

## TABLE DES MATIÈRES

Remerciements.....	i
RÉSUMÉ.....	ii
AVANT-PROPOS .....	iii
TABLE DES MATIÈRES .....	iv
LISTE DES FIGURES.....	vii
Liste des tableaux .....	viii
Liste des abréviations.....	ix
INTRODUCTION.....	2
CHAPITRE 1 : GÉNÉRALITÉS SUR LES KÉRATINES.....	4
1.1 Structure de la peau .....	4
1.1.1 L'hypoderme .....	5
1.1.2 Le derme.....	5
1.1.3 L'épiderme .....	6
1.2 Les kératines .....	7
1.2.1 Structure et fonction des kératines .....	9
1.2.2 Les kératines dans les fonctions cellulaires .....	13
CHAPITRE 2 : ÉPIDERMOLYSES BULLEUSES HÉRÉDITAIRES.....	16
2.1 Définition des épidermolyses bulleuses héréditaires .....	16
2.2 Différents types d'épidermolyses bulleuses héréditaires .....	16
2.2.1 L'épidermolyse bulleuse simplex.....	17
2.2.2 L'épidermolyse bulleuse dystrophique.....	18
2.2.3 L'épidermolyse bulleuse jonctionnelle.....	18
2.3 Définition et épidémiologie de l'épidermolyse bulleuse simplex .....	19
2.4 Différents types d'épidermolyse bulleuse simplex.....	20
2.4.1 Épidermolyse bulleuse localisée (EBS-loc).....	20
2.4.2 Épidermolyse bulleuse pigmentation mouchetée (EBS-MP).....	21
2.4.3 Épidermolyse bulleuse généralisée (EBS-gen) .....	22
2.4.4 Épidermolyse bulleuse Dowling-Meara (EBS-DM).....	22
CHAPITRE 3 : INTERFÉRON GAMMA .....	24
3.1 Définition .....	24
3.1.1 Interféron de type 2 .....	24
3.1.2 Structure de l'IFN- $\gamma$ .....	26
3.2 IFN- $\gamma$ et immunité .....	28
3.3 Mécanisme d'action de l'IFN- $\gamma$ .....	30
3.3.1 Activation de la voie de signalisation par l'IFN- $\gamma$ via JAK/STAT-1.....	32
3.3.2 Activation par l'IFN- $\gamma$ des voies de signalisation alternatives.....	33
3.4 IFN- $\gamma$ et thérapies .....	34
3.4.1 IFN- $\gamma$ et cancer.....	34
3.4.2 IFN- $\gamma$ et tuberculose .....	35

3.4.3	IFN- $\gamma$ et dermatite atopique.....	36
3.4.4	IFN- $\gamma$ et psoriasis .....	37
	<b>HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS.....</b>	<b>39</b>
	Hypothèse.....	39
	Objectif.....	39
	<b>CHAPITRE 4: Interferon gamma impact on keratin aggregates in keratinocytes isolated from Epidermolysis Bullosa Simplex patients caused by keratin 14 mutations.....</b>	<b>40</b>
	Abstract .....	41
	Objectives .....	41
	Results.....	42
	Conclusion .....	42
	Introduction .....	43
	Material and methods .....	44
	Individuals.....	44
	Keratinocytes culture and immortalization .....	44
	Interferon gamma treatment.....	45
	Evaluation of the toxicity of IFN- $\gamma$ .....	45
	qRT-PCRs .....	46
	Western blotting.....	46
	Keratinocyte lines heat-shock and pre-treatment with IFN- $\gamma$ .....	47
	Statistical analysis .....	48
	Results... ..	48
	The effect of IFN- $\gamma$ on the aggregates and toxicity.....	48
	IFN- $\gamma$ decreases the expression level of the <i>KRT15</i> gene in immortalized and in primary keratinocytes .....	49
	IFN- $\gamma$ increases the expression level of the <i>KRT16</i> gene in immortalized and in primary keratinocytes .....	51
	IFN- $\gamma$ treatment of immortalized keratinocytes induces a decrease in K15 level in a dose dependent manner .....	52
	Discussion .....	54
	Conclusion .....	58
	Acknowledgments: .....	58
	References .....	59
	<b>CHAPITRE 5: DISCUSSION GÉNÉRALE.....</b>	<b>62</b>
5.1	Interprétation générale .....	62
5.1.1	Modèle cellulaire.....	62
5.1.2	Immortalisation des kératinocytes .....	63
5.1.3	Préactivation des kératinocytes .....	63
5.2	Thérapie génique .....	65
5.3	Utilisation de molécules thérapeutique.....	66
5.3.1	La voie de signalisation Keap1/Nrf2/ARE.....	66

<b>5.3.2 Réduction d'agrégats de kératines .....</b>	<b>67</b>
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>69</b>
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>70</b>

## LISTE DES FIGURES

Figure 1: Représentation schématique des différentes couches et cellules de la peau..	4
Figure 2: Représentation schématique des différentes couches de l'épiderme .....	6
Figure 3 : Représentation schématique de la structure des kératines de type 1 et de type 2 .....	10
Figure 4 : Représentation schématique des associations de la kératine 14 et la kératine 5 en dimères.....	12
Figure 5 : Représentation schématique d'un tissu de peau normal et muté .....	20
Figure 6 : Représentation schématique de la voie de signalisation d'IFN- $\gamma$ .....	26
Figure 7 : Représentation schématique de la structure de l'IFN- $\gamma$ .....	27
Figure 8 : Représentation schématique de la communication entre les cellules dendritiques et les lymphocytes T pour la synthèse de l'IFN- $\gamma$ .....	28
Figure 9 : Représentation schématique de la production de l'IFN- $\gamma$ .....	30
Figure 10 : Représentation schématique du récepteur de l'IFN- $\gamma$ .....	32
Figure 11: Effect of IFN- $\gamma$ on <i>KRT15</i> gene expression in immortalized keratinocytes .....	50
Figure 12: Effect of IFN- $\gamma$ on <i>KRT15</i> gene expression in primary keratinocytes.....	51
Figure 13: Effect of IFN- $\gamma$ on <i>KRT16</i> gene expression.....	52
Figure 14: Western blot representative of the effect of IFN- $\gamma$ treatments on K15.....	53

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Les différents gènes codant pour les kératines .....	8
Tableau 2 : Les kératines de type 1 et de type 2.....	8
Tableau 3: Les principales catégories d'EBH et leur défaut moléculaire. ....	17
Tableau 4: Phenotypes and mutations found in three patients with EBS.....	44

## Liste des abréviations

ADAR : Adénosine désaminase agissant sur l'ARN

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

ASK1 : *Apoptosis Signal-regulating Kinase-1*

Asn : Asparagine

Bcl-2 : *B-cell lymphoma-2*

BPAG-2 : *Bullous Pemphigoid Antigen 2*

CD : Cellule dendritique

CD-4/8 : Voie de différenciation

c-FLIP : *Cellular FLICE-inhibitory Protein*

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CTP : Codon de terminaison prématuré

DAP : *Death Associated Protein*

DLK : *Dual Leucine Zipper-bearing Kinase*

eIF-2 : *Eucaryotic Initiation Factor-2*

Fas : *Apoptosis stimulating fragment*

GAF : *Gamma Activation Factor*

GAS : *Gamma Activation Site*

HIP : *Helix Initiation Peptide*

HLA-DR : *Human Leucocyte Antigen*

HSP70 : *Heat Shock Protein*

HTP : *Helix Termination Peptide*

ICAM : *Inter-Cellular Adhesion Molecule*

IDO : Indolamine dioxygénase

IFN : Interférons  
IL-X : Interleukine X  
IL-XR : Récepteur de l'interleukine X  
iNOS : *Oxyde Nitrile Syntase Inductible*  
IRF-9 : *Interferon Regulatory Factor-9*  
IRSE : *IFN- $\alpha$  Stimulated Response Element*  
ISGF3 : *Interferon Stimulated Gene Factor-3*  
JAK : *c-Janus N-terminal Kinase*  
KAR : *Killer Activation Receptor*  
K-X : Kératine-X  
KRT-X : Gène de kératine X  
LH : Cellule de Langerhans  
NAPDH : Nicotinamide adénine di-nucléotide phosphate (forme réduite)  
NK : *Natural Killer*  
PEG : Polyéthylène glycol  
PKR : Protéine Kinase dépendante de l'ARN  
RA : Récepteur d'activation  
RCT : Récepteurs des cellules T  
RI : Récepteur d'inhibition  
STAT : *Signal Transduction and Activators of Transcription*  
Th : *Cellule T Helper*  
TLR : *Toll-Like Receptor*  
TNF- $\alpha$  : *Tumor Necrosis Factor Alpha*  
TRAD : *Tumor Necrosis Factor Receptor Type 1 Associated Death Domain Protein*  
TYK : Tyrosine kinase

## INTRODUCTION

Depuis 2007, un programme de recherche sur l'épidermolyse bulleuse simplexe (EBS) a été initié à l'Université du Québec à Chicoutimi sous la direction du Dre Catherine Laprise. Ce programme de recherche est centré d'abord sur la documentation de la biologie du trait, mais également sur la recherche d'avenues thérapeutiques. Le présent projet s'intègre dans ce programme de recherche et l'objectif principal était d'évaluer l'effet de l'interféron gamma (IFN- $\gamma$ ) sur la production de la kératine (K) 15 dans les kératinocytes issus de patients atteints d'EBS puisque cette kératine pourrait remplacer la kératine 14 lors de la formation des dimères avec la kératine 5.

L'EBS est une maladie génétique rare ou orpheline puisque sa prévalence se situe selon les populations entre une personne sur 30 000 et une personne sur 50 000. Elle se caractérise par la formation de bulles ou d'ampoules cutanées causées par un décollement intra-épidermique au niveau de la couche basale de l'épiderme, en réponse à une force mécanique tel le frottement. Cette maladie est la résultante d'un défaut génétique dans la production de certaines protéines de structure de la peau, dont les principales sont la K5 et la K14, qui lorsque mutées ne peuvent plus s'assembler pour former des dimères et donner l'architecture normale à la structure de l'épiderme (Kerns *et al.*, 2007).

Selon le degré de sévérité et la distribution des zones atteintes, l'EBS est subdivisée en 4 phénotypes différents. On distingue : l'EBS-localisée (EBS-loc), l'EBS-généralisée (EBS-gén), l'EBS à pigmentation mouchetée (EBS-MP) et le phénotype le plus sévère l'EBS Dowling-Meara (EBS-DM) (Garcia *et al.*, 2011).



Actuellement, les traitements visent à réduire la symptomatologie et les efforts de recherche se concentrent sur l'identification de molécules à potentiel thérapeutique. Ce mémoire s'inscrit dans ce contexte puisqu'il entend évaluer l'efficacité de l'INF- $\gamma$  pour les patients EBS ayant une mutation au niveau de la K14.

---

# CHAPITRE 1

## GÉNÉRALITÉS SUR LES KÉRATINES

### 1.1 Structure de la peau

La peau est un tissu de revêtement très souple et résistant qui enveloppe le corps. Elle constitue la première barrière protectrice contre les agressions externes (Chamcheu *et al.*, 2010a). Elle est l'organe le plus lourd du corps humain (environ 4 kg) et d'une superficie allant jusqu'à 2m<sup>2</sup>. La peau est composée de trois grandes parties : l'épiderme, le derme et l'hypoderme (figure 1) (Baroli, 2009).

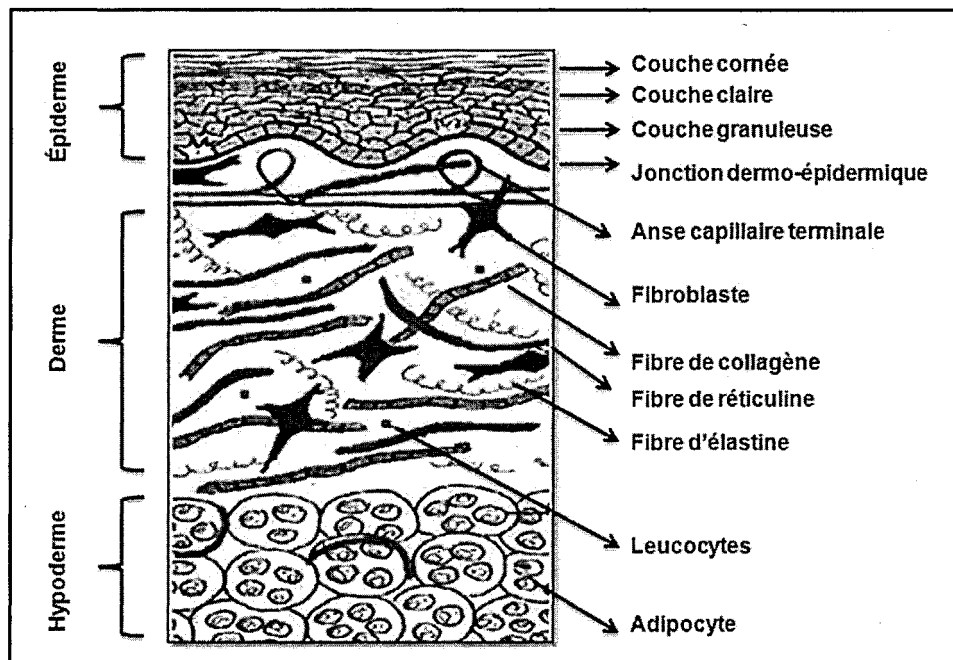


Figure 1: Représentation schématique des différentes couches et cellules de la peau.

Modifiée de (Baroli, 2009)

### ***1.1.1 L'hypoderme***

L'hypoderme est un tissu conjonctif adipeux. Il relie le derme aux organes profonds. L'hypoderme est rattaché au derme par des expansions de fibres de collagènes et d'élastines. Il constitue un isolant thermique et aussi une réserve énergétique (Kanitakis, 2002).

