



UNIVERSITÉ
DE NAMUR

University of Namur

Institutional Repository - Research Portal

Dépôt Institutionnel - Portail de la Recherche

researchportal.unamur.be

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Etude fonctionnelle de TRIM29, une protéine impliquée dans la réponse des kératinocytes humains exposés à des stress répétés et sub-létaux aux UVB

Van Goietsenoven, Gwendoline

Award date:
2007

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

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

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

Take down policy

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



FACULTÉS UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR

Faculté des Sciences

**Étude fonctionnelle de TRIM29, une protéine impliquée dans la réponse des
kératinocytes humains exposés à des stress répétés et sub-létaux aux UVB**

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de

licencié en Sciences biologiques

Gwendoline VAN GOIETSENOVEN

Juin 2007

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier le Professeur Martine RAES pour m'avoir accueillie au sein du département de Biologie Cellulaire. Je remercie également les Professeurs Olivier TOUSSAINT et Yves POUMAY qui m'ont guidée, conseillée et encouragée tout au long de ce travail.

Je dis également un grand Merci à Véronique VALLERY qui, malgré les circonstances particulières, m'a soutenue par son optimisme, ses conseils et sa bonne humeur.

Ce grand Merci va également à Aline, Céline, Manu, Valérie, Emilie, Françoise et Edouard pour leur aide et leurs nombreux conseils.

Je n'oublie pas non plus les autres mémorants, et tout particulièrement Doro, mes parents, ma sœur et le reste de ma famille pour le réconfort, le soutien et les encouragements lors des petites fatigues et baisses de moral.

Enfin, je remercie les membres de mon jury pour avoir pris le temps de lire ce mémoire.

Merci à tous !!!

Étude fonctionnelle de TRIM29, une protéine impliquée dans la réponse des kératinocytes humains exposés à des stress répétés et sub-létaux aux UVB

VAN GOIETSENOVEN Gwendoline

Résumé :

L'épiderme constitue notre première couche de protection contre les rayons ultraviolets de type B (UVB). Dans ce mémoire, nous avons étudié une protéine dont l'abondance est modifiée lors de la réponse de kératinocytes humains à des doses répétées et sub-létales d'UVB : la protéine Tripartite Motif 29 (TRIM29).

La protéine TRIM29 a été caractérisée dans le cadre de la pathologie Ataxia Telangiectasia (AT). Cette pathologie génétique neurodégénérative présente une mutation dans le gène codant pour la protéine ATM et montre, entre autre, un retard dans l'induction de p53. Une complémentation des cellules de patients atteints d'AT avec le locus codant pour la protéine TRIM29 restaure cette induction de p53, ce qui amène à poser l'hypothèse que la protéine TRIM29 serait impliquée dans la voie intracellulaire de réponse aux dommages à l'ADN.

Dans un premier temps, nous avons étudié le profil d'abondance de cette protéine TRIM29 et de son ARNm au cours du temps après des expositions aux UVB. Nous avons mis en évidence une augmentation de l'abondance de TRIM29 à 4 h et 16 h après exposition aux UVB aussi bien au niveau protéique qu'au niveau de l'ARNm. À 64 h après exposition, cette augmentation n'est plus que faiblement visible.

Dans un second temps, nous avons étudié la possibilité d'interaction protéique entre TRIM29 et ATM/ATR et p53, ATR étant l'équivalent de la protéine ATM dans le cas plus spécifique des stress aux UV. Pour cela, les extractions protéiques ont été réalisées à 16 h après les expositions aux UVB. Nous avons montré qu'il n'y avait pas d'interaction de TRIM29 avec ATM ou ATR mais bien avec p53. Au vu de ces résultats, nous avons étudié la localisation de TRIM29 dans les cellules exposées aux UVB afin de vérifier la possibilité d'une délocalisation dans le noyau qui serait compatible avec un rôle de TRIM29 sur p53. Les marquages par immunofluorescence réalisés sur les kératinocytes mettent en évidence cette délocalisation à 16 h après exposition aux UVB.

Enfin, nous avons étudié l'effet de l'inactivation de l'expression de TRIM29 par un shRNA ciblant l'ARNm de TRIM29. Au vu des faibles différences observées entre les cellules où l'expression de TRIM29 est invalidée et les cellules contrôles, nous émettons différentes perspectives quant au(x) rôle(s) potentiel(s) de TRIM29 dans la réponse aux UVB.

INTRODUCTION

1. CONTEXTE GÉNÉRAL	1
2. LA PEAU	3
2.1. L'ÉPIDERME.....	3
2.1.1. <i>Les kératinocytes</i>	4
2.1.2. <i>Les mélanocytes</i>	4
2.1.3. <i>Les cellules de Langerhans</i>	4
2.1.4. <i>Les cellules de Merckel</i>	4
2.2. LA LAME BASALE	5
2.3. LE DERME	5
2.4. L'HYPODERME.....	5
3. LES DIFFÉRENTES VOIES OUVERTES AUX KÉRATINOCYTES	6
3.1. LA DIFFÉRENCIATION	6
3.1.1. <i>La couche basale</i>	6
3.1.2. <i>La couche épineuse</i>	6
3.1.3. <i>La couche granuleuse</i>	6
3.1.4. <i>La zone de transition</i>	7
3.1.5. <i>La couche cornée</i>	7
3.2. L'ACTIVATION.....	7
4. LES ULTRAVIOLETS ET LEURS EFFETS	8
4.1. LES ULTRAVIOLETS (UV).....	8
4.1.1. <i>Les UVA</i>	8
4.1.2. <i>Les UVB</i>	9
4.1.3. <i>Les UVC</i>	9
4.2. LES EFFETS DES RAYONS UV	9
4.2.1. <i>Les effets généraux</i>	9
4.2.2. <i>Les dommages oxydatifs</i>	10
4.2.3. <i>Les effets sur l'ADN</i>	11
4.3. CONSÉQUENCES DES DOMMAGES À L'ADN	12
4.3.1. <i>p53</i>	12
4.3.2. <i>p21^{WAF-1}</i>	14
4.4. L'ACTIVATION DES VOIES INTRACELLULAIRES PAR LES UV	14
4.4.1. <i>Voies du récepteur à l'EGF (EGF-R)</i>	14
4.4.2. <i>La voie des MAPK</i>	15
4.4.3. <i>La voie de PKCδ</i>	15
5. LE MODÈLE DE STRESS RÉPÉTÉS ET SUB-LÉTAUX AUX UVB	17
5.1. LE MODÈLE DE STRESS UTILISÉ.....	17
5.2. LES EFFETS DES EXPOSITIONS RÉPÉTÉES DES KÉRATINOCYTES N-hTERT AUX UVB.....	17
5.3. ÉTUDE PROTÉOMIQUE DES KÉRATINOCYTES N-hTERT EXPOSÉS AUX UVB	18
6. LA PROTÉINE ÉTUDIÉE : TRIM29	19
6.1. ATAXIA TELANGIECTASIA (AT)	19
6.2. ATM/ATR ET LA VOIE DE SIGNALISATION EN RÉPONSE AUX DOMMAGES À L'ADN	19
6.3. TRIM29.....	20
7. BUT DU MÉMOIRE	21
MATERIEL ET METHODES	
1. CONDITIONS DE CULTURE DES KÉRATINOCYTES N-hTERT	22
1.1. PRINCIPE.....	22
1.2. MATÉRIELS ET SOLUTIONS.....	22
1.3. MÉTHODES D'ENSEMENCEMENT.....	22
1.4. MÉTHODE DE CONGÉLATION.....	22
1.5. MÉTHODE DE DÉCONGÉLATION	23

Table des Matières

2. STRESS RÉPÉTÉS SUB-LÉTAUX AUX UVB	23
2.1. PRINCIPE.....	23
2.2. MATÉRIEL ET SOLUTIONS.....	23
2.3. MÉTHODE.....	23
3. EXTRACTIONS PROTÉIQUES	24
3.1. PRINCIPE.....	24
3.2. MATÉRIEL ET SOLUTIONS.....	24
3.3. MÉTHODE.....	24
4. DOSAGE PROTÉIQUE PAR LA MÉTHODE DU BRADFORD	24
4.1. PRINCIPE.....	24
4.2. MATÉRIEL ET SOLUTIONS.....	24
4.3. MÉTHODE.....	24
5. WESTERN BLOT	25
5.1. PRINCIPE.....	25
5.2. MATÉRIEL ET SOLUTIONS.....	25
5.3. ELECTROPHORÈSE.....	25
5.3.1. Préparation du gel de migration (<i>Running Gel</i>).....	25
5.3.2. Préparation du gel de concentration (<i>Stacking Gel</i>).....	25
5.3.3. Préparation et dépôt des échantillons.....	25
5.3.4. Migration.....	26
5.4. TRANSFERT SUR MEMBRANE.....	26
5.4.1. Préparation de la membrane.....	26
5.4.2. Transfert.....	26
5.5. TRAITEMENT DE LA MEMBRANE ET DÉTECTION EN CHÉMOLUMINESCENCE.....	26
5.5.1. Saturation de la membrane.....	26
5.5.2. Traitement de la membrane : anticorps primaires et secondaires.....	26
5.5.3. Révélation.....	26
5.6. CAS PARTICULIER DES GELS NU-PAGE.....	27
5.7. MARQUAGE DES PROTÉINES PAR LE « KRYPTON™ PROTEIN STAIN ».....	27
6. CO-IMMUNOPRÉCIPITATION	27
6.1. PRINCIPE.....	27
6.2. MATÉRIEL ET SOLUTIONS.....	27
6.3. MÉTHODE.....	27
7. EXTRACTION D'ARN	28
7.1. PRINCIPE.....	28
7.2. MATÉRIEL ET SOLUTIONS.....	28
7.3. MÉTHODE.....	28
7.3.1. Extraction de l'ARN total.....	28
7.3.2. Précipitation de l'ARN total.....	28
7.3.3. Lavage et resuspension de l'ARN total.....	28
7.3.4. Dosage de l'ARN total.....	28
8. TRANSCRIPTION INVERSE	29
8.1. PRINCIPE.....	29
8.2. MATÉRIEL ET SOLUTIONS.....	29
8.3. MÉTHODE.....	29
9. PCR EN TEMPS RÉEL (RT-PCR)	29
9.1. PRINCIPE.....	29
9.2. MATÉRIEL ET SOLUTIONS.....	30
9.3. MÉTHODE.....	30
10. TEST DE CYTOTOXICITÉ : MTT	30
10.1. PRINCIPE.....	30
10.2. MATÉRIEL ET SOLUTION.....	30

Table des Matières

10.3.	MÉTHODE	30
11.	TRANSFORMATION BACTRIENNE.....	31
11.1.	PRINCIPE	31
11.2.	MATÉRIEL ET SOLUTION.....	31
11.3.	MÉTHODE	31
11.3.1.	<i>Transformation bactérienne.....</i>	<i>31</i>
11.3.2.	<i>Amplification.....</i>	<i>31</i>
11.3.3.	<i>Extraction d'ADN plasmidique (Miniprep).....</i>	<i>32</i>
11.3.4.	<i>Maxiculture (Maxiprep).....</i>	<i>32</i>
11.3.5.	<i>Digestion enzymatique.....</i>	<i>32</i>
12.	TRANSFECTION STABLE DES CELLULES N-HTERT.....	33
12.1.	PRINCIPE	33
12.2.	MATÉRIEL ET SOLUTION.....	33
12.3.	MÉTHODE	33
13.	IMMUNOFLUORESCENCE.....	34
13.1.	PRINCIPE	34
13.2.	MATÉRIEL ET SOLUTION.....	34
13.3.	MÉTHODE	34
14.	INCORPORATION DE LA THYMIDINE TRITIÉE	35
14.1.	PRINCIPE	35
14.2.	MATÉRIEL ET SOLUTION.....	35
14.3.	MÉTHODE	35
15.	DOSAGE PROTÉIQUE PAR LA MÉTHODE AU FOLIN.....	35
15.1.	PRINCIPE	35
15.2.	MATÉRIEL ET SOLUTION.....	35
15.3.	MÉTHODE	35
 RESULTATS ET DISCUSSION		
1.	INTRODUCTION	37
2.	PROFIL D'ABONDANCE DE TRIM29 SUITE À L'EXPOSITION DES KÉRATINOCYTES À DES DOSES RÉPÉTÉES ET SUB-LÉTALES D'UVB	38
2.1.	PROFIL D'ABONDANCE DE TRIM29 AU NIVEAU PROTÉIQUE	38
2.2.	ABONDANCE RELATIVE EN ARNm DE TRIM29.....	38
2.3.	DISCUSSION	38
3.	CO-IMMUNOPRÉCIPITATION DE TRIM29	40
3.1.	MISE AU POINT	40
3.1.1.	<i>Vérification de l'extraction de TRIM29 par les différents tampons de lyse.....</i>	<i>40</i>
3.1.2.	<i>Premier essai d'immunoprécipitation de TRIM29.....</i>	<i>40</i>
3.1.3.	<i>Deuxième essai d'immunoprécipitation de TRIM29.....</i>	<i>40</i>
3.1.4.	<i>Troisième essai d'immunoprécipitation de TRIM29.....</i>	<i>41</i>
3.2.	CO-IMMUNOPRÉCIPITATION DE TRIM29 AVEC ATM/ATR	42
3.3.	CO-IMMUNOPRÉCIPITATIONS DE TRIM29 AVEC P53	42
3.4.	DISCUSSION	43
4.	LOCALISATION DE TRIM29, P53 ET P-P53	44
5.	CRÉATION DE MUTANT STABLE SOUS-EXPRIMANT TRIM29 PAR EXPRESSION D'UNE SHRNA INHIBITRICE DE L'ARNM DE TRIM29	45
5.1.	TRANSFORMATION BACTÉRIENNE ET DIGESTION ENZYMATIQUE	45
5.2.	TRANSFECTION DES KÉRATINOCYTES N-HTERT	46
5.3.	CHOIX DES CLONES CONTRÔLES ET DES CLONES SOUS-EXPRIMANT TRIM29	46

Table des Matières

6. RÉPONSE AUX UVB DES CLONES OÙ L'EXPRESSION DE TRIM29 EST INVALIDÉE.....	48
6.1. EFFET SUR L'ABONDANCE DE TRIM29	48
6.2. EFFET SUR L'ABONDANCE DE L'INVOLUCRINE	49
6.3. EFFET SUR LA MORPHOLOGIE CELLULAIRE	49
6.4. EFFET SUR LA PROLIFÉRATION CELLULAIRE.....	50
6.4.1. <i>Observation au microscope optique</i>	50
6.4.2. <i>Test de cytotoxicité des expositions aux UVB par incorporation de MTT</i>	50
6.4.3. <i>Test d'incorporation de la thymidine tritiée</i>	51
6.5. EFFET SUR L'ABONDANCE DE P53.....	52
6.6. EFFET SUR L'ABONDANCE DE P21 ^{WAF-1}	52
6.7. EFFET SUR L'INDUCTION DE L' APOPTOSE.....	52
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	
1. AUGMENTATION DE L'ABONDANCE PROTÉIQUE DE TRIM29 SUITE AUX EXPOSITIONS RÉPÉTÉES ET SUB-LÉTALES AUX UVB	54
2. TRIM29 EN RÉPONSE AUX DOMMAGES À L'ADN.....	56
3. TRIM29 ET P53.....	56
4. EFFET DE LA SOUS-EXPRESSION DE TRIM29 DANS LES KÉRATINOCYTES	57
5. CONCLUSION	58
BIBLIOGRAPHIE.....	59

Liste des abréviations

¹ O ₂	Oxygène Singulet
2D	2 Dimensions
2D-DIGE	2D Difference In-Gel Electrophoresis
6-4PP	Photoproduits de pyrimidine (6-4) pyrimidone
ADN	Acide Déoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ARNm	Acide Ribonucléique messenger
AT	Ataxia Telangiectasia
ATDC	Ataxia Telangiectasia groupD Complementing gene
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATP	Adénosine triphosphate
ATR	ATM and Rad 3 related protein
C	Cytosine
cccDNA	DNA covalently closed circular
Cdk	Cycline dependent kinase
cocDNA	DNA covalently open circular
CoIP	Co-immunoprécipitation
DAG	Diacylglycérol
DCP	Dimères Cyclobutyliques de Pyrimidines
DNA-PK	DNA-dependent Protein Kinase
EGF	Epidermal Growth Factor
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinase
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-Phosphate Deshydrogenase
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
Hsp	Heat shock protein
IFN _γ	Interferon gamma
Ig	Immunoglobuline
IL-1	Interleukine-1
JNK	c-Jun N-terminal kinase
K	Kératine
KAP	KRAB-associated protein
Kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MAPKK	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase
MAPKKK	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase
MEK	MAPK/ERK Kinase
mJ/cm ₂	Millijoule/cm ₂
MTT	Bromure de 3,(4,5-diméthyl-thiazol-2-yl) diphényltétrazolium
N-hTERT	Kératinocytes humains normaux immortalisés par la sous-unité catalytique de la télomérase
ng	Nanogramme
nm	Nanomètre
·OH	Radicaux hydroxyle

Abréviations

O ₂ ^{·-}	Anion superoxyde
PARP	Poly ADP-ribose polymérase
pb	Paires de base
PCR	Polymerisation Chain Reaction
PI3K	Phosphatidylinositol -3- Kinase
PIKK	Phosphoinositide 3-Kinase related Kinase
PKC	Protein Kinase C
PM	Poids Moléculaire
ROS	Reactive Oxygen Species
RT-PCR	Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
SDS	Sodium Dodécyl Sulfate
SDS-PAGE	SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis
shRNA	Short hairpin RNA
SIPS	Sénescence Induite Prématûrement par les Stress
T	Thymine
TGF- _β	Transforming Growth Factor beta
TNF- _α	Tumor Necrosis Factor alpha
TRIM	Tripartite Motif Protein
UV	Ultraviolets
UVA	Ultraviolets de type A
UVB	Ultraviolets de type B
UVC	Ultraviolets de type C

1. Contexte Général

Dans la société actuelle, l'apparence physique est particulièrement importante. Les personnes jeunes et parfaitement bronzées sont souvent idolâtrées et les personnes à peau claire s'investissent énormément pour leur ressembler notamment en faisant tout pour être bien bronzées. Quand le soleil n'est pas suffisant, elles font du banc solaire. En d'autres termes, elles s'exposent de plus en plus aux rayons ultraviolets.

À court terme, les principaux dommages causés par ces rayons, sont les érythèmes ou « coups de soleil » mais à long terme, des expositions répétées ou intensives à ces rayons peuvent non seulement accélérer le processus de vieillissement de la peau (Scharffetter-Kochanek, Brenneisen et al. 2000) mais également mener à des cancers de la peau (Katiyar 2007).

Le vieillissement de la peau est un phénomène complexe constitué d'une part du vieillissement intrinsèque et d'autre part du vieillissement extrinsèque. Le vieillissement intrinsèque est largement déterminé génétiquement tandis que le vieillissement extrinsèque, aussi appelé photovieillissement, est dû aux facteurs environnementaux et particulièrement les rayons ultraviolets (UV) du soleil (Jenkins 2002). Ces deux processus sont bien sûr largement enchevêtrés au point qu'il est souvent difficile de distinguer leurs effets respectifs (Scharffetter-Kochanek, Brenneisen et al. 2000).

Le cancer de la peau représente un problème de santé majeur et croissant. Plus d'un million de nouveaux cas sont détectés chaque année rien qu'aux Etats-Unis (Katiyar 2007). En Belgique, ce sont 1.500 nouveaux cas qui sont détectés en moyenne chaque année. Cette augmentation constante est notamment due aux changements des conditions environnementales car de plus en plus de rayons ultraviolets atteignent la surface terrestre, au phénomène de mode des peaux bronzées et à la mode vestimentaire (de plus en plus de zone sont exposées au soleil). Les rayons ultraviolets du soleil représentent la première cause de cancer de la peau. Non seulement, ils ont un potentiel carcinogénique propre mais ce potentiel est de surcroît augmenté par leur effet immunosuppresseur (Katiyar 2007).

Les rayonnements ultraviolets représentent en fait le stress le plus important auquel sont confrontées les cellules de la peau et ce, tous les jours. Ces cellules ne sont pas exposées aux stress de la même manière en fonction de leur localisation dans la peau. En effet, celle-ci est composée de trois couches distinctes parmi lesquelles l'épiderme est la plus exposée, vient ensuite le derme et enfin l'hypoderme (Katiyar 2007). Les kératinocytes qui composent l'épiderme sont donc les premières cibles des UV.

Dans ce mémoire, les protéines impliquées dans la réponse à long terme des kératinocytes à des expositions répétées et sub-létales d'ultraviolets B (UVB) seront étudiées. Véronique Vallery a mis au point un modèle de stress qui a permis de mettre en évidence différentes réponses des kératinocytes aux UVB. Notamment, les kératinocytes exposés aux UVB montrent une morphologie étalée et cessent de proliférer. De plus, une augmentation de l'abondance protéique de l'involucrine, un marqueur de différenciation des kératinocytes et de p21^{WAF-1}, une protéine impliquée dans l'arrêt du cycle cellulaire, sont observées.

I. Introduction

La protéine que nous étudierons plus particulièrement dans le cadre de ce mémoire est TRIM29 dont une variation d'abondance protéique a été mise en évidence. TRIM29 pourrait avoir un rôle dans la détection et la réponse aux dommages à l'ADN.

L'introduction de ce mémoire s'organise en six parties. Tout d'abord, il semblait important de décrire la peau et son organisation. Dans un deuxième temps, les voies de différenciation et d'activation des kératinocytes seront expliquées. Par la suite, nous parlerons des rayons ultraviolets, de leurs effets et des voies de transduction du signal qui sont activées sous leur influence. La quatrième partie sera dédiée au modèle de stress utilisé dans ce mémoire. Ensuite, nous parlerons de nos protéines d'intérêts. Finalement, nous déterminerons les objectifs de ce mémoire ainsi que l'approche expérimentale que nous utiliserons.

2. La Peau

La peau est l'organe le plus volumineux du corps humain et présente une surface de l'ordre de 1,5 à 2 m² (Katiyar 2007). Elle est constituée de trois couches distinctes : l'épiderme, le derme et l'hypoderme. Il faut également tenir compte de la jonction épidermo-dermique qui joue un rôle important dans la cohésion entre l'épiderme et le derme (**Figure 1**). La peau possède plusieurs rôles qui sont essentiels pour la survie de l'organisme : la protection contre des agents traumatiques externes, la thermorégulation, la sensation tactile et le métabolisme.

La peau représente la première barrière de défense de l'organisme face aux agressions extérieures comme les ultraviolets, la pollution, les bactéries, etc (Mancini 2004). La couche cornée de l'épiderme assure une protection souple et efficace contre les agressions mécaniques. Les fibres de collagène et les fibres élastiques du derme donnent à la peau sa force de tension et son élasticité. L'hypoderme, principalement composé de tissu adipeux, protège les muscles et les os sous-jacents contre les chocs et les pressions (Histologie Humaine, Stevens and Lowe, Editions DeBoeck 2002).

En ce qui concerne les agressions chimiques, il existe deux types de protection : la couche cornée et le film formé par la sueur et le sébum. Cependant, ces protections ne sont pas infranchissables, certaines substances peuvent pénétrer à travers la peau et atteindre la circulation générale. Ce mode de pénétration est d'ailleurs de plus en plus utilisé comme voie d'entrée de certains médicaments (Silvander, Ringstad et al. 2006).

Une protection biologique contre les micro-organismes pathogènes est, quant à elle, assurée par la couche cornée, les cellules immunitaires et la flore microbienne commensale qui est développée à la surface de la peau.

La peau est un organe sensoriel qui renseigne l'organisme sur quatre types de sensation, à savoir le toucher, la température, la pression et la douleur. Cette propriété sensitive est due à la présence dans la peau de terminaisons nerveuses libres et encapsulées.

La thermorégulation permet de minimiser les pertes de chaleur grâce au tissu adipeux de l'hypoderme et aux poils. Dans le cas contraire, où il faut évacuer de la chaleur excessive, ce sont la dilatation active des vaisseaux sanguins, la fermeture des anastomoses du derme et la transpiration qui interviennent.

Enfin, la peau collabore à la synthèse de vitamine D au niveau de l'épiderme (Lehmann, Querings et al. 2004) et permet un stockage énergétique sous la forme d'une accumulation de triglycérides dans les cellules adipeuses de l'hypoderme.

2.1. L'épiderme

L'épiderme, la couche la plus externe de la peau, est un épithélium pavimenteux stratifié kératinisé qui n'est irrigué par aucun vaisseau sanguin. Les quatre types cellulaires qui le composent sont alimentés par diffusion à partir du derme. Ces quatre types cellulaires de l'épiderme sont les kératinocytes, les mélanocytes, les cellules de Langerhans et les cellules de Merckel.

2.1.1. Les kératinocytes

Les kératinocytes sont le type cellulaire majoritaire de l'épiderme. Ils y représentent environ 90% des cellules. En fonction de leur état de différenciation, les kératinocytes s'organisent en différentes couches distinctes les unes des autres : la couche basale, la couche épineuse, le couche granuleuse et la couche cornée (**Figure 2**).

Leur cytosquelette, les systèmes de jonctions entre les cellules (desmosomes) et avec la matrice extracellulaire (hémidesmosomes) permettent le maintien de la cohésion de l'épiderme. De plus, leur réseau de kératines, des protéines fibreuses et insolubles dans l'eau, et les protéines de l'enveloppe cornée assure à la peau ses propriétés d'imperméabilité et de protection contre les agressions extérieures.

2.1.2. Les mélanocytes

Les mélanocytes (**Figure 2**), situés dans la couche basale de l'épiderme, sont les cellules qui pigmentent la peau. Cette pigmentation résulte de la production d'un pigment, la mélanine, au niveau des mélanosomes qui sont des organites ovoïdes situés dans le cytoplasme des mélanocytes. Les mélanosomes subissent un processus de différenciation en quatre étapes, la mélanogénèse, qui aboutit à une accumulation de mélanine et à son transfert vers les kératinocytes (Slominski, Tobin et al. 2004).

Chez l'humain, la proportion de mélanocytes par rapport aux kératinocytes est constante quelle que soit l'intensité de la pigmentation à raison d'un mélanocyte pour plus ou moins 36 kératinocytes (Slominski, Tobin et al. 2004). Néanmoins leur proportion n'est pas la même sur toute les parties du corps comme par exemple la paume des mains et la plante des pieds où cette proportion est plus faible.

2.1.3. Les cellules de Langerhans

Les cellules de Langerhans (**Figure 2**) sont des cellules présentatrices d'antigènes. Elles proviennent de la moëlle osseuse et migrent dans l'épiderme où elles s'intercalent entre les kératinocytes. Ces cellules comportent une douzaine de dendrites formant un réseau qui entoure les kératinocytes. Elles jouent un rôle immunologique en surveillant la présence d'antigènes.

2.1.4. Les cellules de Merckel

Les cellules de Merckel sont localisées au niveau de la couche basale où elles peuvent être isolées ou réparties en amas appelés corpuscules de Merckel. Elles se distinguent des autres cellules épidermiques par la présence dans leur cytoplasme de granules denses très riches en médiateurs biochimiques. Toujours en contact avec une terminaison nerveuse, elles jouent un rôle de mécanorécepteurs et sont donc impliquées dans la fonction du toucher.

2.2. La lame basale

La lame basale, ou jonction épidermo-dermique, est l'interface entre l'épiderme et le derme. Elle constitue le site d'ancrage de l'épiderme au derme et est élaborée à la fois par les kératinocytes épidermiques de la couche basale et par les fibroblastes du derme. La lame basale influence le comportement des kératinocytes en modulant leur polarité, leur prolifération, leur migration et leur différenciation. Elle représente également une barrière physiologique particulièrement importante dans le cas des pathologies tumorales en limitant leur invasion vers les autres tissus.

Morphologiquement, quatre zones définissent la lame basale. Premièrement le pôle basal des kératinocytes contient des hémidesmosomes dans lesquels les filaments de kératines viennent s'ancrer. Ensuite, la *lamina lucida*, une région claire aux électrons, est traversée par les filaments d'ancrage connectant les hémidesmosomes à la région suivante, la *lamina densa*, dense aux électrons, dans laquelle viennent s'accrocher les filaments d'ancrage. Finalement, la zone sous-basale du derme superficiel contient les fibrilles d'ancrage (collagène de type VII) reliant la *lamina densa* aux plaques d'ancrage (collagène IV) du derme supérieur.

2.3. Le derme

Le derme est le tissu de soutien sur lequel repose l'épiderme. C'est un tissu conjonctif fibro-élastique constitué de fibroblastes baignant dans une matrice extracellulaire composée de fibres de collagènes, de fibres élastiques et d'une substance fondamentale amorphe. Il contient de nombreux vaisseaux sanguins et lymphatiques, des nerfs et des terminaisons nerveuses ainsi que diverses annexes cutanées dérivées de l'épiderme tels que les ongles, les follicules pileux, les glandes sudoripares et sébacées (**Figure 1**).

Du point de vue histologique, le derme se subdivise en deux parties : le derme superficiel papillaire et le derme profond réticulaire. Le derme superficiel papillaire est un tissu lâche composé d'un réseau de faisceaux de collagène fins et orientés perpendiculairement à la lame basale épidermique. Cette partie du derme suit intimement les crêtes formées par les circonvolutions de la couche basale de l'épiderme et est riche en fibroblastes et en vaisseaux sanguins permettant la nutrition de l'épiderme par diffusion des nutriments. Le derme profond est, quant à lui, un tissu dense constitué de nombreux et épais faisceaux de collagène sans orientation particulière et entremêlés de fibres élastiques. Cette partie du derme est pauvre en cellules et en substance fondamentale.

2.4. L'hypoderme

L'hypoderme est un tissu conjonctif cellulaire continuant le derme. Il est richement vascularisé et contient plus ou moins de lobules adipeux selon les conditions de nutrition et les régions de la peau. Les adipocytes qui composent les lobules adipeux, sont riches en triglycérides et en acide gras et interviennent dans le stockage énergétique sous forme de graisse. L'hypoderme joue également un rôle de protection mécanique et thermique.

3. Les différentes voies ouvertes aux kératinocytes

3.1. La différenciation

Comme dit plus haut, la différenciation des kératinocytes aboutit à la formation de couches distinctes qui évoluent à partir de la couche basale vers l'extérieur de l'épiderme. Chacune de ces couches montre des caractéristiques particulières dans la morphologie des kératinocytes qui la composent (**Figure 2**).

3.1.1. La couche basale

La couche basale (*stratum basalis*), la plus profonde, consiste en une assise de cellules non-différenciées et ancrées dans la lame basale par des jonctions de type hémidesmosome. Parmi ces cellules, il y a tout d'abord les cellules souches qui ont un potentiel de division lent mais infini. Elles engendrent les cellules intermédiaires amplificatrices qui se divisent beaucoup plus rapidement mais avec un potentiel limité. Ces cellules intermédiaires amplificatrices donnent naissance à leur tour à un troisième type de cellules qui sont capables de quitter la couche basale et d'entrer dans la voie de différenciation (Bickenbach and Grinnell 2004) (Watt 1998). Cette différenciation débute réellement lorsque les hémidesmosomes reliant la cellule et la lame basale sont rompus.

C'est dans cette couche que se retrouvent également les cellules de Merckel et les mélanocytes.

3.1.2. La couche épineuse

La couche épineuse (*stratum spinosum*) est située directement au-dessus de la couche basale et est composée de cellules qui s'aplatissent au fur et à mesure de leur ascension dans l'épiderme mais dont le noyau et les organites cellulaires sont intacts. D'une part, la couche épineuse est caractérisée par les desmosomes qui font la jonction entre les différentes cellules et qui leur donnent une morphologie en épine, à l'origine de son appellation, observable dans les coupes histologiques classiques. D'autre part, les corps d'Odland, ou corps lamellaires, apparaissent dans le cytoplasme des cellules. Ces corps d'Odland sont des organites multilamellaires qui se remplissent de lipides, d'enzymes capables de les modifier, d'hydrolases acides et d'hydrates de carbone qui joueront un rôle dans les étapes suivantes de la différenciation. Les premiers marqueurs de la différenciation des kératinocytes que sont la kératine 1 et la kératine 10, apparaissent dans cette couche (Poumay and Pittelkow 1995), rapidement suivi de l'involucrine (Eckert, Crish et al. 1997).

3.1.3. La couche granuleuse

La troisième couche de l'épiderme est la couche granuleuse (*stratum granulosum*). Celle-ci est composée de cellules très aplaties dont les noyaux commencent à dégénérer mais elle est surtout caractérisée par la présence de granules de kératohyaline au sein des faisceaux de kératines. Ces grains contiennent des produits de la différenciation des kératinocytes tels que la loricine et la filaggrine. Ces produits seront utilisés pour l'assemblage des structures présentes dans les kératinocytes en différenciation terminale.

3.1.4. La zone de transition

Entre la troisième et la dernière couche de l'épiderme, il y a une zone de transition (*stratum lucidum*) qui sépare les cellules vivantes des cellules mortes. C'est une région d'activité enzymatique intense où les différents organites et le noyau de la cellule seront détruits par l'action de nucléases, de protéases et d'autres enzymes. Les corps d'Odland vont, quant à eux, libérer leur contenu dans le milieu intercellulaire de la couche cornée par exocytose et former ainsi le ciment intercellulaire. C'est également à ce niveau qu'ont lieu les dernières étapes pour la formation du réseau de kératines et de l'enveloppe des cellules de la couche cornée (Eckert, Crish et al. 1997).

3.1.5. La couche cornée

La couche cornée (*stratum corneum*) représente la dernière étape dans la différenciation des kératinocytes. À ce niveau, les cellules sont mortes puisqu'elles ne possèdent plus ni noyau ni organite et deviennent des cornéocytes. Ceux-ci sont complètement aplatis et présentent un assemblage serré et stable des filaments de kératines. À la surface de la couche cornée, les cornéocytes se détachent de l'épiderme suite à la lyse du ciment intercellulaire. C'est le processus de desquamation.

C'est cette couche qui confère à l'épiderme son rôle de protection et qui réduit la perte d'eau de l'organisme.

3.2. L'activation

L'activation est une voie alternative ouverte aux kératinocytes en réponse à des dommages de l'épiderme ou dans certaines conditions pathologiques. Ce processus d'activation est modulé par des facteurs de croissance et des cytokines (Freedberg, Tomic-Canic et al. 2001). L'expression des gènes de certaines kératines particulières peut être utilisée comme marqueur des cellules activées. En effet, les kératinocytes activés expriment les kératines 6, 16 et 17 tandis que les kératinocytes de la couche basale expriment principalement les kératines 5 et 14 (**Figure 3**) (Freedberg, Tomic-Canic et al. 2001).

Les kératinocytes activés sont hyperprolifératifs et capables de migrer. Ils changent l'organisation de leur cytosquelette, augmentent le niveau de récepteurs à leur surface cellulaire et produisent des composants de la lame basale. Dans les derniers stades de la réparation tissulaire, les kératinocytes activés acquièrent également une capacité de contraction.

Les kératinocytes activés sécrètent aussi des signaux paracrines pour alerter les fibroblastes, les cellules endothéliales, les mélanocytes et les lymphocytes, ainsi que des signaux autocrines ciblant les kératinocytes voisins. Les cellules affectées par ces signaux sécrètent alors à leur tour des signaux paracrines et autocrines qui pourront modifier les actions des kératinocytes activés. L'ensemble de ces signaux permettra donc d'orchestrer les actions de tous les types cellulaires concernés pour une réparation efficace des zones endommagées.

En fin de cicatrisation, les kératinocytes activés recevront un signal de dé-activation et reviendront vers la voie de différenciation normale. Ce signal est médié par des facteurs de croissance et des cytokines produites par les kératinocytes eux-mêmes ou par les autres types cellulaires cités précédemment comme par exemple le « Transforming Growth Factor- β » (TGF- β) produit par les fibroblastes du derme (Freedberg, Tomic-Canic et al. 2001).

4. Les Ultraviolets et leurs effets

L'exposition aux ultraviolets constitue le stress environnemental le plus important auquel est confrontée la peau. Les deux principaux effets à long terme de cette exposition sont l'accélération du processus de vieillissement de la peau (Scharffetter-Kochanek, Brenneisen et al. 2000) et l'augmentation du risque de cancer (Katiyar 2007).

4.1. Les Ultraviolets (UV)

Le soleil émet un spectre continu de radiations électromagnétiques qui peuvent être divisées en trois principales catégories en fonction de leur longueur d'onde. On retrouve les rayons ultraviolets (UV), dont la longueur d'onde est comprise entre 100 et 400 nm, la lumière visible, entre 400 et 800 nm et les rayons infrarouges, dont la longueur d'onde est supérieure à 800 nm (**Figure 4**).

Les UV représentent près de 5% de l'énergie émise par le soleil. Ils traversent l'atmosphère par tous les temps et n'ont rien à voir avec la sensation de chaleur procurée par le soleil qui est en réalité due aux infrarouges.

Les UV peuvent également être divisés en trois sous-catégories : les UVA (320 à 400 nm), les UVB (280 à 320 nm) et les UVC (100 à 280 nm) (Rai and Srinivas 2007) (Mancini 2004). Cependant, tous les rayonnements d'une longueur d'onde inférieure à 300 nm sont absorbés par la couche d'ozone de l'atmosphère. De ce fait, les UVC et une partie des UVB n'atteignent jamais la surface terrestre (**Figure 5**) (Rai and Srinivas 2007). L'appauvrissement de la couche d'ozone stratosphérique a pour conséquence que des UV de longueurs d'onde juste inférieures à 300 nm commencent à atteindre la surface terrestre, ce qui correspond à une augmentation de la proportion des UVB. Ce phénomène intervient probablement dans l'augmentation du taux de cancers de la peau ces dernières années (De Fabo 2005) (Saladi and Persaud 2005). De plus, l'intensité des UV arrivant à la surface de la terre dépend d'une multitude de facteurs comme par exemple, la saison, l'altitude, la concentration dans l'atmosphère de polluants divers, etc (Rai and Srinivas 2007).

