) et les cellules HaCaT (d, e et f). ....	145
Figure 50 : Profil d'expression génique de la filaggrine et de la transglutaminase-1 dans les KNHs (a et b) et les cellules HaCaT (c et d). ....	148
Figure 51 : Profil d'expression génique de K5 dans les KNHs (a) et les cellules HaCaT (b). ....	149
Figure 52 : Profil d'expression génique de p21 dans les KNHs (a) et les cellules HaCaT (b). ....	151
Figure 53 : Profil d'expression génique des isoformes PPARs dans les KNHs (a, b et c) et les cellules HaCaT (d, e et f). ....	154
Figure 54 : Profil d'expression génique de DEGS2 dans les KNHs (a) et les cellules HaCaT (b). ....	156
Figure 55 : Profil d'expression génique d'ABCG1 dans les KNHs (a) et les cellules HaCaT (b). ....	158
Figure 56 : Profil d'expression génique de FATP4, d'ABCD1 et d'ADRP dans les KNHs (a, b et c) et les cellules HaCaT (d, e et f). ....	161
Figure 57 : Profil d'expression génique de FIAF dans les KNHs (a) et les cellules HaCaT (b). ....	163
Figure 58 : Profil de l'expression protéique des kératines K1 et K10 dans les KNHs (a) et les cellules HaCaT (b). ....	165
Figure 59 : Profil de l'expression protéique de l'involucrine dans les KNHs (a) et cellules HaCaT (b). ....	167
Figure 60 : Profils d'élution (a) et collecte (b) des différentes fractions. ....	169
Figure 61 : Etude de l'activité proliférative de la lignée HaCaT après fractionnement par SdFFF. ....	171
Figure 62 : Expression génique des kératines K1 (a) et K10 (b) après fractionnement par SdFFF. ....	172
Figure 63 : Expression génique de l'involucrine (a) et de la transglutaminase-1 (b) après SdFFF. ....	173
Figure 64 : Répartition des cellules HaCaT dans les différentes phases du cycle cellulaire après fractionnement par SdFFF. ....	174

## **LISTE DES TABLEAUX**

Tableau 1 : Distribution tissulaire et cellulaire des différentes kératines. ....	19
Tableau 2 : Les intégrines kératinocytaires. ....	30
Tableau 3 : Composition protéique de l'enveloppe cornée des cornéocytes. ....	34
Tableau 4 : Eléments régulateurs des gènes SPRs. ....	44
Tableau 5 : Bilan récapitulatif des protéines SPRs. ....	46
Tableau 6 : Les complexes Cdk / cycline dans les différentes phases du cycle cellulaire. ....	67
Tableau 7 : Gènes étudiés et couples d'amorces respectifs. ....	126
Tableau 8 : Anticorps primaires et secondaires utilisés pour les expérimentations de Western Blots. ....	131
Tableau 9 : Temps de collecte des différentes fractions. ....	169