### ***1.1.2 Le derme***

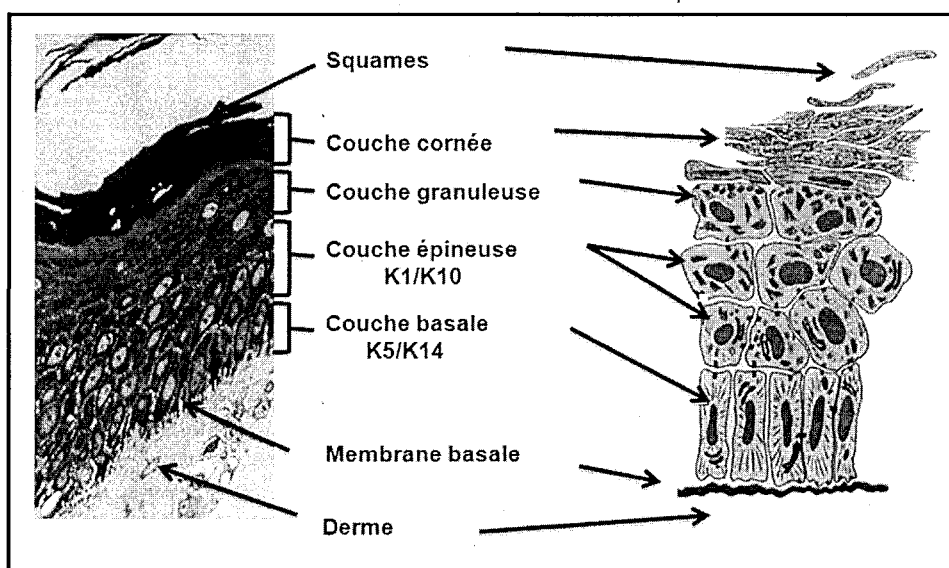
Le derme est un tissu conjonctif épais (dense) situé sous l'épiderme. Il constitue un élément de soutien et de nutrition pour l'épiderme (Marionnet *et al.*, 2006). Il est constitué de plusieurs types cellulaires produisant différentes protéines qui participent au maintien de la structure de la peau (Kanitakis, 2002). Il se subdivise en deux zones :

a) **Zone papillaire:** Elle représente un tissu conjonctif lâche, riche en matrice extracellulaire, en fibres de collagène et en élastine. On y trouve aussi les terminaisons nerveuses telles que les disques de Merckel (corpuscules responsables de la perception tactile) et aussi des vaisseaux sanguins.

b) **Zone réticulaire :** Elle constitue un tissu conjonctif dense, riche en fibres de réticuline. Cette zone renferme aussi des vaisseaux sanguins.

### 1.1.3 L'épiderme

L'épiderme constitue la partie superficielle de la peau. Il s'agit d'un épithélium pavimenteux stratifié kératinisé. Il ne contient ni vaisseaux sanguins ni lymphatiques. Toutefois, il renferme de nombreuses terminaisons nerveuses libres. Il est constitué de quatre couches cellulaires dont la plus superficielle (couche basale, épineuse, granuleuse et la couche cornée (figure 2).



**Figure 2: Représentation schématique des différentes couches de l'épiderme**

L'épiderme constitue la couche superficielle de la peau. Il est formé de quatre couches (basale, épineuse, granuleuse et la couche cornée) représentées à gauche. Les principales kératines synthétisées dans la couche épineuse sont K1/K10 et dans la couche basale sont K5 et K14 qui sont représentées à droite. Modifiée de (Paller *et al.*, 1994)

L'épiderme est également composé de plusieurs types cellulaires. On distingue : les kératinocytes (90%), les mélanocytes (5%), les cellules de Langerhans (2-8%) et les cellules de Merkel (1%) (Kanitakis, 2002; Marionnet *et al.*, 2006).

Le cytosquelette des cellules de plusieurs organismes pluricellulaires est composé de trois systèmes de filaments protéiques abondants. Ils interviennent dans le maintien de l'organisation et de l'intégrité des cellules d'un tissu donné. On distingue les microfilaments d'actine (7-10 nm de diamètre), les microtubules interconnectés (25 nm de diamètre) et les filaments intermédiaires qui sont formés par l'association des kératines (10-12 nm de diamètre). Ces derniers sont les plus abondants.

## 1.2 Les kératines

Les filaments intermédiaires des kératines sont les protéines structurales majeures des kératinocytes et elles sont codées par plusieurs gènes. Les filaments intermédiaires représentent dans les cellules humaines environ le 3/4 de tous les filaments identifiés. Ces filaments forment un réseau de 10 à 12 nm de diamètre s'étendant du noyau vers la périphérie de la cellule. Ils confèrent une résistance et une stabilité tissulaire en assurant la connexion entre cellules par le biais des desmosomes et entre la cellule et la matrice par le biais des hémidesmosomes (Coulombe *et al.*, 1991). Les kératines sont de poids moléculaires variables (40-70 kDa). Elles sont subdivisées, selon ce critère, en deux groupes. Les plus petites sont appelées acides (40-60 kDa) ou kératines de type 1. Celles de poids moléculaire plus élevé sont appelées basiques (52-70 kDa) ou kératines de type 2 (Moll *et al.*, 1982). Les analyses génomiques ont récemment démontré que l'homme possède un total de 54 gènes de kératines formant deux groupes de 27 gènes sur les chromosomes 17q21.2 et 12q13.13, 28 codant pour les kératines de type 1 et 26 codant pour les kératines de type 2 (tableau 1)(Rogers *et al.*, 2004; Schweizer *et al.*, 2006).

**Tableau 1** : Les différents gènes codant pour les kératines

Gènes codant pour les kératines	Type 1	Type 2
Total des gènes	33	34
Pseudogènes	5	8
Gènes fonctionnels	28	26
➤ Gènes codant pour les kératines épithéliales	17	20
➤ Gènes codant pour les kératines de cheveux	11	6

Tableau tiré de (Schweizer *et al.*, 2006)

Parmi ces gènes, ceux codant pour les kératines épithéliales de type 1 et de type 2 sont regroupés sur deux loci situés sur deux régions chromosomiques différentes 17q12-q21 pour le type 1 et 12q12-q13 pour le type 2. Les gènes des kératines épithéliales de type 2, (*KRT1*, *KRT2* et *KRT5*) renferment 9 exons alors que ceux du type 1 (*KRT10* et *KRT14*) ne sont constitués que de 8 exons (Schweizer *et al.*, 2006). Les kératines de type 1 sont acides ( $\text{PH} < 7$ ) et celles du type 2 sont basiques ou neutre ( $\text{PH} \geq 7$ ) tableau 2.

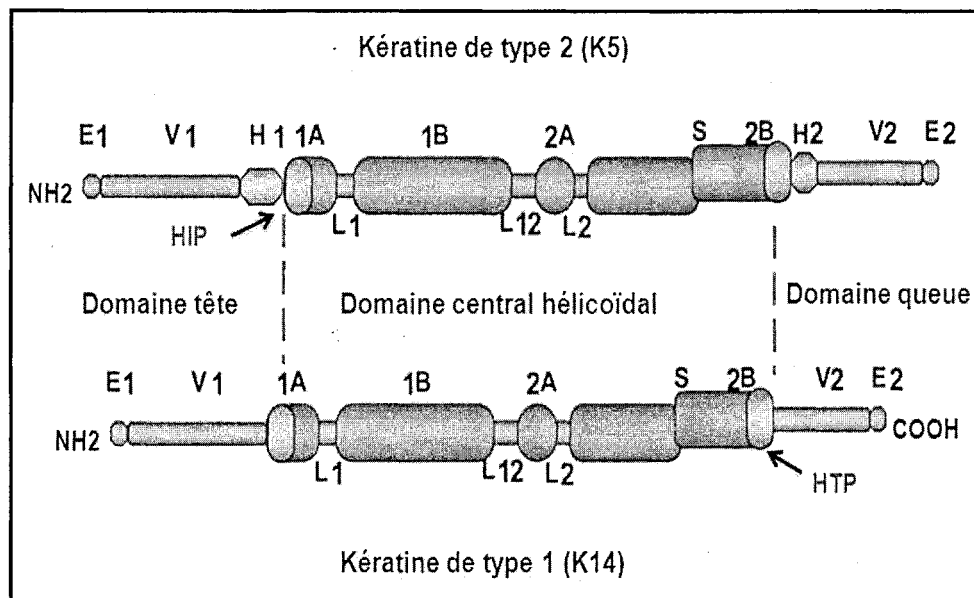
**Tableau 2** : Les kératines de type 1 et de type 2

<b>Kératines de type 1</b> ( $\text{PH} < 7$ )	Kératine 9, kératine 10, kératine 11, kératine 12, kératine 13, kératine 14, kératine 15, kératine 16, kératine 17, kératine 18, kératine 19, kératine 20
<b>Kératines de type 2</b> ( $\text{PH} \geq 7$ )	Kératine 1, kératine 2, kératine 3, kératine 4, kératine 5, kératine 6, kératine 7, kératine 8

Tableau tiré de (Schweizer *et al.*, 2006)

### 1.2.1 Structure et fonction des kératines

Les kératines de type 1 et de type 2 ont une structure similaire telle que représentée schématiquement à la figure 3. Chaque protéine est composée de deux extrémités (C-terminale COOH, une N-terminale NH<sub>2</sub>) et d'un domaine central en hélice qui comporte quatre segments hélicoïdaux : 1A, 1B, 2A et 2B. Ces domaines sont interrompus par trois parties flexibles non hélicoïdales (*Linker*) L1, L2 et L12. Le domaine central est formé de 310 acides aminés et il contient des séquences répétitives formées de 7 résidus dont deux hydrophobes impliqués dans la formation de la structure hélicoïdale (Conway and Parry, 1988). Au centre du domaine 2B, il existe une séquence peptidique (désignée par la lettre S dans la figure 3) causant une irrégularité dans la jonction de deux séquences répétitives suite à une délétion de trois acides aminés. Cette région serait impliquée dans l'élongation et la rotation des kératines. Cependant, elle ne participe pas à la formation du domaine hélicoïdal (Steinert *et al.*, 1993). De plus, il a été rapporté que cette région est conservée dans tous les filaments intermédiaires (Conway and Parry, 1988).



**Figure 3 : Représentation schématique de la structure des kératines de type 1 et de type 2**

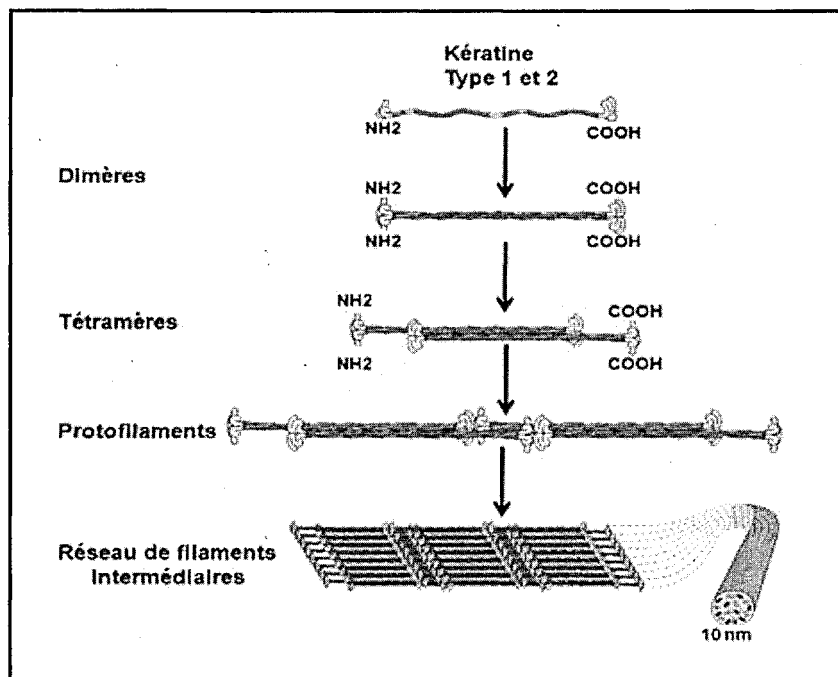
Les kératines de type 1 et de type 2 ont structure similaire. Elles comportent un domaine central composé de quatre parties (1A, 1B, 2A et 2B) interrompues par trois segments, appelés (linker), un domaine C-terminal et N-terminal. La différence entre les deux types, celles du type 1 présentent la partie H1 et H2 contrairement à celles du type 2. Modifiée de (Uitto *et al.*, 2007)

Les extrémités N-terminale du domaine 1A et C-terminale du domaine 2B sont caractérisées par deux motifs peptidiques hélicoïdaux hautement conservés désignés par *Helix Initiation Peptide* (HIP) et *Helix Termination Peptide* (HTP) (domaines représentés en rose sur la figure 3). Constitués de 20 acides aminés, ces motifs interviennent lors de l'assemblage des filaments de kératines en hétérodimères (Steinert, 1993; Steinert *et al.*, 1993). Plusieurs des maladies héréditaires observées, causées par les kératines altérées sont directement liées aux mutations des motifs HIP et HTP. La comparaison intergroupe ou intragroupe des kératines de type 1 et 2 a



permis de montrer certaines différences entre les kératines au niveau des régions variable (V1), homologue (H1) et terminale (E pour end) du domaine tête et des régions V2, H2 et E du domaine queue. En effet, les kératines de type 2 sont plus longues et plus extensibles que celles de type 1 (Arin, 2009). Les extrémités du filament de kératines entrent en interaction avec d'autres filaments et protéines cellulaires. Elles servent de substrat pour des modifications post-traductionnelles régulant ainsi la structure, l'organisation et la fonction du filament (Izawa and Inagaki, 2006; Omary *et al.*, 2006).