Chez l'homme, les cibles premières des UV sont la peau et les yeux. Plus la longueur d'onde est élevée, plus les UV pénètrent profondément dans les tissus (Tyrrell 1995) (**Figure 2**). Dans l'épiderme, les UV sont soit absorbés, soit réfléchis.

4.1.1. Les UVA

Les UVA, qui sont moins énergétiques que les UVB et les UVC, constituent 5 % du rayonnement solaire total atteignant la surface terrestre et 90 à 95 % des rayons UV atteignant la surface terrestre (Rai and Srinivas 2007). Ils ne sont pas filtrés par l'atmosphère, ils traversent le verre (Adam 1999) et leur intensité reste relativement constante tout au long de la journée.

In vivo, les UVA pénètrent jusque dans le derme profond de la peau (**Figure 2**). Ils sont immunosuppresseur et interviennent dans le photovieillissement en induisant des stress oxydatifs (Katiyar 2007). Ils interviennent également dans le bronzage immédiat, ils sont d'ailleurs communément utilisés dans les salons de bronzage où les appareils émettent de deux à cinq fois plus de rayons UVA que le rayonnement solaire (Adam 1999).

Pendant longtemps, les UVA ont été considérés comme ne causant aucun dommage à long terme. Cependant de récentes études ont suggéré qu'ils pouvaient augmenter le risque de développement des tumeurs de la peau principalement *via* la formation de radicaux libres qui endommagent les constituants cellulaires et aussi *via* leur action immunosuppressive (Bachelor and Bowden 2004). En fait, étant les UV les plus abondants et les plus pénétrants dans la peau, ils sont considérés comme des acteurs qui augmentent les effets néfastes des UVB (Adam 1999).

4.1.2. Les UVB

Les UVB, plus énergétiques que les UVA mais moins que les UVC, constituent 0,5 % du rayonnement solaire total atteignant la surface de la terre (Adam 1999). Ils sont partiellement absorbés par la couche d'ozone (Rai and Srinivas 2007) et ne traversent pas le verre. Leur pénétration à travers la couche d'ozone est maximale entre 10 h et 14 h et tend à s'intensifier pendant l'été, à haute altitude et près de l'équateur (Adam 1999).

Les UVB pénètrent dans la peau jusqu'au derme supérieur (**Figure 2**). Ils sont considérés comme étant les rayons ultraviolets les plus dangereux atteignant la surface terrestre principalement par leur caractère mutagène. En effet, ils provoquent des mutations puisqu'ils sont absorbés directement par l'ADN. Il a été démontré que les UVB sont responsables des différents types de cancers cutanés. De plus, ils génèrent également des stress oxydatifs. Enfin, ils sont aussi responsables des érythèmes, de phénomènes d'immunosuppression et participent aux processus du photovieillissement et de formation de la cataracte (Katiyar 2007) (Rai and Srinivas 2007).

4.1.3. Les UVC

Les UVC sont les rayonnements UV les plus énergétiques et de ce fait les plus nocifs. Heureusement, ils sont absorbés par la couche d'ozone de l'atmosphère et donc n'atteignent pas la surface terrestre (Rai and Srinivas 2007). Si ils devaient atteindre la surface terrestre, ils ne pénétreraient pas profondément dans l'épiderme (**Figure 2**).

Aux endroits où la couche d'ozone est particulièrement mince, les UVC peuvent être considérés comme des acteurs dans les érythèmes, le photovieillissement et les cancers cutanés (Rai and Srinivas 2007).

Les principales sources d'UVC au sol sont les lampes germicides utilisés dans les hôpitaux et les laboratoires pour la stérilisation des locaux, des instruments, etc. En effet, les UVC détruisent les bactéries et les virus. Cette capacité est variable en fonction de la longueur d'onde émise et est maximale pour les longueurs d'onde comprises entre 200 et 280 nm.

4.2. Les effets des rayons UV

4.2.1. Les effets généraux

Les rayons UV entraînent une multitude d'effets. Il y a bien sûr les effets directement observables tels que le bronzage, les érythèmes et à plus long terme le photovieillissement (Rai and Srinivas 2007).

Au niveau cellulaire, les UV provoquent l'apparition de différentes caractéristiques comme une perte de contact intercellulaire, un changement morphologique, des boursouffures (blebs) en surface des cellules, etc... (Scharffetter-Kochanek, Brenneisen et al. 2000). De plus, les UV ont une action pro-inflammatoire puisqu'ils induisent la sécrétion de cytokines, telles que l'Interleukine 1 (IL-1), le « Tumor Necrosis Factor- α » (TNF α) et l'Interferon- γ (IFN γ), notamment par les kératinocytes et la sécrétion d'autres signaux inflammatoires par d'autres types cellulaires (Rittie and Fisher 2002). Enfin, les UV ont un effet immunosuppresseur en diminuant la capacité de reconnaissance de corps étrangers et d'engager une réponse immunitaire (Ichihashi, Ueda et al. 2003). Ils entraînent la libération par les kératinocytes de médiateurs immunosuppresseurs solubles, tel que l'IL-10, qui pourront entrer dans la circulation et aller inhiber les réactions immunitaires de manière systémique (Katiyar 2007). Ces effets immunosuppresseurs s'appliquent également aux cellules de Langerhans. En effet, des expositions de la peau aux UV entraînent une émigration des cellules de Langerhans tandis que celles qui restent dans l'épiderme, perdent leur habilité à présenter les antigènes puisque les UV suppriment l'expression des MHC (Major Histocompatibility Complex) de classe II à leur surface. Cet effet immunosuppresseur augmente encore le potentiel carcinogène des UV (Katiyar 2007).

Il y a également un certain nombre d'effets au niveau moléculaire. Lorsqu'une molécule organique absorbe un rayonnement UV, elle se retrouve sous une forme excitée. Un de ces électrons est alors transféré sur une orbitale supérieure. La molécule excitée, devenue un radical libre, peut réagir avec beaucoup d'autres molécules, menant parfois à des réactions en chaîne. Ce processus est nommé photosensibilisation et les molécules capables d'absorber les rayons, des photosensibilisateurs ou chromophores.

Plusieurs constituants cellulaires, par exemple l'ADN et les flavines, mais aussi certains médicaments comme les tétracyclines peuvent réagir comme des chromophores à l'intérieur de la cellule. L'état excité de ces chromophores cellulaires peut être considéré comme des espèces génotoxiques similaires aux espèces réactionnelles dérivées de l'oxygène telles que le radical hydroxyle ou l'oxygène à l'état singulet.

4.2.2. Les dommages oxydatifs

Les stress oxydatifs jouent un rôle central dans l'initiation et la propagation de voies de signalisation intracellulaire en réponse aux UV. Un faible niveau d'espèces réactionnelles dérivées de l'oxygène ou « Reactive Oxygen Species » (ROS) est continuellement produit *in vivo* et est impliqué dans des processus physiologiques. Les rayons UV ont pour effet d'augmenter les concentrations en ROS via l'action de chromophores intracellulaires, tels que le NADH (Nicotinamide Adénine Dinucléotide), le NADPH (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate) ou le tryptophane et d'appauvrir les concentrations en enzymes anti-oxydantes (Rittie and Fisher 2002).

Les différents ROS sont formés suite à la réaction du chromophore excité avec l'oxygène. Ces ROS incluent l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et l'oxygène singulet (1O_2). La superoxyde dismutase (SOD) convertit $O_2^{\cdot-}$ en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui sera lui-même convertit en un radical hydroxyle ($\cdot OH$) en présence de fer. 1O_2 et $\cdot OH$ ont la capacité d'activer un certain nombre de protéines et donc d'enclencher des voies de signalisations (**Figure 6**) (Rittie and Fisher 2002) (Scharffetter-Kochanek, Brenneisen et al. 2000).

Par ailleurs, ces ROS endommagent la plupart des constituants cellulaires comme l'ADN, les lipides et les protéines. Il a été démontré que les protéines modifiées par oxydation s'accumulent lors du vieillissement de la peau (Petropoulos, Conconi et al. 2000) et lors de l'exposition de la peau aux UV (Bulteau, Moreau et al. 2002). Cette oxydation des protéines peut mener soit à leur inactivation soit à leur accumulation et à leur aggrégation, nocive pour la cellule (Carrard, Bulteau et al. 2002).

4.2.3. Les effets sur l'ADN

Les dommages au niveau de l'ADN causés par une exposition au UV se divisent en deux catégories : les dommages directs où les UV induisent eux-mêmes des dégâts au niveau de l'ADN et les dommages indirects engendrés par des composés chimiques intermédiaires.

4.2.2.1. Les effets directs ou réaction de type I

La longueur d'onde maximale d'absorbance de l'ADN se situe aux alentours de 260 nm. Plus précisément, l'ADN absorbe les longueurs d'ondes comprises entre 245 et 290 nm, c'est-à-dire les UVC et, dans une moindre mesure, les UVB, ce qui explique leur grand pouvoir mutagène (Ichihashi, Ueda et al. 2003). Par contre, l'ADN n'est pas un chromophore des UVA. Cette absorption des UV par l'ADN fournit l'énergie nécessaire à la liaison covalente entre deux pyrimidines, thymine ou cytosine. Cette liaison peut se faire de deux manières différentes, amenant la génération des deux principaux types de photoproduits : les dimères cyclobutyliques de pyrimidines (DCP) et les photoproduits de pyrimidine (6-4) pyrimidone (6-4PP) (**Figure 7**) (Ichihashi, Ueda et al. 2003).

Les DCP sont en moyenne cinq à dix fois plus fréquemment formés que les 6-4PP. Ils sont générés lorsque deux pyrimidines adjacentes se lient de façon covalente pour former une structure en anneau. Les 6-4PP sont également générés par une liaison covalente entre deux pyrimidines adjacentes mais cette liaison ne se fait pas entre les mêmes carbones de ces pyrimidines et nécessite plus d'étapes intermédiaires (Ichihashi, Ueda et al. 2003). Sur l'ADN, les DCP et les 6-4PP créent une distorsion et de ce fait bloquent une vaste majorité des ADN et ARN polymérases lors de la réplication et de la transcription (Ichihashi, Ueda et al. 2003).

Ces deux types de dommages peuvent conduire à des mutations et au développement de cancers (Ichihashi, Ueda et al. 2003).

Parmi les DCP, les dimères thymine-cytosine (TC) et les dimères cytosine-cytosine (CC) sont connus pour être les plus mutagènes. Les mutations de type TC → TT et CC → TT sont d'ailleurs souvent retrouvées dans le gène de p53, impliqué dans les cancers induits par les UV (Ichihashi, Ueda et al. 2003).

4.2.2. Les effets indirects ou réaction de type II

Bien que les UVA ne soient pas absorbés par l'ADN et que les UVB ne le soient pas totalement, ils peuvent aussi induire indirectement des dommages à l'ADN. En effet, ils excitent des chromophores cellulaires qui peuvent directement cibler les bases guanines de l'ADN ou générer des ROS, ceux-ci pouvant à leur tour attaquer l'ADN au niveau des guanines. Ces attaques aboutissent à la formation de 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) dans les brins d'ADN. Cette 8-OHdG est une étape entre la transformation d'une guanine en une thymine et donc, représente une petite fraction des mutations induites par les UV (Ichihashi, Ueda et al. 2003). C'est également un marqueur de stress oxydatif au niveau de l'ADN.

Les rayons UV peuvent aussi générer d'autres dommages à l'ADN comme les cassures simple brin, les thymines glycol, etc (Ichihashi, Ueda et al. 2003).

4.3. Conséquences des dommages à l'ADN

Lorsqu'une cellule est exposée à un stress entraînant des dommages à l'ADN, elle arrête son cycle de division (**Figure 8**) de façon temporaire via, entre autre, l'activation de p53 et p21^{WAF-1}, pour permettre la réparation de l'ADN et éviter ainsi l'apparition de mutations dans les générations cellulaires suivantes. Si la fréquence des dommages n'est pas trop élevée et/ou que la réparation est efficace, la prolifération cellulaire reprend. Le cas échéant, la plupart des types cellulaires enclenchent un processus de mort programmée, l'apoptose.

4.3.1. p53

p53 est une phosphoprotéine nucléaire qui est principalement un activateur transcriptionnel spécifique d'une séquence consensus. Elle se lie au « p53 responsive element » et active la transcription des gènes qui dépendent des promoteurs contenant cette séquence. Les protéines encodées par les gènes cibles de p53, plus ou moins une centaine, sont impliquées dans une multitude de voies de signalisation incluant l'inhibition du cycle cellulaire, l'apoptose, la sénescence, la différenciation et l'accélération de la réparation de l'ADN (Oren 2003). p53 peut elle-même permettre l'accélération de la réparation de l'ADN grâce à son activité 3'-5' exonucléase (Oren 2003) (Smith and Fornace 1997).

En condition normale, l'abondance de p53 est très faible car la protéine Mdm2 se lie à p53 et l'inactive. Cette inactivation est due à deux mécanismes moléculaires distincts. Dans un premier temps, Mdm2 interfère avec l'activité transcriptionnelle de p53 en se liant à son domaine de trans-activation N-terminal. Cette interaction bloque les interactions de p53 avec d'autres protéines nécessaires à son activité. Dans un deuxième temps, Mdm2 joue un rôle critique dans la dégradation de p53. En effet, la liaison de Mdm2 à p53 provoque son exportation vers le cytoplasme. À ce moment, l'activité E3 ubiquitine ligase de Mdm2 lui permet de fixer des ubiquitines sur p53. Ces ubiquitines représentent un signal pour la dégradation de p53 par le protéasome (Oren 2003).

Lorsqu'il y a des dommages à l'ADN, p53 est phosphorylée sur sa Ser-15, ce qui déstabilise sa liaison avec Mdm2. De plus, en présence de ces dommages, Mdm2 est sujet à l'auto-ubiquitination et est donc dégradé. De ce fait, p53 est libre de retourner dans le noyau et y subit les différentes modifications post-traductionnelles qui lui permettront de jouer son rôle de facteur de transcription (Alarcon-Vargas and Ronai 2002).

I. Introduction

Lorsque p53 est activée, elle met en place un feedback négatif en activant la transcription de Mdm2 qui pourra ensuite à nouveau l'inhiber, si les conditions intracellulaires sont revenues à la normale (Oren 2003).

L'une des questions les plus importantes à propos de p53 est de savoir comment elle détermine la vie ou la mort de la cellule. Le contexte cellulaire détermine l'action de p53. Les principaux signaux de ce contexte cellulaire sont les signaux de survie sous forme de molécules sécrétées émanant des interactions entre cellules ou entre cellules et matrice extracellulaire. Les signaux de survie rendent les cellules plus résistantes à l'apoptose, incluant l'apoptose médiée par p53. Dans ce cas-là, p53 aura plutôt comme effet un arrêt du cycle cellulaire réversible ou irréversible dans le cas de la sénescence. En cas d'absence des signaux de survie adéquat, l'activation de p53 conduira plutôt à l'apoptose (Oren 2003).

Lorsqu'il y a des dommages à l'ADN, il existe plusieurs points de contrôle permettant de bloquer le cycle cellulaire. D'une part, p53 peut agir par l'intermédiaire d'une protéine encodée par l'un de ces gènes cibles, p21^{WAF-1}. p21^{WAF-1} est une protéine inhibitrice des cyclines dépendantes de kinases (cdk). L'induction de p21^{WAF-1} par p53 aboutit donc à l'inhibition de la progression du cycle cellulaire en le bloquant en phase G1 ou en phase G2.

D'autre part, l'entrée des cellules en mitose est également bloquée au niveau du point de contrôle de la phase G2 du cycle cellulaire. Les mécanismes par lesquels p53 régule ce passage entre la phase G2 et la phase M impliquent la cycline dépendante de kinases Cdc2 qui est essentielle pour l'entrée des cellules en mitose. p53 a également d'autres cibles qui n'affectent pas Cdc2 mais qui contribuent tout de même à l'arrêt du cycle cellulaire (Taylor and Stark 2001).

Au niveau de l'inhibition de Cdc2, il y a plusieurs mécanismes possibles. p53 agit directement sur Cdc2 en réduisant ses phosphorylations sur tyrosine qui sont nécessaires à son activité ou inhibe d'autres protéines impliquées dans l'activation de Cdc2 (**Figure 9**) (Taylor and Stark 2001). Cependant, Cdc2 peut également être inhibée de manière indépendante de p53 via l'action des protéines ATM et ATR qui sont activées plus précocement lors de dommages à l'ADN (Taylor and Stark 2001).

p53 est souvent mutée dans les cancers car c'est une mutation qui favorise l'accumulation d'autres mutations dans la cellule puisque la cellule poursuit son cycle malgré les dommages à l'ADN. Par conséquent, une mutation de p53 aide à la transformation des cellules normales en cellules cancéreuses (Raj, Brash et al. 2006).

Dans le cas des kératinocytes exposés aux UVB, il a été démontré que des expositions à de faibles doses d'UVB permettent aux kératinocytes de se protéger contre de futures expositions plus importantes via l'induction de p53. Ce rôle protecteur de p53 serait dû à l'arrêt du cycle cellulaire mené par p21^{WAF-1} et à l'induction de protéines nécessaires à la réparation de l'ADN comme p53R2. Ces mécanismes étant déjà installés, ils pourraient protéger les kératinocytes contre des expositions ultérieures (Decraene, Smaers et al. 2005).

4.3.2. p21^{WAF-1}

p21^{WAF-1} est un inhibiteur de cyclines dépendantes de kinases (cdk) qui fait partie de la famille d'inhibiteur de cdk Cip/Kip. p21^{WAF-1} est une cible transcriptionnelle de p53 puisqu'il a au moins deux sites « p53 responsive element » et joue un rôle crucial dans l'arrêt du cycle cellulaire en réponse à des dommages à l'ADN. En plus de p53, p21^{WAF-1} peut également être transcrit suite à l'action de nombreux autres facteurs de transcription tels que les Smads, les STAT, Ap2, etc (Gartel and Radhakrishnan 2005).

En plus de son rôle dans la réponse aux dommages à l'ADN, p21^{WAF-1} est également impliquée dans la différenciation terminale des kératinocytes, la sénescence répllicative et la protection contre l'apoptose médiée ou non par p53 (Gartel and Radhakrishnan 2005).

p21^{WAF-1} peut inhiber l'entrée en mitose des cellules en phase G2 par inhibition de Cdc2 selon quatre mécanismes différents. Dans un premier temps, p21^{WAF-1} peut inhiber Cdc2 par contact direct avec le complexe formé par Cdc2 et une autre cycline, la cycline B1. Le deuxième mécanisme repose sur le fait que pour l'activation de Cdc2, Cdk2 est nécessaire. p21^{WAF-1} peut inhiber Cdk2 et donc causer la perte de l'activité Cdc2. Dans le troisième mécanisme, p21^{WAF-1} intervient sur la phosphorylation de Cdc2 sur sa thréonine 161. Cette phosphorylation est réalisée par la protéine CAK et p21^{WAF-1} peut interférer avec l'activité de cette dernière (**Figure 9**). Enfin, le dernier mécanisme dépend de la capacité de p21^{WAF-1} à lier et inactiver PCNA, Proliferating Cell Nuclear Antigen. PCNA est requis pour la synthèse de l'ADN et son inhibition conduit donc à l'arrêt du cycle cellulaire (Taylor and Stark 2001).

4.4. L'activation des voies intracellulaires par les UV

L'une des premières réponses observables des cellules de la peau aux UV est l'activation d'un grand nombre de récepteurs aux facteurs de croissance et aux cytokines qui conduira ensuite à l'activation de nombreuses voies de signalisation. Dans le cas des kératinocytes et des UVB, l'activation du récepteur de l'« Epidermal Growth Factor » (EGF) aboutit à l'activation de la voie des MAPK et des PKC (**Figure 10**).

4.4.1. Voies du récepteur à l'EGF (EGF-R)

Lorsqu'il est activé, l'EGF-R, le récepteur de l'EGF, induit de multiples cascades de transduction du signal (Xu, Voorhees et al. 2006) qui régulent la prolifération, l'adhésion, la migration (Haase, Evans et al. 2003), la différenciation et la survie (Rodeck, Jost et al. 1997) de la cellule. De plus, en 2003, il a été démontré que les voies découlant de l'activation de l'EGF-R régulent la forme et la migration des kératinocytes notamment par réarrangement du cytosquelette d'actine. De ce fait, cette voie est également importante pour la réparation de l'épiderme suite à une blessure (Haase, Evans et al. 2003).

Le stress oxydatif découlant de la formation des ROS comme H_2O_2 suite aux expositions répétées aux UVB, joue un rôle important dans l'activation de l'EGF-R (Miller, Hale et al. 1994) (Peus, Vasa et al. 1998) (Xu, Voorhees et al. 2006). Il a été montré que cette activation qui est indépendante du ligand, résulte de l'action de H_2O_2 sur la phosphorylation du domaine intracellulaire du récepteur qui détermine son activation (Peus, Vasa et al. 1998) (Rittie and Fisher 2002). Cette activation ligand-indépendante découle du fait que les ROS produits par les UVB inhibent les phosphatases responsables de la déphosphorylation du récepteur, par oxydation d'une cystéine critique dans leur site catalytique (Knebel, Rahmsdorf et al. 1996). L'activation du récepteur est donc permanente et déclenche ensuite des cascades de signalisation aboutissant à l'activation de la voie des MAPK, les « Mitogen-Activated Protein Kinase » et de la voie des PKC, les Protéines Kinases C (Rittie and Fisher 2002).

4.4.2. La voie des MAPK

La cascade des MAPKs est un système complexe de transduction du signal qui participe à différents programmes cellulaires tels que la différenciation, le mouvement, la division et la mort cellulaire. Cette cascade joue un rôle clef aussi bien dans la régulation de l'expression des gènes que dans la régulation des activités cytoplasmiques. Elle est classiquement organisée en trois niveaux d'architectures consistant en une MAPK, un activateur de MAPK (MEK ou MAPKK) et un activateur de MEK (MAPK/ERK Kinase) (MAPKKK) (Schaeffer and Weber 1999).

Trois principales voies des MAPK sont décrites et aboutissent à l'activation des MAPK « ERK » Extracellular-signal Regulated Kinase, des $p38^{MAPK}$ et des JNK, « c-Jun N-terminal Kinase » (**Figure 11**). ERK est principalement activée par les facteurs de croissance et les cytokines impliquant la transduction d'un signal de prolifération ainsi que la promotion de la survie cellulaire en conférant une protection contre l'apoptose (Chouinard, Valerie et al. 2002). JNK et $p38^{MAPK}$ sont également sensibles aux facteurs de croissance mais elles sont plus spécialisées pour la réponse aux stress. Ces voies dépendent du contexte cellulaire et sont importantes par leur effet positif ou négatif sur l'apoptose (Chouinard, Valerie et al. 2002) (Peus, Vasa et al. 1999).

4.4.3. La voie de PKC δ

La famille des PKC est une famille de sérines/thréonines kinases. Les PKC jouent un rôle important dans de nombreuses voies de signalisation, notamment dans la mitogenèse, la prolifération cellulaire, la différenciation des kératinocytes, l'apoptose, l'activation des plaquettes, la réorganisation du cytosquelette d'actine, la modulation des canaux ioniques et la sécrétion (Toker 1998). Cette famille est divisée en trois catégories : les PKC conventionnelles (cPKC) comprenant les PKC α , β , γ , β II, les nouvelles PKC (nPKC) comprenant les PKC δ , ϵ , η et θ et les PKC atypiques (aPKC) comprenant les PKC ζ et λ . Une famille additionnelle est formée par la PKC la plus récemment découverte, PKC μ (Toker 1998). L'activation des PKC se fait en présence de diacylglycérol (DAG) et nécessite une concentration en calcium plus élevée qu'au niveau physiologique (**Figure 10**) (Gschwendt 1999).

I. Introduction

La PKC δ est activée par l'exposition des cellules aux UVB (Chen, Ma et al. 1999). Elle joue un rôle dans la régulation de la croissance cellulaire et du remodelage tissulaire (Steinberg 2004). Son rôle est également important dans la différenciation terminale des kératinocytes. Son activation dépend bien du DAG mais est totalement indépendante de la concentration en calcium (Denning 2004).

La PKC δ dispose d'un mode d'activation distinct via des phosphorylations sur tyrosine par les protéines de la famille des Src kinases. Cette forme de la PKC δ s'accumule dans la fraction soluble des cellules exposées à des stress oxydatifs et est activée d'une manière totalement indépendante des lipides membranaires. De même ses substrats ne sont plus obligatoirement situés au niveau de la membrane cellulaire (Steinberg 2004).

5. Le modèle de stress répétés et sub-létaux aux UVB

Le but de ce modèle est d'étudier l'effet à long terme d'expositions répétées des kératinocytes humains à des doses non-létales d'UVB. De fait, la peau et plus particulièrement l'épiderme sont régulièrement exposés aux UV. De plus, les dommages les plus sévères, photovieillissement, immunosuppression et cancers (Scharffetter-Kochanek, Brenneisen et al. 2000), sont des conséquences à long terme d'expositions cumulées aux UV et non d'une seule exposition.

Les cellules utilisées proviennent d'une lignée de kératinocytes humains immortalisés (N-hTERT). Ces cellules sont immortalisées par expression ectopique de la sous-unité catalytique de la télomérase et sont caractérisées par le fait qu'elles n'expriment pas p16^{INK4a}, un inhibiteur du cycle cellulaire. Néanmoins, ces kératinocytes conservent leur potentiel de différenciation (Dickson, Hahn et al. 2000).

5.1. Le modèle de stress utilisé

Le modèle d'exposition répétée aux UVB a été mis au point par Véronique Vallery en utilisant des doses sub-létales d'UVB, ce qui entraîne un arrêt de la prolifération des cellules N-hTERT.

Dans ce modèle, les cellules N-hTERT sont exposées huit fois à une dose sub-létale d'UVB, à savoir 300 mJ/cm², et cela à raison de quatre stress par jour pendant deux jours. Les cellules contrôles (CTL) subissent les mêmes rinçages que les cellules stressées mais ne sont pas exposées aux UVB. Les cellules sont ensuite mises au repos pendant deux jours. Les études des effets à long terme ont lieu au cinquième jour, c'est-à-dire 64 h après le dernier stress (**Figure 12**).

5.2. Les effets des expositions répétées des kératinocytes N-hTERT aux UVB

Les expositions répétées aux UVB provoquent des dommages à l'ADN et un stress oxydatif sévère. À 64 h après la dernière exposition, les cellules présentent un étalement morphologique, un arrêt de leur prolifération et un arrêt du cycle cellulaire lié à une augmentation de l'abondance de p53 et à une augmentation d'abondance de p21^{WAF-1} au niveau de l'ARNm et de la protéine.

L'involucrine est également induite dans les cellules exposées aux UVB. L'involucrine est une protéine impliquée dans la formation de l'enveloppe cornée et représente un marqueur tardif de la différenciation des kératinocytes.

Enfin, la protéine chaperone Hsp27 (Heat shock protein), protéine impliquée dans la défense au stress oxydatif (Kampinga 2006), est phosphorylée dans les cellules exposées aux UVB.

5.3. Étude protéomique des kératinocytes N-hTERT exposés aux UVB

Une étude protéomique a été réalisée pour mieux caractériser la réponse des kératinocytes N-hTERT exposés de manière répétée et sub-létale aux UVB. Pour cela, des gels bidimensionnels (2D-DIGE) ont été réalisés à partir de protéines marquées par un fluorochrome. Cette analyse a permis de mettre en évidence 41, 34 et 30 variations significatives d'abondance protéique entre les cellules exposées aux UVB et les cellules CTL après, respectivement, 16 h, 40 h et 64 h de récupération. L'identification des protéines correspondant à ces spots a ensuite été réalisée par spectrométrie de masse.

Ces protéines sont impliquées dans de multiples processus tels que le cycle cellulaire, la différenciation, l'inflammation, le cytosquelette et son réarrangement, la défense contre les stress, le métabolisme général et énergétique et les processus de transcription et de traduction. A côté des mécanismes de protection et des voies de réponse déjà bien connus dans la littérature, cette étude protéomique a relevé plusieurs protéines précédemment reconnues comme étant impliquées dans une réponse spécifique d'adaptation des kératinocytes face à des expositions répétées d'UVB. Plus spécifiquement, l'induction de la protéine TRIM29 par les UVB n'avait encore jamais été mises en évidence.

TRIM29 (Tripartite Motif Protein 29), une protéine de réponse au stress voit son abondance augmenter de 1,9 fois chez les cellules exposées aux UVB à 16 h après le dernier stress mais pas après 40 h ou 64 h de récupération. Lors de ce mémoire, nous nous sommes donc intéressés à cette protéine en particulier.

6. La protéine étudiée : TRIM29

6.1. Ataxia Telangiectasia (AT)

Ataxia Telangiectasia (AT) est une pathologie génétique autosomale récessive neurodégénérative qui débute tôt chez l'enfant et qui entraîne un handicap progressif. Au niveau clinique, elle est caractérisée par des mouvements non coordonnés et est souvent associée à des télangiectasies oculaires (dilatation de petits vaisseaux de l'œil). Les principaux signes neurologiques d'Ataxia Telangiectasia sont la perte des fonctions cérébrales et des défauts de la parole. Ces signes sont en fait dus à une atrophie cérébrale et principalement du cervelet (McKinnon 2004).

Outre ces problèmes neurologiques, cette pathologie est caractérisée par un certain nombre d'autres problèmes, incluant des dysfonctions immunitaires, la stérilité, des cancers lymphoïdes et une sensibilité accrue aux radiations ionisantes (McKinnon 2004). L'immunodéficience est généralement due à une diminution ou une absence d'IgA, d'IgE et d'IgG. D'ailleurs, la cause de mort chez les patients atteints de Ataxia Telangiectasia est souvent une pneumonie (McKinnon 2004). L'arrêt de la synthèse d'ADN observé dans des cellules normales exposées aux Rayons X n'est pas observé dans les cellules issues de patients atteints d'Ataxia Telangiectasia (cellules AT). Dans les cellules AT, la synthèse d'ADN se poursuit normalement, ce qui implique l'apparition de mutations (Lambert, Schultz et al. 1991).

Une dysfonction de la kinase ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) est responsable de cette pathologie. La mutation identifiée dans le gène codant pour ATM résulte en une instabilité de la protéine (McKinnon 2004).

6.2. ATM/ATR et la voie de signalisation en réponse aux dommages à l'ADN

ATM et ATR (ATM and Rad 3 related protein) interviennent dans la réponse cellulaire aux dommages à l'ADN. Les protéines de la famille Rad sont suspectées d'être les premiers senseurs des dommages à l'ADN. Leur structure leur permet de former des hétérotrimères qui encerclent l'ADN. Ce sont ces protéines Rad qui permettraient l'activation d'ATM/ATR en cas de dommages à l'ADN (**Figure 13**) (Abraham 2001).

Alors qu'ATM agit en réponse à des dommages globaux à l'ADN, comme les cassures double brins, ATR est spécifiquement associée aux dommages induits par les ultraviolets (Dhanalakshmi, Agarwal et al. 2005).

ATM et ATR sont des sérines/thréonines kinases de la famille des PIKK, les phosphoinositide 3-kinase related kinases (Abraham 2001). Elles phosphorylent leurs protéines cibles, comme p53, qui activent alors des voies de signalisation ralentissant la progression du cycle cellulaire et stimulant la réparation de l'ADN. Si les dommages à l'ADN sont irréparables, l'arrêt du cycle cellulaire conduit à l'élimination des cellules par apoptose (Bartek and Lukas 2003). L'activation de p53 dépend, entre autre, de sa phosphorylation par ATM/ATR qui mène à sa stabilisation en la protégeant de la dégradation par le protéasome (**Figure 13**) (Raj, Brash et al. 2006).

6.3. TRIM29

TRIM29 (Tripartite Motif Protein 29) ou ATDC (Ataxia Telangiectasia Group D Complementing gene) est codée par un gène localisé sur le locus 11q22-23. La complémentation de cellules issues de patients atteints d'Ataxia Telangiectasia par ce locus permet de résoudre le problème de la sensibilité accrue aux radiations ionisantes d'où son appellation originale d'ATDC (Lambert, Schultz et al. 1991) (Brzoska, Chen et al. 1995). En effet, dans les cellules normales, l'exposition aux radiations ionisantes induit une augmentation du niveau de la protéine p53. Cette induction est retardée dans les cellules de patients atteints d'AT. Par conséquent, les cellules AT ne bloquent pas leur cycle cellulaire et les mutations s'accumulent. La complémentation par TRIM29 restaure l'induction de p53, ce qui suggère un rôle de TRIM29 dans la détection des dommages à l'ADN et/ou dans la transduction du signal suite à ces dommages à l'ADN (Brzoska, Chen et al. 1995).

TRIM29 est une protéine de 65 kDa et fait partie de la famille des tripartites motifs protéines (TRIM) qui ont la particularité de posséder trois domaines de liaison au zinc, un RING (R), une B-box de type 1 (B1) et une B-box de type 2 (B2), qui sont suivis par une région super enroulée. Au total, cette famille compte 37 membres. Dans les cellules du placenta, de la prostate et du thymus, TRIM29 est localisée dans le cytoplasme et montre une structure en ruban suite à son homomultimérisation (Reymond, Meroni et al. 2001).

Notons que TRIM28 ou KAP-1 (KRAB Associated Protein) est connue pour être un co-répresseur universel de la transcription de gènes et s'associe physiquement aux membres de la famille des HP1 (Hétérochromatine Protein 1) qui participent au packaging de la chromatine. Pour que la cellule puisse réparer des dommages à l'ADN, il faut relaxer la chromatine au niveau de la mutation. Cette relaxation a lieu grâce à TRIM28 qui est activée suite à sa phosphorylation par ATM/ATR (Ziv, Bielopolski et al. 2006).

Il a été montré que TRIM29 est plus exprimée dans les kératinocytes par rapport à d'autres types cellulaires de la peau comme les fibroblastes, ce qui suggère un rôle spécifique chez les kératinocytes. Par ailleurs, dans les cellules A431 issues d'un carcinome, TRIM29 est constitutivement phosphorylée (Laderoute, Knapp et al. 1996). La capacité de TRIM29 à moduler la radiosensibilité cellulaire pourrait d'ailleurs être médiée par la voie de signalisation des PKC qui sont responsables de sa phosphorylation dans les cellules A431 (Laderoute, Knapp et al. 1996).

Le fait que TRIM29 ne soit pas exprimé dans les cellules de patients atteints d'Ataxia Telangiectasia résulterait d'un épissage alternatif de son ARN pré-messager (Tauchi, Green et al. 2000). En effet, la longueur de l'ARNm codant pour la protéine fonctionnelle est de 3,0 kb. Cet ARNm code normalement pour une protéine fonctionnelle de 65 kDa (Hosoi, Kapp et al. 2006). L'ARNm présent dans les cellules des patients atteints d'AT est long de 2,4 kb. Ce transcrit de 2,4 kb possède un codon stop situé 33 pb après la première méthionine, ce qui bloque la traduction après onze acides aminés. De ce fait, les cellules de patients atteints d'AT n'expriment aucune protéine TRIM29 fonctionnelle (Tauchi, Green et al. 2000) (Hosoi, Kapp et al. 2006).

7. But du Mémoire

L'objectif de ce projet est de caractériser une protéine impliquée dans la réponse à long terme des kératinocytes exposés à des doses répétées et sub-létales d'UVB selon un modèle mis au point au laboratoire sur une lignée de kératinocytes humains N-hTERT. Ce modèle est composé de huit expositions de 300 mJ/cm² d'UVB réparties en deux jours à raison de quatre stress par jour. Une étude protéomique a mis en évidence des différences d'abondance pour un certain nombre de protéines dans les cellules exposées aux UVB après 16 h, 40 h et 64 h de récupération après expositions aux UVB.

Parmi ces protéines, l'induction de la protéine TRIM29 chez les cellules exposées aux UVB a retenu notre attention par son originalité et par son rôle potentiel dans une réponse spécifique des kératinocytes contre les UVB. C'est pourquoi dans ce mémoire, nous avons entamé une étude fonctionnelle de cette protéine. Il s'agira de caractériser le profil d'abondance et l'effet d'une invalidation de l'expression de TRIM29 dans le modèle d'expositions répétées aux UVB et de mettre en évidence des protéines interagissant avec TRIM29 (**Figure 14**).

Afin d'étudier le profil d'abondance de TRIM29, nous effectuerons des extractions protéiques à différents temps pendant la récupération des cellules et réaliserons des analyses par Western blot. De plus, nous réaliserons des extractions d'ARN à différent moment de la phase de récupération et analyserons par RT-PCR en temps réel l'abondance de TRIM29. À partir des résultats obtenus, nous déciderons du temps de récupération adéquat pour extraire les protéines en vue d'une étude par co-immunoprécipitation de TRIM29 avec ATM/ATR et/ou p53. En effet, dans la littérature, il est spécifié que la complémentation de cellules issues de patients atteint d'AT par TRIM29 permet de restaurer l'induction de p53 dans ces cellules (Brzoska, Chen et al. 1995), ce qui laisse supposer un rôle de TRIM29 dans la voie de signalisation suivant la détection de dommages à l'ADN. Au moins deux hypothèses sont alors possibles. Soit TRIM29 interagit avec ATM/ATR au niveau de la détection des dommages. Dans ce cas, il serait envisageable que TRIM29 soit phosphorylée par ATM/ATR comme cela a été montré avec la protéine TRIM28. Soit TRIM29 agit plus en aval et pourrait intervenir dans l'arrêt du cycle cellulaire déclenché par p53. Des essais de co-immunoprécipitations permettront de déterminer si TRIM29 interagit directement avec p53 et/ou ATM/ATR.

