

# Relation entre les kératines et les voies de signalisation pro-apoptotique de FAS et anti-apoptotique de AKT dans la réponse des cellules HEPG2 au stress toxique induit par la griséofulvine

Anne-Marie Fortier  
30023637

## RÉSUMÉ

Dans plusieurs pathologies hépatiques, tel que l'hépatite alcoolique, on observe la présence d'inclusions cytoplasmiques à l'intérieur des hépatocytes. Ces amas, appelés corps de Mallory (CMs), sont constitués principalement de protéines de filaments intermédiaires (FIs) qui constituent le cytosquelette, en l'occurrence les kératines 8 et 18 (K8/18) qui sont exprimées par les hépatocytes. On ne sait pas encore si ces agrégats protéiques sont la cause du dysfonctionnement cellulaire ou la conséquence du stress imposé à la cellule. Toutefois, les récentes études tendent à démontrer que les K8/18 peuvent jouer un rôle dans la résistance à différents stress et à l'apoptose. Bien que les mécanismes moléculaires sous-jacents à cette résistance restent encore à déterminer, plusieurs études ont démontré que certaines modifications post-traductionnelles, tel que la phosphorylation, permettent aux FIs d'interagir avec de nombreuses protéines impliquées dans la signalisation intracellulaire. Le premier objectif de cette étude est d'établir un modèle d'étude *in vitro*, par la culture de cellules HepG2 soumises à un stress toxique induit par la griséofulvine (GF). Cet agent chimique, couramment utilisé pour l'étude de la formation des CMs chez la souris, induit la réorganisation du réseau de FIs et la phosphorylation des kératines *in vivo*. Le second objectif de ce projet est de caractériser le processus d'apoptose observé dans notre modèle d'étude, en déterminant si une relation existe entre le récepteur de mort cellulaire Fas et la phosphorylation des K8/18. Le dernier objectif consiste à déterminer si la phosphorylation des K8/18 et le mécanisme de résistance à l'apoptose peut être associée à la protéine Akt, qui est un médiateur important de la survie et de la prolifération cellulaire. Ces objectifs sont réalisés à l'aide de techniques d'immunobuvardage de type Western, d'immunofluorescence, de spectrophotométrie et de RT-PCR. Nos résultats ont montré que l'exposition des cellules HepG2 à la GF induit la réorganisation du réseau de K8/18 et la phosphorylation de la K8 au niveau de la sérine 79 et de la K18 sur la sérine 33. On observe de plus la formation d'agrégats de K8 phosphorylées et d'ubiquitine pouvant s'apparenter aux CMs observés dans les modèles *in vivo*. Le traitement à la GF induit l'apoptose des cellules HepG2 par la présence croissante de la caspase 3 clivée et la

diminution de la prolifération cellulaire au cours du traitement. Nous avons également démontré que le FasR est présent dans les cellules HepG2 au niveau de la membrane plasmique ainsi que dans le cytosol et que le marquage colocalise avec celui des K8/18 phosphorylées dans certaines cellules contrôles et traitées à la GF. Il en est de même pour le marquage de la protéine Akt phosphorylée, dont la localisation est davantage cytosolique, qui colocalise avec le marquage des K8/18 phosphorylées dans les cellules contrôles en cours de mitose et dans certaines cellules exposées à la GF. De plus, nous avons montré que le traitement à la GF n'influence pas l'expression protéique du FasR, mais augmente la phosphorylation de Akt. L'inhibition de cette phosphorylation ne modifie pas les niveaux de phosphorylation des K8, ce qui laisse supposer que les K8 ne sont pas des substrats directs de la kinase Akt. Toutefois, les niveaux d'expression de la caspase 3 clivée augmentent dans les cellules dont la protéine Akt est inactivée, contrairement au FasR et à son ligand dont l'expression reste stable. Ces résultats suggèrent donc que Akt joue effectivement un rôle dans la résistance des cellules HepG2 à l'apoptose induite par la GF, sans toutefois moduler l'expression du FasR et de son ligand. L'ensemble de nos résultats montre que les K8/18 phosphorylées peuvent interagir avec la protéine Akt et le FasR. De plus, il apparaît que le mécanisme de résistance contre l'apoptose implique la protéine Akt, mais n'affecte pas l'expression du FasR ni celle de son ligand. À partir de ces résultats, nous suggérons que les kératines peuvent jouer un rôle dans la translocation ou la séquestration de ces protéines. En réponse au stress induit par la GF, le réseau de K8/18 se désorganise et devient hyperphosphorylé, ce qui permet l'interaction des K8/18 avec ces protéines : l'association des K8/18 avec Akt phosphorylée pourrait donc favoriser la résistance à l'apoptose imputable aux kératines et leur interaction avec le FasR pourrait influencer sa translocation à la membrane plasmique. Les kératines pourraient donc jouer un rôle dans la modulation de la signalisation intracellulaire en réponse à un stress toxique.

Mots-clés : hépatite alcoolique, filaments intermédiaires, kératines 8 et 18, phosphorylation, corps de Mallory, apoptose, Akt, Fas.