Les kératines de type 1 et de type 2 s'associent en hétérodimères dans un ratio molaire de 1:1 formant ainsi un réseau de filaments structuré. Les hétérodimères s'assemblent de façon échelonnée et antiparallèle pour former des tétramères. Ces tétramères s'unissent ensuite pour former des protofilaments qui à leur tour se joignent latéralement pour construire un réseau de filaments intermédiaires (figure 4). Chaque construction comporte huit protofilaments en forme de corde de 10 à 12 nm de diamètre (Chamcheu *et al.*, 2011b; Herrmann and Aebi, 2004; Parry, 1996; Steinert *et al.*, 1976; Steinert *et al.*, 1993).



**Figure 4 : Représentation schématique des associations de la kératine 14 et la kératine 5 en dimères**

L'association des kératines de type 1 et 2 forme les hétérodimères qui s'assemblent de façon échelonnée et antiparallèle en tétramères stables. Les tétramères s'associent bout à bout pour donner naissance aux protofilaments. Enfin quatre protofibrilles s'associent latéralement pour former les filaments intermédiaires (10 nm de diamètre). Cette organisation structurale aide au maintien de l'intégrité de la peau. Modifiée de (Shimomura *et al.*, 2010)

Les deux kératines ciblées dans ce mémoire sont la kératine 5 (type 2) et la kératine 14 (type 1) puisqu'elles sont associées à la maladie traitée, soit l'EBS. Spécifiquement, les mutations affectant les gènes *KRT5* ou *KRT14* conduisent à la synthèse de protéines défectueuses incapables de former un réseau de filaments organisé ce qui cause la maladie (EBS). Plusieurs mutations ont été répertoriées sur les gènes de *KRT5* et *KRT14*. Ces dernières peuvent affecter tous les domaines des deux kératines donnant naissance aux différents phénotypes observés de la

maladie soient : l'EBS Weber-Cockayne (EBS localisée), l'EBS Koebner (EBS généralisée), l'EBS Dowling-Meara et l'EBS à pigmentation mouchetée.

### ***1.2.2 Les kératines dans les fonctions cellulaires***

Le cytosquelette de kératines régule plusieurs fonctions cellulaires. En effet, le réseau de K5 et K14 aide au maintien de l'intégrité de la peau (tel qu'il a été décrit dans la section 1.2.1). Il a été également rapporté que les kératines jouent un rôle important dans la différenciation cellulaire et la signalisation de l'apoptose (Caulin *et al.*, 2000).

#### **a) Les kératines et la croissance cellulaire**

Les kératines entrent en interaction avec des MAP kinases dans un réseau de signalisation permettant ainsi le maintien de l'homéostasie épidermique. Deux molécules clés, activées par les MAPK, sont exprimées au niveau des couches supérieures de l'épiderme et sont impliquées dans la différenciation des kératinocytes (Robitaille *et al.*, 2005; Sayama *et al.*, 2001). Ces deux molécules sont : *apoptosis signal-regulating kinase-1* (ASK1) et *dual leucine zipper-bearing kinase* (DLK). ASK sous sa forme active dans les kératinocytes induit des changements morphologiques, ce qui permet aux cellules de synthétiser d'autres kératines dans les couches supérieures de l'épiderme et poursuivre ainsi leur cycle de différenciation jusqu'à la couche cornée. Il a été également rapporté que l'augmentation de la phosphorylation des kératines (résidus sérine) et la réorganisation des filaments intermédiaires sont observées lors de la mitose. Ceci suggère que l'organisation des filaments de kératines est régulée en grande partie par la phosphorylation (Izawa and Inagaki, 2006). À titre d'exemple, une étude a rapporté que des souris déficientes en K8/K18

subissent un retard dans leur croissance et que la majorité des embryons meurent quelques jours après la gestation suite à une hémorragie du foie (Baribault *et al.*, 1993). En effet la phosphorylation du résidu sérine (Ser33) de K18 permet sa liaison avec les protéines de la famille 14-3-3, ce qui augmente la solubilité des kératines au cours de la mitose (Ku *et al.*, 2002).

#### b) Les kératines et l'apoptose

L'apoptose est un processus important pour la survie des organismes pluricellulaires. Les filaments de kératines protègent plusieurs modèles cellulaires en culture de l'apoptose médiée par le *tumor necrosis factor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ). (Caulin *et al.*, 2000) Une étude a rapporté que les cellules déficientes en K8 et en K18 sont 100 fois plus sensibles au TNF- $\alpha$  (Caulin *et al.*, 2000). La liaison du TNF- $\alpha$  à son récepteur TNF-R1 recrute le *tumor necrosis factor receptor type1 associated death domain protein* (TRADD qui est une protéine de 34 kDa). TRADD se lie à son tour au récepteur TNF-R2 au niveau du domaine de la mort cellulaire permettant ainsi à la voie de signalisation de l'apoptose de s'initier (Inada *et al.*, 2001). L'interaction de K8 et K18 avec la partie COOH de TRADD par le biais de leur partie NH<sub>2</sub> protège les cellules de l'apoptose médiée par le TNF- $\alpha$  en séquestrant TRADD ce qui l'empêche ainsi de se lier au récepteur TNF-R1 (Inada *et al.*, 2001). En l'absence de K18 chez un embryon de souris, le trophoblaste (couche de cellules externes de la morula) est détruit par apoptose sous l'effet du TNF $\alpha$  (Jaquemar *et al.*, 2003).

Des travaux antérieurs ont rapporté le rôle de K8/K18 dans la régulation de l'apoptose médiée par le récepteur *apoptosis stimulating fragment* (Fas). La stimulation des Fas génère une réponse apoptotique plus élevée dans les hépatocytes

de souris déficientes en K8/K18 (Bowcock and Krueger, 2005; Gilbert *et al.*, 2001). Dans les hépatocytes de type sauvage, K8 et K18 sont localisées à la surface de la cellule et jouent un rôle dans le maintien de l'intégrité de la membrane cellulaire et tandis que Fas est en grande partie dans l'appareil de Golgi. Dans le cas de mutation sur K8 ou K18, Fas migre vers la surface via les microtubules et déclencher ainsi la voie des caspases (Gilbert *et al.*, 2001).

### c) Les kératines et la pigmentation

Les kératines interviennent dans la régulation de la pigmentation de la peau. Sous l'effet des rayons ultra-violets ou de médiateurs biologiques, le processus de pigmentation est amorcé et par conséquent la mélanine est produite par les mélanocytes. Ces derniers sont localisés dans la couche basale de l'épiderme et sont en contact avec les kératinocytes par de nombreuses dendrites. Des mutations dans les gènes *KRT5* ou *KRT14* causent des troubles de pigmentation (Zimmermann *et al.*, 2011). En effet, il existe des mutations (par exemple la mutation P25L sur le gène *KRT5* ou M119T sur le gène *KRT14*) qui conduisent à une hyperpigmentation de la peau (Harel *et al.*, 2006; Tay and Weston, 1996). Une étude en 2003 a rapporté que la délétion de la guanine (G) 1649 au niveau du gène de la *KRT5* aboutit à une forme rare d'EBS, caractérisée par la formation d'érythème annulaire chez les patients adultes. La mutation conduit à une forme plus longue de la K5 comparativement à l'état sauvage, précisément causée par un décalage du codon stop (Gu *et al.*, 2003). L'étude de Betz *et al.*, en 2006 a rapporté également que des mutations sur les gènes *KRT5* et *KRT14* engendrent d'autres maladies pigmentaires telle que Dowling-Degos (Betz *et al.*, 2006).

---

## **CHAPITRE 2**

### **ÉPIDERMOLYSES BULLEUSES HÉRÉDITAIRES**

#### **2.1 Définition des épidermolyses bulleuses héréditaires**

Les épidermolyses bulleuses héréditaires (EBH) constituent un groupe de dermatoses qui se manifestent par la formation de cloques et de lésions conduisant à une fragilité de la peau (Pulkkinen and Uitto, 1999). Il s'agit de maladies rares à faible prévalence dites également maladies orphelines puisqu'elles affectent moins d'un individu sur 20 000 (Horn *et al.*, 1997). Le degré de sévérité varie en fonction de la forme de la maladie (Roth *et al.*, 2009). Les recherches sur les EBH ont identifié plusieurs mutations affectant dix gènes différents, ce qui peut expliquer l'hétérogénéité de la maladie (Uitto and Richard, 2005).

#### **2.2 Différents types d'épidermolyses bulleuses héréditaires**

Les EBH sont subdivisées en trois principaux types en fonction de la couche de la peau atteinte (Sawamura *et al.*, 2010). On distingue : l'épidermolyse bulleuse simplex (EBS) dont les altérations affectent les kératinocytes basaux au niveau des protéines plectine et kératines 5 et 14, l'épidermolyse bulleuse dystrophique (EBD) dont le derme est fragilisé au niveau du collagène et l'épidermolyse bulleuse jonctionnelle (EBJ) où les protéines de lamina lucida de la membrane basale ne sont pas fonctionnelles (tableau 3).

**Tableau 3:** Les principales catégories d'EBH et leur défaut moléculaire.

Type d'EBH	Sous-types	Protéines
EB simplex (EBS)	Dowling-Meara, Koebner, Weber-Cockayne	K5, K14
	Dystrophie musculaire	Plectine
EB dystrophique (EBD)	Dominante, récessive Hallopeau-Siemens	Collagène VII
EB jonctionnelle (EBJ)	EBJ de Herlitz	Laminine 332
	EBJ non Herlitz	Laminine 332, BP180
	EBJ avec atrésie pylorique	Integrines $\alpha 6\beta 4$

Tiré de (Sawamura *et al.*, 2010)

### 2.2.1 L'épidermolyse bulleuse simple

Dans les différentes formes d'EBS, les décollements cutanés prennent naissance au niveau des kératinocytes basaux (épiderme). La forme d'EBS dominante est causée par des mutations affectant les gènes des kératines 14 et 5 (*KRT14* et *KRT5*) aboutissant à trois principaux sous types : Weber-Cockayne (EBS-WC ; forme localisée), Koebner (EBS-K : forme généralisée) et Dowling-Meara (EBS-DM; phénotype le plus sévère) (Sawamura *et al.*, 2010). Les mutations qui causent le phénotype modéré (EBS-loc) sont localisées dans le domaine Linker (L1-2) et celles qui causent l'EBS-DM sont généralement situées au niveau du domaine central (1A ou 2B) (Chan *et al.*, 1993; Lane and McLean, 2004; Lane *et al.*, 1992). La forme récessive de l'EBS est due aux mutations du gène de la plectine. Elle est caractérisée

par une atteinte plus générale et une dystrophie musculaire. Une forme létale de l'EBS due aux mutations de la plectine a été récemment détectée. Elle se caractérise par une atrésie pylorique qui s'ajoute à la formation des ampoules cutanées (Pfundner and Uitto, 2005; Sawamura *et al.*, 2007).

### 2.2.2 *L'épidermolyse bulleuse dystrophique*

Les défauts moléculaires de l'EBD affectent le derme. La maladie présente à la fois une forme autosomique dominante et une forme autosomique récessive. Toutefois, les deux formes sont dues à la mutation du gène codant pour le collagène VII (*COL7A1*). Cette mutation entraîne un défaut de formation des fibrilles d'ancrage (Christiano *et al.*, 1994). L'EBD récessive Hallopeau–Siemens constitue le phénotype le plus sévère de la maladie. La membrane basale des patients souffrant de ce phénotype d'EBD produisent peu ou pas de collagène VII (Hilal *et al.*, 1993).

### 2.2.3 *L'épidermolyse bulleuse jonctionnelle*

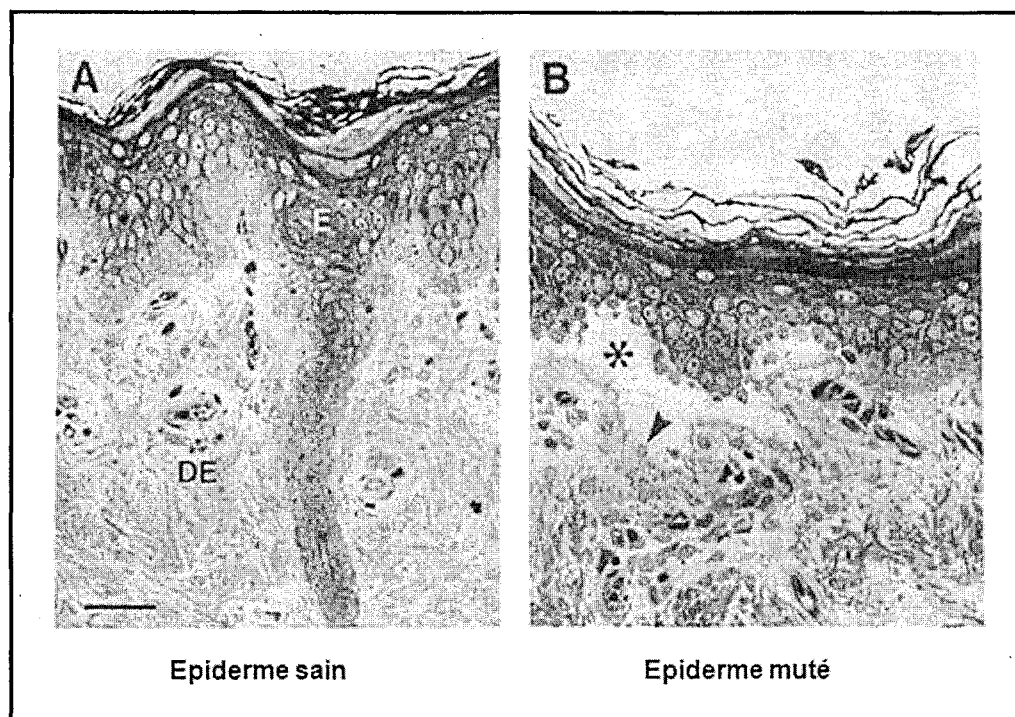
Les sous types de l'EBJ se transmettent de manière autosomique récessive et se caractérisent par la formation de cloques dans la *lamina lucida*. Le groupe EBJ de Herlitz présente le phénotype le plus sévère. La plupart des nourrissons atteints succombent à la maladie dès la naissance à cause de l'infection généralisée (Yuen *et al.*, 2011). Le type EBJ est dû aux mutations homozygotes ou hétérozygotes faisant apparaître un codon de terminaison prématuré (CTP) qui touchent un des trois gènes codant pour la laminine 332 (Aberdam *et al.*, 1994). La même mutation au niveau d'un ou des deux allèles des gènes de la laminine 332 est associée à l'EBJ non-Herlitz (McGrath *et al.*, 1995). Les mutations affectant les gènes codant pour les intégrines  $\beta 4$  et  $\alpha 6$  engendrent un autre sous type nommé : l'EBJ avec atrésie pylorique



(Georges-Labouesse *et al.*, 1996; Vidal *et al.*, 1995). L'analyse de la banque de données des mutations génétiques suggère que les CTP se retrouvent dans la forme létale tandis que les mutations faux-sens sont fréquemment associées à la forme non létale (Abe *et al.*, 2007).