L'effet de l'invalidation de TRIM29 sera étudié par une transfection stable des cellules avec un plasmide codant pour un shRNA qui interfère avec les ARMm de TRIM29 et donc bloquera l'expression de la protéine. Ces cellules invalidant l'expression de TRIM29 seront alors soumises aux expositions aux UVB selon le modèle décrit précédemment et nous étudierons différents points tels que l'effet sur l'induction de p53, de l'arrêt du cycle cellulaire, de l'arrêt de prolifération, de l'apoptose et des différents marqueurs caractéristiques du modèle tels que p21^{WAF-1} et l'involucrine.

1. Conditions de culture des Kératinocytes N-hTERT

1.1. Principe

Les cellules N-hTERT sont incubées à 37°C en présence de 5% de CO₂ et en atmosphère humide (*Incubateur Heraeus Hera Cell 240 Qlab*). Pour éviter la contamination des cultures par des bactéries ou des champignons qui modifieraient le comportement des cellules, toutes les manipulations des cultures doivent être réalisées de manière stérile, sous hotte à flux laminaire (*Esco class II Biohazard Safety Cabinet Aistream*).

Les kératinocytes N-hTERT sont des kératinocytes humains immortalisés par expression ectopique de la sous-unité catalytique de la télomérase. De plus, la disparition de l'expression de la protéine p16^{INK4a} a ensuite été observée dans ces cellules immortalisées (Dickson, Hahn et al. 2000).

1.2. Matériels et solutions

Voir **Tableau 1**

1.3. Méthodes d'ensemencement

Les kératinocytes N-hTERT sont cultivés dans des boîtes de culture stériles de 75 cm₂ (T75) ou de 25 cm₂ (T25) et dans du milieu Epilife (Cascade Biologics) sans sérum, auquel est ajouté un supplément de facteurs de croissance HKGS (5 ml pour 500 ml d'Epilife, Cascade Biologics) et 250 µl de gentamycine (175 µg/ml), un antibiotique. Le milieu est renouvelé tous les deux jours.

Les cellules N-hTERT doivent être repiquées lorsqu'elles arrivent à une densité cellulaire proche de la confluence, mais sans l'atteindre, sous peine d'initier leur différenciation. Pour le repiquage, les cellules sont d'abord rincées avec 3 ml de Trypsine EDTA qui sont ensuite éliminés et remplacés par 2 ml que nous laissons agir pendant 5 à 10 minutes à température ambiante pour permettre le détachement des cellules. La trypsine est ensuite neutralisée avec 10 ml de milieu DMEM contenant 10% de sérum de veau fœtal (FBS). Les cellules en suspension sont alors récoltées dans un tube stérile sur glace et centrifugées à 1.000 rpm pendant 5 min à 4°C afin d'éviter leur différenciation (*Centri Heraeus instruments fonction line labofuge 400R*). Le surnageant est éliminé tandis que le culot cellulaire est resuspendu dans 8 ml d'Epilife. La concentration en cellules de la suspension est estimée à l'aide d'une chambre de Neubauer. Ce comptage permet de calculer le volume correspondant à un nombre précis de cellules qui sera ajouté à 4 ml ou 10 ml d'Epilife par T25 ou T75. Les boîtes sont délicatement mélangées pour permettre une distribution homogène des cellules avant d'être déposées dans l'incubateur à 37°C.

1.4. Méthode de congélation

Premièrement, deux milieux sont à préparer. Le premier est composé de DMEM contenant 40 % de FBS et le second, de DMEM contenant 20 % de DMSO. Après la trypsinisation des cellules et la centrifugation, les cellules sont resuspendues dans le premier milieu (DMEM supplémenté de 40% de FBS). 600 µl de cette suspension cellulaire sont alors transférés dans un tube de cryocongélation auxquels est ajouté au dernier moment un même volume du milieu DMEM contenant le DMSO. Au final, les cellules sont donc congelées dans un milieu contenant 20 % de FBS et 10 % de DMSO. Les tubes de cryocongélation sont ensuite placés dans un récipient rempli d'alcool à - 80°C pour 48 h. Finalement, les tubes sont déposés dans la cuve d'azote liquide.

1.5. Méthode de décongélation

Préalablement, il faut préparer une T75 contenant 10 ml d'Epilife et un bécher contenant de l'eau à 37°C. Le tube de cryocongélation est directement transféré de l'azote liquide dans l'eau à 37°C. Une fois que la suspension cellulaire est décongelée, celle-ci est transférée dans la T75. La boîte est légèrement agitée pour une répartition homogène des cellules et placée dans l'étuve à 37°C en présence de 5% de CO₂ et en atmosphère humide (*Incubateur Heraeus Hera Cell 240 Qlab*).

Le milieu est changé dès le lendemain car le DMSO, présent dans le milieu de congélation, est toxique pour les cellules et doit impérativement être éliminé.

2. Stress répétés sub-létaux aux UVB

2.1. Principe

De nombreuses études sur l'effet des UVB ont déjà été réalisées mais toujours avec une seule exposition des cellules aux UVB. Il est donc intéressant de voir l'effet à long terme de stress répétés sub-létaux. C'est ce qui est réalisé ici. L'ensemble des expositions successives aux UVB qui sont effectuées, est également sub-létal puisqu'il ne doit pas causer la mort des cellules.

2.2. Matériel et solutions

Voir **Tableau 2**

2.3. Méthode

L'ensemencement des cellules N-hTERT est réalisé deux jours avant le premier stress à raison de 2000 cellules/cm². Après ces deux jours, les cellules vont être exposées aux UVB quatre fois par jour avec une exposition toutes les deux heures et cela pendant deux jours. Après ces huit expositions, les cellules récupèrent pendant différentes périodes jusqu'à deux jours après la dernière exposition (**Figure 1**).

Pour chaque exposition aux UVB, le milieu est décanté et les boîtes sont rincées avec 4 ml ou 10 ml de PBS stérile pour les T25 ou T75 respectivement. Pour l'exposition en elle-même, 4 ml ou 10 ml de PBS stérile sont répartis sur l'ensemble de la surface des boîtes. Les cellules sont alors exposées à une dose d'UVB de 300 mJ/cm². Seulement deux boîtes peuvent être traitées à la fois et sont placées de part et d'autre d'une boîte témoin contenant un capteur. Celui-ci est relié à un radiomètre qui permet de mesurer la dose d'UVB que les cellules reçoivent à l'intérieur de la boîte. Les cellules dites « contrôles » sont traitées exactement de la même manière mais ne sont pas exposées aux UVB.

Une fois la dose de 300 mJ/cm² atteinte, le PBS est éliminé et remplacé par 4 ml ou 10 ml d'Epilife en fonction du type de boîtes. Les cellules sont ensuite incubées à 37°C en présence de 5% de CO₂ jusqu'au stress suivant, soit une période de récupération de 2 h 30 min entre chaque exposition aux UVB. Après le dernier stress, il faut remettre 5 ml ou 12 ml d'Epilife dans les boîtes pour les deux jours de récupération.

3. Extractions Protéiques

3.1. Principe

L'extraction protéique est réalisée avec un tampon de lyse qui en cassant les cellules, va permettre de récupérer leur contenu.

3.2. Matériel et solutions

Voir **Tableau 3**

3.3. Méthode

Toutes les étapes de l'extraction protéique se font à 4°C pour empêcher l'activité des protéases et autres enzymes. Tout d'abord, les boîtes sont rincées avec 4 ml ou 10 ml de PBS à 4°C. Celui-ci est ensuite bien aspiré et le tampon de lyse (100 µl) est ajouté directement sur les cellules. Afin de les récupérer, le fond de la boîte est raclé à l'aide d'un râteau stérile. Lorsque toutes les cellules semblent raclées, la solution est récupérée dans un microtube. Pour améliorer l'extraction protéique, les microtubes sont placés sur agitateur à froid pendant 20 min à 1.000 rpm. Ils sont ensuite centrifugés à 13.000 rpm, à 4°C pendant 15 min. Le surnageant est alors récupéré et congelé à -20°C.

4. Dosage protéique par la méthode du Bradford

4.1. Principe

Pour prélever une quantité égale de protéines dans chaque échantillon, il est nécessaire de connaître la concentration en protéines de ces échantillons.

4.2. Matériel et solutions

Voir **Tableau 4**

4.3. Méthode

Pour chaque échantillon, le dosage est réalisé en double. 1 ml de solution de Bradford, diluée 5 fois et filtrée, est préparé dans un tube. 2,5 µl d'échantillon sont ensuite ajoutés dans le tube. La réaction colorimétrique étant optimale après 5 min, la mesure d'absorbance est réalisée 5 min après l'ajout de l'échantillon dans le réactif de Bradford. Cette mesure est réalisée à 595 nm par un spectrophotomètre. Pour cela, la solution est transférée dans une cuvette de spectrométrie qui est rincée une fois à l'acétone et deux fois à l'eau distillée entre chaque mesure.

L'étalon utilisé consiste en 2,5 µl de BSA (Bovine Serum Albumine 2 mg/ml). Le blanc pour l'étalon correspond à 2,5 µl d'eau distillée puisque la BSA est diluée dans de l'eau distillée tandis que pour les échantillons, il s'agit de 2,5 µl de tampon de lyse.

Les concentrations en protéines des échantillons sont calculées de la manière suivante :

$$\frac{((\text{Moyenne éch} - \text{Moyenne Blanc}) / (\text{Moyenne Etalon} - \text{Moyenne eau})) \times (\text{Cc Etalon} \times \mu\text{l Etalon})}{\mu\text{l échantillons}} = \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

5. Western blot

5.1. Principe

Des extraits protéiques sont chargés sur un gel de polyacrylamide en présence de SDS (Sodium Dodécyl Sulfate), un détergent qui dénature les protéines et leur confère une charge négative. Sous l'influence d'un courant électrique, les protéines migrent dans le gel vers l'anode et sont ainsi séparées uniquement en fonction de leur poids moléculaire.

Un marqueur de poids moléculaires, composé de différentes protéines de poids moléculaire connu, est placé dans un puits en parallèle ce qui permet de situer la protéine d'intérêt.

Après la migration, les protéines sont transférées du gel sur une membrane de polyvinylidène difluorure (PVDF) qui est ensuite saturée avec une solution contenant du lait afin de limiter les liaisons aspécifiques des anticorps. Pour finir, la membrane est traitée d'abord avec un anticorps spécifique reconnaissant un épitope de la protéine d'intérêt (anticorps primaire) et ensuite avec un deuxième anticorps (anticorps secondaire) reconnaissant le fragment Fc des anticorps primaires. Cet anticorps secondaire est couplé à une peroxydase émettant de la lumière après son oxydation ce qui permet la révélation les bandes correspondant à la protéine d'intérêt.

5.2. Matériel et solutions

Voir **Tableau 5**

5.3. Electrophorèse

5.3.1. Préparation du gel de migration (Running Gel)

Le mélange correspondant au pourcentage adéquat en polyacrylamide est préparé dans un berlin dans les proportions indiquées dans le **Tableau 6**. Le mélange homogène est coulé entre les 2 plaques de verre du montage. La polymérisation du gel se fait pendant une heure à température ambiante et en recouvrant le gel d'une couche d'isobutanol saturé en eau afin d'obtenir une surface plane et d'éviter tout contact entre le gel et l'oxygène.

5.3.2. Préparation du gel de concentration (Stacking Gel)

Ce gel permet de concentrer les échantillons au fond des puits. Le mélange est préparé comme indiqué dans le **Tableau 6** et coulé au dessus du premier gel qui a été préalablement débarrassé de sa couche d'isobutanol et rincé une fois à l'eau. Dès que le gel est coulé, un peigne y est placé et la polymérisation dure à nouveau une heure.

5.3.3. Préparation et dépôt des échantillons

Le dosage protéique par la méthode de Bradford décrite précédemment permet de calculer le volume à charger dans les puits pour y mettre 20 µg de protéines pour chaque échantillon. Les échantillons sont décongelés et vortexés afin qu'ils soient homogènes. Le tampon de charge, à diluer 5 fois dans chacun des échantillons, est ajouté. Les échantillons sont ensuite chauffés à 100°C pendant 4 min puis, centrifugés à 13.000 rpm pendant 5 min à température ambiante avant d'être déposés dans les puits du gel de concentration. Dans un puits parallèle, 10 µl du marqueur de poids moléculaire coloré sont chargés.

5.3.4. Migration

La migration se fait dans du tampon d'électrophorèse (voir **Tableau 5**) sous l'influence d'un courant de 200 V pendant 1 h dans les cuves d'électrophorèse (Amersham, GE Healthcare).

5.4. Transfert sur membrane

5.4.1. Préparation de la membrane

Une membrane découpée à la dimension du gel est plongée pendant 1 min dans du méthanol, rincée à l'eau et incubée dans du tampon de transfert pendant 10 min au minimum.

5.4.2. Transfert

Il faut préalablement découper quatre morceaux de papier Wattmann ajustés aux dimensions de la membrane. Le montage du système de transfert s'effectue comme repris dans la **Figure 2**. Chaque couche doit être imbibée de tampon de transfert et il est important de réaliser ce montage en évitant les bulles.

Le transfert s'effectue avec un courant de 150 mA pendant 2h30 ou à 30 mA pendant toute la nuit.

5.5. Traitement de la membrane et détection en chémoluminescence

5.5.1. Saturation de la membrane

La membrane est immergée, pendant 2 h à température ambiante ou toute une nuit à 4°C, dans de l'agent bloquant (Amersham, GE Healthcare) dilué dans du TBS-Tween 1x (dilution 2%).

5.5.2. Traitement de la membrane : anticorps primaires et secondaires

La membrane est incubée dans une solution d'agent bloquant où l'anticorps primaire a été dilué en fonction de son affinité et de la quantité de protéines chargées et ce pendant 2 h sous agitation à température ambiante ou toute la nuit sous agitation à 4°C.

Suite à cette incubation, la membrane est lavée 3 fois pendant 15 min dans du TBS-Tween 1x. Elle est ensuite incubée en présence de l'anticorps secondaire également dilué dans la solution d'agent bloquant. Cette incubation dure de 45 min à 1h. Avant la révélation, 3 nouveaux lavages de la membrane dans du TBS-Tween 1x sont nécessaires pour éliminer l'excès d'anticorps.

La liste des anticorps primaires et secondaires utilisés durant ce mémoire est reprise dans le **Tableau 7**.

5.5.3. Révélation

Les réactifs ECL (Enhancing Chemo Luminescence) (Amersham, GE Healthcare), la solution A et la solution B, sont mélangés dans un rapport 1 : 1 juste avant l'utilisation. Ce mélange est déposé pendant 5 min sur la membrane. Celle-ci est alors égoutée et placée entre deux feuilles de papier transparent dans une cassette (Amersham).

Dans le noir, un film de radiographie est déposé sur le transparent. La durée d'exposition du film est variable pour chaque expérience en fonction de l'intensité du signal. Le film est ensuite immergé dans le révélateur jusqu'à l'apparition des bandes attendues, puis effectuée un court passage dans l'eau avant d'être immergé dans le fixateur pendant au moins 3 min. Le film est finalement rincé à l'eau de ville.

5.6. Cas particulier des gels Nu-PAGE

Les gels Nu-PAGE (Invitrogen) sont des gels précoulés. Pour leur utilisation, nous avons suivi le protocole indiqué par la firme.

5.7. Marquage des protéines par le « Krypton™ Protein Stain »

Le réactif « Krypton™ Protein Stain » (PIERCE) permet un marquage par fluorescence de toutes les protéines présentes dans un gel. Dans le cas de ce marquage, il n'y a donc pas de transfert sur membrane. Après la migration, le gel est récupéré et incubé dans différentes solutions qui vont permettre l'incorporation de la fluorescence dans les protéines.

Pour la préparation de ces solutions et le marquage en lui-même, nous avons suivi le protocole standard fourni par la firme (PIERCE).

6. Co-immunoprécipitation

6.1. Principe

Beaucoup d'associations entre protéines, existant dans une cellule, restent intactes si la cellule est lysée en conditions non dénaturantes. Si une protéine X est immunoprécipitée, alors la protéine Y, qui lui est associée de façon stable, peut-être également précipitée. Une co-immunoprécipitation permet donc de vérifier si il y a une interaction entre deux protéines. Pour ce faire, l'une des deux protéines est mise en présence d'un anticorps qui la reconnaît. Le complexe formé est précipité grâce à des billes recouvertes d'une matrice de sépharose portant des protéines A ou G qui reconnaissent les fragments Fc des anticorps utilisés pour cibler la protéine d'intérêt. Les billes sont insolubles et peuvent donc facilement être isolées de la solution par centrifugation. Si l'autre protéine qui nous intéresse interagit avec la première, elle pourra ensuite être détectée par Western blot.

6.2. Matériel et solutions

Voir **Tableau 8**

6.3. Méthode

Les extractions protéiques sont réalisées comme pour les extractions destinées aux Western blot (voir point 3). Seul le tampon de lyse change car pour une co-immunoprécipitation, le tampon doit permettre de conserver les interactions entre les protéines ce qui implique de ne pas les dénaturer.

Dans un premier temps, 150 µl d'extraits protéiques sont incubés en présence de 5 µg d'anticorps (voir **Tableau 9**) et soumis à une agitation sur roue pendant 2h à 4°C. Par échantillon, 50 µl de billes sont préparés (Protein A Sepharose 4 Fast Flow ou Protein G Sepharose 4 Fast flow, selon le type d'anticorps primaire, Amersham, GE Healthcare). Ces billes sont lavées trois fois dans le tampon de lyse utilisé pour l'extraction protéique. Entre chaque lavage, les billes sont centrifugées 30 secondes à 12.000 g à 4°C. Pour finir, les billes sont resuspendues dans un volume égal de tampon de lyse (billes à 50%).

Après les 2 h d'incubation en présence des anticorps, 90 µl de billes (à 50%) sont ajoutés pour chaque échantillon. À nouveau, les échantillons sont incubés à 4°C sur roue. Les échantillons sont ensuite lavés 3 fois avec 500 µl de tampon de lyse et une fois dans 600µl de tampon de lavage recommandé par la firme (50 mM Tris, pH 8). Après chaque lavage, les billes sont centrifugées pendant 30 secondes à 12.000g à 4°C. Le surnageant est éliminé et le culot de billes est resuspendu par le lavage suivant. Après le dernier lavage, le culot est resuspendu dans 30µl du tampon échantillon (réducteur) recommandé par la firme (1 % SDS, 100 mM DTT, 50 mM Tris, pH 7.5). Les échantillons sont alors chauffés à 95°C pendant

10 min puis centrifugés à 12.000 g pendant 30 secondes. À ce moment là, c'est le surnageant qui est récupéré et on lui ajoute le volume adéquat du tampon de charge classique ou du tampon de charge Nu-PAGE. Les échantillons sont prêts à être chargés dans le gel pour le Western blot.

7. Extraction d'ARN

7.1. Principe

L'extraction d'ARN demande un certains nombres de précautions. En effet, l'ARN étant très sensible aux ribonucléases de notre environnement qui le dégrade, il est nécessaire de travailler sur une zone où les ribonucléases sont absentes. Pour cela, nous portons des gants et le plan de travail, ainsi que tous les objets utilisés sont nettoyés avec du SDS 0,1 %.

7.2. Matériel et solutions

Voir **Tableau 10**

7.3. Méthode

7.3.1. Extraction de l'ARN total

Tout d'abord, le milieu de culture est décanté et les cellules sont rincées une fois dans 5 ou 10 ml de PBS à 4°C (selon la taille de la boîte de culture T25 ou T75). Ce PBS est ensuite décanté au maximum et la solution dénaturante est ajoutée à raison de 200 µl ou 600 µl (T25 ou T75). Le fond de la boîte est alors raclé avec un râteau stérile et le lysat est récupéré dans un microtube. 20 µl ou 60 µl d'acétate de sodium ainsi que 200 µl ou 600 µl de la phase organique du phénol/chloroforme/alcool isoamylique sont ajoutés dans le microtube qui est mélangé par 4 ou 5 inversions et ensuite vortexé pendant 10 secondes pour homogénéiser jusqu'à formation d'une solution blanchâtre.

Après une incubation de 15 min sur glace, le microtube est centrifugé à 12.000 rpm à 4°C pendant 20 min. Le chloroforme ajouté permet la séparation en trois phases non miscibles des différents constituants cellulaires en fonction de leur solubilité. La phase supérieure est la phase aqueuse qui contient l'ARN total. La phase inférieure constitue la phase organique et contient les acides nucléiques. L'interface blanche située entre ces deux phases contient les protéines.

7.3.2. Précipitation de l'ARN total

La phase supérieure est récupérée dans un nouveau microtube et un volume égal d'isopropanol lui est ajouté. Le microtube est incubé à -20°C pendant au moins 30 min. Après quoi, le microtube est centrifugé à 12.000 rpm à 4°C pendant 20 min.

7.3.3. Lavage et resuspension de l'ARN total

Le culot est resuspendu dans 1 ml d'éthanol 75 % et le microtube est à nouveau centrifugé à 12.000 rpm à 4°C pendant 15 min. Après cette centrifugation, le surnageant est éliminé et nous laissons sécher le culot à température ambiante pendant environ 15 min. Le culot contient l'ARN total et est resuspendu dans de l'eau sans ribonucléase.

7.3.4. Dosage de l'ARN total

Pour son dosage, l'ARN est dilué 50 fois. Le dosage se fait dans une cuvette de spectrophotomètre où les mesures se feront à 260 et 280 nm.

8. Transcription inverse

8.1. Principe

La transcription inverse génère des brins d'ADN complémentaire (ADNc) à partir de matrices d'ARN messagers (ARNm). Des amorces polyT s'hybrident sur les queues polyA des ARNm, ce qui permet la synthèse d'un brin d'ADNc à l'ARNm grâce à une transcriptase inverse.

8.2. Matériel et solutions

Voir **Tableau 11**

8.3. Méthode

À partir du dosage d'ARN réalisé précédemment, 2 µg d'ARN sont prélevés pour chaque échantillon et placés dans un nouveau microtube. À cet ARN, nous ajoutons le volume d'eau stérile nécessaire pour atteindre un volume final de 7,5 µl ainsi que 2 µl d'oligonucléotides dT (500 ng/µl). Le mélange est incubé 10 min à 70°C et est placé ensuite sur glace pendant 5 min.

Pendant ces temps d'incubation, le mix pour la transcription inverse est préparé à raison de 4 µl de Buffer RT 5×, 2 µl de DTT 0,1 M, 1 µl d'eau RNase-free, 1 µl de RNAsin (40U/µl) et 1 µl de dNTP mix pour chaque échantillon. 9 µl de ce mélange sont ajoutés à chaque échantillon qui sont ensuite incubés 5 min à température ambiante.

Ensuite, 1,5 µl d'enzyme SuperScript (200U/µl) sont déposés dans chaque microtube et ceux-ci sont incubés 1h30 à 42°C et ensuite 15 min à 70°C pour neutraliser la réaction. Finalement, 1µl de RNase H (2U/µl) est ajouté et les échantillons sont incubés 20 min à 37°C. L'ADNc ainsi obtenu est conservé à -20°C.

9. PCR en temps réel (RT-PCR)

9.1. Principe

La PCR ou réaction de polymérisation en chaîne en temps réel se base sur la technique classique de la PCR (Polymérisation Chain Reaction) et permet de mesurer l'amplification de l'ADN cycle après cycle. Cette amplification est visualisée par l'utilisation d'un fluorochrome, ici le SYBR Green. Ce fluorochrome, qui émet de la fluorescence à 520 nm, possède la propriété de s'intercaler dans le petit sillon de l'ADN double brin. La fluorescence émise par la sonde intercalée dans l'ADN est donc proportionnelle à la quantité d'ADN au départ.

Le cycle seuil (ou cycle threshold) peut être défini comme le premier cycle de PCR au cours duquel la fluorescence émise peut se distinguer du bruit de fond et correspond à la phase exponentielle de l'amplification. Le cycle seuil est inversement proportionnel à la quantité de matériel de départ, c'est-à-dire que au plus la quantité d'ADN de départ est élevée, au plus le cycle seuil est faible.

Pour déterminer l'abondance relative d'un ARNm, l'abondance cet ARNm est comparé à celle de l'ARNm de la GAPDH qui est ce qu'on appelle un « house keeping gene ». Les « house keeping gene » sont des gènes dont l'abondance en ARNm n'est pas modifiée entre différentes conditions, comme différents stress, auxquelles sont soumises les cellules.

À la suite de l'étape d'amplification, une étape de dissociation a lieu afin de s'assurer de la spécificité de cette amplification. Cette étape consiste à augmenter progressivement la température jusqu'à 95°C, ce qui mène à la dissociation des amplicons et donc une forte diminution de la fluorescence. Chaque gène étudié a une température de dissociation bien précise en fonction de la taille et de la composition de l'amplicon.

9.2. Matériel et solutions

Voir **Tableau 12**

9.3. Méthode

L'ADNc, obtenu grâce à la transcription inverse, est utilisé à une dilution de 100 fois et les amorces à une concentration de 3 µM. Pour une réaction, le mix suivant est préparé : 2,5 µl d'eau distillée, 2,5 µl d'amorces sens (3 µM), 2,5 µl d'amorces antisens (3 µM) et 12,5 µl de SYBR Green PCR Master Mix.

Dans une plaque de 96 puits, 20 µl du mélange sont distribués par puits et 5 µl d'ADNc dilué 100 fois ou 5 µl d'eau distillée (blanc) y sont ajoutés. La plaque est recouverte avec un autocollant adéquat puis centrifugée à 600 rpm pendant 1 minute.

Après cette centrifugation, la plaque est placée dans le 7900HT Fast Real-Time PCR system et les paramètres étudiés ainsi que la répartition des échantillons dans la plaque sont encodés. Le programme de PCR utilisé est le suivant : 2 minutes à 50°C, 10 min à 95°C et 40 fois un cycle de 15 secondes à 95°C suivi de 1 min à 60°C. La courbe de dissociation est réalisée par 15 secondes à 95°C et 15 min à 60°C.

10. Test de cytotoxicité : MTT

10.1. Principe

Le principe de ce test de cytotoxicité repose sur le fait que les cellules métaboliquement actives incorporent le MTT (Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-yl)-2,5-diphényltétrazolium) et le clivent en son dérivé formazan qui forme des cristaux de couleur mauve insolubles en milieu aqueux. La succinate déshydrogénase, une enzyme mitochondriale, est l'enzyme responsable de cette réaction.

En présence d'un traitement toxique, le nombre de cellules capables de réaliser cette réaction diminue. De ce fait, une corrélation peut être établie entre la viabilité cellulaire et la quantité de MTT réduit.

10.2. Matériel et solution

Voir **Tableau 13**

10.3. Méthode

Les cellules sont incubées en présence de la molécule à tester (les inhibiteurs) dans une plaque 24 puits pendant 24 heures.

Pour tester la viabilité cellulaire après 8 expositions aux UVB, les stress sont réalisés en T25. Après 16 h de récupération suivant la dernière exposition, le milieu est éliminé et les cellules sont incubées 2 h dans l'incubateur à 37°C dans la solution MTT concentrée à 1,25 mg/ml en final (4 ml/T25). La solution MTT est ensuite remplacée par la solution de lyse (4 ml/T25) qui permet la lyse des cellules et la solubilisation des cristaux de couleur mauve. Les boîtes sont placées en chambre chaude avec une légère agitation pendant 4 h avant de réaliser la lecture des résultats par spectrophotométrie à 570 nm. Pour cela, le lysat est prélevé

(3 fois 800 µl) et placé en plaque 12 puits. Un puits contenant 800 µl de solution de lyse est utilisé comme blanc.

11. Transformation bactérienne

11.1. Principe

La transformation bactérienne consiste à introduire un plasmide dans une bactérie pour que celle-ci l'amplifie. La sélection des bactéries possédant le plasmide se fait grâce à un antibiotique. En effet, un gène codant la résistance à cet antibiotique est présent dans le plasmide. Les bactéries qui ont incorporé le plasmide sont donc résistantes à l'antibiotique et se développent tandis que les bactéries initiales ne peuvent pas survivre en présence de l'antibiotique. Une fois les colonies de bactéries transformées obtenues, le plasmide est récupéré par « mini-prep » et la présence du plasmide est vérifiée par digestion. Finalement, le plasmide est amplifié à l'aide de plus grandes cultures bactériennes et purifié. La présence du plasmide est vérifiée une dernière fois à la fin de l'amplification par une digestion.

Nous avons utilisé cinq plasmides commerciaux (SuperArray) (**Figure 3**) : quatre codent pour une hairpin inhibitrice de l'ARNm de TRIM29 et le dernier est un contrôle négatif codant pour une hairpin ne s'appariant à aucun ARNm. Les plasmides utilisés possèdent une résistance à l'ampicilline, qui permettra de sélectionner les bactéries transformées et une résistance à la néomycine, qui permettra par la suite de sélectionner les cellules transfectées. Le plasmide de base possède également un site unique de restriction Pst I, mais lorsque l'insert codant l'hairpin est présent, un deuxième site est créé. De ce fait, une digestion enzymatique par Pst I permet d'obtenir deux fragments de taille bien précise.

11.2. Matériel et solution

Voir **Tableau 14**

11.3. Méthode

Dans un premier temps, toutes les solutions nécessaires à la transformation bactérienne sont préparées et autoclavées ainsi que les récipients à utiliser. Cependant, l'antibiotique, l'ampicilline, n'est ajouté aux solutions qu'après l'autoclave puisque l'ampicilline ne peut pas être exposée à de grandes températures sous peine d'être dénaturée.

11.3.1. Transformation bactérienne

La transformation des bactéries compétentes (E.Coli Sure) est réalisée par choc thermique. Pour chaque plasmide à amplifier, 2 µl d'ADN plasmidique sont ajoutés à 100 µl de bactéries E.Coli Sure. Cette solution est incubée 30 minutes sur glace, 45 secondes dans un bain à 42°C et à nouveau 2 minutes sur glace. Ensuite, 500 µl de milieu LB sont ajoutés à la solution qui est alors placée sous agitation à 37°C pendant 45 min. Pour finir, le tout est étalé sur un milieu agar solide contenant l'ampicilline (50 µg/ml). Les boîtes sont incubées dans une étuve à 37°C pendant toute la nuit.

11.3.2. Amplification

Pour chaque plasmide, une colonie bactérienne bien distincte des autres est sélectionnée, repiquée et incubée dans 5 ml de milieu LB contenant de l'ampicilline (50 µg/ml), sous agitation à 37°C pendant toute la journée.

11.3.3. Extraction d'ADN plasmidique (Miniprep)

À partir de la culture liquide, 1,4 ml est prélevé stérilement dans un microtube, le reste étant conservé à 4°C, et centrifugé pendant 5 min à 13.000 rpm. Le culot est récupéré et resuspendu dans 300 µl de « Cell Resuspension Solution » auquel on ajoute ensuite 300 µl de « Cell Lysis Solution ». La solution est mélangée par inversion et incubée à température ambiante pendant 3 min. Ensuite, on ajoute 500 µl de solution de neutralisation, on mélange par inversion et on incube sur glace pendant 15 min avant de centrifuger pendant 15 min à 13.000 rpm à 4°C. 700 µl de surnageant sont récupérés et 700 µl de phénol/chloroforme/isoamyl alcohol y sont ajoutés pour précipiter l'ADN. Le tout est homogénéisé et centrifugé 10 min à 13.000 rpm à température ambiante. 400 µl de la phase aqueuse sont récupérés, 800 µl d'éthanol 100% y sont ajoutés, le mélange est laissé 5 min à température ambiante et est ensuite centrifugé 10 min à 13.000 rpm à 4°C. Le culot est récupéré et lavé dans 300 µl d'éthanol 70% pour être ensuite centrifugé 10 min à 13.000 rpm à 4°C. L'éthanol est éliminé et le culot est laissé à température ambiante pour sécher. Le culot est resuspendu dans 20 µl d'eau distillée et incubé 1h à 37°C. Pour finir, les échantillons sont dilués pour le dosage au spectrophotomètre.

Un stock glycérol est réalisé à partir de la culture liquide qui a été conservée à 4°C. Pour cela, 983 µl de la culture sont prélevés dans un tube stérile auxquels est ajouté 517 µl de glycérol stérile car la concentration finale de glycérol doit être de 30 % et la concentration du stock de glycérol est de 87 %. Le tout est doucement vortexé et congelé directement à -80°C.

11.3.4. Maxiculture (Maxiprep)

À partir de la culture liquide qui a servi pour la miniprep, on prélève 1,5 ml qui seront transféré dans 150 ml de milieu LB + ampicilline (50 µg/ml). Le tout est incubé toute la nuit sous agitation à 130 rpm à 37°C.

Après cette incubation, tout doit se faire à température ambiante. La première étape est une lyse cellulaire. La culture est centrifugée dans une bouteille de 250 ml 10 min à 10.000 g et le culot est resuspendu au vortex dans 6 ml de « Cell Resuspension Solution ». Une fois qu'il est bien resuspendu, 6 ml de « Cell Lysis Solution » sont ajoutés, ensuite, on ajoute 10 ml de « Neutralisation Solution », on mélange par inversion et le tout est incubé 3 min puis centrifugé 30 min à 14.000 g. Le surnageant est alors déposé sur la colonne et le vide est appliqué jusqu'à ce que tout soit passé. Pour les lavages, 5 ml d'« Endotoxin Removal Wash » sont d'abord ajoutés et on refait le vide. Quand tout est passé à travers la colonne, on fait passer 20 ml de « Colonne Wash Solution » contenant de l'éthanol qui permet de précipiter l'ADN et la membrane est ensuite séchée sous vide pendant 30 à 60 secondes. Pour éluer l'ADN plasmidique, la colonne est placée dans un tube de 50 ml et 600 à 800 µl d'eau stérile y sont ajoutés. Le tube est centrifugé 5 min à 1.500 g et le filtrat est transféré stérilement dans un microtube stérile. Les échantillons sont ensuite dosés à des dilutions de 35 fois dans de l'eau distillée.

Une fois les échantillons dosés, ils sont dilués dans de l'eau stérile afin d'obtenir tous les échantillons à une concentration de 500 ng/µl d'ADN plasmidique.

11.3.5. Digestion enzymatique

La digestion enzymatique permet de vérifier que le plasmide récupéré correspond bien à celui que l'on désirait amplifier. Dans le cas présent, nous avons utilisé l'enzyme de restriction Pst I comme il était recommandé par la firme qui a délivré les plasmides. Pour chaque échantillon, le mix suivant est préparé : 2 µl de Buffer H (Promega) et 0,2 µl de acetylated BSA 10 µg/µl (Promega). Les échantillons (500 ng/µl) sont dilués dans de l'eau stérile à raison de 1 µl (500 ng) dans 16,3 µl d'eau. On ajoute ensuite 2,2 µl de mix par échantillon et pour finir, 0,5 µl d'enzyme de restriction Pst I (10 U/µl, Promega) qui doit

impérativement être ajoutée en dernier lieu. Après l'ajout de l'enzyme de restriction, les échantillons sont incubés 2 h à 37°C.

Il faut prévoir un contrôle négatif de restriction pour lequel 1 µl d'eau remplace l'échantillon. De plus, 1 µl (500 ng) d'échantillon non digéré, auquel l'enzyme de restriction n'a pas été ajouté, sera placé en parallèle sur le gel d'agarose.

Le gel d'agarose utilisé pour faire migrer les échantillons est composé de 0,8 g d'agarose dilué dans 100 ml de TBE. Pour une bonne dilution de l'agarose dans le TBE, la solution passe 2 min au micro-ondes. Une fois que la solution est bien translucide et refroidie, 15 µl de bromure d'éthidium y sont ajoutés et le gel peut être coulé. Il faut compter 1h pour qu'il soit polymérisé.

Après la digestion des échantillons à 37°C, 4 µl de bleu de charge sont ajoutés dans chaque échantillon. 5 à 10 µl d'étalon sont déposés dans le premier et le dernier puits du gel et 15 µl d'échantillon sont déposés dans les autres puits. Après 1h de migration à 100 volts, une photographie du gel est réalisée sous un éclairage aux UV qui permettent de voir le bromure d'éthidium qui s'est intercalé dans l'ADN.

12. Transfection stable des cellules N-hTERT

12.1. Principe

Le but d'une transfection stable est de faire entrer un plasmide dans les cellules jusque dans le noyau et qu'il s'intègre dans l'ADN cellulaire. Pour permettre son entrée dans la cellule, un agent transfectant est utilisé, ici le Fugène.

La sélection des cellules transfectées qui ont intégré le plasmide dans leur génome se fait après 48 h via la néomycine (G418) qui est placée dans le milieu de culture utilisé.

12.2. Matériel et solution

Voir **Tableau 15**

12.3. Méthode

Les cellules N-hTERT sont repiquées la veille en plaque 6 puits à une densité de 120.000 cellules par puits dans du milieu Epilife dépourvu d'antibiotique.

Dans un premier temps, le Fugène (Roche) est dilué à raison de 6 µl de Fugène dans 94 µl de milieu Epilife sans antibiotique pour chaque puits. Cette solution est incubée 5 min à température ambiante. Parallèlement, 4 µl d'ADN plasmidique (500 ng/µl) sont déposés dans 6 microtubes différents : les 4 plasmides codant l'hairpin dirigé contre l'ARNm de TRIM29, le plasmide « scramble » et le sixième étant pour un contrôle négatif contenant 4 µl d'eau stérile. 100 µl de la solution de Fugène dilué sont ajoutés dans chaque microtube et ceux-ci sont incubés 30 min à température ambiante pour permettre aux complexes ADN/lipides de se former.