### 2.3 Définition et épidémiologie de l'épidermolyse bulleuse simple

L'EBS affecte environ une personne sur 30 000 à une personne sur 50 000 de la population mondiale (Tang *et al.*, 2009). La sévérité de la maladie est différente d'un individu à l'autre et dépend aussi de la nature de la mutation (Coulombe *et al.*, 1991). Tel qu'indiqué précédemment, l'EBS est une maladie qui est souvent causée par des mutations responsables du décollement de l'épiderme au niveau des gènes qui codent pour la K5 ou la K14 (Figure 5). À ce jour, plus de 100 mutations ont été répertoriées sur les gènes *KRT5* et *KRT14* (Bowden *et al.*, 2009). L'EBS est également plus marquée chez les enfants en pleine croissance (Kowalewski *et al.*, 2007). En effet, dans la physiopathologie de l'EBS, l'inflammation est un processus important qui implique une activation des voies immunitaires Th1 et Th2 (Kupper, 1990). Ainsi puisque chez les enfants, le système immunitaire n'est pas à maturité, ceci pourrait expliquer la sévérité et la morbidité de la maladie comparativement aux adultes (Fine *et al.*, 2008). Il a été également rapporté que les cloques disparaissent avec l'âge à cause de l'épaississement de la peau qui constitue un moyen compensatoire (Paller, 2004).



**Figure 5 : Représentation schématique d'un tissu de peau normal et muté**

La figure ci-dessus représente en (A) un épiderme (désigné par E) sain qui est rattaché au derme désigné par (DE) et en (B) un épiderme de sujet atteint d'EBS, muté en K14 dont le phénotype permet de noter que l'épiderme qui décolle du derme (\*). Modifiée de (Chan *et al.*, 1994)

## 2.4 Différents types d'épidermolyse bulleuse simplex

### 2.4.1 *Épidermolyse bulleuse localisée (EBS-loc)*

L'EBS-loc se caractérise par la localisation des bulles cutanées au niveau des pieds et des mains. Les premiers symptômes de la maladie apparaissent généralement après la naissance (vers 18 mois) et parfois à l'adolescence (Rugg *et al.*, 2007). Une étude sur la génétique d'une famille slovène en 2004 a rapporté une nouvelle

mutation faux-sens sur le gène *KRT5* sur le sous-domaine L1-2 où l'acide aspartique est remplacé par l'acide glutamique (Liovic *et al.*, 2000). En effet, différentes mutations (D328V et D328H V323A, V324D, L325P, M327K et M327T) sur le même domaine du gène *KRT5* peuvent causer ce phénotype (Chiang *et al.*, 2008; Liovic *et al.*, 2000). La substitution de l'acide aminé sur le domaine 2B de K14 conduit aussi à une mutation faux-sens (L408M) et entraîne le phénotype EBS-loc (Schuilenga-Hut *et al.*, 2003). Une autre étude a également rapporté que dans une famille polonaise présentant l'EBS-loc (mutation V133M), les adultes ne souffrent que de petites cloques légères mais leurs enfants ont des lésions plus généralisées (Hamada *et al.*, 2005).

#### 2.4.2 *Épidermolyse bulleuse pigmentation mouchetée (EBS-MP)*

L'EBS-MP se caractérise par la formation de taches brunes surtout au niveau de l'abdomen, des aisselles et des pieds. Elle apparaît généralement pendant l'enfance. Ces taches ont environ 2 à 5 millimètres de diamètre (Irvine *et al.*, 2001). Une étude a rapporté que ces troubles de la pigmentation disparaissent avec l'âge (Tay and Weston, 1996) mais parfois restent toute la vie (Fischer and Gedde-Dahl, 1979). L'histologie de la peau montre une teneur accrue en mélanine dans les mélanophages (Fischer and Gedde-Dahl, 1979) et l'analyse ultra-structurale des zones pigmentées a révélé une présence abondante des mélanosomes dans les kératinocytes basaux (Uttam *et al.*, 1996). L'EBS-MP est souvent liée à une mutation faux-sens P25L (substitution de la proline en leucine) sur le domaine V1 non-hélicoïdal de la K5 (Irvine *et al.*, 2001). Il a été également rapporté que des mutations au niveau du gène codant pour la K14 pouvaient être responsables de ce type d'EBS (Browning and Mohr, 2012). L'étude de Bchenia *et al.*, a également rapporté que la transition de la leucine en résidu proline à la position 74 de K5 engendre le phénotype EBS-MP.

L'étude a également rapporté que le gène de la tyrosinase *TYR* responsable de la biosynthèse de la mélanine est surexprimé chez le patient atteint d'EBS-MP. Ceci suggère que cette enzyme joue un rôle pertinent dans la physiopathologie de la maladie (Bchetnia *et al.*, 2012).

#### **2.4.3 *Épidermolyse bulleuse généralisée (EBS-gen)***

L'EBS généralisée, ou de type Koebner est également appelée EBS-non Dowling-Meara. Les bulles cutanées apparaissent à la naissance ou dès les premiers mois de la vie (Yasukawa *et al.*, 2006). Elle se distingue de l'EBS-loc par le nombre de zones atteintes qui sont plus nombreuses et de l'EBS-DM par l'absence de kératines agglomérées dans les kératinocytes basaux. En général, EBS-gen est moins sévère que l'EBS-DM mais le chevauchement clinique est élevé. Il a été rapporté également que les mutations sont souvent localisées dans le domaine central et le domaine de liaison L1-2 des 2 kératines (K5 et K14) (Bonifas *et al.*, 1991; Galligan *et al.*, 1998). Galligan *et al.*, en 1998, ont rapporté que le changement d'une base thymine (T) pour une cytosine (C) dans le codon 323 du gène *KRT5* chez des individus atteints d'EBS-K amène un remplacement d'une valine en alanine sur le septième résidu du domaine L1-2. Ils ont rapporté aussi que la valine à la position 7 est conservée dans toutes les kératines de type 2, ce qui suggère qu'elle joue un rôle important dans l'intégrité du filament intermédiaire (Galligan *et al.*, 1998).

#### **2.4.4 *Épidermolyse bulleuse Dowling-Meara (EBS-DM)***

Il s'agit de la forme la plus sévère d'EBS et elle peut être mortelle (Titeux *et al.*, 2006). Les lésions et les bulles cutanées apparaissent à la naissance et peuvent

toucher aussi les organes internes. Dans les cas graves d'EBS-DM, l'analyse d'immunohistochimie et la microscopie électronique ont détecté un clivage intra-épidermique dans la couche basale de l'épiderme (Porter and Lane, 2003). En outre, les kératinocytes basaux chez les patients atteints d'EBS-DM présentent généralement des agrégats protéiques à la suite d'un choc (thermique ou osmotique) (Anton-Lamprecht and Schnyder, 1982). Les mutations associées avec le type EBS-DM sont généralement localisées dans les régions hautement conservées des domaines centraux des deux kératines (K5/K14) (Herrmann and Aebi, 1998). Le résidu le plus souvent altéré est l'arginine en position 125 de K14, qui représente 70% de tous les cas d'EBS-DM (Porter and Lane, 2003).

Plusieurs études se sont intéressées à l'EBS afin de trouver des cibles thérapeutiques. En effet plusieurs molécules à potentiel thérapeutique ont été étudiées. Le sulforaphane (SF) est une molécule (extrait du brocoli) qui stimule la production de K16 et K17 (Kerns *et al.*, 2007) alors que la molécule triméthylamine N-oxyde (TMAO) (issue de certains crustacés et requins) réduit les agrégats protéiques formés par les mauvais repliements des kératines à la suite d'un stress thermique (Chamcheu *et al.*, 2011a). Radoja *et al.*, 2004 ont rapporté que l'IFN- $\gamma$  pourrait aussi être une cible thérapeutique pour l'EBS en stimulant la production de K15 qui pourrait remplacer K14 mutée en s'assemblant avec la K5 pour former les hétérodimères.

---

## CHAPITRE 3

### INTERFÉRON GAMMA

#### 3.1 Définition

Les interférons (INF) sont des glycoprotéines de taille moyenne (17-25 kDa) appartenant à la famille des cytokines. Elles sont initialement décrites comme molécules à activité biologique, secrétées lors d'une infection virale (Isaacs and Lindenmann, 1987). Il s'agit de protéines solubles caractérisées par des propriétés antivirales, anti-tumorales et immunomodulatrices. Les interférons sont regroupés en trois principales familles en fonction de leur spécificité aux récepteurs, de leur homologie de structure, de leurs propriétés physicochimiques ainsi que de leur localisation chromosomique. Les IFN de type 1 (IFN- $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\omega$ ) sont secrétés par les leucocytes, les cellules épithéliales et les fibroblastes (Kadowaki *et al.*, 2001). Chez l'homme le type 2 est constitué par l'IFN- $\gamma$  et il est secrété sous forme clivée par les cellules T activées et les cellules NK. (Schroder *et al.*, 2004) Le type 3 regroupe l'IFN- $\lambda$ 1, l'IFN- $\lambda$ 2 et l'IFN- $\lambda$ 3 qui sont synthétisés par les cellules dendritiques (Sheppard *et al.*, 2003).

##### 3.1.1 Interféron de type 2

La famille de type 2 est représentée par l'IFN- $\gamma$ . Il s'agit d'une glycoprotéine de 17 à 25 kDa (Devos *et al.*, 1982; Sareneva *et al.*, 1995). Elle est biologiquement active sous forme d'homodimères et se fixe sur son récepteur tétraédrique composé

de deux chaînes d'IFN $\gamma$ -R1 et deux chaînes d'IFN $\gamma$ -R2. Ce complexe active ainsi les tyrosines *Janus kinase* (JAK) et la dimérisation du facteur de transcription *Signal transducers and activators of transcription* (STAT1) (figure 6) (Baccala *et al.*, 2005; Farrar and Schreiber, 1993; Schroder *et al.*, 2004).

Plusieurs polymorphismes conduisant à différentes maladies incluant l'arthrite rhumatoïde et les maladies dues aux rejets de greffes, sont répertoriés sur le gène de l'IFN- $\gamma$  (Cavet *et al.*, 2001).

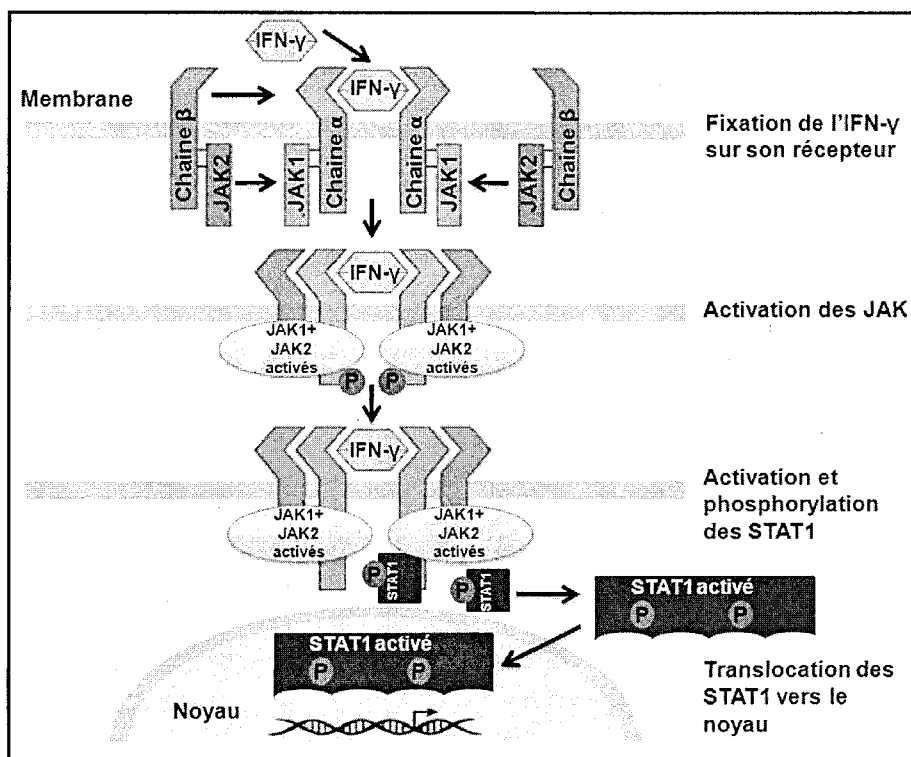


Figure 6 : Représentation schématique de la voie de signalisation d'IFN- $\gamma$

L'IFN- $\gamma$  phosphoryle son récepteur après fixation. Le complexe phosphorylé ainsi formé active les JAK1 et JAK2. Cette activation conduit au recrutement et à la phosphorylation des STAT1. Par la suite les STAT 1 sont activés et forment des homodimères qui seront transférés dans le noyau. L'association des deux chaînes forme un récepteur fonctionnel et conduit ainsi à l'expression des gènes impliqués dans les différentes réponses à l'IFN- $\gamma$ . Modifiée de (Baccala *et al.*, 2005)

### 3.1.2 Structure de l'IFN- $\gamma$

L'IFN- $\gamma$  est formé de deux monomères identiques. Chaque monomère est constitué de six hélices  $\alpha$  (figure 7). Ces hélices sont liées entre elles de façon non covalente et antiparallèle. Cette architecture forme une structure globulaire compacte.



L'IFN- $\gamma$  possède plusieurs sites de glycosylation qui lui confèrent une résistance contre les protéases (Ealick *et al.*, 1991; Samudzi *et al.*, 1991).

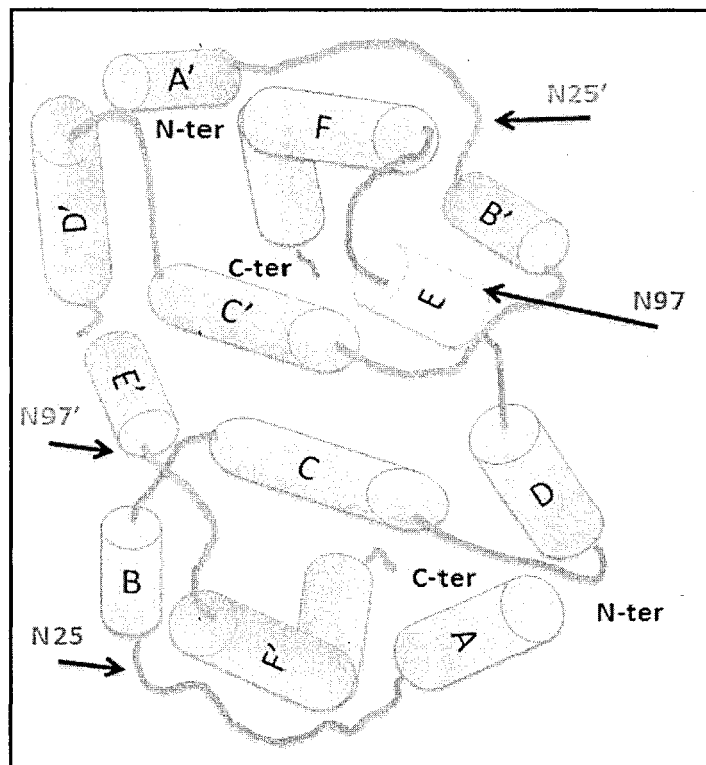


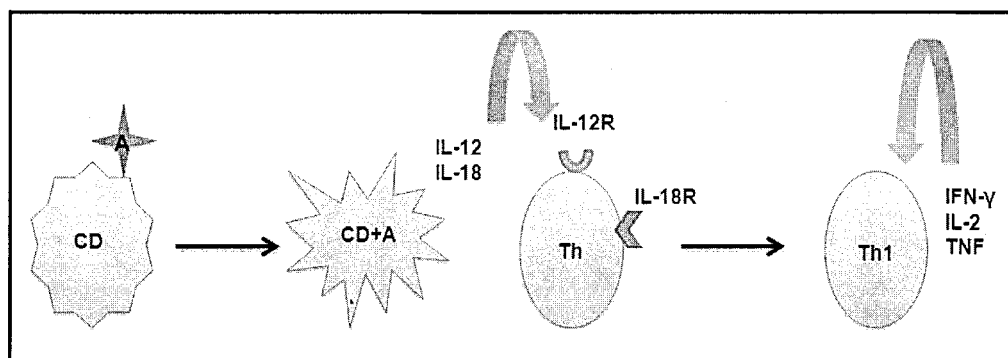
Figure 7 : Représentation schématique de la structure de l'IFN- $\gamma$

La figure ci-dessus représente la structure de l'IFN- $\gamma$  et ses principaux sites de glycosylation (représentés par les flèches). L'IFN- $\gamma$  est formé de deux monomères identiques. Chaque monomère est constitué de six hélices  $\alpha$ . Les hélices sont liées de façon non covalente. Modifiée de (Sareneva *et al.*, 1995)

### 3.2 IFN- $\gamma$ et immunité

L'IFN- $\gamma$  est synthétisé par plusieurs cellules immunitaires telles que les lymphocytes de type Th1, les cellules NK et les cellules naturelles tueuses T (NKT). Il est également produit par les cellules présentatrices de l'antigène telles que les macrophages, les cellules dendritiques ( $CD4^+$ ,  $CD8^+$ ) et les lymphocytes B (Munder *et al.*, 1998b; Sad and Mosmann, 1995; van Boxel-Dezaire and Stark, 2007).

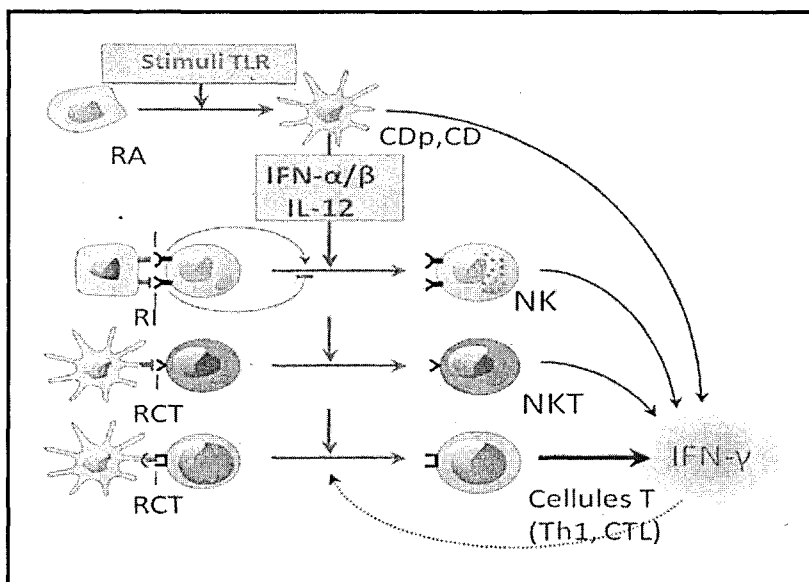
L'IFN- $\gamma$  est produit durant la réponse immunitaire innée sous l'influence et la régulation de plusieurs effecteurs tels que l'IL-12, IL-18 et IFN- $\alpha/\beta$  qui stimulent les cellules dendritiques et les cellules T favorisant l'induction des cellules Th1 (figure 8) (Frucht *et al.*, 2001; Munder *et al.*, 1998a; Munder *et al.*, 2001).



**Figure 8 : Représentation schématique de la communication entre les cellules dendritiques et les lymphocytes T pour la synthèse de l'IFN- $\gamma$**

La production de l'IFN- $\gamma$  peut avoir lieu à la suite de l'activation de plusieurs effecteurs favorisant ainsi la voie Th1. Par exemple, dans le cas de la tuberculose l'IFN- $\gamma$  renforce le système immunitaire en stimulant les cytokines par la voie Th1 pour l'élimination des pathogènes. A : antigène, CD : cellule dendritique, IL-X : interleukine-X, IL-XR : récepteur de l'interleukine, Th : cellule T Helper, TNF : Tumor Necrosis Factor. Modifiée de (Frucht *et al.*, 2001)

La maturation des cellules Th1 via les IFN- $\alpha/\beta$ , IL-12 et d'autres cytokines, telles que IL-27 et IL-23, amplifie la production d'IFN- $\gamma$  en induisant l'activation des STAT. Sous la stimulation de l'IL12, de l'IFN- $\alpha/\beta$ , et des stimuli *Toll-like receptors* (TLR), les cellules NK produisent principalement l'IFN- $\gamma$  (Salazar-Mather *et al.*, 2000; Sivori *et al.*, 2004). Il a été rapporté que les interférons  $\alpha$  et  $\beta$  peuvent stimuler ou inhiber la production de l'IFN- $\gamma$  selon la régulation du facteur de transcription STAT-1 (Nguyen *et al.*, 2000). L'activation des cellules NK dépend également d'une balance entre les récepteurs d'inhibition, reconnaissant les molécules de CMH de la classe I et les récepteurs d'activation reconnaissant des ligands endogènes non caractérisés. Les cellules NKT représentent une autre source de production de l'IFN- $\gamma$  (Baccala *et al.*, 2005). Ces cellules expriment les récepteurs des cellules T (RCT) qui sont reconnus par les cellules dendritiques liées aux phospholipides ou aux glycolipides (figure 9).



**Figure 9 : Représentation schématique de la production de l'IFN- $\gamma$**

Production de l'IFN- $\gamma$  par les cellules dendritiques et macrophages activés par les cellules T, IFN- $\alpha/\beta$  et l'interleukine 12 au cours de la réponse immunitaire innée. Ces signaux favorisent également la production de l'IFN- $\gamma$  par les NK. RA : récepteur d'activation, NK : *Natural Killer*, CD : cellule dendritique, TLR : *Toll-like Receptor*, RI : récepteur d'inhibition, RCT : récepteur des cellules T. Tirée de (Baccala *et al.*, 2005)

### 3.3 Mécanisme d'action de l'IFN- $\gamma$

Le mécanisme d'action de l'IFN- $\gamma$  est très complexe car il fait appel à de nombreuses cascades (Ma *et al.*, 2001). Le récepteur de l'IFN- $\gamma$  est composé de deux chaînes : IFN- $\gamma$ R1 et IFN- $\gamma$ R2. La chaîne R1 est une glycoprotéine de 90 kDa dont le gène humain est localisé sur le chromosome 6. Elle permet, via l'extrémité N-terminale (domaine extracellulaire), l'interaction spécifique avec son ligand (IFN- $\gamma$ ) (Aguet *et al.*, 1988). Le domaine transmembranaire de la chaîne R1 est impliqué dans l'internalisation de l'IFN- $\gamma$ . Cette région contient la séquence LPKS (résidus 266-

269) qui est responsable de l'activation de la voie de signalisation déclenchée comme réponse cellulaire à l'IFN- $\gamma$ . Le domaine cytoplasmique de R1 est particulièrement riche en résidus sérine et tyrosine dont la phosphorylation survient après la fixation de l'IFN- $\gamma$ . Ce domaine renferme aussi le site de liaison au facteur STAT-1 (Soh *et al.*, 1994) La chaîne R2, localisée sur le chromosome 21, code pour une protéine de 35 kDa riche en sites potentiels à la glycosylation. Cette protéine transmembranaire est également appelée *accessory factor-1*(AF-1). Son domaine intracellulaire est indispensable pour la transmission du signal. En effet, la délétion des 49 derniers acides aminés de l'extrémité carboxylique (COOH) de cette protéine conduit à la perte d'expression des gènes codant pour les molécules CMH. La chaîne R2 se lie à une courte séquence contenant l'histidine 196 du domaine cytoplasmique de la chaîne R1. L'association des deux chaînes forme un récepteur fonctionnel et conduit ainsi à l'expression des gènes impliqués dans les différentes réponses à l'IFN- $\gamma$  (Hemmi *et al.*, 1994; Soh *et al.*, 1994). L'IFN- $\gamma$ , sous sa forme d'homodimères, se fixe à son récepteur via ses deux extrémités N-terminale et C-terminale. La fixation de l'extrémité C-terminale au récepteur nécessite une protéine de jonction appelée héparine qui permet le changement de conformation de l'IFN- $\gamma$  favorisant ainsi son interaction avec le récepteur (figure 10) (Vanhaverbeke *et al.*, 2004). Plusieurs mutations peuvent affecter les chaînes IFN- $\gamma$ R1/R2 causant ainsi un défaut partiel ou total de la voie de signalisation de l'IFN- $\gamma$ , soit en inhibant sa fixation ou la transduction du signal. Les sujets porteurs de ce défaut génétique sont sensibles aux infections mycobactériennes (Catherinot *et al.*, 2005; Newport *et al.*, 1996).

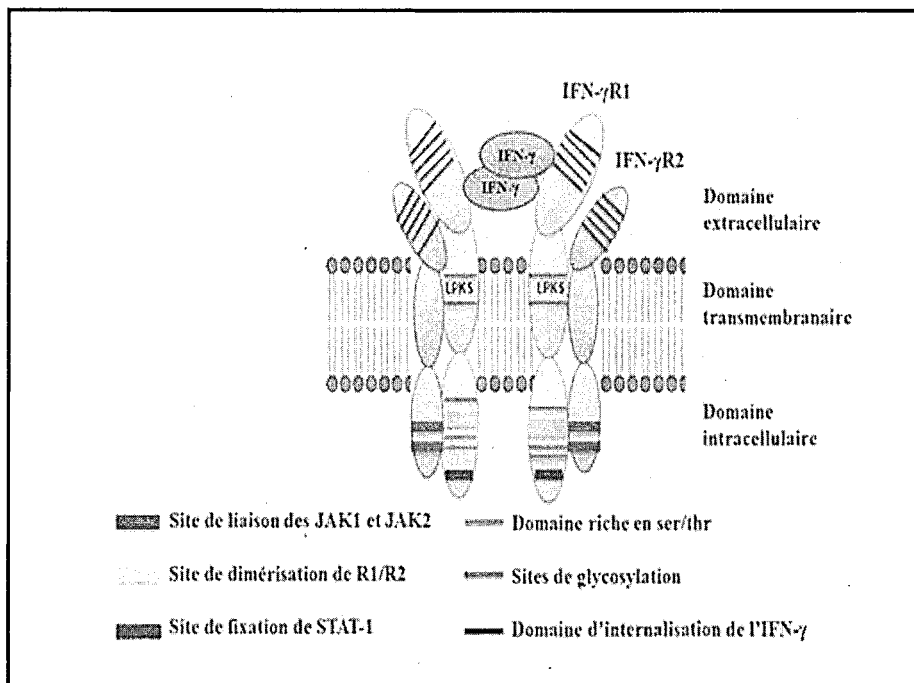


Figure 10 : Représentation schématique du récepteur de l'IFN-γ

La figure ci-dessus représente la structure du récepteur de l'IFN-γ. Il est constitué de quatre sous-unités (2α et 2β). Le domaine extracellulaire constitue le site de liaison de l'IFN-γ. Le domaine intracellulaire constitue le site de liaison des JAK et des STAT 1 et il est indispensable à la transmission du signal. Modifiée de (Meyer, 2009)

### 3.3.1 Activation de la voie de signalisation par l'IFN-γ via JAK/STAT-1

À la suite de la formation du complexe IFN-γ/récepteur, les deux chaînes du récepteur R1 et R2 se rapprochent conduisant à la phosphorylation des deux kinases JAK1 et JAK2. À leur tour, ces enzymes se lient et phosphorylent les chaînes du récepteur et conduisent au recrutement et à la phosphorylation du facteur de transcription STAT-1. Deux molécules STAT-1 s'activent en formant un hétérodimère et forment le complexe *IFN gamma activated factor* (GAF). Le

complexe ainsi formé transloque vers le noyau et se fixe sur les sites *IFN- $\gamma$  activation sequence* (GAS) au niveau des promoteurs des gènes inductibles par l'IFN- $\gamma$  permettant la transcription des kératines (Bach et al., 1997; Komine et al., 1996; Navarro et al., 2003a; Perez et al., 1993).