Pendant ce temps, le milieu des puits est éliminé. Les cellules sont rincées une fois avec 2 ml de milieu Epilife sans antibiotique avant de placer 1,4 ml de milieu Epilife sans antibiotique auquel on ajoutera goutte à goutte les 100 µl du mélange Fugène-ADN. Les cellules sont incubées 5 h à 37°C après quoi le milieu de la transfection est remplacé par du milieu Epilife sans antibiotique.

Ce n'est que 48 h après la transfection que la néomycine est ajoutée dans le milieu (50 µg/ml) pour commencer la sélection des cellules. Ces cellules devront par la suite être continuellement cultivées dans du milieu contenant de la néomycine pour ne pas risquer qu'elles perdent le plasmide et qu'une cellule ne contenant plus l'hairpin prenne le dessus et s'amplifie.

13. Immunofluorescence

13.1. Principe

L'immunofluorescence est un marquage spécifique d'une protéine d'intérêt dans la cellule ce qui permet de visualiser sa localisation cellulaire. Deux anticorps sont utilisés. Tout d'abord l'anticorps primaire qui reconnaît la protéine d'intérêt et ensuite, l'anticorps secondaire couplé à un fluorochrome qui reconnaît l'anticorps primaire. Par la suite, il suffira donc d'exciter ce fluorochrome avec une longueur d'onde précise pour localiser la protéine cible au sein de la cellule. Généralement, lors d'une immunofluorescence, le noyau est également marqué avec un agent intercalant (To-PRO 3) afin de pouvoir localiser les cellules.

13.2. Matériel et solution

Voir **Tableau 16**

13.3. Méthode

Dans le cas présent, il s'agit de faire l'immunofluorescence sur des cellules exposées aux stress répétés et sub-létaux d'UVB. De ce fait, les cellules sont repiquées directement après le dernier stress à raison de 20.000 cellules par puits sur des lamelles en verre préalablement déposées dans une plaque 24 puits.

Après 16 h, le milieu des puits est décanté et les cellules sont fixées 10 min avec 1 ml de PBS-PFA 3 % à température ambiante. Après trois rinçages au PBS, les cellules sont perméabilisées avec 1 ml de PBS-Triton 1 % pendant 5 minutes. Les puits sont à nouveau rincés trois fois pendant 10 minutes avec du PBS-BSA 3 %. Pendant ce temps, une chambre humide est préparée en tapissant le fond d'une boîte de pétri en verre de papier Whatmann humidifié d'eau distillée et recouvert de parafilm. L'anticorps primaire est dilué 100 fois dans du PBS-BSA 3 % et une goutte de 40 µl est déposée sur le parafilm pour chaque couvre-objet. Chaque couvre-objet est alors récupéré au fond des puits à l'aide d'une pince, égoutté légèrement et retourné sur la goutte d'anticorps primaire. Les cellules ont été incubées toute une nuit à 4°C en présence de l'anticorps primaire. Un parafilm est placé autour de la boîte pour maintenir l'humidité de la chambre.

Lorsque cette incubation est terminée, les couvre-objets sont replacés dans leur plaque de 24 puits (en veillant à les retourner pour que les cellules se retrouvent au-dessus) et sont rincés trois fois avec du PBS-BSA 3 %. L'incubation avec l'anticorps secondaire est réalisée de la même façon que celle de l'anticorps primaire, les couvre-objets sont mis en présence de l'anticorps secondaire dilué 1000 fois dans du PBS-BSA 3 % dans une chambre humide et sont incubés pendant une heure à température ambiante et dans l'obscurité afin de préserver les fluorochromes.

Tous les couvre-objets sont replacés dans les puits toujours en veillant à les retourner. Trois rinçages au PBS-BSA 3 % et un dernier au PBS seul sont effectués avant de marquer les noyaux avec un agent intercalant dans l'ADN (To-PRO 3). Ce marquage est aussi réalisé de la même façon, c'est-à-dire en chambre humide, mais l'incubation dure 30 minutes et se fait dans l'obscurité en présence de To-PRO 3 dilué 80 fois dans une solution de RNase (2mg/ml PBS). Ce dernier marquage terminé, les couvre-objets sont remis dans les puits et sont rincés trois fois au PBS puis sont montés sur lames à l'aide de Mowiol préchauffé à 56°C. Les lames sont alors conservées à 4°C pendant au moins une nuit avant d'être observées au microscope confocal à fluorescence.

14. Incorporation de la thymidine tritiée

14.1. Principe

Afin de mesurer le taux de prolifération d'une culture cellulaire, de la thymidine tritiée ($[^3\text{H}]\text{-T}$) est ajoutée dans le milieu de culture de ces cellules. En effet, les cellules qui prolifèrent doivent dupliquer leur ADN et vont incorporer cette thymidine, ce qui ne sera pas le cas d'une culture où les cellules ont cessé de proliférer.

14.2. Matériel et solution

Voir **Tableau 17**

14.3. Méthode

Directement après la dernière exposition aux UVB, les cellules sont repiquées en plaque 24 puits à raison de 10.000 cellules par puits, dans du milieu Epilife. Pour chaque échantillon, le test est réalisé en triple à partir de 3 puits distincts.

48 h plus tard, le milieu de culture des cellules est remplacé par du nouveau milieu Epilife supplémenté de 1 $\mu\text{Ci/ml}$ de thymidine tritiée c'est-à-dire 1 μl $[^3\text{H}]\text{-T}/1$ ml de milieu. Les plaques 24 puits sont ensuite incubées 24 h à 37°C en présence de 5% de CO_2 et en atmosphère humide (*Incubateur Heraeus Hera Cell 240 Qlab*) afin de permettre l'incorporation de la $[^3\text{H}]\text{-T}$ chez les cellules qui prolifèrent.

Une fois cette incubation terminée, les cellules sont rincées 2 fois dans 1 ml de PBS, 1 fois dans 1 ml de TCA 10% qui aura préalablement été refroidi sur glace, 1 X dans 1 ml d'éthanol 70 % et 1 fois dans 1 ml de PBS. Suite à cette série de lavages, 250 μl de NaOH 0,5 M sont ajoutés sur les cellules pendant 30 minutes. La réaction est ensuite neutralisée au moyen de 250 μl d'Hcl 0,5 M. Après homogénéisation à la pipette Pasteur, 0,5 ml de lysat sont repris dans une fiole et nous y ajoutons 5 ml de Ultima Gold. La fiole est fortement agitée et est ensuite placée dans le compteur à scintillation.

Les blancs sont constitués d'un mélange de 250 μl de NaOH 0,5 M, de 250 μl d'Hcl 0,5 M et de 5 ml de Ultima Gold.

15. Dosage protéique par la méthode au Folin

15.1. Principe

Le dosage protéique par la méthode au Folin permet de quantifier la quantité de protéines dans chaque puits de culture cellulaire. Ce Folin qui est réalisé le jour de l'ajout de la $[^3\text{H}]\text{-T}$ dans le milieu de culture des cellules, est donc utilisé afin de normaliser les valeurs obtenues pour l'incorporation de la thymidine tritiée par rapport à la quantité de protéines cellulaires qui est un bon indicateur de la densité cellulaire des puits correspondant.

15.2. Matériel et solution

Voir **Tableau 18**

15.3. Méthode

Lors du repiquage destin au test d'incorporation de la $[^3\text{H}]\text{-T}$, les mêmes suspensions de cellules sont également repiquées en plaque 12 puits à raison de 25.000 cellules par puits.

Après 48 h, le milieu de culture est éliminé et les cellules sont alors rincées 1 fois dans 1 ml de PBS qui sera ensuite remplacé par 1 ml de NaOH 0,5 N. Après 30 minutes d'incubation à température ambiante, la solution est homogénéisée à la pipette Pasteur et

II. Matériel & Méthodes

2 fois 400 μl du lysat sont prélevés et placés dans 2 tubes de 4 ml. La mesure est donc réalisée en double.

Dans chaque tube, 2 ml de solution A sont ajoutés de 30 secondes en 30 secondes. Après 15 minutes, 200 μl de la solution de Folin sont également ajoutés de 30 secondes en 30 secondes. Les tubes sont vortexés pendant 5 à 10 secondes et incubés à température ambiante pendant 30 minutes.

Des échantillons d'étalons protéiques sont utilisés afin de réaliser une courbe standard permettant de quantifier les protéines. Ces étalons sont préparés à partir d'une solution composée de 100 μl de BSA (2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). À partir de cette solution stock, différentes dilution sont réalisées afin d'obtenir des étalons concentrés à 200, 100 et 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ dans du NaOH 0,5 N en final. Les blancs sont composés de 400 μl de NaOH 0,5 N. Tous les étalons sont analysés en parallèle des échantillons.

La lecture des résultats se fait au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 740 nm et se réalise également de 30 secondes en 30 secondes entre chaque échantillon.

1. Introduction

Un modèle d'expositions répétées et sub-létales des kératinocytes N-hTERT aux UVB a été mis au point par Véronique Vallery. Ce modèle consiste en huit expositions des kératinocytes N-hTERT à une dose d'UVB de 300 mJ/cm₂ à raison de quatre expositions par jour pendant deux jours. Des cellules contrôles sont traitées en parallèle des cellules exposées aux UVB, mais sans exposition aux UVB (**Figure 1**).

Une augmentation d'abondance de l'ARNm de l'involucrine, un marqueur tardif de la différenciation des kératinocytes et de p21^{WAF-1}, un marqueur de l'arrêt du cycle cellulaire, a été observée par V. Vallery dans ce modèle, ce que nous avons confirmé dans ce mémoire (**Figure 2**). En effet, ces abondances relatives en ARNm augmentent après 64 h de récupération des kératinocytes N-hTERT exposés aux UVB.

Les kératinocytes exposés aux UVB présentent aussi une forte baisse de prolifération qui est observée dès 16 heures après la dernière exposition aux UVB. De plus, les kératinocytes exposés aux UVB présentent une morphologie étalée à partir de 40 h après les expositions aux UVB (**Figure 3**).

Dans ce mémoire nous nous sommes intéressés à la protéine TRIM29 qui a été mise en évidence par une étude protéomique réalisée sur le modèle d'expositions répétées et sub-létales aux UVB. Cette protéine a retenu notre attention car elle pourrait intervenir dans la détection des dommages à l'ADN ou dans une voie de signalisation en aval (Brzoska, Chen et al. 1995). Dans un premier temps, nous étudierons son profil d'abondance protéique au cours des 64 h suivant les expositions aux UVB et nous suivrons également le profil d'abondance au niveau de son ARNm. Dans un deuxième temps, nous tenterons de déterminer le rôle de TRIM29 dans la voie de signalisation d'ATM/ATR et p53 en réponse aux UVB par des essais de co-immunoprécipitations avec ces acteurs. Nous tenterons de vérifier par immunofluorescence les interactions protéiques observées. Troisièmement, nous créerons des mutants stables dans lesquels l'expression de TRIM29 sera invalidée par transfection stable des kératinocytes N-hTERT par des plasmides codant un shRNA (short hairpin RNA) dirigé contre l'ARNm de TRIM29. Enfin, nous étudierons si cette invalidation provoque des modifications de la réponse des cellules N-hTERT exposées aux UVB. Plus particulièrement, nous étudierons l'effet sur leur capacité de prolifération, sur l'induction éventuelle de l'apoptose et sur l'augmentation d'abondance protéique de p53.

2. Profil d'abondance de TRIM29 suite à l'exposition des kératinocytes à des doses répétées et sub-létales d'UVB

2.1. Profil d'abondance de TRIM29 au niveau protéique

Lors de l'étude protéomique par gels bidimensionnels (gel 2D) réalisée par V. Vallery, trois spots alignés présentant une augmentation d'abondance protéique de 1,9 fois dans les kératinocytes exposés aux UVB après 16 heures de récupération, ont été mis en évidence et identifiés comme étant la protéine TRIM29.

Nous avons réalisé des triplicats d'extractions protéiques avec le tampon DLA, qui a été utilisé pour les gels 2D, à 4 h, 16 h, 40 h et 64 h après la dernière exposition aux UVB (**Figure 4**), afin de réaliser des Western blots pour estimer l'abondance relative de TRIM29.

Une augmentation de l'abondance protéique de TRIM29 est observée dans les cellules à 4 h, 16 h et 40 h après les expositions aux UVB. Cette augmentation est beaucoup plus faible à 64 h après exposition aux UVB.

Une autre observation importante fournie par ce Western blot est la présence d'une double bande pour TRIM29. Cette double bande est compatible avec l'hypothèse d'une modification post-traductionnelle de TRIM29, comme une phosphorylation, ce qui pourrait aussi expliquer que TRIM29 avait été identifiée dans une série de 3 spots alignés sur les gels 2D de l'étude protéomique.

2.2. Abondance relative en ARNm de TRIM29

Dans le but de déterminer si l'augmentation au niveau protéique de l'abondance de TRIM29 est corrélée à une augmentation relative de l'abondance de l'ARNm, des extractions d'ARN ont été réalisées à 4 h, 16 h et 64 h après la dernière exposition aux UVB (**Figure 5**).

Quand nous comparons l'abondance relative en ARNm de TRIM29 entre les kératinocytes exposés aux UVB et les kératinocytes contrôles, nous observons une augmentation aux deux premiers temps étudiés : à 4 h après le dernier stress, le niveau relatif d'expression en ARNm de TRIM29 augmente de 1,5 fois par rapport aux cellules contrôles et à 16 h, cette augmentation est de 2,5 fois. Par contre, l'abondance de l'ARNm de TRIM29 est quasi équivalente chez les cellules exposées aux UVB ou non, à 64 h après la dernière exposition.

Ces résultats concordent non seulement avec les Western blots mais également avec les résultats obtenus par l'étude protéomique qui avait mis en évidence une augmentation de l'abondance de TRIM29 de l'ordre de 1,9 fois après 16 h de récupération.

2.3. Discussion

L'augmentation d'abondance de TRIM29 chez les cellules exposées aux UVB mise en évidence par l'étude protéomique a donc été confirmée au niveau protéique par Western blot et au niveau de l'ARNm par PCR en temps réel.

Bien que des mécanismes complexes peuvent intervenir entre la transcription d'un gène et l'abondance protéique du produit de ce gène, nous observons également une bonne concordance entre les abondances relatives en ARNm et en protéine de TRIM29.

III. Résultats et Discussion

Par la suite, nous avons donc choisi d'effectuer les expériences de co-immunoprécipitations et de détection par immunofluorescence, à 16 h après la dernière exposition aux UVB puisque c'est à ce temps que la différence d'abondance protéique de TRIM29 est la plus marquée, ce qui nous permettra sans doute d'être au maximum dans l'action de TRIM29.

3. Co-immunoprécipitation de TRIM29

3.1. Mise au point

3.1.1. Vérification de l'extraction de TRIM29 par les différents tampons de lyse

La co-immunoprécipitation demande l'utilisation de tampons de lyse particuliers étant donné que les autres tampons habituellement utilisés, comme le tampon DLA, sont trop forts pour permettre de maintenir les interactions protéiques. Nous avons testé trois tampons de lyse (IP1, IP2 et IP4) dont la composition est donnée dans le « matériel et méthodes ». Les différences les plus importantes entre ces tampons concernent principalement le pH, la nature du détergent et sa concentration. Le triton et le NP-40 sont les deux détergents les plus classiquement utilisés dans les expériences d'immunoprécipitation. Le tampon IP1 est à pH 8 et l'agent détergent utilisé est le NP-40 à 0,5 %. Le tampon IP2 est à un pH de 7,5 avec 1 % de triton X-100 et enfin, le tampon IP4, à pH 7,5, contient 1 % de NP-40.

Nous avons d'abord vérifié par Western blot que ces tampons permettaient bien d'extraire la protéine TRIM29. Pour ce faire, des extractions protéiques ont été réalisées sur des kératinocytes N-hTERT en condition normale. Un échantillon protéique venant de kératinocytes exposés aux UVB et extrait avec du tampon DLA 16 h après le dernier stress (UVB 16 h) a été utilisé comme contrôle positif à titre de comparaison (**Figure 6**).

Nous observons que la protéine TRIM29 a été extraite avec ces trois tampons. Dans le cas des tampons IP2 et IP4, nous observons toujours la double bande observée à la figure 4 après lyse cellulaire avec le tampon DLA.

À partir de ces résultats, nous avons choisi d'utiliser les tampon IP1 ou IP4 pour la suite.

3.1.2. Premier essai d'immunoprécipitation de TRIM29

Avant d'essayer de co-immunoprécipiter TRIM29 avec p53 ou avec ATM/ATR, nous avons d'abord vérifié que notre protocole expérimental permettait bien de précipiter TRIM29. Le premier essai a été réalisé avec le tampon de lyse IP4.

Nous disposons de deux anticorps anti-TRIM29 différents, produits soit par la firme Imgenex soit par la firme Santa Cruz. Chaque anticorps reconnaît une extrémité différente de la protéine et nécessite des billes différentes pour la précipitation. Pour information, l'anticorps Imgenex est un anticorps polyclonal de lapin qui nécessite les billes coatés avec des protéines A tandis que l'anticorps polyclonal de chèvre Santa Cruz nécessite celles coatés avec des protéines G. Nous avons donc testé la précipitation dans les deux sens : un des deux anticorps pour immunoprécipiter et l'autre pour révéler le Western blot et *vice versa*. Durant ce premier essai, aucune précipitation n'a été observée lors de la révélation par Western blot (données non montrées).

3.1.3. Deuxième essai d'immunoprécipitation de TRIM29

Afin de tenter de remédier aux problèmes rencontrés lors du premier essai, nous avons augmenté la quantité de départ en protéines et d'anticorps pour la précipitation. Nous avons aussi testé les tampons IP1 et IP4. Nous avons utilisé les tampons de lavage et de charge recommandés par le fournisseur des billes. Puis nous avons testé la précipitation avec les deux anticorps dirigés contre TRIM29.

Dans un premier temps, nous avons réalisé une coloration du gel au « Krypton Protein Stain » pour marquer par fluorescence l'ensemble des protéines présentes dans le gel après immunoprécipitation ou non (**Figure 7**). Cette expérience nous a permis de vérifier la première étape de la précipitation de TRIM29 indépendamment de toute la procédure de Western blot et de révélation par le deuxième anticorps. Dans les lysats totaux, nous observons un très grand nombre de bandes protéiques, que ce soit avec le tampon IP1 ou IP4. En ce qui concerne les échantillons précipités, les bandes sont beaucoup moins nombreuses. Que la précipitation ait été réalisée avec l'anticorps Imgenex ou Santa Cruz et avec le tampon IP4 ou IP1, deux bandes apparaissent aux poids moléculaires (PM) de TRIM29. Une bande d'intensité plus importante est également apparue et correspond probablement aux chaînes lourdes des IgG des anticorps utilisés pour la précipitation qui ont un PM de 55 kDa.

Nous avons également réalisé un Western blot pour vérifier s'il s'agit réellement de TRIM29. Les échantillons qui correspondent aux lysats totaux étaient utilisés comme contrôle positif et montraient chacun une belle bande correspondant à TRIM29. Par contre, les bandes correspondantes à TRIM29 dans les échantillons immunoprécipités étaient très faibles et très irrégulières (données non montrées).

3.1.4. Troisième essai d'immunoprécipitation de TRIM29

Forts de deux essais infructueux, nous avons à nouveau utilisé les deux anticorps commerciaux et le tampon IP4. De plus, un tampon de lyse supplémentaire IP5 constitué de 25 mM de Tris HCl pH 8, de 100 mM de NaCl et de 0,5 % de NP-40 a été testé. La principale différence entre IP4 et IP5 est que IP5 contient moins de sels. Ceci permet de diminuer la stringence lors des premiers lavages. De plus, nous avons testé l'efficacité de la précipitation lorsque l'anticorps est incubé au contact du lysat toute une nuit ou seulement pendant 2 h. Enfin, juste avant le chargement des échantillons dans le gel, nous avons ajouté à ceux-ci du tampon de charge classique (Tampon 5x ou Tampon Nu-PAGE) afin de les alourdir et permettre leur chargement dans les puits.

Le Western blot réalisé montre un enrichissement en TRIM29 des échantillons précipités par rapport aux échantillons correspondants aux lysats totaux et ce en utilisant les deux anticorps commerciaux (**Figure 8**). De plus cet enrichissement est comparable quelque soit le tampon utilisé et dans le cas des échantillons extraits avec le tampon IP4, quelque soit le temps d'incubation des anticorps avec le lysat total.

À partir de ces résultats, nous avons pu déterminer un protocole optimal pour nos co-immunoprécipitations. Nous avons finalement choisi le tampon de lyse IP5. En effet, celui-ci fonctionne aussi bien que le tampon IP4 (**Figure 8**) mais a l'avantage de contenir moins de détergent (0,5 % de NP-40). Le tampon IP5 est donc moins susceptible de rompre les interactions fragiles entre protéines. Bien que nous n'ayons pas décelé de différences entre les deux anticorps contre TRIM29, nous avons choisi celui provenant de la firme Imgenex car nous l'avons déjà utilisé avec succès pour les Western blots (**Figure 4**). Enfin, nous avons décidé que cet anticorps sera incubé avec le lysat total pendant 2 h avant l'ajout des billes et non pendant une nuit. En effet, ces deux temps d'incubation donnent une immunoprécipitation fort similaire mais l'incubation de 2 h diminue le risque de dégradation des protéines.

3.2. Co-immunoprécipitation de TRIM29 avec ATM/ATR

Dans son travail de thèse, V. Vallery a montré une augmentation des DCP dans l'ADN de kératinocytes N-hTERT exposés huit fois à une dose sub-létales d'UVB. Généralement, suite à la génération et la détection de dommages à l'ADN, les protéines ATM et ATR sont activées et orchestrent la réponse cellulaire menant à la réparation de ces dommages et à l'arrêt du cycle cellulaire, notamment par activation de p53 (**Figure 9**). Un des objectifs de ce mémoire était d'essayer de déterminer le rôle éventuel de TRIM29 dans la voie de signalisation classiquement activée suite à des dommages à l'ADN, dans ce modèle d'exposition aux UVB.

Afin de déterminer si il y a interaction entre TRIM29 et ATM ou ATR après des expositions répétées et sub-létales aux UVB, des extraits protéiques ont été réalisés avec le tampon IP5, à 16 h après la dernière exposition aux UVB, ce qui correspond à l'augmentation maximale de TRIM29 observée précédemment. Les extraits protéiques venant de cellules « contrôles » et de cellules exposées aux UVB, ont été incubés pendant 2 h en présence de l'anticorps anti-TRIM29 et 2 h en présence des billes coatées avec des protéines A. De plus, des protéines de kératinocytes ont été extraites et incubées 2 h en présence des billes mais sans anticorps. Ce contrôle négatif (CTL -) permet de vérifier que les billes ne fixent pas des protéines de manière non spécifique. Les lysats totaux ont également été chargés en parallèle sur le gel.

La protéine TRIM29 a bien été précipitée et nous pouvons même confirmer l'augmentation de son abondance protéique dans l'échantillon précipité correspondant aux cellules stressées aux UVB (**Figure 10**). Les protéines ATM et ATR sont bien présentes dans les lysats totaux venant des cultures exposées aux UVB (UVB) ou dans les cellules contrôles (CTL) mais pas dans les échantillons précipités. Nous n'observons donc pas d'interaction entre les protéines TRIM29 et ATM ou ATR (**Figure 10**).

3.3. Co-immunoprécipitations de TRIM29 avec p53

D'un autre côté, nous avons tenté de déterminer si il y a interaction entre les protéines TRIM29 et p53, ce qui situerait TRIM29 plus en aval dans la cascade de signalisation (**Figure 9**). Pour cela, des extraits protéiques ont également été réalisés à 16 h après la dernière exposition aux UVB.

Nous avons vérifié que TRIM29 a bien été précipité. Une augmentation de l'abondance de TRIM29 dans le cas de l'échantillon précipité venant de cellules exposées aux UVB a également été mise en évidence (**Figure 11**). Lorsque la révélation du western blot se fait à l'aide d'un anticorps dirigé contre p53, nous observons une bande correspondant à p53 dans les lysats totaux ainsi que dans les échantillons précipités. Cependant, on détecte également une bande dans le contrôle négatif. Cette dernière est néanmoins beaucoup moins intense que celle présente dans les échantillons précipités et ne semble pas avoir le même poids moléculaire que dans les lysats totaux qui servent de contrôle positif (**Figure 11**).

Afin de pouvoir conforter ce résultat, nous avons recommencé cette co-immunoprécipitation et avons également immunoprécipité p53 pour ensuite révéler le Western blot avec l'anticorps dirigé contre TRIM29.

Dans le cas de la co-immunoprécipitation de TRIM29 avec p53, nous trouvons à nouveau une précipitation de TRIM29. p53 est également présente dans les échantillons précipités et n'est pas présente dans le contrôle négatif (**Figure 12**). Bien qu'une augmentation de p53 soit observée dans les lysats de la condition UVB, la co-immunoprécipitation ne met pas en évidence une telle différence.

Dans le sens inverse, c'est-à-dire en ce qui concerne la co-immunoprécipitation de p53 avec TRIM29, nous trouvons une précipitation de p53 avec un anticorps différent dirigé contre p53. Une diminution d'abondance de p53 est observée dans l'échantillon « UVB » précipité, alors qu'en temps normal nous devrions observer le contraire (**Figure 13**). Néanmoins, une immunoprécipitation reste une manipulation délicate comprenant beaucoup d'étapes, telles que les lavages et les centrifugations, qui sont des risques de perte de matériel protéique. Par contre, la révélation du Western blot avec un anticorps contre TRIM29 montre que TRIM29 est faiblement présente dans les échantillons précipités et n'est que très peu visible dans les lysats totaux (**Figure 13**).

3.4. Discussion

Ces résultats suggèrent qu'il y aurait une interaction entre TRIM29 et p53 mais pas entre TRIM29 et ATM/ATR. Néanmoins, une immunoprécipitation n'étant pas quantitative, il est difficile de déterminer si cette interaction TRIM29-p53 est plus importante dans les cellules exposées aux UVB.

Si cette interaction semble bien avoir lieu, elle pose cependant une question biologique. En effet, TRIM29 est décrite dans la littérature comme étant une protéine cytoplasmique (Reymond, Meroni et al. 2001). Or c'est dans le noyau que p53 joue son rôle actif de facteur de transcription. Dès lors, quel pourrait être le rôle d'une interaction entre TRIM29 et p53 dans les cellules exposées aux UVB ? Il semblait intéressant de vérifier si TRIM29 est délocalisée dans le noyau suite aux expositions répétées et sub-létales des kératinocytes N-hTERT aux UVB. Pour ce faire, nous avons utilisé la technique de l'immunofluorescence.

4. Localisation de TRIM29, p53 et P-p53

Des kératinocytes N-hTERT ont été exposés huit fois à une dose sub-létales d'UVB (300 mJ/cm^2) à raison de quatre expositions par jour pendant deux jours (UVB). Les kératinocytes contrôles (CTL) ont été traités en parallèle mais n'ont pas été exposés aux UVB. Suite à la dernière exposition, les cellules ont été repiquées sur des lamelles de verre en plaque de 24 puits, à raison de 20.000 cellules par puits. À 16 h après la dernière exposition aux UVB, les cellules ont été fixées avec de la paraformaldéhyde 3 % et ensuite perméabilisées avec du triton X-100.

Premièrement, nous avons voulu détecter TRIM29, de manière à pouvoir déterminer s'il y avait une délocalisation de la protéine TRIM29 dans le noyau des cellules lorsque celles-ci sont exposées aux UVB. Deuxièmement, nous avons voulu détecter la forme totale de p53 afin de savoir si les expositions aux UVB entraînent bien une délocalisation de p53 vers le noyau des cellules exposées. Troisièmement, nous avons voulu détecter la forme phosphorylée de p53. Cette forme phosphorylée est indispensable à l'activation de p53. Logiquement, cette forme active de p53 devrait se retrouver dans le noyau des cellules exposées aux UVB.

Un marquage au TOPRO 3 a été conjointement réalisé à chaque fois afin de pouvoir repérer les différentes cellules grâce à leur noyau. La visualisation des images a été réalisée par microscopie confocale.

Pour ce qui est de TRIM29, nous observons un signal diffus dans le cytoplasme des kératinocytes N-hTERT non exposés aux UVB (**Figure 14**). Après exposition des cellules aux UVB, nous observons non seulement une augmentation du signal dans le cytoplasme mais également un signal dans le noyau d'une majorité de cellules (**Figure 14**).

Pour ce qui est de la forme totale de p53, nous n'observons qu'un très faible signal dans le cytoplasme des cellules contrôles tandis que ce signal devient intense dans le noyau des cellules exposées aux UVB (**Figure 14**).

Enfin, pour la forme phosphorylée de p53, nous n'observons quasiment aucun signal dans les kératinocytes non exposés. Par contre, le signal est très intense dans le noyau des cellules exposées aux UVB (**Figure 14**).

Les résultats de cette immunofluorescence confirme de manière visuelle que les expositions répétées et sub-létales des kératinocytes N-hTERT aux UVB entraînent une augmentation d'abondance des protéines TRIM29 et p53. De plus, nous confirmons également que p53 est non seulement activée, puisqu'elle est phosphorylée, mais qu'elle est également délocalisée dans le noyau. Ces résultats tenteraient donc à montrer que p53 est bien activée lorsqu'il y a exposition des cellules aux UVB.

Enfin, ce qui nous intéresse le plus ici, nous observons non seulement que l'abondance de la protéine TRIM29 est augmentée mais aussi qu'une fraction des protéines TRIM29 est délocalisée dans le noyau. Donc TRIM29 n'est pas uniquement localisée dans le cytoplasme et pourrait interagir avec p53 après translocation dans le noyau.

5. Création de mutant stable sous-exprimant TRIM29 par expression d'une shRNA inhibitrice de l'ARNm de TRIM29

Après avoir montré une translocation de TRIM29 dans le noyau cellulaire après exposition aux UVB, nous nous sommes demandés si TRIM29 jouerait un rôle, notamment dans la survie cellulaire après exposition aux UVB.

Nous avons donc tenté d'invalider l'expression de TRIM29 par une approche utilisant des siRNA. La transfection transitoire avec des siRNA n'était pas du tout efficace chez les kératinocytes. En effet, des expériences préliminaires ont montré que des transfusions transitoires de siRNA ne permettaient qu'une inhibition peu reproductible d'à peine 55 à 60 % de l'expression de TRIM29. De plus, cette inhibition par siRNA n'a pratiquement plus d'effet sur l'expression des protéines ciblées après 48 heures. Ceci est peu engageant vu que le modèle de stress aux UVB utilisé lors de ce mémoire s'étend sur une semaine entière. Nous avons donc décidé de créer des lignées par transfection stable.

5.1. Transformation bactérienne et digestion enzymatique

Afin de créer des mutants stables invalidant l'expression de TRIM29, nous avons transfecté des kératinocytes N-hTERT avec des plasmides provenant de la firme SuperArray Biosciences Corporation. Ces plasmides sont au nombre de cinq : quatre codent pour un « short hairpin » RNA (shRNA) pouvant invalider l'ARNm de TRIM29 et le cinquième code pour un shRNA « contrôle négatif » dont la séquence bien précise ne reconnaît aucun ARNm dans les cellules.

Outre le shRNA, le plasmide de base contient une séquence codant une résistance à l'ampicilline, ce qui permettra de sélectionner les bactéries transformées, et une résistance à la néomycine, ce qui permettra de sélectionner les cellules transfectées. Ce plasmide de 4.758 pb (4.818 lorsque le shRNA est inséré) possède également un site de restriction Pst I (**Figure 15**). Lorsque le shRNA est intégré dans le plasmide par la firme, cela crée un deuxième site de restriction Pst I. L'incorporation du shRNA dans le plasmide peut donc être vérifiée grâce à une digestion enzymatique par l'enzyme de restriction Pst I (**Figure 16**).

La transformation des bactéries *E.Coli* Sure a été réalisée par choc thermique. Les bactéries transformées sont ensuite étalées sur milieu solide contenant de l'ampicilline, ce qui permet la sélection des bactéries ayant intégré le plasmide. Par la suite, une mini-préparation a été réalisée pour vérifier l'incorporation du plasmide dans les bactéries sélectionnées suivie d'une maxi-préparation afin d'amplifier les bactéries sélectionnées. Pour finir, une restriction enzymatique par Pst I a été réalisée afin de nous assurer que les différents shRNA étaient bien insérés dans les différents plasmides.

Nous avons chargé un gel d'agarose avec chaque plasmide digéré et non digéré. Pour la forme non digérée, nous avons simplement chargé 500 ng de plasmide sans que celui-ci ne soit incubé en présence de l'enzyme de restriction Pst I. Nous avons également chargé un contrôle négatif dans lequel l'enzyme a été incubée uniquement avec de l'eau.

Dans les puits chargés avec les plasmides non digérés, nous observons deux bandes correspondant aux formes « Covalently Closed Circular » (cccDNA) et « Covalently Open Circular » (cocDNA) qui sont respectivement la forme intacte du plasmide et la forme présentant une cassure simple brin. La bande correspondant au cccDNA migre plus bas dans le gel. Cette bande est plus intense que celle correspondant au cocDNA, ce qui signifie que nos plasmides amplifiés sont de bonne qualité (**Figure 16**).

Pour ce qui est des plasmides digérés, nous observons deux bandes d'une longueur se situant aux alentours de 3.900 pb et des 1.000 pb. Or, les fragments attendus suite à la digestion des plasmides par l'enzyme de restriction Pst I, sont de 3.827 pb et de 991 pb. Les plasmides amplifiés contiennent donc bien une séquence codant les shRNA (**Figure 16**). Les deux contrôles négatifs sont bien négatifs puisque nous n'y observons aucune bande (**Figure 16**).

5.2. Transfection des kératinocytes N-hTERT

Nous nous sommes ensuite lancés dans la transfection des kératinocytes N-hTERT avec ces différents plasmides. Les transfusions ont été réalisées à partir de 2 µg de plasmide avec le Fugène comme agent transfectant et ce, dans un rapport ADN/Fugène de 1:3. Les cellules sont incubées pendant 5 heures dans le milieu contenant le mélange plasmide/Fugène, après quoi le milieu de culture est changé. Après 48 heures, le milieu est à nouveau changé mais cette fois, il est remplacé par du milieu contenant de la néomycine pour commencer la sélection des cellules ayant intégré le plasmide.

Cette transfection a été réalisée à trois reprises. Pour le dernier essai, un rapport ADN/Fugène de 1:6 a été utilisé et différentes quantités d'ADN ont été testées. Il a fallu attendre en moyenne deux semaines avant de voir apparaître un clone stable. Au final, nous avons obtenus 13 clones différents, cinq contrôles négatifs (Sc ; Sc 0,5 ; Sc 1 ; Sc 2 et Sc T2) et huit clones contenant un shRNA qui invalide l'expression de TRIM29 (1 T2 ; 1 T3 ; 2 T2 ; 2 T3 ; 3 ; 4 T2 ; 4 T1 et 4). Dans les contrôles négatifs, les chiffres 0,5, 1 et 2 correspondent à 0,5, 1 et 2 µg d'ADN transfectés. Pour les shRNA, le premier chiffre indique un des quatre shRNA différents fournis par la firme tandis que T « x » représente l'essai « x » de transfection.

Au niveau de la morphologie cellulaire (**Figure 17**), il n'y a pas vraiment de différence entre les kératinocytes non transfectés, les clones exprimant un shRNA qui n'inhibe aucun ARNm et ceux exprimant un shRNA qui cible l'ARNm de TRIM29, inhibant son expression. Les kératinocytes ayant été transfectés présentent tout de même une morphologie légèrement arrondies sans atteindre une augmentation de surface telle qu'observée chez les kératinocytes exposés aux UVB (**Figure 17**).

5.3. Choix des clones contrôles et des clones sous-exprimant TRIM29

Parmi tous ces clones obtenus après trois transfusions du shRNA spécifique de TRIM29, il était nécessaire de déterminer lesquels montraient l'inhibition la plus importante de l'expression de TRIM29. Il fallait aussi un clone avec une absence totale d'inhibition dans le cas des contrôles.

Nous avons effectué une extraction d'ARN et une extraction protéique pour chaque clone, ainsi que pour des kératinocytes non transfectés qui serviront de contrôle pour le niveau de base de TRIM29. Au niveau de l'abondance relative en ARNm de TRIM29 (**Figure 18**), les abondances pour chaque clone ont été comparées à celle des kératinocytes non transfectés (CTL) dont l'abondance relative a été ramenée à 1.

Pour les kératinocytes transfectés avec le plasmide contrôle qui ne cible et donc n'inhibe aucun ARNm dans les cellules, l'abondance en ARNm de TRIM29 dans le clone Sc 1 est au même niveau d'abondance que les kératinocytes contrôles. Le clone Sc montre un niveau d'ARNm de TRIM29 légèrement plus élevé tandis que les clones Sc 0,5 et Sc T2 montrent

III. Résultats et Discussion

une abondance relative en ARNm de TRIM29 beaucoup plus élevée par rapport au contrôle. Dans le cas du clone Sc 0,5, ce niveau est même plus que doublé (**Figure 18**). Or, le shRNA codé par ce plasmide possède une séquence choisie pour n'inhiber aucun ARNm dans les cellules et n'est pas non plus censée augmenter l'abondance d'un ARNm particulier. Cette augmentation pourrait être expliquée par l'insertion du plasmide dans le génome des cellules, par exemple dans le promoteur ou dans la séquence d'un régulateur négatif de la transcription de TRIM29. De plus, les transfections pourraient peut-être aussi avoir un impact sur le comportement des cellules. Enfin, on pourrait imaginer que la cellule possède un système de détection de plasmide, impliquant une induction de TRIM29.

Pour les kératinocytes transfectés avec les plasmides codant pour un shRNA inhibant l'expression de TRIM29, nous observons des diminutions mais assez curieusement aussi des augmentations. Dans les clones 2 T3, 4, 4 T1 et 4 T2, il y a une diminution de l'abondance relative en ARNm de TRIM29. Cette diminution est la plus importante pour le clone 2 T3 où elle atteint 64 % d'inhibition par rapport au contrôle. Les clones 1 T3 et 3 restent quant à eux, avec une abondance relative en ARNm de TRIM29 quasi équivalente à celle des kératinocytes non transfectés. Par contre les clones 1 T2 et 2 T2 montrent une augmentation de cette abondance relative (**Figure 18**).

Afin de confirmer ces résultats, nous avons également déterminé l'abondance protéique de TRIM29 dans ces différents clones cellulaires. Ces abondances ont été comparées à celle de kératinocytes non transfectés.

Pour les kératinocytes transfectés avec le plasmide contrôle, l'abondance protéique de TRIM29 dans les clones Sc 0,5 et Sc 1 est au même niveau que dans les kératinocytes contrôles. Par contre, les clones Sc et Sc 2 montrent une expression légèrement plus élevée et le clone Sc T2 présente une expression beaucoup plus forte (**Figure 19**). Ces résultats sont assez étonnants dans le cas du clone Sc 0,5 qui montre un niveau protéique équivalent à celui des kératinocytes non transfectés alors que son niveau d'abondance relative en ARNm de TRIM29 y était supérieur de plus de deux fois. Pour les autres Sc, les résultats sont comparables au niveau de l'ARNm et au niveau protéique.

Pour les kératinocytes transfectés avec un plasmide codant pour un shRNA qui invalide l'expression de l'ARNm de TRIM29, ce sont les clones 2 T3, 3 et 4 T1 qui montrent les plus fortes diminutions d'abondance protéique de TRIM29 ; le clone 3 étant celui où l'invalidation semble la plus efficace (**Figure 19**) alors que l'abondance relative en ARNm de TRIM29 montrait un niveau comparable à celle trouvée chez des kératinocytes contrôles. Le clone 4 a un niveau d'abondance protéique de TRIM29 comparable à celui des kératinocytes contrôles. Enfin, les clones 1 T2, 1 T3, 2 T2 et 4 T2 montrent quant à eux, une augmentation de l'abondance protéique de TRIM29. Une hypothèse pourrait aussi être que la pression de sélection réalisée par la néomycine n'était pas suffisante et que certaines cellules n'ayant pas intégré le plasmide, aient quand même pu survivre à l'antibiotique.

À partir des résultats obtenus lors de ces expériences, nous avons décidé de travailler en priorité avec le clone 2 T3 pour lequel une bonne corrélation était observée entre une diminution importante de l'abondance protéique de TRIM29 et une diminution de l'abondance de l'ARNm de TRIM29. Par ailleurs, nous avons aussi travaillé avec le clone 3 car il montrait la diminution la plus importante de l'abondance protéique de TRIM29. Pour les cellules transfectées avec le plasmide encodant un shRNA contrôle, nous avons décidé de travailler avec le clone Sc.

6. Réponse aux UVB des clones où l'expression de TRIM29 est invalidée

Des kératinocytes ont été exposés huit fois à la dose sub-létale d'UVB utilisés précédemment. Il s'agissait de kératinocytes non transfectés et des kératinocytes issus des clones Sc, 2 T3 et 3. Des cellules contrôles de chaque origine n'ont pas été exposées aux UVB. Les cellules non transfectées ont été considérées comme point de comparaison auquel les réponses des différents clones ont été comparées. Le clone contrôle (Sc) est nécessaire pour vérifier que les effets obtenus avec les clones invalidant l'expression de TRIM29 sont réellement dus à cette invalidation et non pas à un effet secondaire à la transfection stable des kératinocytes.

6.1. Effet sur l'abondance de TRIM29

Nous avons réalisé des extractions d'ARN et de protéines à 4 h, 16 h et 64 h après la dernière exposition aux UVB. Les deux premiers temps ont été choisis car ils correspondent aux moments auxquels l'induction de TRIM9 est maximale. Le temps de 64 h a été conservé afin de mettre en évidence d'éventuels changements dans la réponse des kératinocytes au temps auquel V. Vallery a observé l'apparition de modification caractéristique comme une surexpression de l'involucrine.

Nous avons analysé l'abondance protéique de TRIM29 par Western blot à ces différents temps pour les quatre lignées de kératinocytes afin de confirmer la diminution d'expression de la protéine TRIM29 et de déterminer lequel des clones 2 T3 ou 3 montre la meilleure invalidation de l'expression de TRIM29.

À 4 h après la dernière exposition aux UVB, une augmentation de l'abondance de TRIM29 est confirmée chez les cellules exposées aux UVB par rapport aux cellules contrôles pour les kératinocytes non transfectés (**Figure 20**). Concernant le clone Sc, cette augmentation est également observée chez les cellules exposées aux UVB avec des niveaux d'expression tout à fait comparables aux cellules de référence. Curieusement, alors que l'abondance de TRIM29 dans les cellules contrôles du clone 2 T3 est bien diminuée par rapport aux cellules non transfectées, les cellules de ce clone 2 T3 qui ont été exposées aux UVB montrent quand même une légère augmentation d'abondance de TRIM29, atteignant une abondance égale à celle observée chez les cellules non transfectées exposées aux UVB. Quant au clone 3, il présente un niveau d'abondance de TRIM29 inférieur à celui du clone 2 T3 lorsqu'il n'est pas exposé aux UVB. L'augmentation de cette abondance après les expositions aux UVB reste vraiment très faible pour ce clone 3 (**Figure 20**).

Le profil d'expression de TRIM29 analysé 16 h après la dernière exposition est fort semblable à celui observé à 4 h (**Figure 20**).

À 64 h de récupération après exposition aux UVB, nous n'observons plus qu'une faible différence d'abondance protéique en TRIM29 entre les cellules contrôles et les cellules exposées aux UVB et ce quel que soit la lignée de kératinocytes, ainsi qu'établi précédemment et vérifié à la figure 4 de ce travail (**Figure 4**). L'abondance relative protéique de TRIM29 dans le clone Sc est au même niveau que chez les kératinocytes non transfectés. Le clone 2 T3 montre une abondance de TRIM29 très faible. Quant au clone 3, nous ne voyons presque plus les bandes correspondant à TRIM29 (**Figure 20**).

En conclusion, le clone Sc peut être conservé comme contrôle. Par ailleurs, il est clair que le clone 3 montre une meilleure invalidation de l'expression de TRIM29 que le clone 2 T3. En effet, nous n'observons plus d'augmentation de TRIM29 après les expositions aux UVB pour le clone 3. Pour la suite de nos travaux, nous nous sommes donc attardés d'avantage sur les résultats obtenus avec le clone 3.

Nous avons ensuite analysé l'abondance relative de l'ARNm de TRIM29 à 16 h et 64 h après exposition aux UVB pour les kératinocytes non transfectés, le clone Sc et le clone 3 afin de confirmer les résultats obtenus au niveau de l'abondance protéique de TRIM29.

À 16 h après la dernière exposition aux UVB, une augmentation très forte de l'abondance relative de l'ARNm de TRIM29 est observée dans les kératinocytes non transfectés et le clone Sc, par rapport aux cellules contrôles (**Figure 21**). Par contre, il n'y a pas de modification de cette abondance entre les cellules exposées aux UVB et les cellules contrôles dans le clone 3, dont l'abondance relative de l'ARNm de TRIM29 est beaucoup plus faible au niveau des cellules contrôles par rapport aux cellules contrôles des kératinocytes non transfectés (**Figure 21**).

À 64 h de récupération après exposition aux UVB, nous observons toujours une augmentation de l'abondance relative de l'ARNm de TRIM29 chez les kératinocytes non transfectés exposés aux UVB par rapport aux cellules non exposées (**Figure 21**). Par contre, dans le clone Sc, il n'y a pas de modification de l'abondance relative de l'ARNm de TRIM29 entre les cellules exposées aux UVB et les cellules contrôles. Pour le clone 3, l'abondance relative de l'ARNm de TRIM29 est toujours plus faible, après exposition aux UVB ou non, par rapport aux cellules contrôles des kératinocytes non transfectés (**Figure 21**).

Les résultats obtenus pour l'ARNm évoluent donc en parallèle du niveau protéique. Nous confirmons donc que le clone Sc peut être conservé comme contrôle et que le clone 3 invalide très bien l'expression de TRIM29.

6.2. Effet sur l'abondance de l'involucrine

Afin de vérifier un impact éventuel de l'invalidation de TRIM29 sur l'abondance relative de l'involucrine, un marqueur de différenciation des kératinocytes, des extractions d'ARN total ont été réalisées à 16 h et 64 h après la dernière exposition aux UVB chez les kératinocytes non transfectés, le clone Sc et le clone 3.

Au niveau de l'abondance relative de l'ARNm de l'involucrine, nous observons une augmentation dans les cellules exposées aux UVB par rapport aux cellules contrôles, surtout à 64 h (**Figure 22 (b)**). Le niveau de cette abondance dans les cellules non exposées varie un peu d'un temps à l'autre au sein d'une même lignée de kératinocytes et entre lignées (**Figure 22 (b)**).

Cette étude, réalisée en double, ne montrent donc pas d'effet de l'invalidation de TRIM29 sur l'involucrine.

6.3. Effet sur la morphologie cellulaire

Les kératinocytes non transfectés, le clone Sc et les clones 2 T3 et 3 ont été exposés à des doses répétées et sub-létales de 300 mJ/cm₂ d'UVB et ce quatre fois par jour sur deux jours suivant le modèle établi (**Figure 1**). Les cellules contrôles ont été traitées de la même manière mais sans UVB.

À 4 h après la dernière exposition aux UVB, les cellules des quatre lignées étudiées exposées aux UVB montrent une morphologie relativement comparable aux cellules non exposées (**Figure 23 (a)**). À 16 h, nous observons de plus en plus de cellules de plus grande taille et certaines commencent à s'allonger légèrement (**Figure 23 (b)**). À 64 h après la dernière exposition, nous observons un étalement des kératinocytes plus important. Il semblerait que les cellules où l'expression de TRIM29 est invalidée présentent une densité moindre et une proportion plus élevée de cellules plus étalées (**Figure 23 (c)**).

6.4. Effet sur la prolifération cellulaire

Afin de savoir si les clones où l'expression de TRIM29 est invalidée présentent une prolifération différente suite aux expositions répétées et sub-létales aux UVB, nous avons tout d'abord observé les cellules au microscope optique après les expositions aux UVB. Nous avons également réalisé un test de cytotoxicité au MTT et un test d'incorporation de la thymidine tritiée.

6.4.1. Observation au microscope optique

Nous avons à plusieurs reprises observé une différence de densité cellulaire entre les quatre lignées étudiées, en condition contrôle (pas d'exposition aux UVB). En effet, alors que les kératinocytes non transfectés restent non totalement confluent à 64 h après les expositions aux UVB, les clones Sc et 3 sont vraiment très denses (**Figure 23 (a), (b) et (c)**).

6.4.2. Test de cytotoxicité des expositions aux UVB par incorporation de MTT

Pour la réalisation du test de cytotoxicité au MTT, les kératinocytes non transfectés et les clones Sc, 2 T3 et 3, ont été exposés à des doses répétées et sub-létales d'UVB (300 mJ/cm²). Les cellules contrôles sont traitées en parallèle mais sans exposition aux UVB. Le test de cytotoxicité a été réalisé à 16 h après la dernière exposition des cellules aux UVB.

Le MTT est une molécule incorporée par les cellules métaboliquement actives. Une fois dans les mitochondries, le MTT est clivé en son dérivé, le formazan, qui forme des cristaux de couleur mauve, détectable par colorimétrie.

Une mesure a été réalisée au jour 0 (J0) afin de connaître la proportion des cellules métaboliquement actives avant les expositions aux UVB. Cette mesure, réalisée sur des kératinocytes non transfectés, a été définie comme référence (100 %).

Par comparaison des valeurs obtenues à 16 h après la dernière exposition aux UVB à cette mesure du jour 0, nous pourrions avoir une estimation relative du nombre de cellules après exposition ou non aux UVB. Dans le cas des kératinocytes non transfectés, nous observons un doublement du clivage du MTT en son dérivé coloré par rapport au J0, chez les cellules non exposés aux UVB. Par contre, chez les kératinocytes non transfectés exposés aux UVB, nous n'observons pas de changement par rapport au jour 0 (**Figure 24**). Il semble que le nombre de cellules n'ait pas trop changé si on exclut une mortalité exactement compensée par de la prolifération.

Pour le clone Sc, nous observons une métabolisation du MTT très importante dans les cellules non exposées aux UVB, avec un triplement des valeurs par rapport au jour 0. Cependant, le ratio entre les valeurs obtenues avec et sans exposition aux UVB sont très similaires chez les cellules non transfectées et les cellules Sc, de l'ordre de 50 % (**Figure 24**). Pour les clones 2 T3 et 3, ce ratio chute respectivement à environ 33 % et 25 % (**Figure 24**).

Notons tout de même qu'il semblerait que la transfection stable modifie la capacité proliférative des cellules, que ce soit après transfection avec un shRNA spécifique de TRIM29 ou pas. Il se pourrait simplement que le processus de sélection des cellules après transfection sélectionne les cellules qui ont un potentiel de prolifération élevé.

Cependant, il est important de remarquer que les cellules transfectées (et sélectionnées) semblaient, après observation au microscope optique, montrer une densité cellulaire plus importante dès le jour 0. Un point de référence jour 0 pour chaque lignée cellulaire aurait peut-être été source de précision à ce sujet.

6.4.3. Test d'incorporation de la thymidine tritiée

En incubant les cellules avec de la thymidine tritiée, nous avons pu évaluer leur capacité de prolifération. En effet, les cellules qui prolifèrent doivent dupliquer leur ADN et, ce faisant, y incorporent de la thymidine.

Afin de réaliser le test d'incorporation de la thymidine tritiée, les cellules ayant été exposées à des doses répétées et sub-létales d'UVB et celles ayant été traitées en parallèle sans exposition aux UVB, ont été repiquées, directement après le dernier stress, en plaque de 24 puits à raison de 10.000 cellules par puits. La thymidine tritiée a été ajoutée à leur milieu de culture 48 heures plus tard et son incorporation a été mesurée 24 heures après cet ajout, soit 64 h après la dernière exposition aux UVB. Les résultats ont été rapportés par mg de protéines cellulaires.

Notons de suite que l'incorporation de thymidine est plus importante chez les kératinocytes transfectés par rapport aux cellules non transfectés (N-hTERT), en l'absence d'UVB. Par exemple, le cas le plus frappant est celui du clone 3 où l'incorporation de thymidine est quasiment doublée par rapport aux kératinocytes non transfectés (**Figure 25**). Rappelons que le clone 3 est celui qui présente la diminution la plus importante de l'abondance de TRIM29. L'arrêt de prolifération observé après exposition répétées et sub-létales aux UVB, est observé pour les quatre lignées de kératinocytes (**Figure 25**).

Nous avons rapporté les résultats obtenus pour les cellules exposées aux UVB en pourcentages de leur contrôle respectif non exposé. Dans ce cas, nous observons que l'arrêt de prolifération observé est semblable pour les kératinocytes non transfectés, le clone Sc et le clone 3. Le clone 2 T3 montrent un arrêt de prolifération un peu moins important que les autres pour une raison inconnue.

6.5. Effet sur l'abondance de p53

Nous avons voulu savoir si ces différences pourraient correspondre à des différences d'abondance de p53 dans les différentes lignées.

Selon notre hypothèse de travail (**Figure 9**), il est possible que TRIM29 joue un rôle dans une voie de signalisation menant à l'induction de p53. Dès lors, les kératinocytes non transfectés et les clones Sc, 2 T3 et 3 ont été exposés à des doses répétées et sub-létales d'UVB. Les cellules contrôles ont été traitées en parallèle mais sans exposition aux UVB. Des extractions protéiques ont été réalisées avec le tampon DLA à 4 h, 16 h et 64 h après exposition aux UVB. Nous avons ensuite analysé l'abondance protéique de p53 par Western blot.

Quel que soit le type de kératinocytes observés, N-hTERT, Sc, 2 T3 ou 3, nous observons une augmentation très importante de l'abondance de p53 à 4 h et 16 h après la dernière exposition aux UVB (**Figure 26**). Il semble que le clone 2 T3 présente l'abondance de p53 la plus importante. Ceci pourrait correspondre à la différence d'incorporation de thymidine observée pour le clone 2 T3. De plus, celle-ci est toujours bien visible à 64 h après la dernière exposition aux UVB. Cependant, l'abondance basale de p53 dans les cellules contrôles semble légèrement augmenté par rapport aux cellules contrôles à 4 h et 16 h, surtout dans les clones 2 T3 et 3 (**Figure 26**). Le clone 3 ne montre pas une abondance de p53 plus élevée que les cellules non transfectées, non exposées aux UVB.

6.6. Effet sur l'abondance de p21^{WAF-1}

Afin de vérifier un impact éventuel de l'inactivation de TRIM29 sur l'abondance relative de p21^{WAF-1}, un marqueur de l'arrêt du cycle cellulaire et un des gènes cibles de p53 activée, des extractions d'ARN total ont été réalisées à 16 h et 64 h après la dernière exposition aux UVB chez les kératinocytes non transfectés, le clone Sc et le clone 3.

À 16 h après la dernière exposition aux UVB, l'abondance relative de l'ARNm de p21^{WAF-1} augmente très fortement quel que soit la lignée de kératinocytes observées (**Figure 22 (a)**).

À 64 h après la dernière exposition aux UVB, cette augmentation de l'abondance relative de l'ARNm de p21^{WAF-1} est toujours présente dans les trois lignées de kératinocytes mais de manière moins marquée qu'à 16 h après la dernière exposition aux UVB. (**Figure 22 (a)**). L'abondance relative de l'ARNm de p21^{WAF-1} au niveau des cellules non exposées de chacune de ces lignées de kératinocytes reste à des niveaux comparables (**Figure 22 (a)**).

Ces résultats ne permettent donc pas de mettre en évidence un quelconque effet de l'inactivation de TRIM29 sur l'abondance de l'ARNm de p21^{WAF-1}.

6.7. Effet sur l'induction de l'apoptose

En diminuant l'expression de TRIM29, il serait possible que les cellules ne survivent plus aux expositions aux UVB. En guise de première approche, les kératinocytes non transfectés et les clones Sc, 2 T3 et 3 ont été exposés à huit doses sub-létales d'UVB selon le modèle établi (**Figure 1**). Des extractions protéiques ont été réalisées avec du tampon DLA à 4 h, 16 h et 64 h après la dernière exposition. Un contrôle positif d'apoptose a été réalisé en traitant des kératinocytes N-hTERT non transfectés et non exposés aux UVB avec de la staurosporine, un puissant inducteur d'apoptose.

III. Résultats et Discussion

À partir de ces extraits, nous avons réalisé un Western blot afin d'observer le clivage de la protéine PARP (Poly ADP-ribose polymérase). En effet, cette protéine de 116 kDa qui est impliquée dans la réparation de l'ADN, est clivée lorsque les cellules entrent en apoptose et un fragment de 85 kDa est alors observable sur le Western blot.

Dans le contrôle positif, nous observons bien ce second fragment de 85 kDa (**Figure 27**). Par contre, quel que soit la lignée de kératinocytes, N-hTERT, Sc, 2 T3 ou 3 et quel que soit le temps de récupération accordé aux cellules après exposition aux UVB, nous n'avons pas observé ce deuxième fragment (**Figure 27**). Il n'y aurait donc pas induction d'apoptose à ces temps de récupération dans les clones invalidant l'expression de TRIM29.

L'objectif de ce mémoire était donc d'essayer de caractériser le rôle éventuel de TRIM29 dans la réponse des kératinocytes à des expositions répétées et sub-létales aux UVB selon le modèle mis au point par Véronique Vallery dans notre laboratoire. Ce modèle consiste en huit expositions à une dose d'UVB de 300 mJ/cm² à raison de quatre expositions par jour pendant deux jours. Une étude protéomique des variations d'abondance protéique préalablement réalisée au laboratoire, a permis de mettre en évidence une augmentation de l'abondance de TRIM29 en réponse aux expositions répétées et sub-létales aux UVB surtout à 16 h après les expositions aux UVB. Cette protéine pourrait avoir un rôle dans la réponse aux dommages à l'ADN (Brzoska, Chen et al. 1995). Néanmoins peu d'informations à ce sujet existent dans la littérature, ce qui nous conduit à formuler différentes hypothèses.

Déjà en 1995, Brzoska *et al.* posaient l'hypothèse que TRIM29 pouvait être impliquée dans la détection des dommages à l'ADN et/ou dans la transduction du signal découlant de ces dommages. Ils posaient cette hypothèse après avoir observé l'effet de la complémentation par TRIM29 dans des cellules de patients atteints d'Ataxia Telangiectasia (AT) (Lambert, Schultz et al. 1991). Cette pathologie montre, entre autres, une sensibilité accrue des cellules aux expositions ionisantes et un retard dans l'induction de p53. Or, le retour d'une induction précoce de p53 fait partie des effets positifs observés lors de la complémentation des cellules AT par TRIM29 (Brzoska, Chen et al. 1995).

Nous savions aussi que des expositions répétées et sub-létales aux UVB entraînent une forte augmentation des DCP (dimères cyclobutyliques de pyrimidines) qui représentent les dommages à l'ADN caractéristiques aux UVB, ainsi que montré au laboratoire.

Au début de ce mémoire, nous avons émis l'hypothèse d'un rôle de TRIM29 dans la voie de signalisation déclenchée par des dommages à l'ADN et conduisant à l'activation de p53, cette voie étant classiquement orchestrée par les kinases ATM ou ATR (**Figure 1**)

Afin de caractériser le rôle de TRIM29 dans la réponse aux UVB dans ce modèle particulier, nous avons, d'une part, étudié l'abondance de TRIM29 après les expositions aux UVB. Nous avons étudié si TRIM29 interagissait avec les principales protéines impliquées dans la réponse aux dommages à l'ADN induit par les UVB. D'autre part, nous avons tenté de caractériser l'effet d'une inhibition de l'expression de TRIM29 sur la réponse des kératinocytes aux expositions répétées et sub-létales aux UVB à l'aide de mutants stables invalidant son expression.

1. Augmentation de l'abondance protéique de TRIM29 suite aux expositions répétées et sub-létales aux UVB

Lors de ce mémoire nous avons tout d'abord mis en évidence que les expositions répétées et sub-létales des kératinocytes aux UVB menaient à une augmentation de l'abondance de TRIM29 aussi bien au niveau protéique qu'au niveau de l'ARNm. Cette augmentation d'abondance est assez rapide puisqu'elle est déjà observable à 4 h après exposition aux UVB et est la plus importante à 16 h après exposition aux UVB. Cette augmentation précoce pourrait être compatible avec un rôle de TRIM29, soit dans la détection des dommages à l'ADN, soit dans une voie de signalisation activée par ceux-ci.

IV. Conclusions & Perspectives

Pour la suite de l'étude de TRIM29, il serait intéressant de vérifier si cette augmentation de l'abondance de TRIM29 suite aux expositions répétées et sub-létales aux UVB est due à une induction transcriptionnelle de TRIM29 ou à une accumulation de son ARNm qui ne serait plus dégradé. Dans le cas où nous mettrions en évidence une induction transcriptionnelle de TRIM29, nous pourrions ensuite essayer de mettre en évidence la voie de signalisation et les facteurs de transcription intervenant dans cette induction. Cependant, il n'y a encore aucune donnée à ce sujet dans la littérature. Il faudrait donc commencer par analyser *in silico* la séquence du promoteur du gène codant pour la protéine TRIM29.

Par ailleurs, il a également été démontré que TRIM29 pouvait subir des modifications post-traductionnelles. TRIM29 est notamment un substrat des sérines/thréonines protéines kinase C (PKC) (Laderoute, Knapp et al. 1996). Nous pourrions envisager de déterminer s'il y a une augmentation de la forme phosphorylée de TRIM29 lors de la réponse des kératinocytes aux expositions répétées et sub-létales aux UVB. En effet, lors de l'étude protéomique qui a révélé son augmentation d'abondance dans le modèle d'expositions répétées et sub-létales aux UVB, TRIM29 a été identifiée à partir de trois spots différents alignés à un poids moléculaire identique mais à des points isoélectriques différents. Ce cas de figure est souvent caractéristique d'une modification de la protéine par phosphorylation. Une étude a montré que la protéine TRIM29 est phosphorylée de manière constitutive dans la lignée cancéreuse A431 (Laderoute, Knapp et al. 1996) sur les sérine 104 et 489 (Beausoleil, Villen et al. 2006).

Si TRIM29 joue un rôle dans la réponse aux UVB, elle doit être régulée dans les cellules ne présentant pas de dommages à l'ADN afin de ne pas enclencher de réponse inadaptée. Dans l'hypothèse où une phosphorylation de TRIM29 serait induite par les expositions répétées et sub-létales aux UVB, le contrôle de TRIM29 dans les cellules non exposées pourrait se faire par une déphosphorylation continue. Une autre possibilité serait que l'abondance de TRIM29 soit contrôlée par un mécanisme lié à sa vitesse de dégradation par analogie à ce qui se passe dans le cas de p53 (Alarcon-Vargas and Ronai 2002). À ce niveau, et étant donné qu'il n'y a aucune donnée dans la littérature, toute autre hypothèse est envisageable.

Par leur position stratégique dans la première couche protection de la peau, les kératinocytes sont les premières cellules exposées aux ultraviolets et ont donc développé des réponses spécifiques pour y répondre (Li, Turi et al. 2001). Dans notre modèle, il faut noter que la protéine TRIM29 est également présente dans les kératinocytes contrôles qui ne sont pas exposés aux UVB. Si TRIM29 est une protéine intervenant dans la réponse aux dommages à l'ADN, cela concorderait avec le fait que les cellules en culture sont connues pour accumuler des dommages à l'ADN en conditions normales. Une étude transcriptomique par damier a d'ailleurs montré que l'ARNm de TRIM29 est particulièrement abondant dans les kératinocytes par rapport à d'autres types cellulaires cutanés comme les fibroblastes (Gazel, Ramphal et al. 2003).

Il ne faut pas oublier que les kératinocytes N-hTERT expriment la sous-unité catalytique de la télomérase et n'expriment pas p16^{INK4a}. L'expression de la télomérase a pour avantage de permettre l'étude des dommages à l'ADN sans tenir compte du raccourcissement télomérique. Par contre, il serait intéressant de voir comment réagiraient des kératinocytes normaux exposés aux UVB en ce qui concerne l'abondance et le rôle de TRIM29 ou de voir ce qui se passerait si p16^{INK4a} était à nouveau exprimé dans les kératinocytes N-hTERT.

2. TRIM29 en réponse aux dommages à l'ADN

Nous avons essayé de mettre en évidence une interaction entre TRIM29 et ATM et/ou ATR. Nos résultats suggèrent cependant que TRIM29 n'interagit ni avec ATM, ni avec ATR. En 2001, Abraham expliquait que les protéines ATM et ATR sont activées lors de dommages à l'ADN par des protéines de la famille des Rad qui détectent elles-mêmes ces dommages en formant un anneau autour de l'ADN (Abraham 2001). Les dommages à l'ADN, notamment ceux causés par les rayons ultraviolets, activent aussi la protéine DNA-PK qui est une sérine thréonine kinase détectant directement les dommages à l'ADN en s'y liant. De plus, DNA-PK conduit également à l'activation de p53 (Yang, Yu et al. 2003).

La protéine TRIM29 pourrait donc être activée soit par les protéines de la famille des Rad ou par la DNA-PK. La DNA-PK pourrait être une bonne candidate puisque c'est une sérine/thréonine kinase et qu'il a été démontré que TRIM29 pouvait être phosphorylée (Laderoute, Knapp et al. 1996) sur les sérines 104 et 489 (Beausoleil, Villen et al. 2006). Par ailleurs, il a été montré que TRIM29 était un substrat de sérine/thréonine kinase telles que les PKC (Laderoute, Knapp et al. 1996).

D'un autre côté, TRIM29 fait partie de la famille des « Tripartites motif protein » et est caractérisée par trois domaines « zinc-finger » (Reymond, Meroni et al. 2001) et un domaine « leucine zipper » adjacent (Leonhardt, Kapp et al. 1994). Or, ces types de domaine peuvent permettre la liaison d'une protéine directement à l'ADN. TRIM29 pourrait donc, peut-être, être directement activée par les dommages à l'ADN eux-mêmes.

3. TRIM29 et p53

Nous avons aussi tenté de mettre en évidence une interaction entre TRIM29 et p53. Les résultats de co-immunoprécipitation montrent que cette interaction est bien présente dans les kératinocytes N-hTERT (**Voir III : Figure 12 à 14**). Cependant, une interaction vue par co-immunoprécipitation n'est pas forcément physiologique. Il serait donc intéressant de vérifier cette interaction par la technique du transfert d'énergie de fluorescence (FRET).

TRIM29 a été décrite comme étant une protéine cytoplasmique (Reymond, Meroni et al. 2001), nous avons vérifié si TRIM29 était transloquée dans le noyau suite aux stress répétés et sub-létaux aux UVB. Nous avons observé qu'il y avait effectivement une légère translocation nucléaire de la protéine TRIM29 (**Voir III : Figure 15**). Étant donné que p53 est active dans le noyau, ceci conforte l'idée que TRIM29 puisse intervenir dans l'activation et/ou l'action de p53. Cela conforte aussi l'idée que TRIM29 pourrait intervenir dans les stades précoces de la réponse aux dommages à l'ADN nucléaire.

Si nous savons maintenant que TRIM29 peut interagir avec p53, nous ne connaissons pas le rôle de cette interaction. En effet, dans la pathologie Ataxia Telangiectasia, la complémentation par TRIM29 suffit à restaurer l'activation de p53 sans ATM et ATR. Dans la voie de réponse aux dommages à l'ADN, ATM et ATR stabilisent l'abondance de p53 en la phosphorylant. Cependant TRIM29 n'a, quant à elle, pas d'activité kinase connue. De ce fait, TRIM29 ne remplace probablement pas ATM et ATR dans la voie de signalisation répondant aux dommages à l'ADN mais son action semble permettre de passer outre cette stabilisation par une voie parallèle.

Certaines protéines de la famille des « tripartite motif proteins », dont fait partie TRIM29, sont des facteurs de transcriptions impliqués dans la carcinogenèse et/ou la différenciation, lorsqu'ils forment des homo- ou hétéro- dimères (Leonhardt, Kapp et al. 1994). De plus, le fait que TRIM29 soit un facteur de transcription expliquerait le grand nombre de dysfonctionnements observés dans les cellules de patients atteints d'Ataxia Telangiectasia (Leonhardt, Kapp et al. 1994). De ce fait, TRIM29 serait peut-être un co-activateur pour la transcription de certains gènes cibles de p53. La liaison de TRIM29 à p53 pourrait peut-être permettre une stabilisation suffisante de l'abondance de p53.

D'autres protéines de la famille des « tripartite motif proteins » sont des « scaffolding proteins », comme par exemple la myospryn (Reynolds, McCalmon et al. 2007). Les « scaffolding proteins » sont des protéines qui permettent de mettre en présence deux protéines qui font partie d'une même voie de signalisation et permettent donc à l'une de ces protéines d'agir sur l'autre. On pourrait imaginer que TRIM29 pourrait être une « scaffolding protein » et mettant p53 en présence des protéines nécessaires à son activation, autres qu'ATM et ATR.

4. Effet de la sous-expression de TRIM29 dans les kératinocytes

Après un long travail menant à la création de mutants stables invalidant l'expression de TRIM29 par shRNA, nous avons étudié l'effet de cette invalidation sur la prolifération cellulaire, l'abondance de p53 et l'induction de l'apoptose dans le modèle d'exposition répétées aux UVB chez les kératinocytes. Quel que soit le marqueur étudié, nous ne sommes pas parvenus à mettre en évidence une différence frappante entre les kératinocytes non transfectés, les kératinocytes transfectés avec le shRNA contrôle ou le shRNA invalidant l'expression de la protéine TRIM29. On voyait aussi parfois des différences entre les deux clones où l'expression de TRIM29 est invalidée.

Cependant l'observation microscopique suggère une mortalité importante chez les cellules invalidant l'expression de la protéine TRIM29, et ce entre les quatre premières expositions (premier jour) et les quatre dernières (deuxième jour). Nous pourrions donc tester le clivage de PARP ainsi que l'activation des caspases, protéines effectrices de l'apoptose, à des temps plus précoces et notamment entre les différentes expositions. Si nous trouvons une fenêtre où des différences apparaissent, nous pourrions alors mieux étudier le rôle de la protéine TRIM29 et son rôle dans la réponse aux dommages de l'ADN. Nous pourrions également faire ces études avec moins d'expositions aux UVB mais à des doses plus importantes.

Pour ce qui est de p53, nous observons la même abondance pour les kératinocytes où l'expression de la protéine TRIM29 est invalidée que pour les kératinocytes où elle ne l'est pas. L'abondance de p53 ne détermine pas son niveau d'activation. Néanmoins lorsque nous étudions l'abondance relative de l'ARNm de p21^{WAF-1}, nous n'observons pas d'effet de l'invalidation de TRIM29. Or p21^{WAF-1} est un gène cible de p53. De ce fait, l'augmentation de l'abondance de l'ARNm de p21^{WAF-1} pourrait signifier que p53 est actif même lorsqu'il y a invalidation de l'expression de la protéine TRIM29. Nous pourrions tester l'activité de liaison de p53 sur l'ADN et analyser l'abondance d'autres gènes cibles de p53. Cependant, la transcription de p21^{WAF-1} peut aussi être activée par d'autres facteurs de transcription pour lesquels des profils d'activité de liaison à l'ADN devront aussi être établis.

Nous savons que la protéine TRIM29 est suffisante à l'induction de p53 lorsque les protéines ATM et ATR sont absentes (Brzoska, Chen et al. 1995). De ce fait, l'absence d'effet sur cette induction dans notre modèle pourrait signifier que lorsque les protéines ATM et ATR sont présentes, elles sont suffisantes pour l'activation de p53 et le rôle de TRIM29 ne serait pas absolument nécessaire. D'un autre côté, l'inhibition de l'expression de la protéine TRIM29 a peut-être pour conséquence un retard dans l'induction de p53 qui serait rattrapé après 16 h de récupération des cellules. Nous devrions donc également analyser l'induction de p53 entre les stress.

Il serait également intéressant de regarder si l'invalidation de l'expression de TRIM29 a un effet sur la vitesse de réparation des dommages à l'ADN.

5. Conclusion

Il est difficile mais très intéressant d'étudier une protéine lorsque si peu de données sont disponibles dans la littérature pour orienter la recherche, ce qui multiplie les hypothèses de travail. Différentes approches peuvent donc encore être envisagées afin d'éclaircir son rôle au niveau de la cellule et particulièrement chez les kératinocytes où TRIM29 est fortement exprimée.

Le travail réalisé durant ce mémoire a néanmoins permis de confirmer l'augmentation d'abondance de TRIM29 rapidement après une série de huit expositions sub-létales aux UVB, aussi bien au niveau protéique qu'au niveau de l'ARNm. Par ailleurs, il semblerait que TRIM29 interagisse avec p53. Par contre, nous avons écarté la possibilité d'une interaction avec les protéines ATM et ATR. Même si l'invalidation de l'expression de TRIM29 par un shRNA n'a pas abouti à des différences d'induction de p53 en réponse aux expositions aux UVB, les cellules où l'expression de TRIM29 est invalidée, ont montré une plus grande sensibilité en terme de survie cellulaire. Par ailleurs, ces mêmes cellules contrôles prolifèrent de façon exagérée par rapport aux cellules non transfectées. À ce propos, Hosoi a récemment montré que la suppression de l'expression de TRIM29 est associée à un phénotype malin dans les lignées cancéreuses d'ostéosarcome et de cancer du poumon (Hosoi, Kapp et al. 2006).

Outre un rôle via p53, TRIM29 pourrait influencer l'organisation du cytosquelette puisqu'elle interagit avec la vimentine (Brzoska, Chen et al. 1995) et/ou jouer un rôle dans une voie de signalisation de PKC puisque TRIM29 interagit avec une PKC et en est l'un des substrats (Brzoska, Chen et al. 1995). TRIM29 pourrait donc être associée à la fois à des processus de carcinogenèse et de sensibilité accrue aux radiations ionisantes mais également de sensibilité aux expositions aux UVB. Cependant, sa véritable fonction n'est pas encore élucidée. Une porte est donc ouverte pour une recherche approfondie sur le rôle biologique exact de TRIM29.