### 3.3.2 Activation par l'IFN- $\gamma$ des voies de signalisation alternatives

La phosphorylation de STAT-1 au niveau de la sérine (résidu 727) contribue à une activation transcriptionnelle maximale et ce indépendamment de la voie médiée par la phosphorylation STAT-1 au niveau de la tyrosine (Wen *et al.*, 1995; Zhu *et al.*, 1997). Une autre étude a rapporté que le stress, les lipopolysaccharides (LPS) ainsi que certaines cytokines inflammatoires (IL-1 et TNF- $\beta$ ) induisent la phosphorylation de la sérine de STAT-1 et travaillent en synergie avec l'IFN- $\gamma$  pour l'activation des gènes (Kovarik *et al.*, 1999). Dans un modèle de souris, la substitution de la sérine 727 pour une alanine au niveau de STAT-1 cause non seulement des perturbations dans l'expression des gènes mais surtout de la difficulté de l'animal à combattre les infections bactériales (Varinou *et al.*, 2003).

Plusieurs études impliquent la voie des *Mitogen-activated protein kinases* (MAPK) dans la phosphorylation de STAT-1 au niveau de la sérine 727 (Wen *et al.*, 1995). L'IFN- $\gamma$  active aussi la voie p38/MAPK. Toutefois le mécanisme employé par cette kinase pour phosphoryler la sérine de STAT-1 n'est pas totalement clair (Kovarik *et al.*, 1999; Ramsauer *et al.*, 2002). Différentes études ont démontré que le phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) (Navarro et al., 2003b; Nguyen et al., 2001), la protéine kinase C delta (Deb *et al.*, 2003) et la calmoduline kinase dépendante (Nair *et al.*, 2002) sont activés par l'IFN- $\gamma$  pour jouer un rôle dans la phosphorylation de la

sérine de STAT-1. L'IFN- $\gamma$  induit également une signalisation indépendante de STAT-1. En effet, bien qu'elles restent sensibles aux infections microbiennes, les cellules déficientes en STAT-1 continuent de proliférer et sont protégées de l'apoptose. En l'absence de STAT-1, l'IFN- $\gamma$  stimule l'expression des oncogènes c-myc et c-jun qui aident au maintien de la survie et la croissance des cellules (Ramana *et al.*, 2001; Ramana *et al.*, 2000).

### 3.4 IFN- $\gamma$ et thérapies

Les premiers essais thérapeutiques avec l'IFN- $\gamma$  ont été réalisés en 1986. La première étude s'est concentrée sur les effets secondaires reliés à une dose réponse de l'interféron. Les plus fréquemment observés sont les symptômes de la grippe (fatigue, céphalée, fièvre et frisson), des éruptions cutanées, la diarrhée et la nausée. Par la suite d'autres études se sont intéressées au potentiel thérapeutique de la cytokine contre différents cancers et infections (Alberts *et al.*, 2008; Kurzrock *et al.*, 1986; Suárez-Mendez *et al.*, 2004).

#### 3.4.1 IFN- $\gamma$ et cancer

Le rôle de l'IFN- $\gamma$  dans la réponse aux cancers a fait l'objet de nombreuses recherches. L'immunothérapie a montré une forte corrélation entre la production de l'IFN- $\gamma$  et la régression des tumeurs. Ceci est en relation avec les activités de la cytokine à savoir : l'effet anti-angiogénique, l'inhibition de la prolifération cellulaire, la régulation d'expression des molécules des classes I et II du CMH, la sensibilisation à l'apoptose et la stimulation de l'activité anti-tumorale du système immunitaire (Jonasch and Haluska, 2001).



L'administration de l'IFN- $\gamma$  par instillation intravésicale, s'est avérée efficace dans le traitement du carcinome superficiel de la vessie. Il a été observé que la production des molécules *human leukocyte antigen* (HLA-DR) est induite par de fortes concentrations de l'IFN- $\gamma$  chez des patients atteints du cancer colorectal. La synthèse de l'ARNm de l'IFN- $\gamma$  est en corrélation avec la production des molécules HLA-DR qui est utilisée comme pronostic dans ce type de cancer (Giannopoulos *et al.*, 2003; Matsushita *et al.*, 2006). La forte production de l'IFN- $\gamma$  intratumoral en relation avec la présence des cellules T CD3<sup>+</sup> est utilisée comme pronostic dans le cancer des ovaires (Marth *et al.*, 2004).

L'utilisation de l'IFN- $\gamma$  dans la thérapie génique s'est avérée bénéfique dans le traitement du cancer de la peau chez la souris. En effet, l'injection d'un plasmide recombinant renfermant le gène de l'IFN- $\gamma$  dans la queue de la souris cancéreuse conduit à une baisse de papillomavirus, à un arrêt de la prolifération des cellules épidermiques et à une activation de la caspase 3. Ces changements sont en relation avec l'augmentation de l'IFN- $\gamma$  sérique (Ko *et al.*, 2011).

#### 3.4.2 IFN- $\gamma$ et tuberculose

La tuberculose survient à la suite d'une infection par le germe *mycobacterium tuberculosis* appelé également bacille de Koch affectant principalement le système respiratoire (Rozyńska and Targowski, 2012). Après quatre semaines de traitement, l'IFN- $\gamma$  administré sous forme d'aérosols augmente l'activité du facteur STAT-1 et active les macrophages alvéolaires. Il conduit ainsi à la diminution de l'infection chez les patients résistant aux drogues contre la tuberculose (Condos *et al.*, 2003; Condos *et al.*, 1997). Suárez-Mendez *et al.*, 2004 ont observé après injection par voie intramusculaire de l'IFN- $\gamma$  (comme adjuvant à la chimiothérapie pendant 6 mois) une

nette diminution des lésions pulmonaires ainsi qu'un résultat négatif des frottis pour les bacilles. Une prise de poids des patients avec une bonne tolérance à l'IFN- $\gamma$  a également été constatée (Suárez-Mendez *et al.*, 2004).

Dans une autre infection mycobactérienne, 32 patients ont été traités soit avec l'IFN- $\gamma$  comme additif à la chimiothérapie, ou avec la chimiothérapie seule (témoins). L'IFN- $\gamma$  a conduit à une amélioration globale de 72,2% avec un taux de mortalité de 11,1% versus 37,5% d'amélioration et un taux de 35,7% de mortalité dans le groupe témoin (Milanes-Virelles *et al.*, 2008).

### 3.4.3 IFN- $\gamma$ et dermatite atopique

La dermatite atopique est une maladie de la peau affectant principalement les enfants. Elle est caractérisée par la formation de lésions sèches et des desquamations prurigineuses. Les personnes sujettes à ce type de maladie sont souvent prédisposées génétiquement aux allergies (Dhar and Banerjee, 2010). En réponse à cette maladie, la balance immunitaire Th1/Th2 tend vers la voie Th2. En effet, le niveau des interleukines IL-4 et IL-5 ainsi que les éosinophiles sont élevés dans le sang tandis que l'IFN- $\gamma$  et les cytokines de la voie Th1 sont en baisse (Tang *et al.*, 1993). Une étude utilisant l'IFN- $\gamma$  recombiné sur 22 patients souffrant de la dermatite atopique sévère a rapporté que l'interféron est bénéfique. Au début de l'étude 14 des 22 patients ont reçu par voie sous-cutanée trois doses journalières et graduelles d'IFN- $\gamma$  : 10  $\mu\text{g}/\text{m}^2$ , 50  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  et 100  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  dans le but d'identifier la dose maximale tolérée. À la suite de cette première phase de l'étude, les patients ont répondu aux différentes doses par une diminution graduelle de la sévérité de leur maladie. Aucun patient n'a manifesté d'effets secondaires à la 1<sup>ère</sup> dose. Trois des quatorze patients recevant la

2<sup>ème</sup> dose ont souffert de maux de tête passagers. Lors de la 2<sup>ème</sup> phase de l'étude, huit nouveaux patients ont joint le traitement. Les 22 patients, traités avec 50µg/m<sup>2</sup>/6 semaines d'IFN-γ, ont répondu au traitement par une diminution de la sévérité et une nette amélioration de leur état de santé. À la dernière phase, neuf patients ont continué le traitement quatorze mois supplémentaires afin de vérifier la tolérance à l'IFN-γ à long terme. Bien que les symptômes de la maladie régressent, le niveau des IgE sériques ne diminue pas avec l'IFN-γ (Boguniewicz *et al.*, 1990). Reinhold *et al.*, ont administré par injection à trois patients, 100 mg d'IFN-γ/5jours lors de la première semaine de traitement, suivies de trois injections/semaine pendant trois semaines supplémentaires. À la fin de la 4<sup>ème</sup> semaine de traitement, l'eczéma avait disparu ainsi que l'inflammation et les démangeaisons. Une baisse des IgE sériques a également été constatée (Reinhold *et al.*, 1990). Une autre étude réalisée sur quatorze patients a rapporté des résultats similaires. Le traitement s'est fait en six semaines par injection sous-cutanée de 100 mg d'IFN-γ. Toutefois, la diminution du niveau des IgE dans le sang n'a pas été observée (Reinhold *et al.*, 1993).

#### 3.4.4 IFN-γ et psoriasis

Le psoriasis est une affection cutanée inflammatoire et chronique considérée comme une maladie auto-immune à susceptibilité génétique. En effet, le polymorphisme du gène de l'IFN-γ peut être corrélé à l'apparition de la maladie (Baran *et al.*, 2008). Chez les sujets atteints, le niveau d'IFN-γ est élevé. La cytokine régule l'expression du gène *T-box transcription factor gene* (T-bet) favorisant ainsi l'induction de la voie Th1 (Zhu *et al.*, 2010). Une étude a montré que l'IFN-γ stimule l'expression des gènes *KRT16* et *KRT17* dans les kératinocytes humains en culture. Il contribue ainsi à la régénérescence de l'épiderme affecté par les lésions du psoriasis (Wei *et al.*, 1999).

Chez les sujets atteints des différentes formes d'EBH, les cellules PBMC (cellules mononuclées périphériques du sang), produisent un faible taux d'IFN- $\gamma$ . Le degré de sévérité des affections cutanées est relié à la déficience des réponses immunitaires ce qui est en étroite relation avec la baisse des cytokines (Chopra *et al.*, 1990).

---

# HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS

## Hypothèse

Comme indiqué dans les chapitres précédents, l'EBS est causée par des mutations au niveau des gènes codant pour K5 ou K14. Cette maladie, par définition est une maladie orpheline et actuellement il n'existe aucune thérapie pour guérir les patients. Pour cela, la recherche se base sur des molécules à effet thérapeutique documenté afin de réduire ou même éliminer les agrégats protéiques causés par le mauvais appariement des kératines. En effet l'étude de Radoja *et al.*, en 2004 a rapporté que dans les cellules HeLa, l'utilisation de l'IFN- $\gamma$  stimulerait la production de K15 appartenant à la même famille que la K14 et qui pourrait la remplacer en formant des hétérodimères avec K5 (Radoja *et al.*, 2004).

En se basant sur cette étude, notre hypothèse est que l'IFN- $\gamma$  va stimuler la production de K15 dans des kératinocytes humains en culture isolés de patients EBS.

## Objectif

L'objectif de cette étude est de vérifier l'effet de l'IFN- $\gamma$  sur la production de K15 dans des kératinocytes immortalisés et primaires isolés de patients atteints d'EBS causée par une mutation au niveau de K14. En effet K15 pourrait remplacer la K14 mutée en s'associant à la K5 pour former des hétérodimères.

---

## **CHAPITRE 4:**

### **Interferon gamma impact on keratin aggregates in keratinocytes isolated from Epidermolysis Bullosa Simplex patients caused by keratin 14 mutations**

**Authors list:** Tarik Farez<sup>1</sup>, Catherine McCuaig<sup>2</sup>, Julie Powell<sup>2</sup>, Georgette Leclerc<sup>3</sup>, Audrey Dupérée<sup>3</sup>, Charles Morin<sup>3</sup>, Valérie Legendre-Guillemain<sup>1</sup>, Mbarka Bchetnia<sup>1</sup>, Catherine Laprise<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Université du Québec à Chicoutimi, Département des sciences fondamentales, Saguenay, Canada.

<sup>2</sup> Hôpital Sainte-Justine, Montréal, Canada. <sup>3</sup> Centre de santé et de services sociaux de Chicoutimi, Saguenay, Canada.

#### **Corresponding Author:**

Catherine Laprise, Ph.D.

Université du Québec à Chicoutimi

Département des sciences fondamentales, P4-2150

555, boulevard de l'Université, Saguenay (Québec) G7H 2B1.

Tel: (418) 545-5011 poste 5659

Fax: (418) 615-1203

E-mail: [catherine.laprise@uqac.ca](mailto:catherine.laprise@uqac.ca).