- Abraham, R. T. (2001). "Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases." Genes Dev **15**(17): 2177-96.
- Adam, J. E. (1999). "Living a "shady life": sun-protective behaviour for Canadians." Cmaj **160**(10): 1471-4.
- Alarcon-Vargas, D. and Z. Ronai (2002). "p53-Mdm2--the affair that never ends." Carcinogenesis **23**(4): 541-7.
- Bachelor, M. A. and G. T. Bowden (2004). "UVA-mediated activation of signaling pathways involved in skin tumor promotion and progression." Semin Cancer Biol **14**(2): 131-8.
- Bartek, J. and J. Lukas (2003). "DNA repair: Damage alert." Nature **421**(6922): 486-8.
- Beausoleil, S. A., J. Villen, et al. (2006). "A probability-based approach for high-throughput protein phosphorylation analysis and site localization." Nat Biotechnol **24**(10): 1285-92.
- Bickenbach, J. R. and K. L. Grinnell (2004). "Epidermal stem cells: interactions in developmental environments." Differentiation **72**(8): 371-80.
- Brzoska, P. M., H. Chen, et al. (1995). "The product of the ataxia-telangiectasia group D complementing gene, ATDC, interacts with a protein kinase C substrate and inhibitor." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(17): 7824-8.
- Bulteau, A. L., M. Moreau, et al. (2002). "Impairment of proteasome function upon UVA- and UVB-irradiation of human keratinocytes." Free Radic Biol Med **32**(11): 1157-70.
- Carrard, G., A. L. Bulteau, et al. (2002). "Impairment of proteasome structure and function in aging." Int J Biochem Cell Biol **34**(11): 1461-74.
- Chen, N., W. Ma, et al. (1999). "Translocation of protein kinase Cepsilon and protein kinase Cdelta to membrane is required for ultraviolet B-induced activation of mitogen-activated protein kinases and apoptosis." J Biol Chem **274**(22): 15389-94.
- Chouinard, N., K. Valerie, et al. (2002). "UVB-mediated activation of p38 mitogen-activated protein kinase enhances resistance of normal human keratinocytes to apoptosis by stabilizing cytoplasmic p53." Biochem J **365**(Pt 1): 133-45.
- De Fabo, E. C. (2005). "Arctic stratospheric ozone depletion and increased UVB radiation: potential impacts to human health." Int J Circumpolar Health **64**(5): 509-22.
- Decraene, D., K. Smaers, et al. (2005). "A low UVB dose, with the potential to trigger a protective p53-dependent gene program, increases the resilience of keratinocytes against future UVB insults." J Invest Dermatol **125**(5): 1026-31.
- Denning, M. F. (2004). "Epidermal keratinocytes: regulation of multiple cell phenotypes by multiple protein kinase C isoforms." Int J Biochem Cell Biol **36**(7): 1141-6.
- Dhanalakshmi, S., C. Agarwal, et al. (2005). "Silibinin up-regulates DNA-protein kinase-dependent p53 activation to enhance UVB-induced apoptosis in mouse epithelial JB6 cells." J Biol Chem **280**(21): 20375-83.
- Dickson, M. A., W. C. Hahn, et al. (2000). "Human keratinocytes that express hTERT and also bypass a p16(INK4a)-enforced mechanism that limits life span become immortal yet retain normal growth and differentiation characteristics." Mol Cell Biol **20**(4): 1436-47.
- Eckert, R. L., J. F. Crish, et al. (1997). "The epidermal keratinocyte as a model for the study of gene regulation and cell differentiation." Physiol Rev **77**(2): 397-424.
- Freedberg, I. M., M. Tomic-Canic, et al. (2001). "Keratins and the keratinocyte activation cycle." J Invest Dermatol **116**(5): 633-40.
- Gartel, A. L. and S. K. Radhakrishnan (2005). "Lost in transcription: p21 repression, mechanisms, and consequences." Cancer Res **65**(10): 3980-5.
- Gazel, A., P. Ramphal, et al. (2003). "Transcriptional profiling of epidermal keratinocytes: comparison of genes expressed in skin, cultured keratinocytes, and reconstituted epidermis, using large DNA microarrays." J Invest Dermatol **121**(6): 1459-68.

Bibliographie

- Gschwendt, M. (1999). "Protein kinase C delta." Eur J Biochem **259**(3): 555-64.
- Haase, I., R. Evans, et al. (2003). "Regulation of keratinocyte shape, migration and wound epithelialization by IGF-1- and EGF-dependent signalling pathways." J Cell Sci **116**(Pt 15): 3227-38.
- Hosoi, Y., L. N. Kapp, et al. (2006). "Suppression of anchorage-independent growth by expression of the ataxia-telangiectasia group D complementing gene, ATDC." Biochem Biophys Res Commun **348**(2): 728-34.
- Ichihashi, M., M. Ueda, et al. (2003). "UV-induced skin damage." Toxicology **189**(1-2): 21-39.
- Jenkins, G. (2002). "Molecular mechanisms of skin ageing." Mech Ageing Dev **123**(7): 801-10.
- Kampinga, H. H. (2006). "Chaperones in preventing protein denaturation in living cells and protecting against cellular stress." Handb Exp Pharmacol(172): 1-42.
- Katiyar, S. K. (2007). "UV-induced immune suppression and photocarcinogenesis: Chemoprevention by dietary botanical agents." Cancer Lett.
- Knebel, A., H. J. Rahmsdorf, et al. (1996). "Dephosphorylation of receptor tyrosine kinases as target of regulation by radiation, oxidants or alkylating agents." Embo J **15**(19): 5314-25.
- Laderoute, K. R., A. M. Knapp, et al. (1996). "Expression of the ATDC (ataxia telangiectasia group D-complementing) gene in A431 human squamous carcinoma cells." Int J Cancer **66**(6): 772-8.
- Lambert, C., R. A. Schultz, et al. (1991). "Functional complementation of ataxia-telangiectasia group D (AT-D) cells by microcell-mediated chromosome transfer and mapping of the AT-D locus to the region 11q22-23." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(13): 5907-11.
- Lehmann, B., K. Querings, et al. (2004). "Vitamin D and skin: new aspects for dermatology." Exp Dermatol **13** Suppl 4: 11-5.
- Leonhardt, E. A., L. N. Kapp, et al. (1994). "Nucleotide sequence analysis of a candidate gene for ataxia-telangiectasia group D (ATDC)." Genomics **19**(1): 130-6.
- Li, D., T. G. Turi, et al. (2001). "Rays and arrays: the transcriptional program in the response of human epidermal keratinocytes to UVB illumination." Faseb J **15**(13): 2533-5.
- Mancini, A. J. (2004). "Skin." Pediatrics **113**(4 Suppl): 1114-9.
- McKinnon, P. J. (2004). "ATM and ataxia telangiectasia." EMBO Rep **5**(8): 772-6.
- Miller, C. C., P. Hale, et al. (1994). "Ultraviolet B injury increases prostaglandin synthesis through a tyrosine kinase-dependent pathway. Evidence for UVB-induced epidermal growth factor receptor activation." J Biol Chem **269**(5): 3529-33.
- Oren, M. (2003). "Decision making by p53: life, death and cancer." Cell Death Differ **10**(4): 431-42.
- Petropoulos, I., M. Conconi, et al. (2000). "Increase of oxidatively modified protein is associated with a decrease of proteasome activity and content in aging epidermal cells." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **55**(5): B220-7.
- Peus, D., R. A. Vasa, et al. (1999). "UVB activates ERK1/2 and p38 signaling pathways via reactive oxygen species in cultured keratinocytes." J Invest Dermatol **112**(5): 751-6.
- Peus, D., R. A. Vasa, et al. (1998). "H₂O₂ is an important mediator of UVB-induced EGF-receptor phosphorylation in cultured keratinocytes." J Invest Dermatol **110**(6): 966-71.
- Poumay, Y. and M. R. Pittelkow (1995). "Cell density and culture factors regulate keratinocyte commitment to differentiation and expression of suprabasal K1/K10 keratins." J Invest Dermatol **104**(2): 271-6.
- Rai, R. and C. R. Srinivas (2007). "Photoprotection." Indian J Dermatol Venereol Leprol **73**(2): 73-9.

Bibliographie

- Raj, D., D. E. Brash, et al. (2006). "Keratinocyte apoptosis in epidermal development and disease." J Invest Dermatol **126**(2): 243-57.
- Reymond, A., G. Meroni, et al. (2001). "The tripartite motif family identifies cell compartments." Embo J **20**(9): 2140-51.
- Reynolds, J. G., S. A. McCalmon, et al. (2007). "Identification and mapping of protein kinase A binding sites in the costameric protein myospryn." Biochim Biophys Acta **1773**(6): 891-902.
- Rittie, L. and G. J. Fisher (2002). "UV-light-induced signal cascades and skin aging." Ageing Res Rev **1**(4): 705-20.
- Rodeck, U., M. Jost, et al. (1997). "EGF-R dependent regulation of keratinocyte survival." J Cell Sci **110** (Pt 2): 113-21.
- Saladi, R. N. and A. N. Persaud (2005). "The causes of skin cancer: a comprehensive review." Drugs Today (Barc) **41**(1): 37-53.
- Schaeffer, H. J. and M. J. Weber (1999). "Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers." Mol Cell Biol **19**(4): 2435-44.
- Scharffetter-Kochanek, K., P. Brenneisen, et al. (2000). "Photoaging of the skin from phenotype to mechanisms." Exp Gerontol **35**(3): 307-16.
- Silvander, M., L. Ringstad, et al. (2006). "A new water-based topical carrier with polar skin-lipids." Lipids Health Dis **5**: 12.
- Slominski, A., D. J. Tobin, et al. (2004). "Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation." Physiol Rev **84**(4): 1155-228.
- Smith, M. L. and A. J. Fornace, Jr. (1997). "p53-mediated protective responses to UV irradiation." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(23): 12255-7.
- Steinberg, S. F. (2004). "Distinctive activation mechanisms and functions for protein kinase Cdelta." Biochem J **384**(Pt 3): 449-59.
- Tauchi, H., C. Green, et al. (2000). "Altered splicing of the ATDC message in ataxia telangiectasia group D cells results in the absence of a functional protein." Mutagenesis **15**(2): 105-8.
- Taylor, W. R. and G. R. Stark (2001). "Regulation of the G2/M transition by p53." Oncogene **20**(15): 1803-15.
- Toker, A. (1998). "Signaling through protein kinase C." Front Biosci **3**: D1134-47.
- Tyrrell, R. M. (1995). "Ultraviolet radiation and free radical damage to skin." Biochem Soc Symp **61**: 47-53.
- Watt, F. M. (1998). "Epidermal stem cells: markers, patterning and the control of stem cell fate." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **353**(1370): 831-7.
- Xu, Y., J. J. Voorhees, et al. (2006). "Epidermal growth factor receptor is a critical mediator of ultraviolet B irradiation-induced signal transduction in immortalized human keratinocyte HaCaT cells." Am J Pathol **169**(3): 823-30.
- Yang, J., Y. Yu, et al. (2003). "ATM, ATR and DNA-PK: initiators of the cellular genotoxic stress responses." Carcinogenesis **24**(10): 1571-80.
- Ziv, Y., D. Bielopolski, et al. (2006). "Chromatin relaxation in response to DNA double-strand breaks is modulated by a novel ATM- and KAP-1 dependent pathway." Nat Cell Biol **8**(8): 870-6.

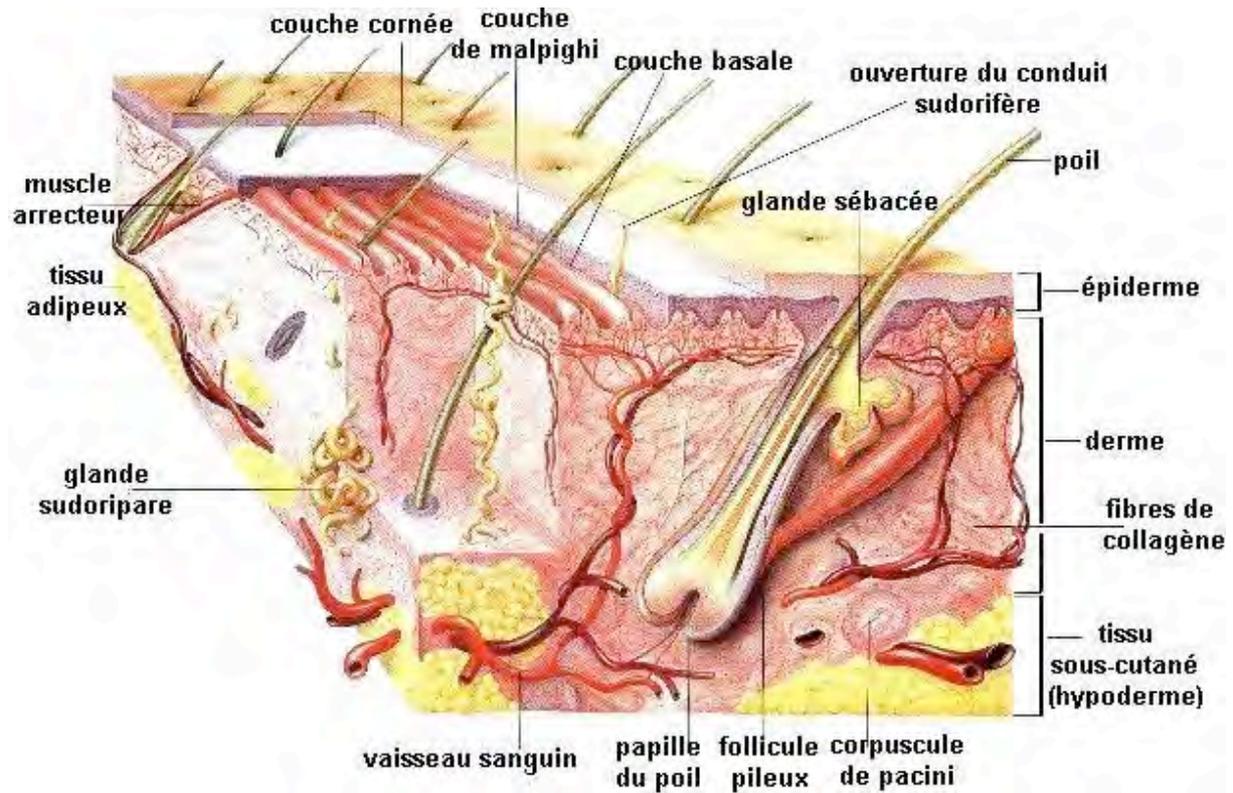


Figure 1 : Schéma présentant les trois couches de la peau, épiderme, derme et hypoderme ainsi que les différentes annexes cutanées. La couche de malpighi correspond à la couche épineuse de l'épiderme. Les corpuscules de pacini, situés en profondeur dans le derme, sont des récepteurs sensoriels formés de terminaisons encapsulées. Ils sont sensibles aux pressions et aux vibrations et sont donc impliqués dans le toucher. Au niveau des poils, la papille du poil correspond à la partie de celui-ci qui le connecte au tissu conjonctif du derme tandis que le follicule pileux est un développement anatomique en forme de sac dans lequel pousse le poil.

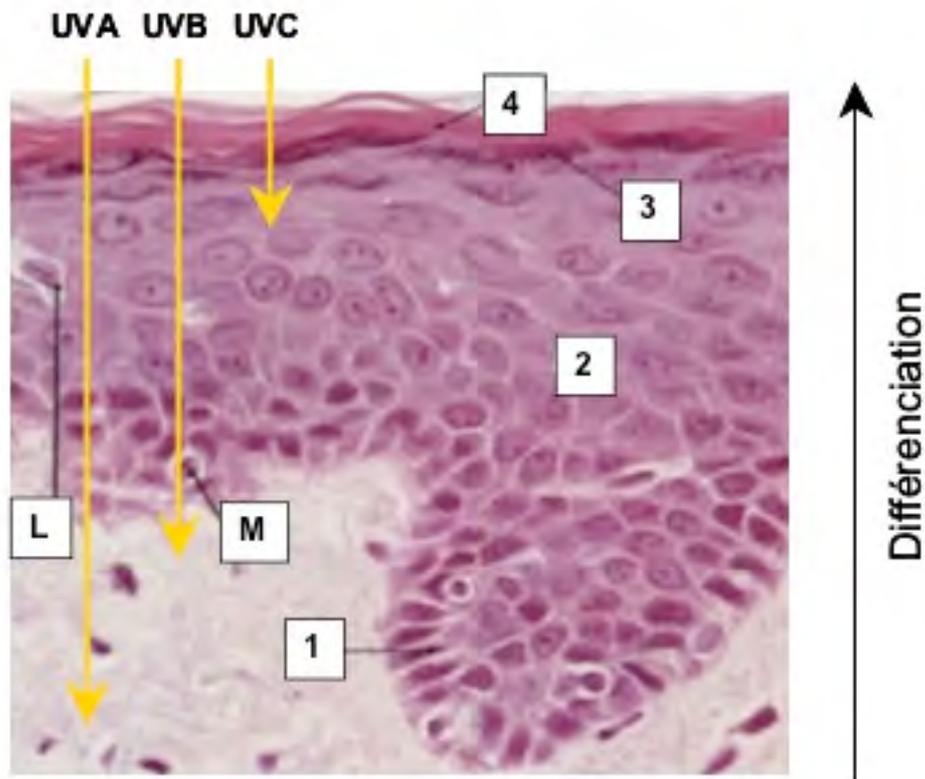


Figure 2 : Coupe histologique de l'épiderme. Les kératinocytes entrent en différenciation à partir de la couche basale (1) ce qui mène à une organisation en quatre couches distinctes : la couche basale (1), la couche épineuse (2), la couche granuleuse (3) et la couche cornée (4). Des mélanocytes (M) et cellules de Langerhans (L) sont également présentes parmi les kératinocytes.

Les rayons ultraviolets ne pénètrent pas tous de la même manière dans les couches de la peau. Plus leur longueur d'onde est grande, plus ils pénètrent profondément. Les UVA pénètrent jusque dans l'hypoderme. Les UVB pénètrent jusqu'au derme supérieur. Enfin, les UVC ne pénètrent pas plus profondément que l'épiderme.

www.theses.ulaval.ca/2005/22519/ch01.html

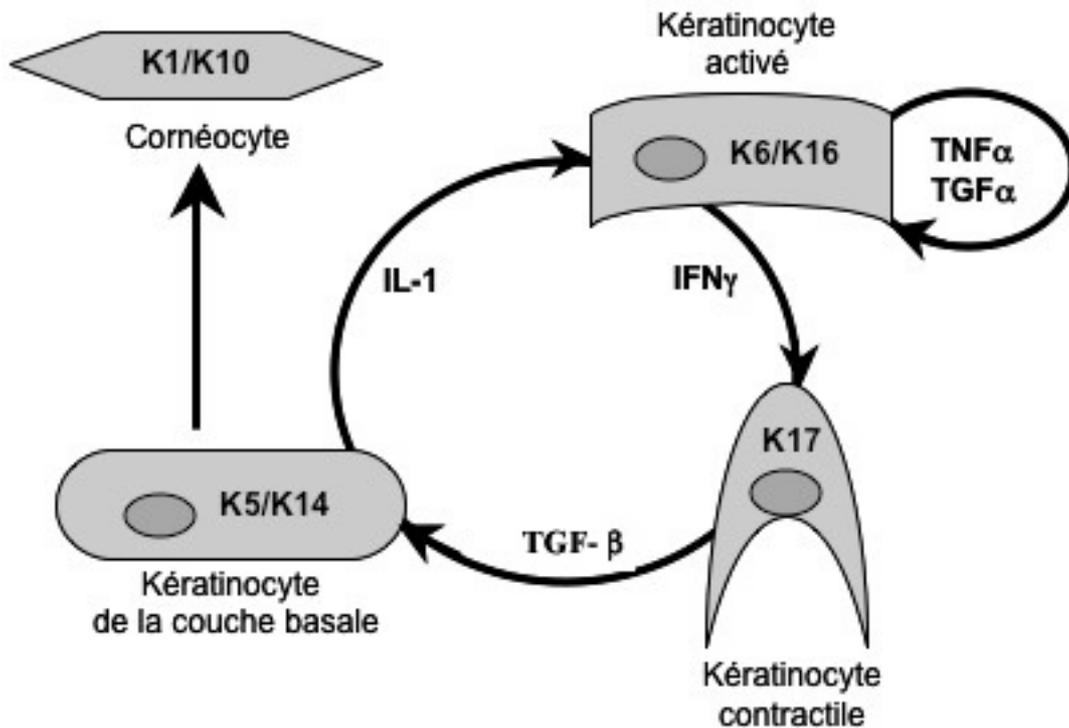


Figure 3 : Schéma présentant la voie d'activation des kératinocytes. Les kératinocytes de la couche basale expriment principalement les kératines 5 et 14. Lors de dommages à l'épiderme, l'IL-1, stockée dans le cytoplasme des kératinocytes, est libérée dans le milieu extracellulaire par les kératinocytes blessés. L'IL-1 ainsi libérée permet alors l'activation des kératinocytes voisins. Les kératinocytes activés, qui expriment les kératines 6 et 16, entretiennent leur activation et entraînent celle de leurs voisins par sécrétion de TNF α et TGF α . Dans les dernières étapes de la réparation tissulaire, c'est sous l'action de l'IFN γ que ces kératinocytes activés acquièrent leur capacité de contraction. À ce moment, ils expriment préférenciellement la kératine 17. Lorsque la cicatrisation est en phase terminale, les kératinocytes activés reçoivent un signal de dé-activation, principalement *via* le TGF- β . Une fois revenus à leur état basal, les kératinocytes peuvent entrer dans la voie de différenciation classique jusqu'à se transformer en cornéocytes qui sont caractérisés par la présence des kératines 1 et 10.

Freedberg, Tomic-Canic et al.2001

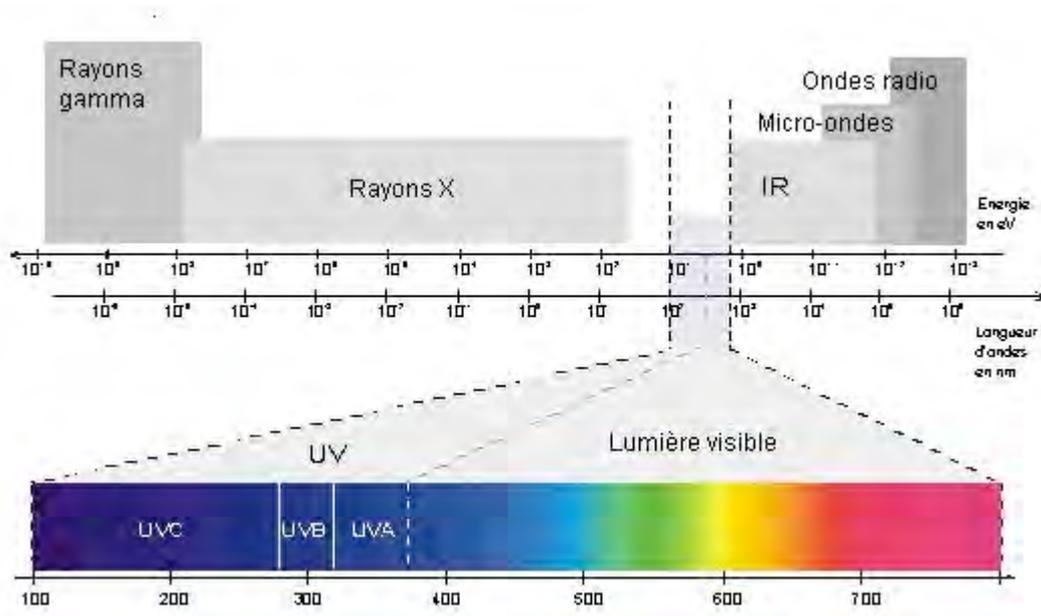


Figure 4 : Spectre des radiations électromagnétiques émises par le soleil. Les rayons ultraviolets ont des longueurs d'ondes inférieures à celles de la lumière visible et supérieures à celles des rayons X à savoir comprises entre 100 et 400 nm.
www.honleuv.fr/Rayonnement_uv.htm

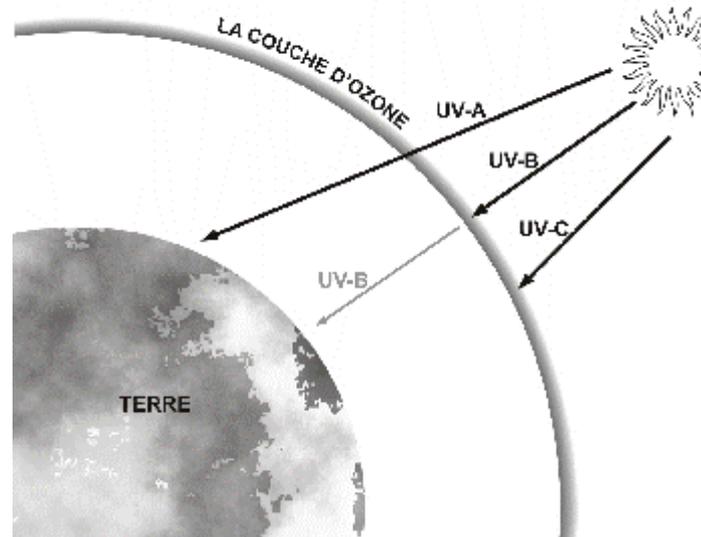


Figure 5 : Les rayonnements émis par le soleil ne parviennent pas tous à atteindre la surface terrestre. En effet, les rayons de longueur d'onde inférieure à 300 nm sont absorbés par la couche d'ozone de l'atmosphère. Dans le cas des rayons ultraviolets, cela concerne les UVC et un pourcentage assez important des UVB. Malheureusement pour la santé humaine, la réduction de la densité de cette couche d'ozone a pour conséquence le passage de rayons de longueurs d'onde de plus en plus petites, plus énergétiques et donc plus dangereuses.
http://www.weatheroffice.pyr.ec.gc.ca/skywatchers/teachersGuide/tg_chap06_f.html

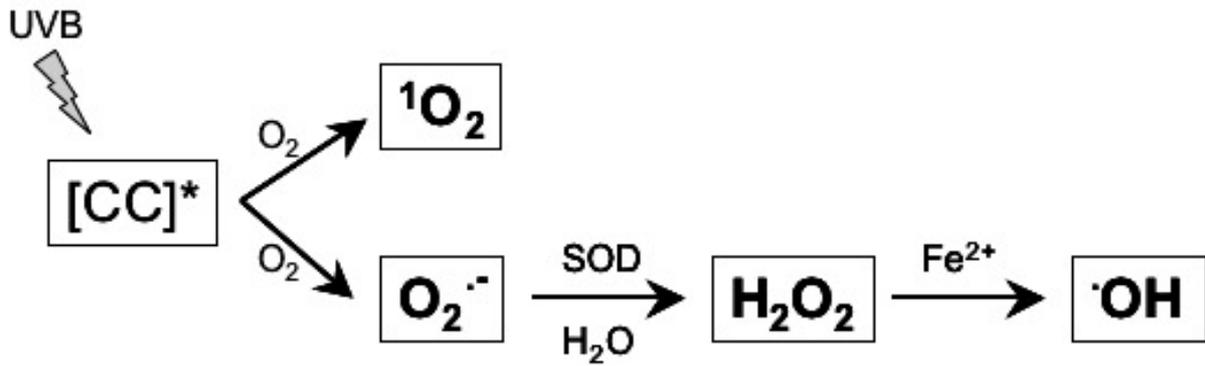
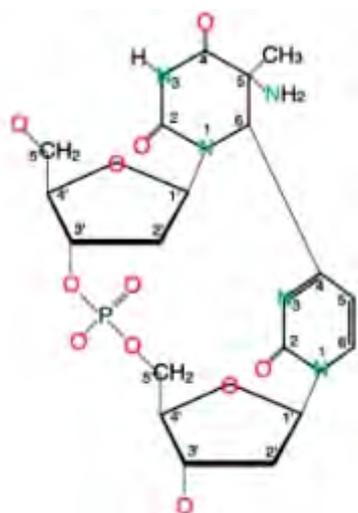


Figure 6 : Lorsqu'un chromophore cellulaire (CC) absorbe un rayonnement UV, il se retrouve sous forme excitée (*). Or, un chromophore sous forme excitée réagit avec l'oxygène pour donner des anions superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et des oxygènes singulets (1O_2). $O_2^{\cdot-}$ est ensuite converti en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par la superoxyde dismutase (SOD) et en présence d'eau (H_2O). H_2O_2 peut, en présence de fer (Fe^{2+}), être lui-même converti en un radical hydroxyle ($\cdot OH$). Ce sont 1O_2 et $\cdot OH$ qui sont les principaux acteurs agissant sur les constituants cellulaires tels que les lipides, les protéines et l'ADN.

6-4 PP



DCP

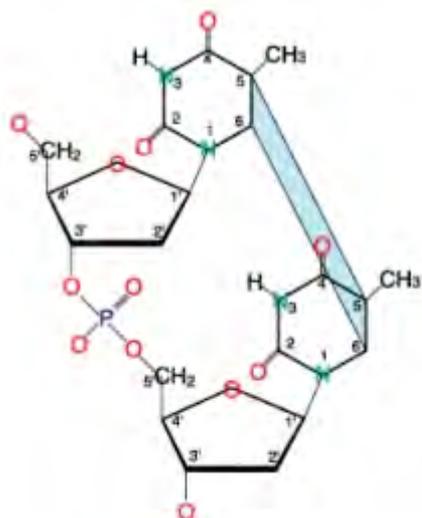


Figure 7 : Représentation schématique d'un photoproduit de pyrimidine (6-4) pyrimidone (6-4 PP) et d'un dimère cyclobutyliques de pyrimidines (DCP).

www.theses.ulaval.ca/2005/22519/ch01.html

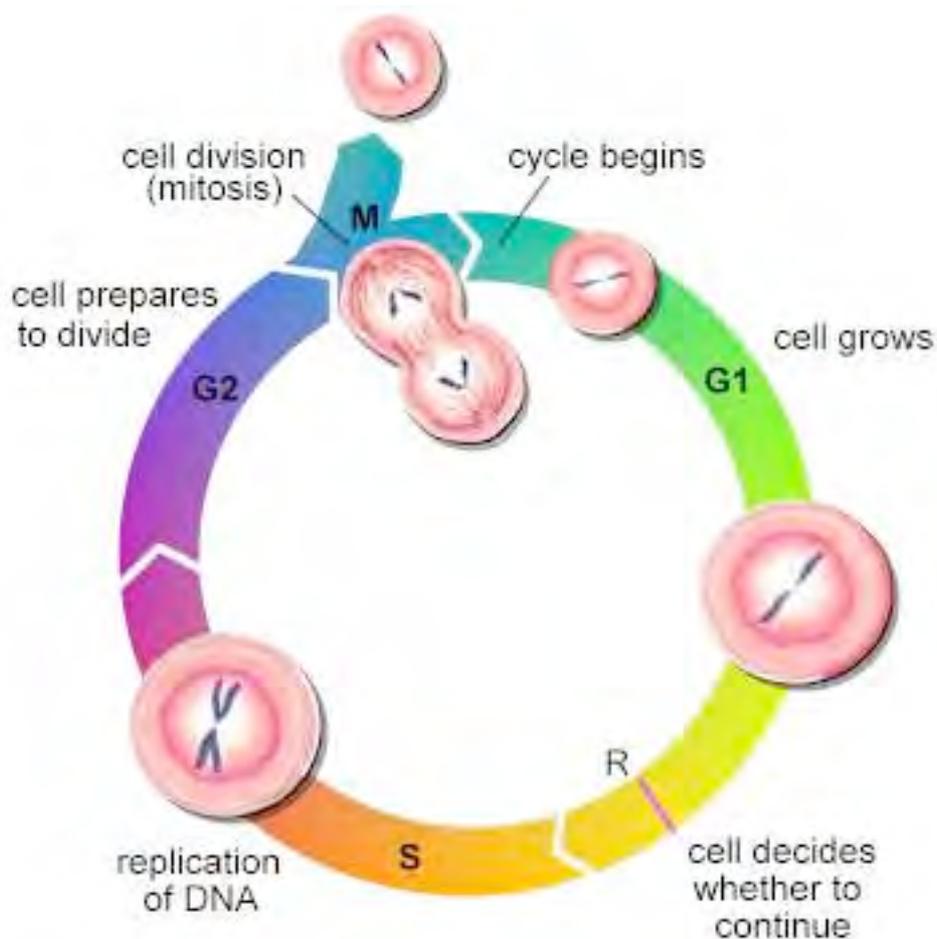


Figure 8 : Schéma représentant le cycle cellulaire. Au début du cycle, la cellule est en phase G1 qui correspond à la phase de croissance qui prépare la cellule à la réplication de son ADN. À ce moment, la cellule ne présente qu'une seule copie de son génome. Juste avant l'entrée en phase S, qui correspond à la phase de réplication de l'ADN, il y a le point de contrôle le plus important du cycle cellulaire. En effet, la cellule ne va pas commencer la réplication de son ADN si il y a des dommages à réparer. La phase S terminée, la cellule possède deux copies de son génome et entre dans la phase G2. Dans cette phase, la cellule se prépare à la division en produisant tous les éléments qui lui seront nécessaires. L'arrêt du cycle cellulaire lors de dommages à l'ADN peut également avoir lieu lors de cette phase G2. Enfin, la phase M est la phase de la mitose où la cellule de départ donne deux cellules filles ayant chacune une copie du génome. Ces cellules filles pourront ensuite à leur tour entrer en phase G1.

http://teachline.ls.huji.ac.il/72373/substance_x/cell-cycle2.jpe

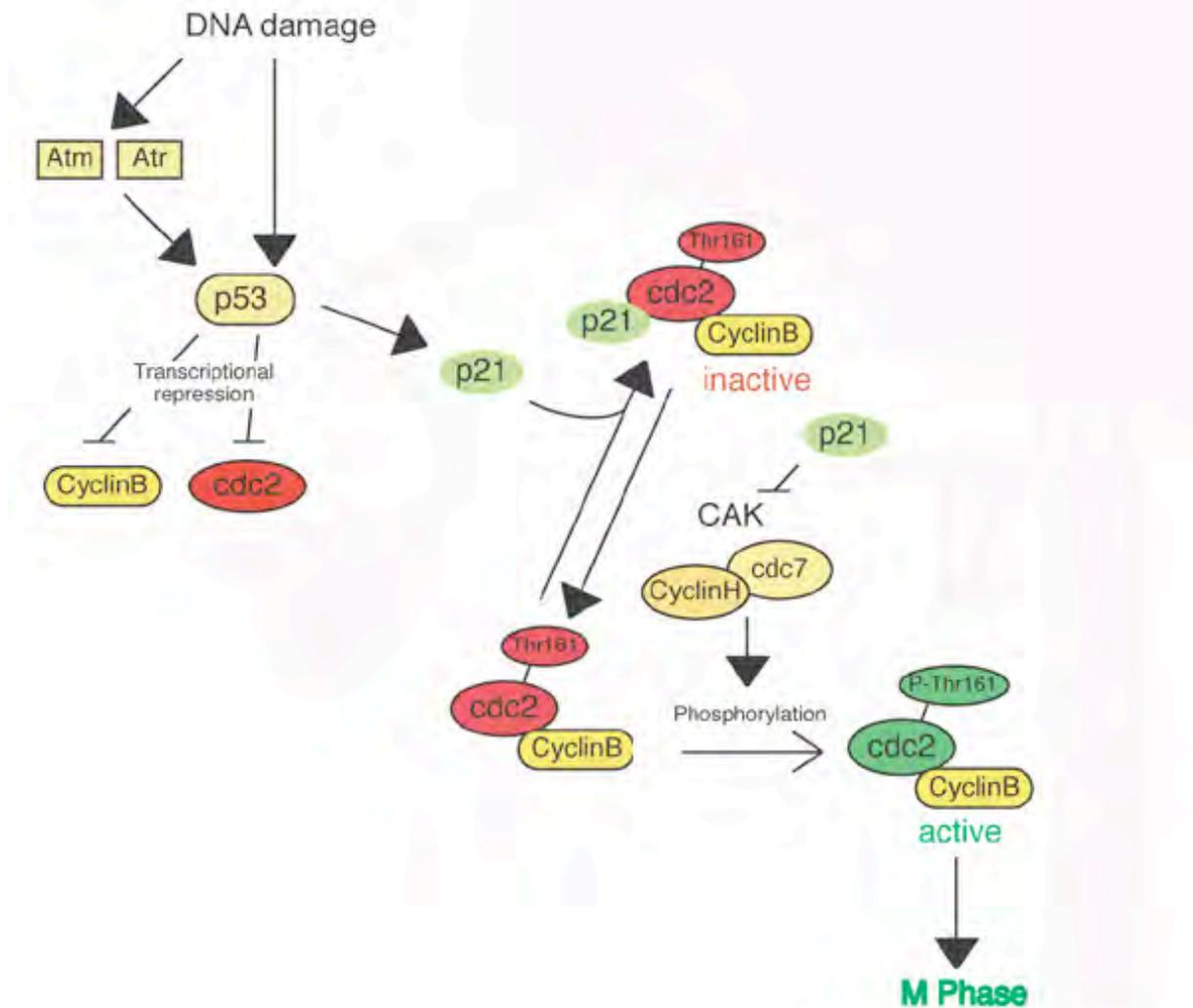


Figure 9 : Représentation schématique de la voie de signalisation médiée par p53 et p21^{WAF-1} menant à l'arrêt du cycle cellulaire. Lorsqu'il y a des dommages à l'ADN, p53 est activé de manière dépendante ou indépendante d'ATM/ATR. p53 conduit à l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2 en inhibant la transcription de la Cycline B et de Cdc2 qui sont essentielles au passage en mitose. Mais p53 agit également *via* l'activation de la transcription de p21^{WAF-1}. p21^{WAF-1} peut bloquer le cycle cellulaire aussi bien au niveau de la phase G1 que de la phase G2. Au niveau de la phase G2, il bloque le cycle cellulaire en se liant au complexe formé par la Cycline B et Cdc2, le rendant ainsi inactif, ou en inhibant CAK (Cdk Activating Kinase) qui est nécessaire pour l'activation du complexe Cycline B - Cdc2.

http://www.brc.riken.jp/lab/dna/en/GENESETBANK/p53-G2_arrest.png

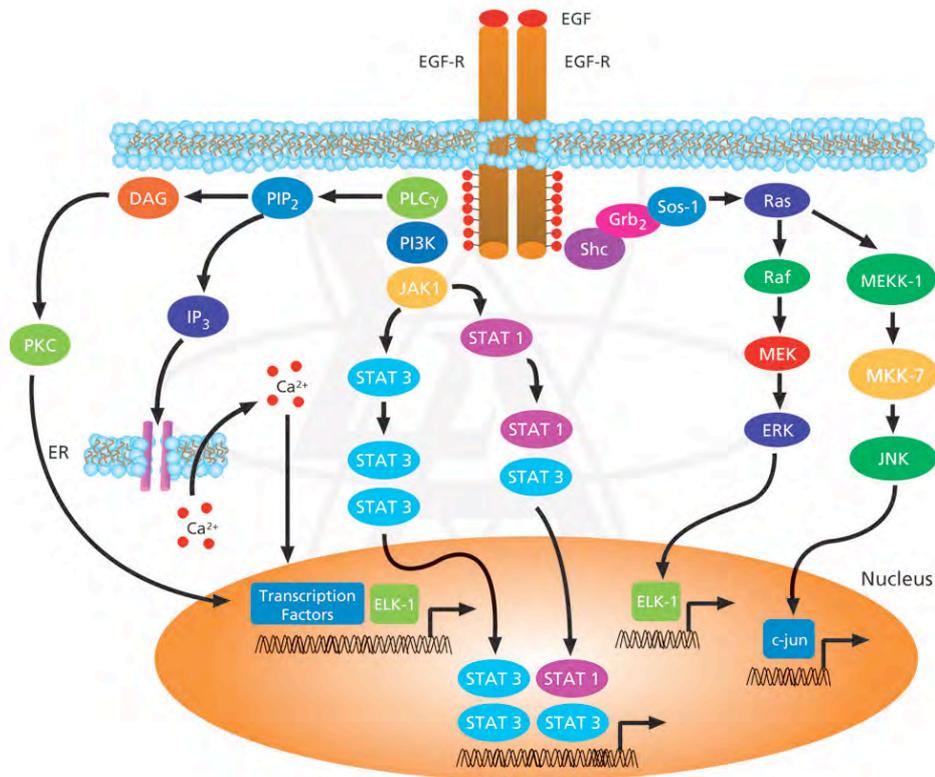


Figure 10 : Représentation schématique des voies de signalisation induites par l'activation du récepteur à l'EGF. Cette activation peut mener à l'activation de la voie des MAPK via Ras, la voie des PKC via le DAG et l'IP3 et la voie des STAT.

http://www.sigmaldrich.com/img/assets/6460/egf_r.gif

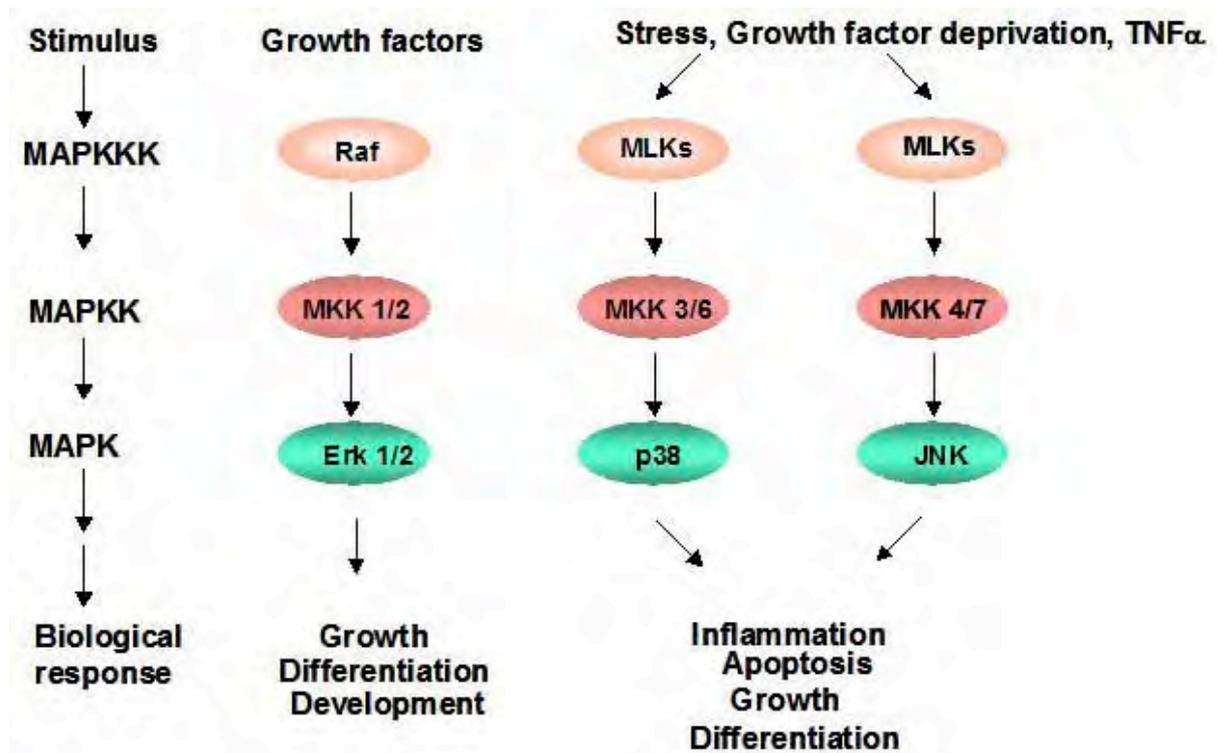


Figure 11 : Les trois voies principales des MAPK sont celles menant à l'activation de ERK, de p38^{MAPK} et de JNK. Ces voies sont organisées en un module de trois kinases : les MAPK, les MAPKK (ou MEK) et les MAPKKK (ou activateur de MEK). Lorsque la MAPKKK est activée par Ras (voir figure 6), elle phosphoryle et active la MAKK qui peut alors activer la MAPK. Celle-ci va phosphoryler des facteurs de transcription ou d'autres protéines impliquées dans la réponse cellulaire induite. La voie classique de ERK semble impliquée dans la prolifération cellulaire et les voies de JNK et p38^{MAPK} seraient plus activées en réponse à des stress.

<http://www.bch.msu.edu/faculty/gallo/mapk-pathways-new.jpg>

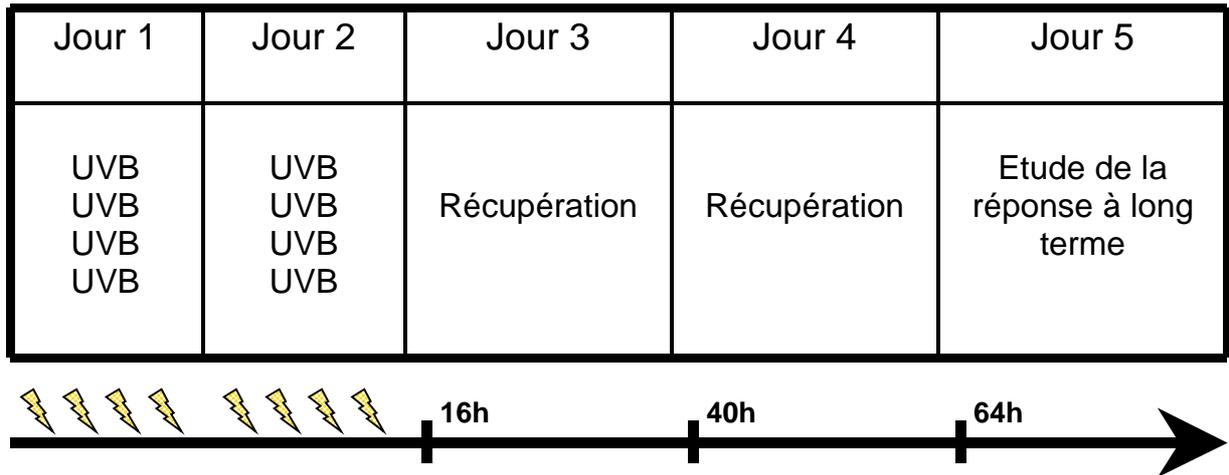


Figure 12 : Le modèle de stress utilisé pour étudier la réponse à long terme des kératinocytes après des expositions répétées aux UVB s'étale sur cinq jours. Pendant les deux premiers jours, les cellules N-hTERT subissent huit expositions aux UVB à 300 mJ par cm² et par dose, à raison de quatre stress par jours. Les jours suivants permettent aux cellules de récupérer. Pour étudier les profils d'abondance protéique, des extractions sont réalisées à 16 h, 40 h et 64 h après la dernière exposition.

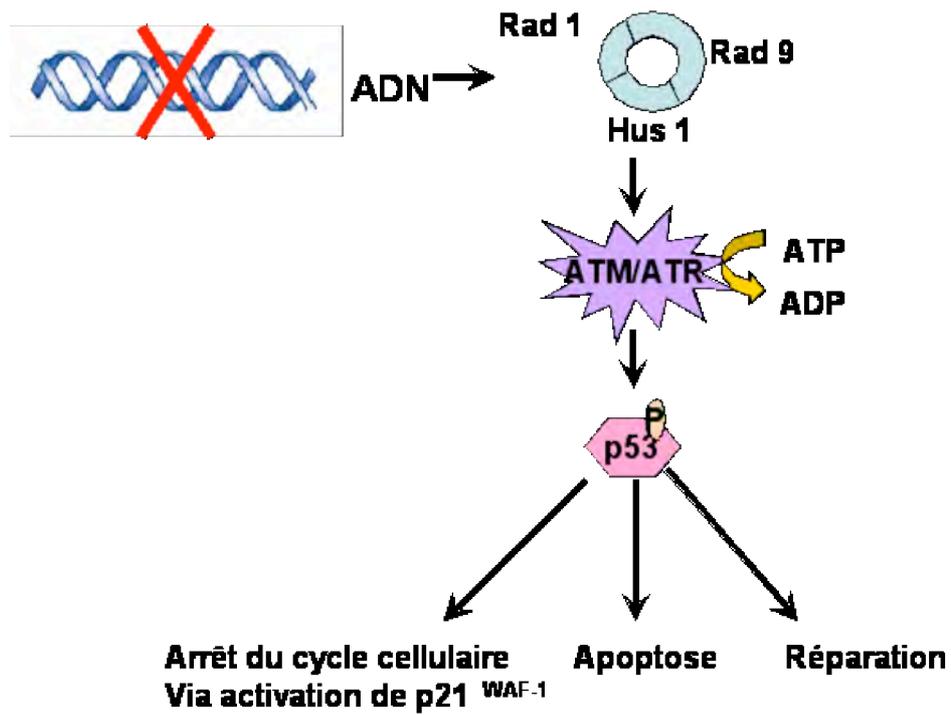


Figure 13 : Lorsqu'il y a des dommages à l'ADN, ceux-ci peuvent être repérés par un hétérotrimère de protéines de la famille Rad. Celles-ci activent alors ATM et ATR qui par consommation d'un ATP vont phosphoryler leurs différents substrats dont p53.

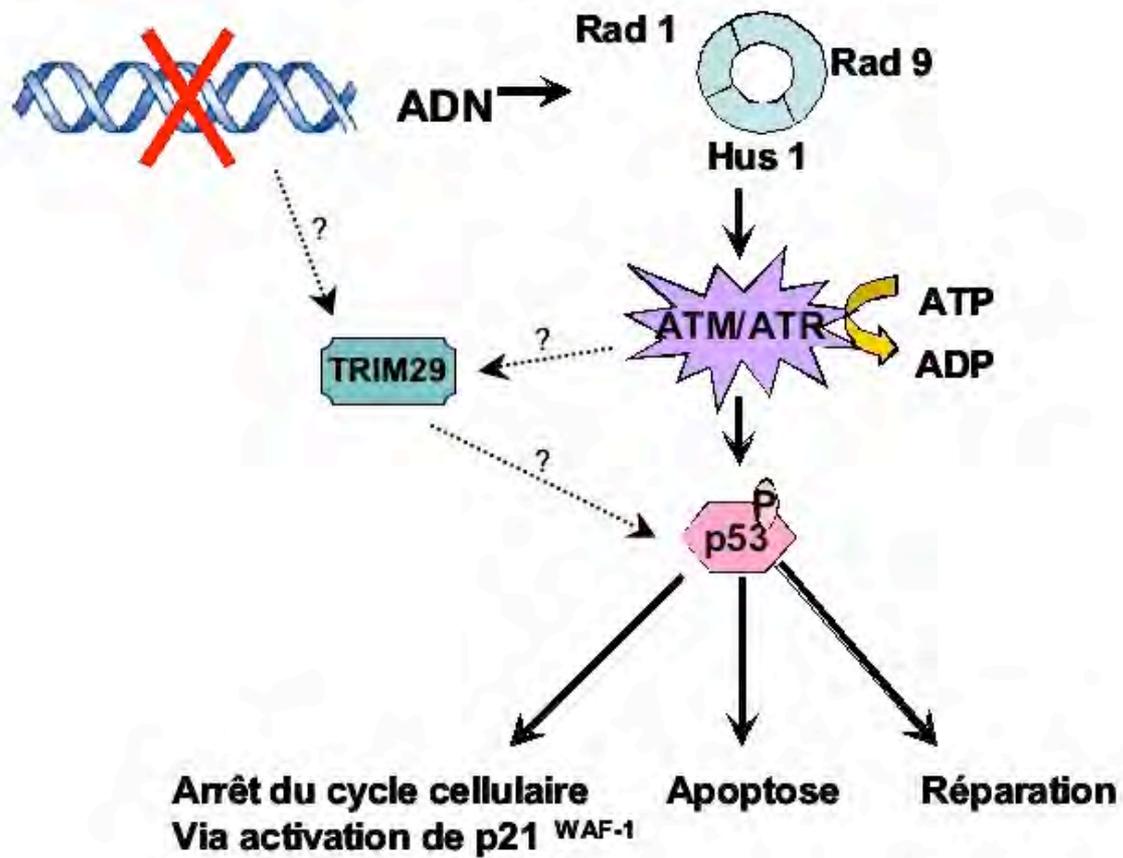


Figure 14 : Lors de ce mémoire, nous allons tenter de préciser le rôle de TRIM29 dans la voie de signalisation en réponse aux dommages à l'ADN générés par les expositions répétées et sub-létales aux UVB.

Tableau 1 : Matériel et solutions utilisés pour la culture des kératinocytes N-hTERT

Matériel et solutions	Composition	Références
Epilife	Milieu sans sérum avec CaCl ₂ 0,06 mM	Cascade Biologics, USA
Human Keratinocytes Growth Serum ou HKGS	BPE (Bovine Pituitary Extract) 0,2 % v/v ; EGF (Epidermal Growth Factor) 0,2 ng/ml ; Hydrocortisone 0,18 µg/ml ; Insuline bovine 5 µg/ml ; Transferrine bovine 5 µg/ml	Cascade Biologics, USA
Trypsine- EDTA (acide éthylènediaminetétraacétique)		Invitrogen Corporation USA
Gentamycine	Solution stock : 10 µg/ml Solution finale : 175 µg/ml	Invitrogen Corporation USA
DMEM + FBS (Fetal Bovine Serum)	Milieu Dulbecco's Modified Eagle's Medium enrichi de FBS	<u>DMEM</u> : Gibco, Invitrogen Corporation, USA <u>FBS</u> : Gibco-BRL, UK
DMEM + DMSO (Dimethyl Sulfoxyde)	Milieu Dulbecco's Modified Eagle's Medium enrichi de DMSO	<u>DMEM</u> : Gibco, Invitrogen Corporation, USA <u>DMSO</u> : Sigma, France
Boîtes de culture stériles de 75 cm ² (T75) et de 25 cm ² (T25)		Corning, USA

Tableau 2 : Matériel et solutions utilisés pour la réalisation des stress répétés sub-létaux aux UVB

Matériel et solutions	Composition	Références
Phosphate Buffer Saline (PBS)	Tampon phosphate salin (10 mM, NaCl 0,9 %, pH 7,4) porter à volume avec de l'eau distillée	<u>NaCl</u> : Merck, Germany
Epilife + HKGS + Gentamycine		<u>Epilife</u> : Cascade Biologics, USA <u>HKGS</u> : Cascade Biologics, USA <u>Gentamycine</u> : Invitrogen Corporation, USA
Lampes UVB		(TL20W/01) Philips, The Netherland
Radiomètre et capteur UVB		Bioblock Scientific, Belgium

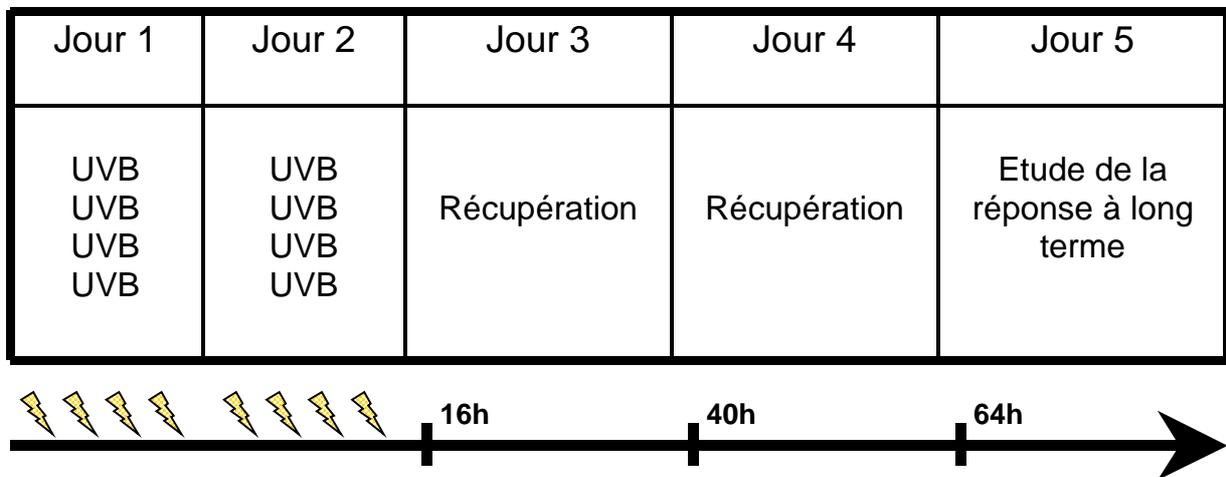


Figure 1 : Le modèle de stress utilisé pour étudier la réponse à long terme des kératinocytes après des expositions répétées aux UVB s'étale sur cinq jours. Pendant les deux premiers jours, les cellules N-hTERT subissent huit expositions aux UVB à 300 mJ par cm² et par dose, à raison de quatre stress par jours. Les jours suivants permettent aux cellules de récupérer. Pour étudier les profils d'abondance protéique, des extractions sont réalisées à 16 heures, 40 heures et 64 heures après la dernière exposition.

Tableau 3 : Matériel et solutions utilisés pour les extractions protéiques

Matériel et solutions	Composition	Références
Tampon de lyse DLA pH 8,5 DIGE-Labeling-Buffer DLA	Urée 7 M Thiourée 2 M Chaps 2 % DTT (dithiothreitol) 2 %	Invitrogen Corporation, USA
Tampon IP5	Tris HCl pH 8 25 mM NaCl 100 mM NP40 0,5 % (Nonidet P40 substitute)	<u>Tris HCl et NaCl</u> : Merck Germany <u>NP40</u> : Fluka, Switzerland
PIC (Protease Inhibitor Cocktail)		Roche, Germany
PIB (Phosphatase Inhibitor Cocktail)		Roche, Germany
PBS (Phosphate Buffer Saline)	Tampon phosphate salin (10 mM, NaCl 0,9 %, pH 7,4) porter à volume avec de l'eau distillée	<u>NaCl</u> : Merck, Germany
Râteau stérile		TRP, switzerland

Tableau 4 : Matériel et solutions utilisés pour le dosage protéique par la méthode de Bradford

Matériel et solutions	Références
Solution de Bradford	Bio-Rad Protein : Assay Biorad, Germany
Étalon BSA (Bovine Sérum Albumine)	<u>BSA (2 µg/µl)</u> : Merck, Germany
Spectrophotomètre	Ultrospec 2100 pro, USA

Tableau 5 : Matériel et solutions utilisés pour la réalisation des Western blots, des Western blots Nu-PAGE et du Krypton Protein Stain

Matériel et solutions	Composition	Références
<i>Gels à couler Tris-Glycine</i>		
Gel de migration	Tris HCl 1,5 M, pH 8,8, SDS (Sodium Dodécyl Sulfate) 0,4 % Acrylamide 30 %, Bis 0,8 % H ₂ O Temed APS (Amonium persulfate 1 %- 50 mg/ 5 ml H ₂ O)	<u>Tris HCl</u> : Merck, Germany <u>Acrylamide 30 % Bis 0,8 %</u> : Bio-Rad Laboratories, USA <u>Temed et APS</u> : Plus One Pharmacia Biotech
Gel de concentration	Tris HCl 0,5 M, pH 6,8, SDS 0,4 % Acrylamide 30 %, Bis 0,8 % H ₂ O Temed APS	<u>Tris HCl</u> : Merck, Germany <u>Acrylamide 30 % Bis 0,8 %</u> : Bio-Rad Laboratories, USA <u>Temed et APS</u> : Plus One Pharmacia Biotech
Tampon d'électrophorèse (pH 8,3 – 8,4)	Tris-HCl 25 mM Glycine 0,192 M SDS 0,1 %	Merck, Germany
Marqueur de poids moléculaire		See blue Invitrogen Invitrogen Corporation, USA
Bleu de charge 5x	Tris HCl 0,5 M, pH 6,8, SDS 0,4 % SDS 20 % β -mercaptoéthanol Glycérol Bleu de bromophénol	<u>SDS</u> : MP Biomedicals, France <u>β-mercaptoéthanol</u> : Fluka, Germany <u>Glycérol et Bleu de bromophénol</u> : Merck Germany
<i>Transfert</i>		
Membrane polyvinylidène difluoride (PVDF)		Amersham, USA
Tampon de transfert (pH 8,3)	Tris HCl 20 mM Glycine 145 mM Méthanol	<u>Tris HCl et Glycine</u> : Merck, Germany <u>Méthanol</u> : Acros, USA
Méthanol		Acros, USA
<i>Traitement de la membrane</i>		
Tampon de rinçage TBS 1 x Tween 0,1 %	<u>TBS 10 x à diluer pour 1l</u> : 24,22 g de Tris 80,06 g de NaCl Porter à 1l avec de l'H ₂ O Porter à pH 7,4 <u>TBS 1x Tween 0,1 % pour 1l</u> : 100 ml de TBS 10 x 1 ml de Tween 20 Porter à 1l avec de l'H ₂ O	Merck, Germany <u>Tween 20</u> : Sigma, Germany

ECL Advance Western Blotting Detection kit	ECL (Enhanced Chemo Luminescence) Agent bloquant	Amersham, UK
Film autoradiographique		Amersham, UK
Logiciels		Image master laboscan V2003.01
<u>Nu-PAGE</u>		
Gel précoulé		Invitrogen, USA
NOVEX Tris-Acetate SDS Running Buffer (20 x)		Invitrogen, USA
Nu-PAGE Antioxydant		Invitrogen, USA
Nu-PAGE LDS Sample Buffer (4 x)		Invitrogen USA
Nu-PAGE Transfert Buffer (20 x)		Invitrogen USA
<u>Krypton Protein Stain</u>		
Krypton Protein Stain		PIERCE, USA

Tableau 6 : Composition des gels de migration et de concentration en fonction de leur pourcentage de polymérisation

	Gel de migration 12%	Gel de migration 10%	Gel de migration 8%	Gel de concentration
Tris HCl 1,5 M pH 8,8, SDS 0,4 %	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	
Tris HCl 1,5 M pH 6,8, SDS 0,4 %				2,5 ml
Acrylamide 30 %, Bis 0,8 %	4 ml	3,33 ml	2,66 ml	1 ml
H ₂ O	3 ml	3,67 ml	4,33 ml	5,5 ml
Temed	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
APS	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	1 ml
Total	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml

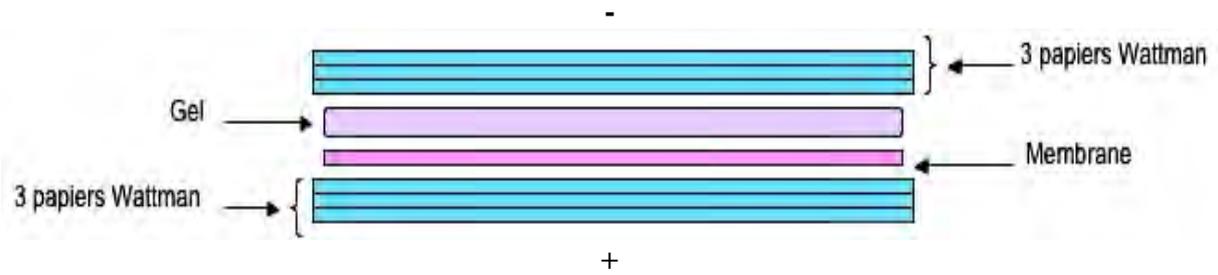


Figure 2 : Représentation schématique du montage du système de transfert. Pour un transfert efficace, les papiers Wattman, la membrane et le gel doivent être imbibés de tampon de transfert. Le montage consiste à superposer d'abord trois papiers Wattman, la membrane, le gel et enfin, à nouveau trois papiers Wattmann. La membrane se situe en dessous du gel du fait que l'anode (+) se situe en dessous du montage et la cathode (-) au dessus. En effet, les protéines étant chargées négativement par le SDS, elles vont migrer vers la cathode.

Tableau 7 : Liste des anticorps primaires et secondaires utilisés dans le cadre des Western blots

Protéines ciblées	Poid moléculaire (kDa)	Dilutions	Espèce	Références
<i>Anticorps primaires</i>				
TRIM29	65	1/4.000	chèvre	Sc-1613 Santa Cruz, Germany
TRIM29	65	1/4.000	lapin	IMG-5277A Imgenex Corporation, San Diego, CA
p53	53	1/1000	souris	05-224 Upstate, UK
p21	21	1/500	souris	65951A BD Pharmingen, BD Biosciences, USA
PARP	116 85 (forme clivée)	1/3000	souris	51-6639GR BD Pharmingen, BD Biosciences, USA
α -tubuline humaine	55	1/50.000	souris	Sc-8035 Santa Cruz, Germany
<i>Anticorps secondaires</i>				
IgG de souris		1/200.000	mouton	Amersham Pharmacia Biotechnology, Bukinghamshire
IgG de lapin		1/150.000	chèvre	Amersham Pharmacia Biotechnology, Bukinghamshire
IgG de chèvre		1/150.000	lapin	Dako, A/S, Danemark

Tableau 8 : Matériel et solution utilisés pour la réalisation des co-immunoprécipitations

Matériel et solutions	Composition	Références
Immunoprecipitation Starter Pack	Billes coâtées avec des protéines A et G	GE Healthcarre, sweden
Tampon IP 1	Tris HCl pH 8 50 mM NaCl 150 mM Np40 0,5 % EDTA 5 mM	<u>Tris HCl, NaCl et EDTA</u> : Merck Germany <u>NP40</u> : Fluka, Switzerland
Tampon IP 2	Tris HCl pH 7,5 20 mM NaCl 150 mM Triton X-100 1 % EDTA 1 mM	Merck Germany
Tampon IP 4	Tris HCl pH 7,5 50 mM NaCl 150 mM Np40 1 % EDTA 1 mM	<u>Tris HCl, NaCl et EDTA</u> : Merck Germany <u>NP40</u> : Fluka, Switzerland
Tampon IP 5	Tris HCl pH 8 25 mM NaCl 100 mM NP40 0,5 % (Nonidet P40 substitute)	<u>Tris HCl et NaCl</u> : Merck Germany <u>NP40</u> : Fluka, Switzerland
Wash Buffer	Tris HCl pH 8 50 mM	Merck, Germany
Sample Buffer	Tris HCl pH 7,5 50 mM DTT 100 mM SDS 1 %	<u>Tris HCl</u> : Merck, Germany <u>SDS</u> : MP Biomedicals, France

Tableau 9 : Liste des anticorps utilisés pour les co-immunoprécipitations

Protéines ciblées	Poid moléculaire (kDa)	Espèce	Références
TRIM29	65	chèvre	Sc-1613 Santa Cruz, Germany
TRIM29	65	lapin	IMG-5277A Imgenex Corporation, San Diego, CA
p53	53	souris	05-224, Upstate, UK
P53	53	lapin	Sc-6243 Santa Cruz, Germany
ATM	370	souris	GTX-70103 GeneTex, The Netherlands
ATR	301	souris	GTX-70109 GeneTex, The Netherlands

Tableau 10 : Matériel et solutions utilisés pour les extractions d'ARN

Matériel et solutions	Références
Kit extraction ARNm RNAgents : <ul style="list-style-type: none">• RNAgents Denaturing Solution• Acétate de sodium 2 M pH 4,0• Alcool Phénol:Chloroforme:Isoamyl (99:24:1, pH 4,7)• Isopropanol• Eau RNase-free	Promega, USA
Ethanol 75 % RNase-free	Merck, Germany
PBS (phosphate buffer saline) : Tampon phosphate salin (10 mM, NaCl 0,9 %, pH 7,4)	<u>NaCl</u> : Merck, Germany

Tableau 11 : Matériel et solutions utilisés pour la transcription inverse

Matériel et solutions	Références
Tampon FS 5 x	Invitrogen Corporation, USA
DTT 0,1 M	Invitrogen Corporation, USA
Inhibiteur de Ribonucléase RNasin	Promega, USA
Amorces Oligo (dT) (12-18)	Invitrogen Corporation, USA
Reverse Transcriptase Superscript II	Invitrogen Corporation, USA
Ribonucléase H	Invitrogen Corporation, USA
Eau sans Nucléase	Promega, USA
dNTP set	Eurogentec, Belgium

Tableau 12 : Matériel et solutions utilisés pour la RT-PCR en temps réel

Matériel et solutions	Séquence des amorces	Références
SYBR Green PCR Master Mix		Applied Biosystems, USA
Amorces sens et antisens		Applied Biosystems, USA
TRIM29	CTA TGT GAA CAA CTA CAC GAA CAG CTT et TGT CAG GTA CAT GGA GTA TCT CTT CAT	
p21 ^{WAF-1}	CTG GAG ACT CTC AGG GTC GAA et CCA GGA CTG CAG GCT TCC T	
Involucrine	GTG GCC ACC CAA ACA TAA ATA AC et CCT AGC GGA CCC GAA ATA AGT	
MMP-9	CCT TCC TTA TCG CCG ACA AGT et ACC GAC GCG CCT GTG TAC	
GAPDH	ACC CAC TCC TCC ACC TTT GAC et GTC CAC CAC CCT GTT GCT GTA	
Plaque 96 puits		Applied Biosystems, USA
SDS 2.2.1		Applied Biosystems, USA

Tableau 13 : Matériel et solutions utilisés pour le MTT

Matériel et solutions	Composition	Références
MTT [bromure de 3,(4,5-diméthyl-thiazol-2-yl) diphényltétrazolium]	MTT (2,5 mg/ml dans PBS) + ajouter le même volume de milieu Epilife	Sigma, USA
Solution de lyse	Préparer 2 volumes de SDS 30 % (dilué dans de l'eau distillée et chauffé à 37°C) et 1 volume de N,N-diméthyl-formamide pH 4,7 Solution à conserver à 37°C	Sigma, USA
Filtre de 0,20 µm		Sarstedt, Germany
Plaques 24 puits		Costar, USA
Lecteur de multi-plaques		Ultramark, BioRad, USA

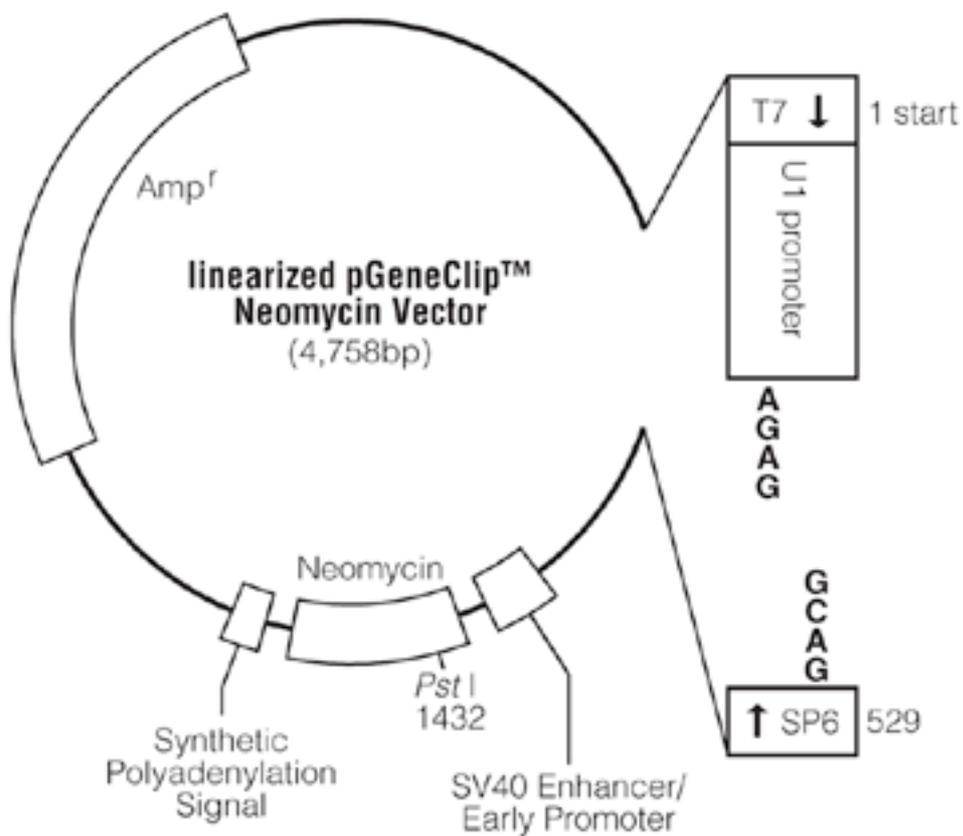


Figure 3 : Plasmide utilisé pour la transfection des cellules N-hTERT. Ce plasmide de 4818 pb est caractérisé par une résistance à l'ampicilline qui permettra de sélectionner les bactéries transformées et par une résistance à la néomycine qui permettra de sélectionner les cellules transfectées. Ce plasmide présente également un site de restriction Pst I. Lorsque la séquence d'intérêt est bien insérée dans le plasmide, celui-ci présente alors deux sites de restriction Pst I qui permettront d'obtenir des fragments de taille bien précise, à savoir de 991 pb et 3827 pb.