## Abstract

Epidermolysis bullosa simplex (EBS) is a rare genetic disease characterized by basal keratinocytes cytolysis, intra-epidermal blister formation and skin fragility. EBS is classified into different subtypes according to the severity: EBS-localized (EBS-loc), EBS-generalized (EBS-gen) and EBS-Dowling-Meara (EBS-DM). It is generally inherited in an autosomal dominant manner and caused by mutations in keratin 5 (*KRT5*) or keratin 14 (*KRT14*) genes. In addition to K14 (type I) and K5 (type 2), the epidermis basal layer produces also K15, that belongs to type 1 keratin and can be substitute the mutated K14.

## Objectives

According to data found in the literature, our interest focused on interferon gamma's effect (IFN- $\gamma$ ) on cultured keratinocytes from EBS patients with mutations in *KTR14* by the analysis of keratin 15 (K15) production level and of the disappearance of aggregates in these cells.

## Methods

Samples consisted of 4 cell lines of primary keratinocytes isolated from 2 patients with the moderate phenotype, 2 control and 6 immortalized cell lines from 3 patients (1 EBS-DM and 2 EBS-loc) and 3 controls. A dose-response with IFN- $\gamma$  was performed (24, 48 and 72 hours). *KRT15* and *KRT16* gene expression level in immortalized and primary keratinocytes was measured by qRT-PCR. To confirm results, the amount of protein was measured by Western for K15.

## Results

The level of K15 decreased with increasing amount of IFN- $\gamma$ . This decrease more important in the patients' cell lines ( $p < 10^{-3}$ ) than in the control ones ( $p = 0.20$ ). The qRT-PCR data validate these results. Indeed, *KRT15* RNA expression is decreased in presence of IFN- $\gamma$ , but it don't reach significance since only a trend is observed for 24, 48 and 72 hours ( $p = 0.1$ ,  $p = 0.84$  and  $p = 0.38$  respectively). The same result is observed in the immortalized and the primary keratinocytes. The results of qRT-PCR showed that interferon gamma tends to increase the expression of *KRT16*.

## Conclusion

These results suggest that IFN- $\gamma$  reduces K15 production in immortalized keratinocytes and in primary ones. Finally, IFN- $\gamma$  doesn't eliminate aggregate keratins and also reduce *KRT15* gene expression.

*(Manuscrit en préparation)*



## Introduction

Keratins are a group of structural proteins, which associate together to form keratin intermediate filaments (IFs) proteins that are specifically expressed in epithelium. Keratinocytes of the basal layer express keratin 5 (K5) and 14 (K14). Keratins are divided into 2 types; type I (acid) and type II (basic) (Jerábková *et al.*, 2010). Type I and type II gather together to form a 10nm filament. Mutations within the keratin 5 (*KRT5*) or keratin 14 (*KRT14*) genes lead to the fragility of intermediate filaments networks which results in epidermolysis bullosa simplex (EBS) (Raj *et al.*, 2006; Schuilenga-Hut *et al.*, 2003). EBS is a rare genetic disease characterized by intra-epidermal blister formation and skin fragility (Premaratne *et al.*, 2002; Roth *et al.*, 2009). It is classified into different phenotypes according to the severity: EBS localized (EBS-loc), EBS generalized (gen-non DM) and EBS Dowling-Meara (EBS-DM) (Rugg *et al.*, 2007). This disease is generally transmitted in an autosomal dominant manner (Baek *et al.*, 2010). Mutations causing a severe or generalized phenotype are usually located in the helix initiation or termination peptide motifs (the beginning of the 1A and the end of the 2B helical domains), whereas the mutations causing a mild phenotype are located in one of the linker domain (L12) (Lane and McLean, 2004). In addition to K5 (type I) and K14 (type II), the epidermis basal layer produces at minor level K15, a type II keratin. Radoja *et al.*, have suggested that stimulating K15 by interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) could remedy to cytoskeleton defects in EBS patients harboring *KRT14* mutations by forming heterodimers with K5.

To test this hypothesis, we investigated the effects of IFN- $\gamma$  on the stimulation of K15, which could replace the K14 in the dimers with K5 in the cells with aggregates.

## Material and methods

### *Individuals*

Three EBS patients (EBS1, EBS4 and EBS6) and 3 controls (EBS14, EBS18 and EBS20) paired for age (-/+ 5 for adults -/+3 for children) and sex were recruited for the present study (Table 1). All individuals are Caucasian and they were recruited from the Hôpital Sainte-Justine of Montreal and the Centre de santé et de services sociaux de Chicoutimi from Saguenay. The two Hospital Centre ethic committees approved the study and informed consent was obtained from all participants.

**Tableau 4:** Phenotypes and mutations found in three patients with EBS

Case	Sex* (years)	Phenotype	<i>KTR14</i> Mutation	Reference
EBS1	M (32)	Localized	I337T	Premaratne <i>et al.</i> , 2002
EBS4	F (8)	Localized	I412F	Bchetnia <i>et al.</i> , 2012
EBS6	M (26)	Dowling-Meara	R125S	Bchetnia <i>et al.</i> , 2012

\*M: male; F: female

### *Keratinocytes culture and immortalization*

Primary Keratinocytes were established from skin biopsies using standard protocols (Rheinwald and Green, 1975). They were maintained in standard keratinocyte tissue culture medium consisting of Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) and Ham's F12 medium in a 3:1 proportion, 10% fetal calf serum, 0.4 µg/ml hydrocortisone, 10<sup>-10</sup> M cholera toxin, 5 µg/ml transferrin, 1.3ng/ml thyronine, 24.3 µg/ml adenine, 5 µg/ml insulin, 10 ng/ml human recombinant epidermal growth factor (EGF) supplemented with 3T3 fibroblast feeder cells. The

primary keratinocyte lines were immortalized by co-plating with mitomycin C-treated PT67 retroviral producer cells provided by Dr Baki Akgul, (Institute of Virology, University of Cologne, Cologne, Germany). Three to four days later, the producer cells were selectively removed and mitomycin C-treated 3T3 feeder cells were added to the cultures a day prior to selection. The transductants were selected with G418 (70-100  $\mu\text{g/ml}$  for 5 days) as described by (Chamcheu *et al.*, 2009).

### *Interferon gamma treatment*

To determine the effective dose of IFN- $\gamma$ , the immortalized keratinocytes were incubated for a dose-response that was carried for 48 hours at 100, 200 and 1000 ng/ml IFN- $\gamma$  (AbD Serotec). After quantification of keratins by Western blot, the effective dose of interferon was suggested to be 1000 ng/ml (figure 12A). Once this dose was determined, we used it to measure the expression of *KRT15* for three times (24, 48 and 72 hours at 1000 ng/ml of IFN- $\gamma$ ).

### *Evaluation of the toxicity of IFN- $\gamma$*

The toxicity of IFN- $\gamma$  on the cells was assayed using the CytoTox 96 non-radioactive cytotoxicity assay kit (Promega, Madison, WI, USA). This kit allows the measure of the quantity of lactate dehydrogenase (LDH) (an enzyme released upon cell lysis). The number of cells seeded was determined according to the manufacturer's recommendations. 24 hours after seeding, the cells were treated with IFN- $\gamma$  for another 24 hours. Then, after centrifugation of the plate, a lysis solution (9% (v/v) Triton X-100) was added to the cells for 1 hour. Afterwards, an enzymatic solution was put in the wells. After 30 minutes of incubation in the dark at room

temperature, the stop solution was added and the absorbance was measured at 490nm. The analysis of the results was performed by Student's t-test.

### ***qRT-PCRs***

The mRNA expression of *KRT15* (K15 to replace the harboring K14) and *KRT16* (to verify the hypothesis of keratinocytes activation) before and after an IFN- $\gamma$  treatment was measured for the control and patient cell lines by qRT-PCR. Total RNA was isolated from the cultured immortalized keratinocytes and primary keratinocytes after 24, 48 and 72 hours of incubation at 1000 ng/ml of IFN- $\gamma$  using the RNase plus Mini Kit (Qiagen, ON, Canada) according to the manufacturer's instructions. RNA was converted into cDNA with the SuperScript III kit (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) with OligodT primers. An amount of 0.675 ng of cDNA for each sample was amplified by qRT-PCR using TaqMan technology (Applied Biosystems, ON, Canada) and the Rotor-Gene 6000 device (Corbett Research, Sydney, Australia). All samples were analyzed in triplicate in the presence of a negative control. The method of the standard curves for the semi-quantifications was used. The glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene was used as the housekeeping gene. Results are expressed as the mean of three experiments.

### ***Western blotting***

Total proteins were extracted from IK using 200  $\mu$ l/well of LSB (Laemmli Sample Buffer). After their separation on SDS-PAGE, the proteins were transferred on a nitrocellulose membrane, which was then blocked with a TBS-5% Blotto solution. The LHK15 antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)

was used at a dilution of 1:250 to detect the K15 protein and K14 anti-serum (Thomas, Magin Lab) at dilution of 1:200 to detect K14. The actin protein was used as loading control and was detected by  $\beta$ -actin antibody (Chemicon, ON, Canada used at dilution 1:500). The immuno-complex was revealed by ECL solutions on an auto radiographic film. The quantification of the protein level was done using the Image J software (version 1.42, National Institutes of Health, USA).

#### ***Keratinocyte lines heat-shock and pre-treatment with IFN- $\gamma$***

Immortalized EBS6 and healthy (EBS14) keratinocytes were cultured in 24-well plates on coverslips in duplicates. Then, they were subjected to thermal stress as previously described with slight modifications (Chamcheu *et al.*, 2009). Briefly, cells were heat shocked at 43°C for 35min followed by a recovery period of 15min. After a pre-treatment of 24 hours with IFN- $\gamma$  (1000 ng/ml), the keratinocytes were heat shocked and stained for immunofluorescence.

#### ***Immunocytochemistry***

EBS6 and EBS14 cells were grown on coverslips at a confluence of 50-60%. Following the heat shock, the cells were fixed with a 4% paraformaldehyde solution for 15 minutes at room temperature. Cells were then permeabilized for 4 minutes using a stabilization Triton solution (0.2% Triton X-100). Unspecific sites were blocked with a 5% normal goat serum, 5% bovine serum albumin (BSA) solution for 30 minutes. Thereafter, the cells were incubated with a specific antibody for K5 diluted in 1% BSA+PBS (1/65 dilution; Cedarlane, ON, Canada) for 1 hour 30 minutes. Then, the cells were incubated with a goat anti-mouse secondary antibody

coupled to Cy3 (1/800 dilution, Invitrogen, Molecular Probes, ON, Canada) for 45 minutes. The coverslips were mounted on glass slides with Dako fluorescent mounting medium (Dako). Using immunofluorescence microscopy, 500 cells were counted for all conditions (treated or untreated, stressed or unstressed) of each experiment. Data analysis was performed using Student's t-test. The results are expressed as the mean of cells with aggregates. Values under 0.05 were considered statistically significant.

### *Statistical analysis*

For qRT-PCR analysis, Student's t-test was performed. For Western blot analysis, one-way Anova and Tukey's tests were realized. Statistical analyses were performed using the SPSS software (version 19.01). Values under 0.05 were considered statistically significant.

### *Results*

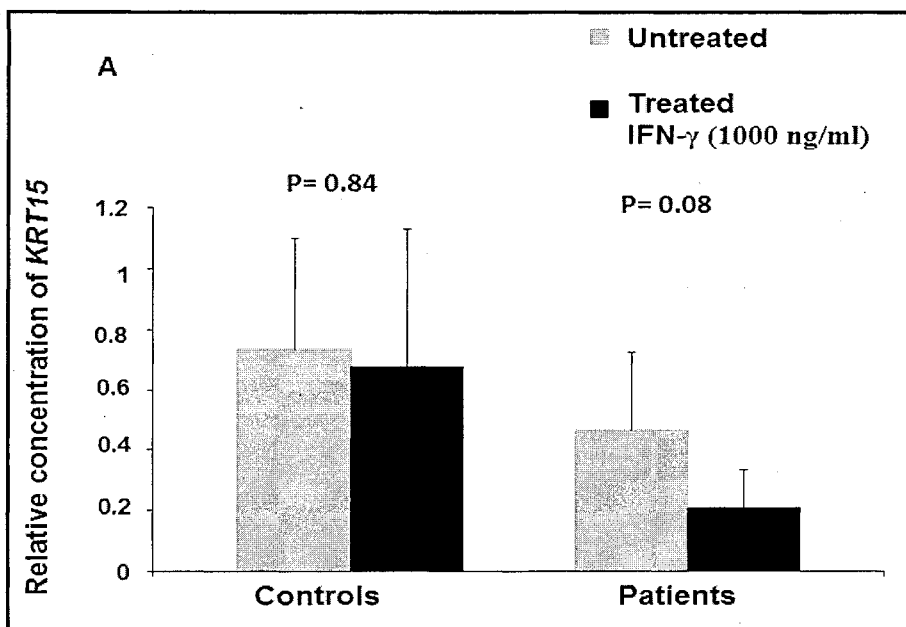
#### **The effect of IFN- $\gamma$ on the aggregates and toxicity**

Immunostaining of keratin 5 showed that in resting conditions, cytoplasmic keratin aggregates or misfolded proteins were observed in EBS6 stained keratinocytes carrying the R125S mutation. The reduction of the number of the cells with keratin aggregates is not statistically significant ( $p=0.68$ ) after application of IFN- $\gamma$  and heat shock. Stressed or unstressed healthy subject's (EBS14) cells showed very few or no aggregates.

The toxicity assays showed that IFN- $\gamma$  is not toxic for the cells. At baseline, the percentage of necrosis was 61% for the healthy EBS14 and 56% for the patient EBS6. After treatment with IFN- $\gamma$ , the necrosis was 55% for EBS14 and 55% for EBS6.