Tableau 14 : Matériel et solutions utilisés pour la transformation bactérienne

Matériel et solutions	Composition	Références
E.Coli Sure		
Sure Silencing sh RNA Plasmid Human TRIM29		SuperArray, Bioscience Corporation, USA
Pure Yield Plasmid Midiprep System	Solution resuspension cellulaire, Solution de lyse cellulaire, Solution de neutralisation, Solution de lavage de la colonne, Endotoxan Removal Wash	Promega, USA
Difco LB Broth Lennox	20 g dans 1l d'H ₂ O	Becton, Dickinson and Company, USA
Bacto Agar	4g dans 200 ml d'H ₂ O	Becton, Dickinson and Company, USA
Ampicilline		Sigma, Germany
Glycérol		Merck, Germany
Pst I		Promega, USA
Tampon H		Promega, USA
BSA Acétylée		Promega, USA
Agarose		Invitrogen, UK
TBE		Invitrogen, UK
Bromure d'éthidium		Sigma, Germany
Tampon de charge Bleue/Orange 6X		Promega, USA
1 kb DNA Ladder		Promega, USA
Vac-Man Laboratory Vacuum Manifold		Promega, USA

Tableau 15 : Matériel et solutions utilisés pour la transfection des cellules N-hTERT

Matériel et solutions	Composition	Références
Epilife	Milieu sans sérum avec CaCl ₂ 0,06 mM	Cascade Biologics, USA
Human Keratinocytes Growth Serum ou HKGS	BPE 0,2 % v/v ; EGF (Epidermal Growth Factor) 0,2 ng/ml ; Hydrocortisone 0,18 µg/ml ; Insuline bovine 5 µg/ml ; Transferrine bovine 5 µg/ml	Cascade Biologics, USA
Agent de transfection Fugène 6		Roche, USA
Néomycine G418	<u>Solution stock</u> : 50 mg dans 5 ml d'Epilife + HKGS <u>Culture</u> : 250 µl dans 50 ml d'Epilife + HKGS	Gibco, Invitrogen Corporation, UK

Tableau 16 : Matériel et solutions utilisés pour l'immunofluorescence

Matériel et solutions	Composition	Références
PBS (phosphate buffer saline)	Tampon phosphate salin (10 mM, NaCl 0,9 %, pH 7,4)	NaCl : Merck, Germany
PBS-BSA 2 ou 3 %		PAA Laboratories GmbH, Autriche
PBS + Triton X-100 1 %		Merck, Germany
PFA (paraformaldéhyde) 4 %		Merck, Germany
Anticorps anti-TRIM29		IMG-5277A Imgenex, USA
Anticorps anti-p53		05-224 Upstate, UK
Anticorps secondaire anti-IgG de lapin couplé à une Alexa 488 nm		Molecular Probes, USA
Anticorps secondaire anti-IgG de souris couplé à une Alexa 488 nm		Molecular Probes, USA
TO-PRO 3		Molecular Probes, USA
Solution de RNase à 2 mg/ml de PBS		ICN, USA
Mowiol	Milieu de montage	Molecular Probes, USA
Plaque 24 puits		Costar, USA
Lamelles couvre-objet de 13 mm de diamètre		VWR international, Belgique
Lames porte-objet de 2,6 x 7,6 cm		VWR international, Belgique

Tableau 17 : Matériel et solutions utilisés pour l'incorporation de la thymidine tritiée

Matériel et solutions	Références
PBS (phosphate buffer saline) : Tampon phosphate salin (10 mM, NaCl 0,9 %, pH 7,4)	<u>NaCl</u> : Merck, Germany
NaOH 0,5 M	Merck, Germany
HCl 0,5 M	Merck, Germany
Acide trichloroacétique (TCA) 10 %	SDS, France
Ethanol 70 %	SDS, France
Thymidine tritiée	NEN, USA
Epilife (CaCl ₂ 0,06 mM)	Cascade Biologics, USA
Human Keratinocytes Growth Serum ou HKGS	Cascade Biologics, USA
Néomycine G418	Gibco, Invitrogen Corporation, UK

Tableau 18 : Matériel et solutions utilisés pour la méthode du Folin

Matériel et solutions	Composition	Références
PBS (phosphate buffer saline)	Tampon phosphate salin (10 mM, NaCl 0,9 %, pH 7,4)	<u>NaCl</u> : Merck, Germany
NaOH 0,5 M		Merck, Germany
Na ₂ CO ₃ 2 %		Merck, Germany
Solution Tartrate 2 %		Merck, Germany
CuSO ₄ 1 %		UCB, Belgium
Solution de Folin	diluée 2 x dans de l'H ₂ O	Merck, Germany
Etalon BSA		<u>BSA (2 µg/µl)</u> : Merck, Germany

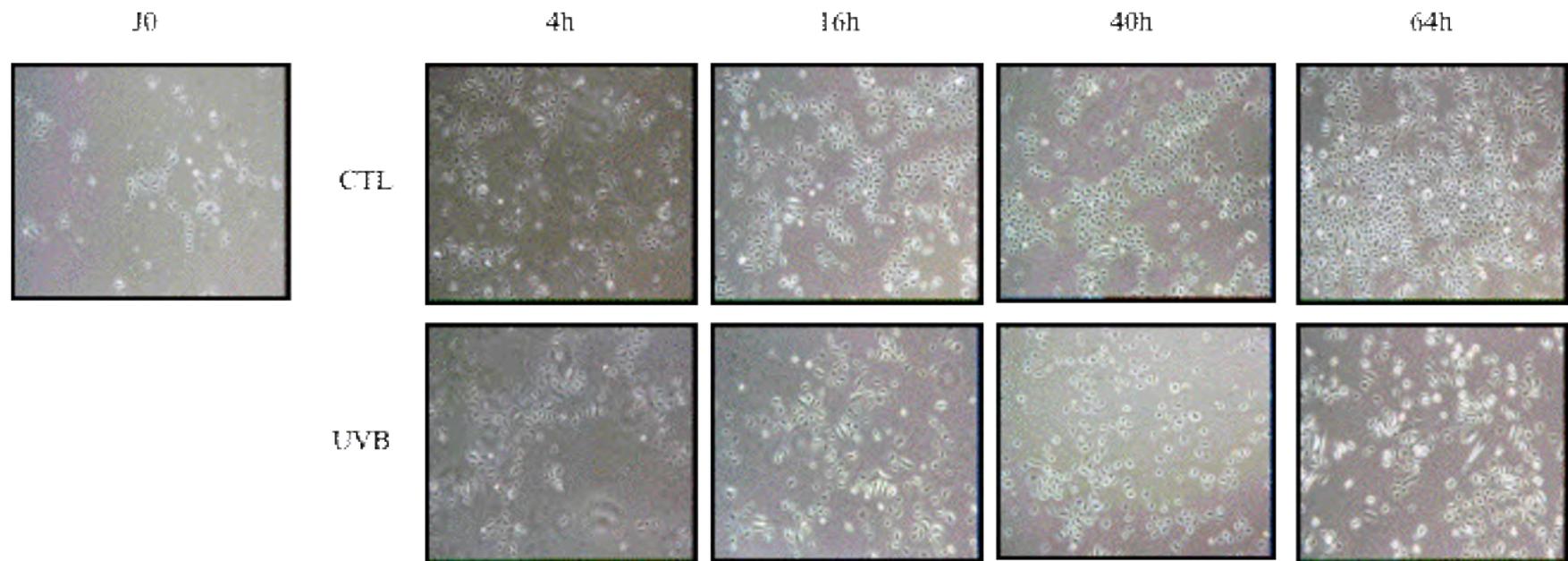


Figure 3 : Influence des expositions répétées et sub-létales aux UVB sur la morphologie et la confluence des kératinocytes N-hTERT. Ceux-ci ont été exposés à 8 doses de 300 mJ/cm^2 d'UVB sur deux jours (UVB). Les kératinocytes contrôles ont été traités en parallèle mais sans exposition aux UVB (CTL). Les cellules ont été visualisées au microscope optique à l'objectif 40 X et photographiées à 4 h, 16 h, 40 h et 64 h après la dernière exposition. La photo J0 représente les kératinocytes N-hTERT avant le premier stress.

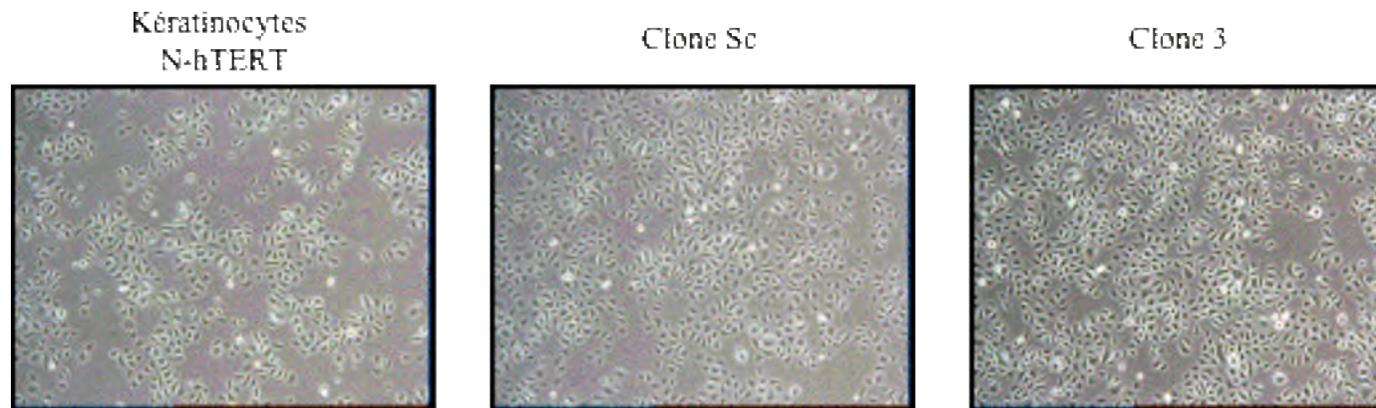


Figure 17 : Observation des différences morphologiques entre les kératinocytes N-hTERT contrôles, les kératinocytes transfectés avec le plasmide codant pour le shRNA CTL qui n'inhibe aucun ARNm de la cellule (Clone Sc) et les kératinocytes transfectés avec un plasmide codant pour un shRNA inhibant l'ARNm de TRIM29 (Clone 3). Les cellules ont été observées au microscope optique à l'aide d'un objectif 40 X.

(a)

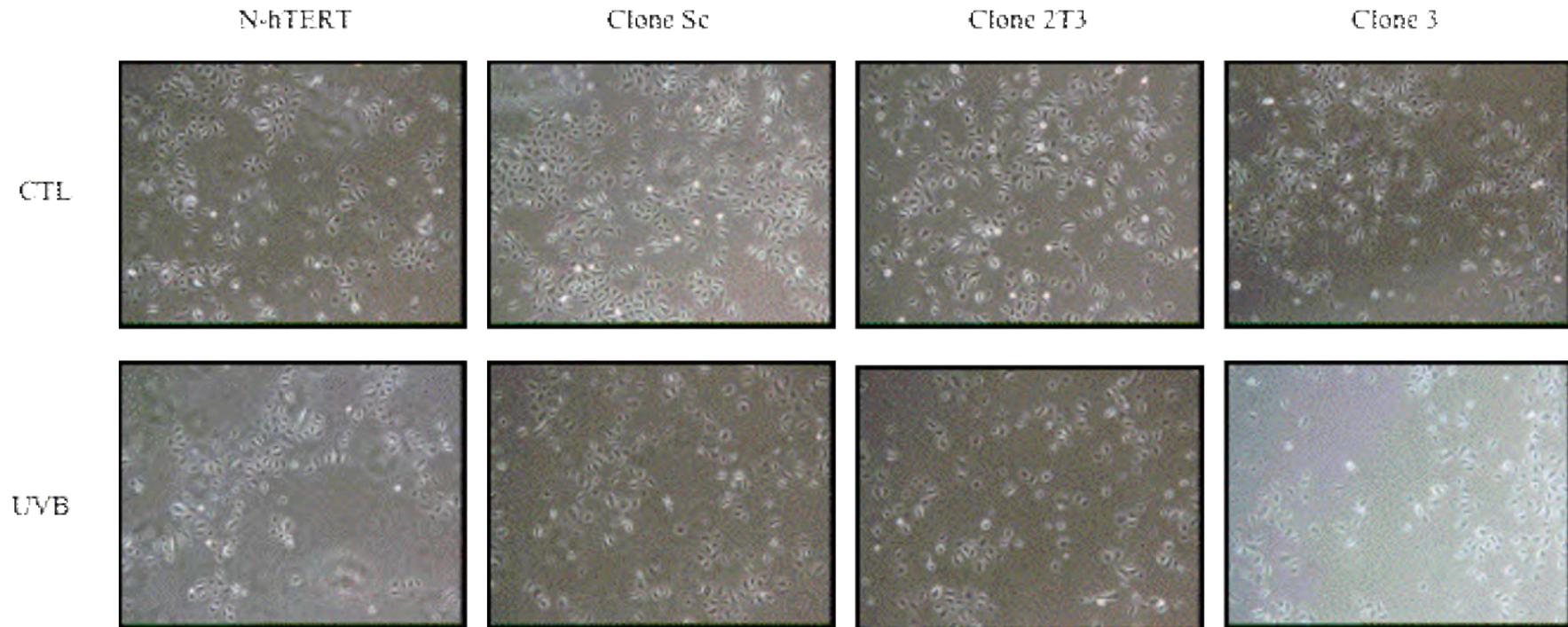


Figure 23(a) : Observation de l'influence des expositions répétées et sub-létales aux UVB sur la morphologie et la prolifération des kératinocytes non transfectés (N-hTERT), du clone Sc, du clone 2T3 et du clone 3. Les cellules contrôles (CTL) n'ont pas été exposées aux UVB. Le clone Sc consiste en des kératinocytes ayant été transfectés avec le plasmide CTL qui code pour un shRNA n'inhibant aucun ARNm. Les clones 2T3 et 3 consistent en des kératinocytes ayant été transfectés avec des plasmides qui codent pour des shRNA invalidant l'ARNm de TRIM29. Les cellules ont été photographiées à 4 h après la dernière exposition aux UVB. Les cellules ont été observées au microscope optique (objectif 40 X).

(b)

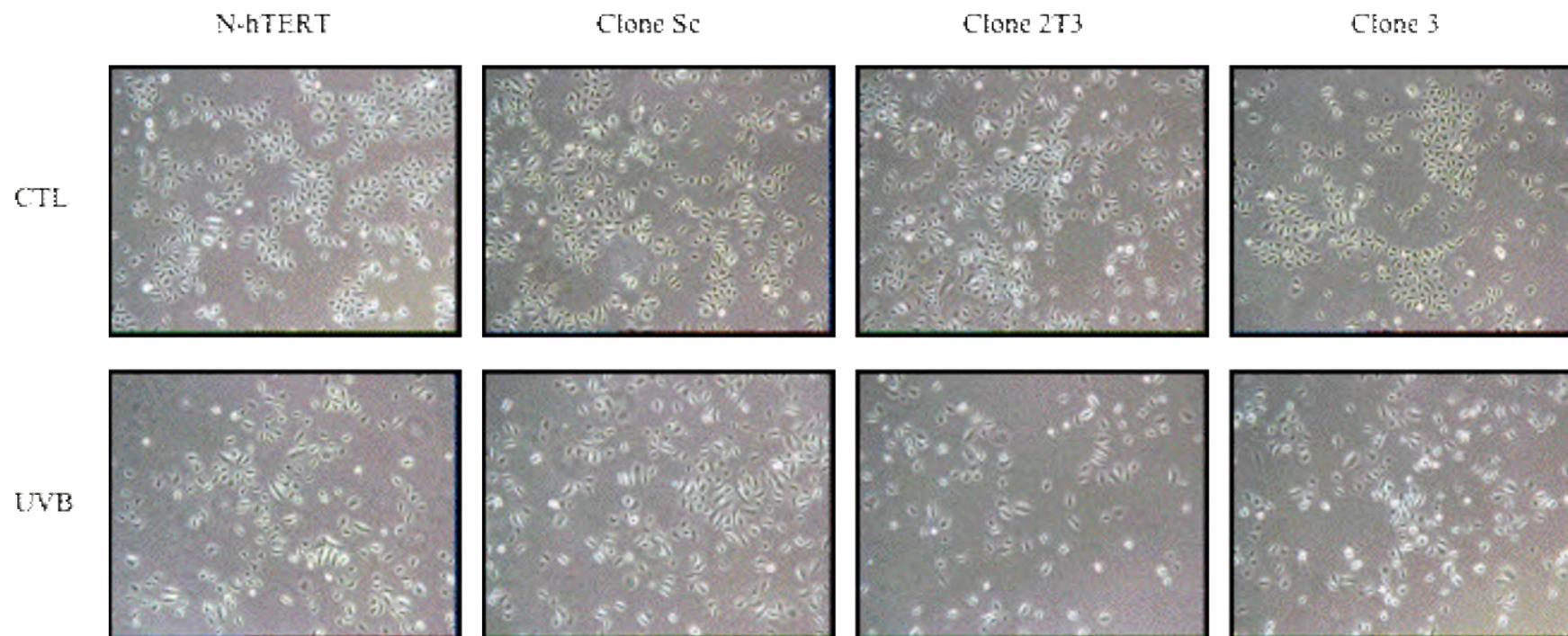


Figure 23(b) : Observation de l'influence des expositions répétées et sub-létales aux UVB sur la morphologie et la prolifération des kératinocytes non transfectés (N-hTERT), du clone Sc, du clone 2T3 et du clone 3. Les cellules contrôles (CTL) n'ont pas été exposées aux UVB. Le clone Sc consiste en des kératinocytes ayant été transfectés avec le plasmide CTL qui code pour un shRNA n'inhibant aucun ARNm. Les clones 2T3 et 3 consistent en des kératinocytes ayant été transfectés avec des plasmides qui codent pour des shRNA invalidant l'ARNm de TRIM29. Les cellules ont été photographiées à 16 h après la dernière exposition aux UVB. Les cellules ont été observées au microscope optique (objectif 40 X).

(c)

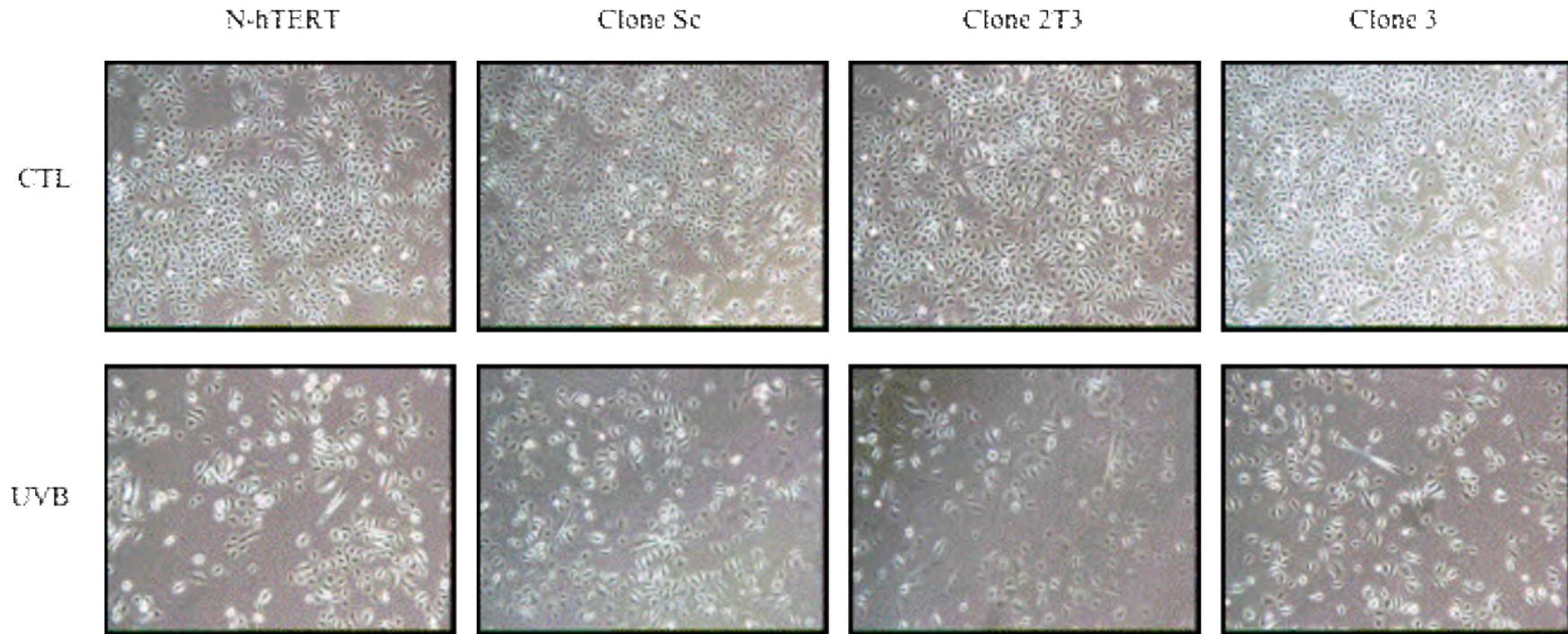


Figure 23(c) : Observation de l'influence des expositions répétées et sub-létales aux UVB sur la morphologie et la prolifération des kératinocytes non transfectés (N-hTERT), du clone Sc, du clone 2T3 et du clone 3. Les cellules contrôles (CTL) n'ont pas été exposées aux UVB. Le clone Sc consiste en des kératinocytes ayant été transfectés avec le plasmide CTL qui code pour un shRNA n'inhibant aucun ARNm. Les clones 2T3 et 3 consistent en des kératinocytes ayant été transfectés avec des plasmides qui codent pour des shRNA invalidant l'ARNm de TRIM29. Les cellules ont été photographiées à 64 h après la dernière exposition aux UVB. Les cellules ont été observées au microscope optique (objectif 40 X).

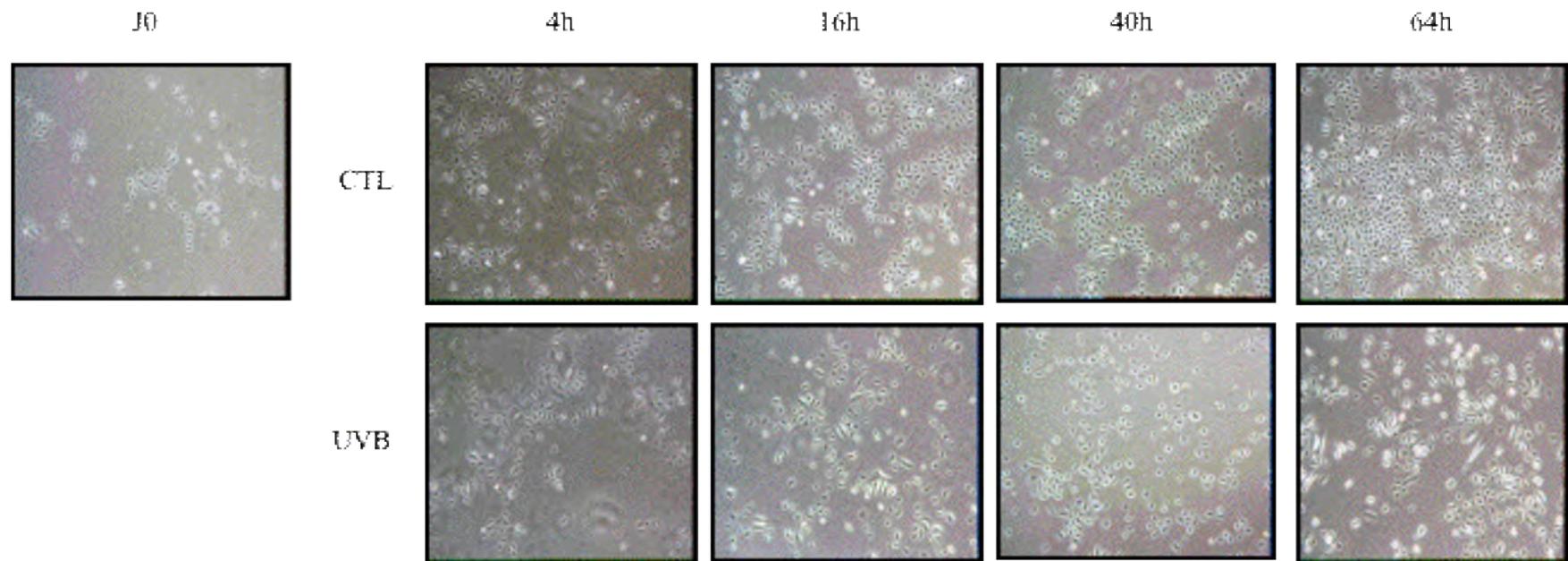


Figure 3 : Influence des expositions répétées et sub-létales aux UVB sur la morphologie et la confluence des kératinocytes N-hTERT. Ceux-ci ont été exposés à 8 doses de 300 mJ/cm^2 d'UVB sur deux jours (UVB). Les kératinocytes contrôles ont été traités en parallèle mais sans exposition aux UVB (CTL). Les cellules ont été visualisées au microscope optique à l'objectif 40 X et photographiées à 4 h, 16 h, 40 h et 64 h après la dernière exposition. La photo J0 représente les kératinocytes N-hTERT avant le premier stress.

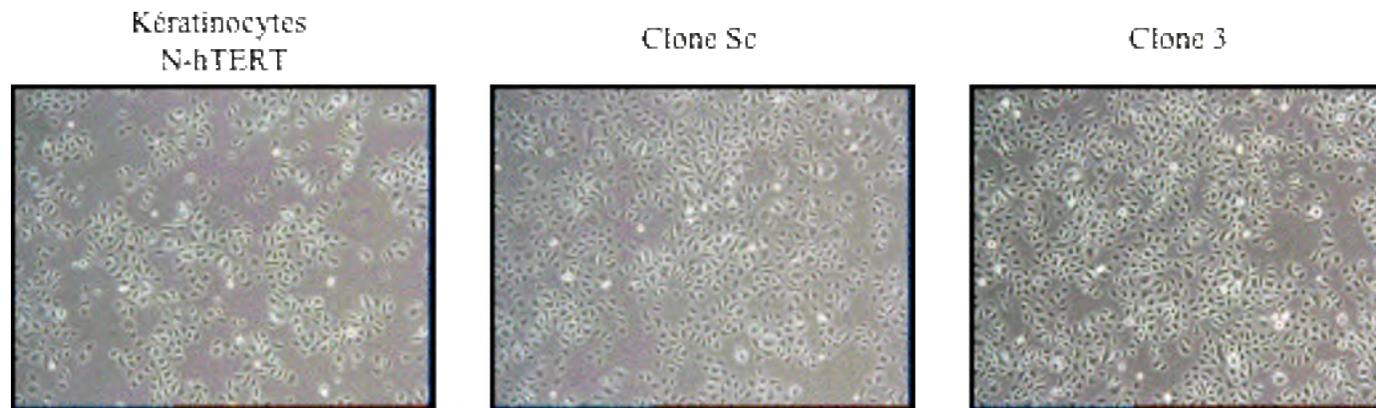


Figure 17 : Observation des différences morphologiques entre les kératinocytes N-hTERT contrôles, les kératinocytes transfectés avec le plasmide codant pour le shRNA CTL qui n'inhibe aucun ARNm de la cellule (Clone Sc) et les kératinocytes transfectés avec un plasmide codant pour un shRNA inhibant l'ARNm de TRIM29 (Clone 3). Les cellules ont été observées au microscope optique à l'aide d'un objectif 40 X.

(a)

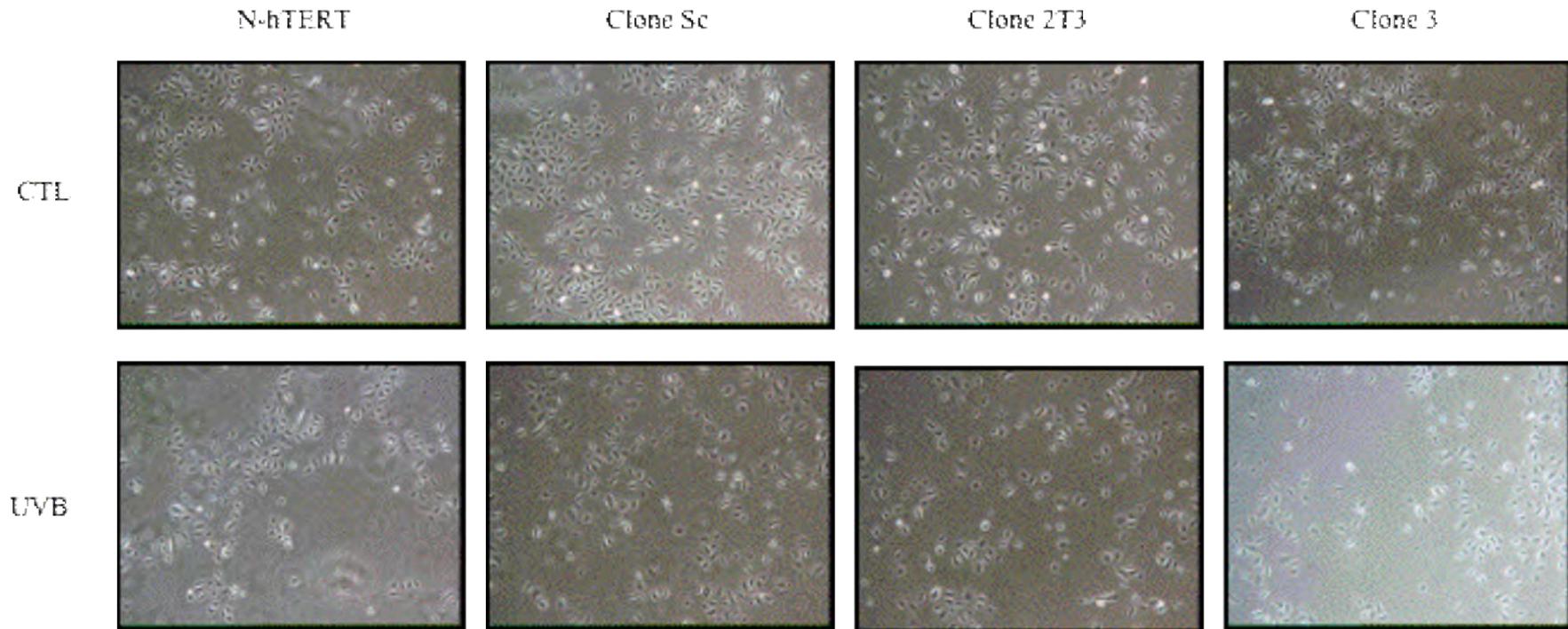


Figure 23(a) : Observation de l'influence des expositions répétées et sub-létales aux UVB sur la morphologie et la prolifération des kératinocytes non transfectés (N-hTERT), du clone Sc, du clone 2T3 et du clone 3. Les cellules contrôles (CTL) n'ont pas été exposées aux UVB. Le clone Sc consiste en des kératinocytes ayant été transfectés avec le plasmide CTL qui code pour un shRNA n'inhibant aucun ARNm. Les clones 2T3 et 3 consistent en des kératinocytes ayant été transfectés avec des plasmides qui codent pour des shRNA invalidant l'ARNm de TRIM29. Les cellules ont été photographiées à 4 h après la dernière exposition aux UVB. Les cellules ont été observées au microscope optique (objectif 40 X).

(b)

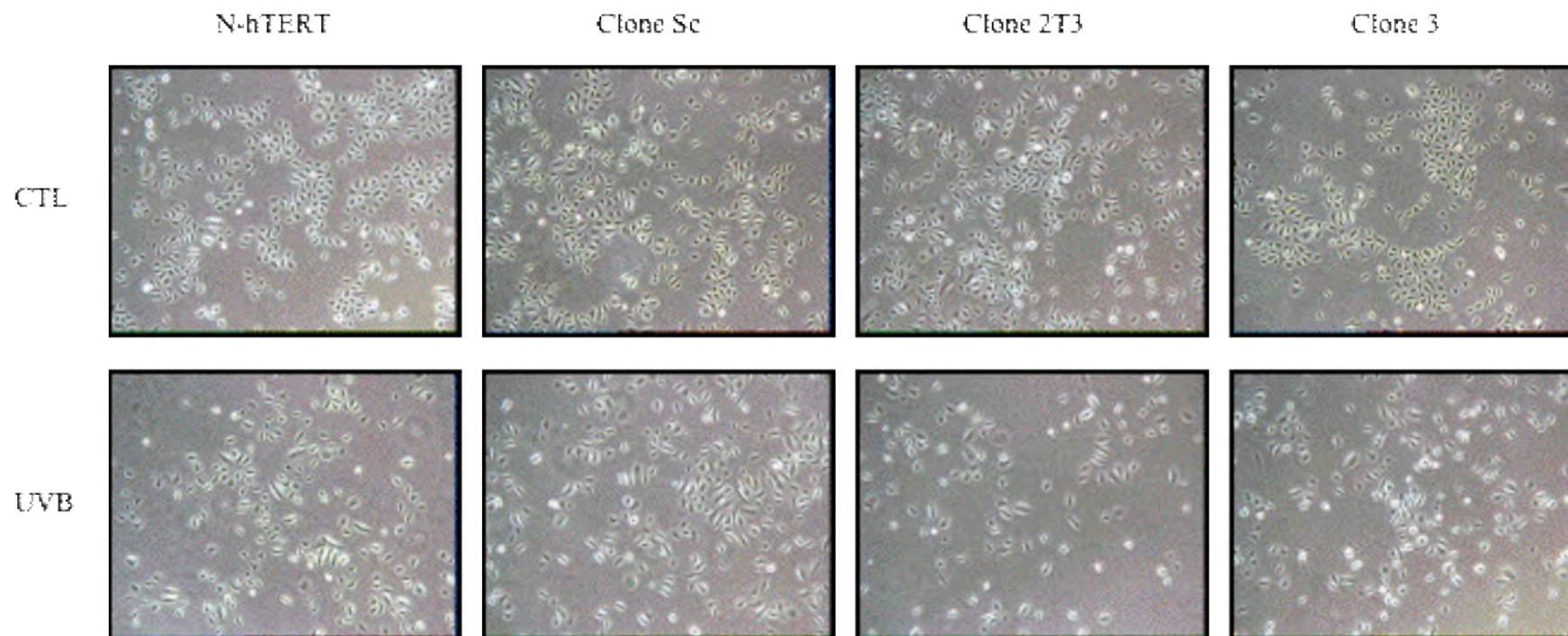


Figure 23(b) : Observation de l'influence des expositions répétées et sub-létales aux UVB sur la morphologie et la prolifération des kératinocytes non transfectés (N-hTERT), du clone Sc, du clone 2T3 et du clone 3. Les cellules contrôles (CTL) n'ont pas été exposées aux UVB. Le clone Sc consiste en des kératinocytes ayant été transfectés avec le plasmide CTL qui code pour un shRNA n'inhibant aucun ARNm. Les clones 2T3 et 3 consistent en des kératinocytes ayant été transfectés avec des plasmides qui codent pour des shRNA invalidant l'ARNm de TRIM29. Les cellules ont été photographiées à 16 h après la dernière exposition aux UVB. Les cellules ont été observées au microscope optique (objectif 40 X).

(c)

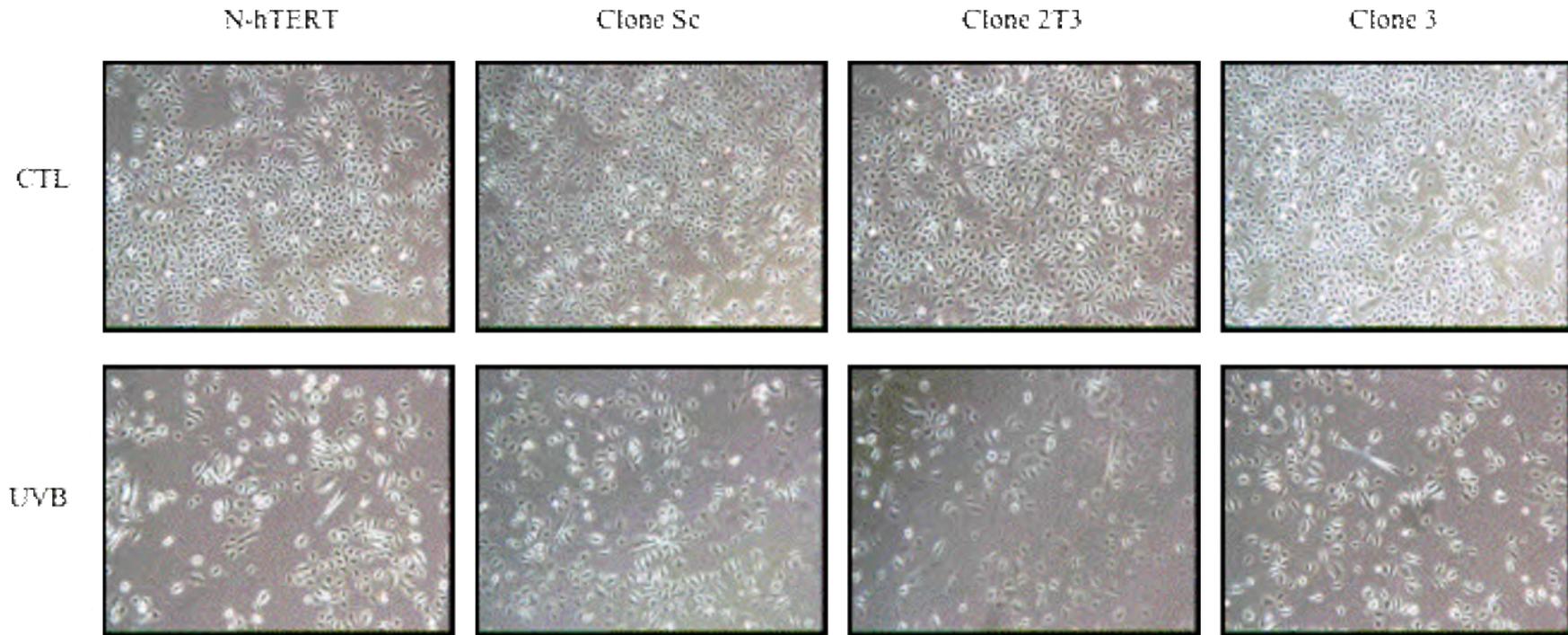


Figure 23(c) : Observation de l'influence des expositions répétées et sub-létales aux UVB sur la morphologie et la prolifération des kératinocytes non transfectés (N-hTERT), du clone Sc, du clone 2T3 et du clone 3. Les cellules contrôles (CTL) n'ont pas été exposées aux UVB. Le clone Sc consiste en des kératinocytes ayant été transfectés avec le plasmide CTL qui code pour un shRNA n'inhibant aucun ARNm. Les clones 2T3 et 3 consistent en des kératinocytes ayant été transfectés avec des plasmides qui codent pour des shRNA invalidant l'ARNm de TRIM29. Les cellules ont été photographiées à 64 h après la dernière exposition aux UVB. Les cellules ont été observées au microscope optique (objectif 40 X).

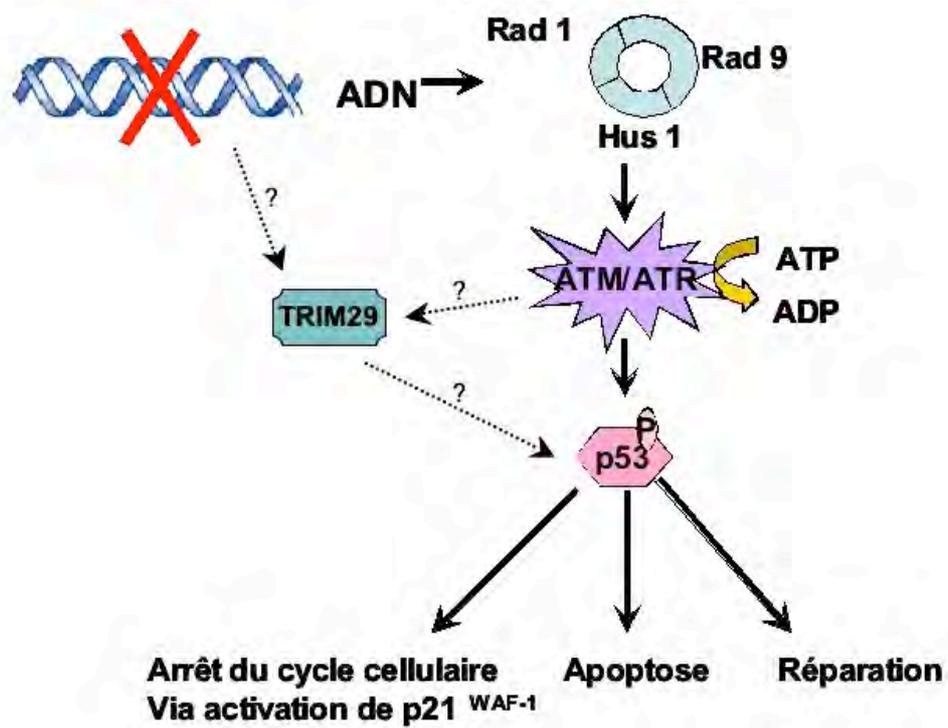


Figure 1 : Lors de ce mémoire, nous allons tenter de préciser le rôle de TRIM29 dans la voie de signalisation en réponse aux dommages à l'ADN générés par les expositions répétées et sub-létales aux UVB.