**IFN- $\gamma$  decreases the expression level of the *KRT15* gene in immortalized and in primary keratinocytes**

After the RNA extraction, the expression of the *KRT15* gene was quantified by qRT-PCR. The different charts show a decrease in the expression of *KRT15* in immortalized keratinocytes in all patients ( $p=0.08$ ) and controls ( $p=0.84$ ) after 48h of incubation with 1000 ng/ml of IFN- $\gamma$  (Figure 11).

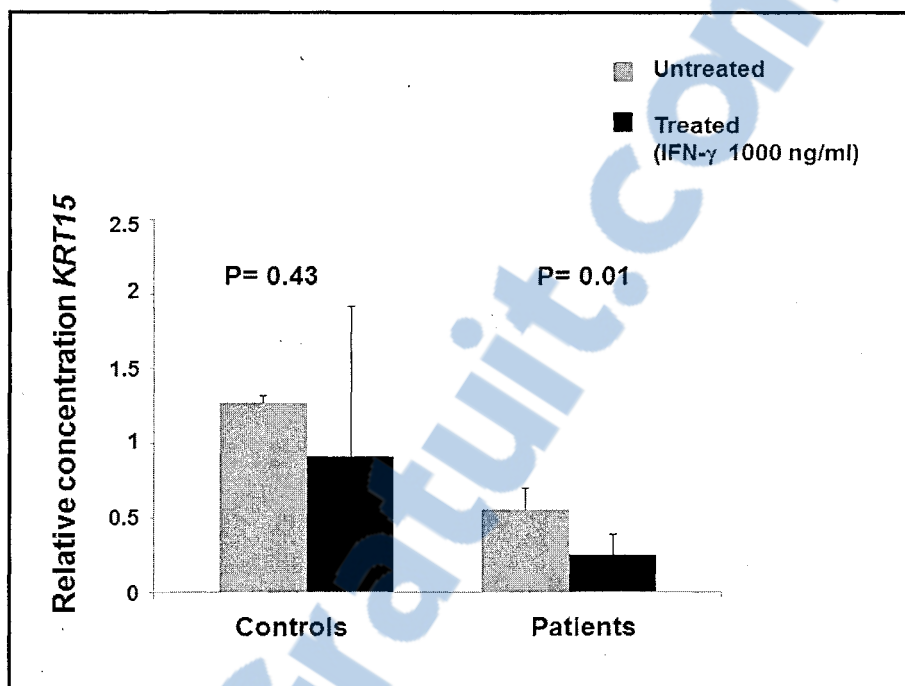


**Figure 11: Effect of IFN- $\gamma$  on *KRT15* gene expression in immortalized keratinocytes**

Schematic representation of *KRT15* gene expression level quantified by qRT-PCR in immortalized keratinocytes controls (n=3) (A) and in patients (n=3) (B). IFN- $\gamma$  down-regulated the *KRT15* gene expression level in controls and patients groups. The measures were performed for treatment with IFN- $\gamma$  during. The results are represented by mean with standard error. The dark represent the treated individuals whereas the gray represent the individuals untreated with the molecule.

We have also observed that IFN- $\gamma$  reduces the *KRT15* gene expression in primary keratinocytes (2 patients with p=0.01 and 2 controls with p=0.43) (Figure 12).



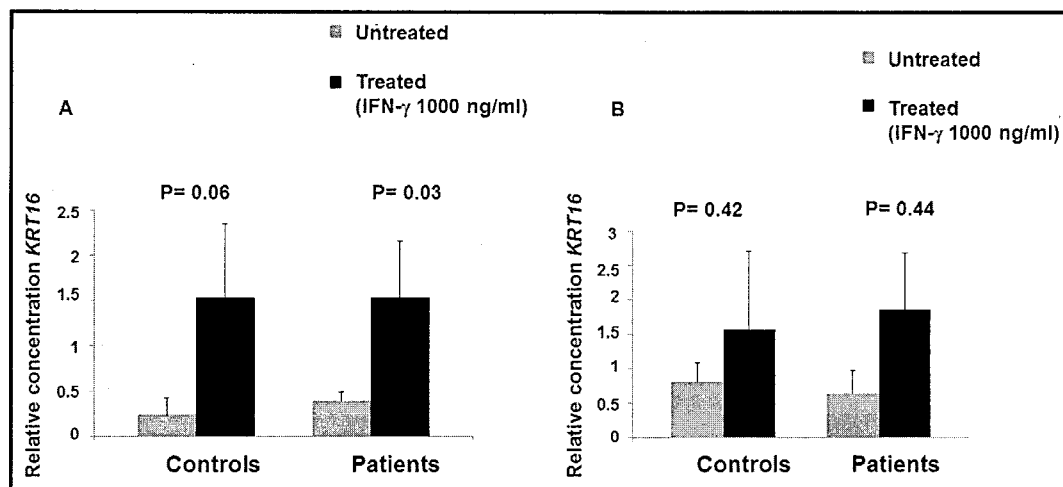


**Figure 12: Effect of IFN- $\gamma$  on *KRT15* gene expression in primary keratinocytes**

Schematic representation of *KRT15* gene expression level quantified by qRT-PCR in controls and patients groups (n=2). The comparison of the *KRT15* expression level in presence or absence of IFN- $\gamma$ . IFN- $\gamma$  down-regulated the *KRT15* gene expression level in controls and patients groups. The dark represent the individuals after treatment with IFN- $\gamma$  and the gray without treatment. The results are represented by mean with standard error.

#### **IFN- $\gamma$ increases the expression level of the *KRT16* gene in immortalized and in primary keratinocytes**

After quantification by qRT-PCR, the expression of *KRT16* was observed in both cell types, primary and immortalized keratinocytes. The results showed that IFN- $\gamma$  increases *KRT16* expression and accentuates the decrease of the *KRT15* gene in both keratinocytes types (Figure 13) (For primary keratinocytes patients p=0.44 and for immortalized keratinocytes patients p=0.03).



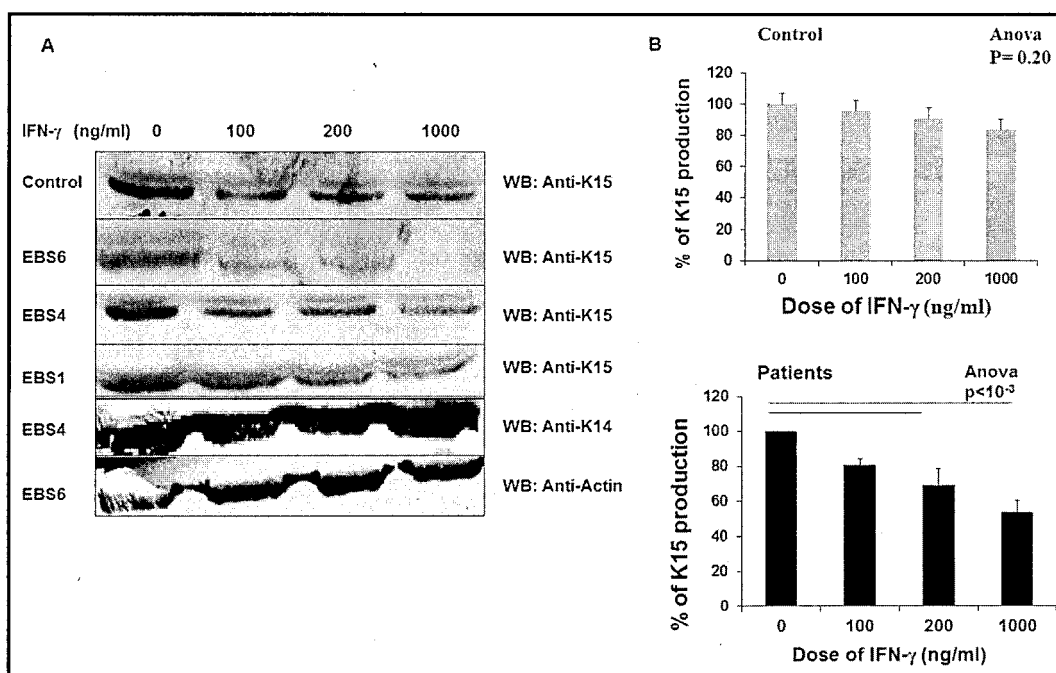
**Figure 13: Effect of IFN- $\gamma$  on *KRT16* gene expression**

Schematic representation of *KRT16* gene expression quantified by qRT-PCR in the controls and patients groups (n=3 for immortalized keratinocytes and n=2 for primary keratinocytes). Comparisons of the expression of *KRT16* level in presence or absence of IFN- $\gamma$  (treatment of 24h) for immortalized cells (A) and for Primary cells (B). IFN- $\gamma$  up-regulated the *KRT15* gene expression level in controls. The dark represent the individuals after treatment with IFN- $\gamma$  and the gray without treatment. Measures are represented by mean with standard error.

#### **IFN- $\gamma$ treatment of immortalized keratinocytes induces a decrease in K15 level in a dose dependent manner**

After the extraction of the proteins (patients and control) from immortalized keratinocytes and the migration, we quantified the level of production of K15 by Western blot. As shown in figure 14A, IFN- $\gamma$  regulates negatively the production of K15. This decrease is significant for the patients ( $p < 1 \times 10^{-3}$ ) but not in control ( $p = 0.20$ ). For EBS patients, the level of K15 decreases gradually with increasing amount of IFN- $\gamma$ . However, IFN- $\gamma$  does not affect the K14. This result is consistent with the observations of Radoja and coworkers (Radoja *et al.*, 2004). With the software Image J, the results of multiple experiments were quantified and grouped

into a flowchart representative of the production of K15 in a dose-dependent response for IFN- $\gamma$ . The absence of significant change was observed in the production of K15 between patients and controls (figure 14B)



**Figure 14: Western blot representative of the effect of IFN- $\gamma$  treatments on K15**

A: Immortalized keratinocytes of patients and control were incubated with gradual amounts (0, 100, 200 or 1000 ng/ml) of IFN- $\gamma$  for 48 hours. Equal amounts of proteins from cell lysate were separated by SDS-PAGE. K15 and K14 were identified by Western blot using appropriate antibodies as indicated. IFN- $\gamma$  down-regulated the K15 production in immortalized keratinocytes (control  $p=0.2$  and patients  $p<10^{-3}$ ). Actin was used as a loading control. B: Quantification with the ImageJ software of K15 protein level in control and patients groups.



## Discussion

The previous studies have reported the therapeutic effect of IFN- $\gamma$  in several diseases such as chronic hepatitis C (Sobue *et al.*, 2001), dermatitis (Boguniewicz *et al.*, 1990) and psoriasis (Wei *et al.*, 1999). In psoriasis, stimulation of K17 and K16 was observed under the effect of IFN- $\gamma$  in cultured cells isolated from skin biopsies from patients and controls (Wei *et al.*, 1999). The same results were observed in HaCaT cells (Bockelmann *et al.*, 2005). In this study, the results indicated that stimulation of K17 in HaCaT immortalized cells depends on the stimulation by IFN- $\gamma$ . By Western blot assays and immunohistochemistry, the production of K17 increases in a dose-dependent manner when the cells are incubated with this cytokine (10, 50, 250 and 1250 U/ml) after 48 hours. At a concentration of 5 U/ml IFN- $\gamma$ , the production of K17 is reduced (Bonnekoh *et al.*, 1995). IFN- $\gamma$  also affects other keratins such as K16 in healthy keratinocytes as it was reported by Barker *et al.*, 1993. In contrast to K14, K5 and K15 which are principally produced in basal layer, K17 is only expressed in the suprabasal layer (Radoja *et al.*, 2004) and therefore the replacement of K14 by K17 in EBS is not possible.

Radoja *et al.*, (2004) have reported that K15 is induced at the transcriptional level by IFN- $\gamma$ . They suggested that the production of K15 could remedy to cytoskeleton defects in EBS harboring *KRT14* mutations by forming heterodimers with K5.

Based on this hypothesis, we focused on the effect of IFN- $\gamma$  on cultured keratinocytes from EBS *KTR14* mutant by the analysis of K15 production. Surprisingly, we observed a down-regulation of K15 production after INF- $\gamma$

treatment. INF- $\gamma$  also down-regulates the expression of the *KRT15* gene in immortalized and primary keratinocytes but this decrease is not significant in immortalized ones after treatment with INF- $\gamma$  at 24, 48 and 72 hours. The difference in meaning between RNA expression and protein production can be explained by three reasons. First, there are many varied post-transcriptional mechanisms involved in the translation of RNA to proteins that are not well understood, in order to calculate the concentration of proteins from RNA. Second, proteins can differ in their *in vivo* half-lives. The third reason is related to the background noise, which can give us a bad image to properly estimate the amount of protein (Greenbaum *et al.*, 2003). To explain this difference in results, three hypotheses have been issued.

First, this could be due to the immortalization process, which may alter the expression of several genes. To verify this hypothesis, we extracted RNA from primary keratinocytes and measured the *KRT15* gene expression by qRT-PCR. We found that INF- $\gamma$  reduced the expression of the *KRT15* gene in primary cell lines. Therefore, the effect of immortalization can be rejected. Western blot analysis was not performed as the primary keratinocytes are in a limited number in the biobank which makes them valuable.

A second hypothesis is that this difference could be due to the cell lines used in the two studies. In the study of Radoja *et al.*, the cellular model chosen was HeLa cells. In our study, it was immortalized keratinocytes. For their model, K15 was significantly increased after transfection under the effect of 100 ng/ml of INF- $\gamma$ , while the same amount clearly reduced K15 in our model (keratinocytes). Radoja *et al.* were interested to transcription factors that INF- $\gamma$  regulates, but in our study we were interested in the effect of this molecule on the production of K15, on the level of expression of the *KRT15* gene and on the formation of aggregates.

A third hypothesis for the decreased production of K15 could be the activation of keratinocytes. Indeed, it was reported that this activation causes a decrease in *KRT15* gene expression in psoriasis (Waseem *et al.*, 1999; Weiss *et al.*, 1984). Given that K16 is a marker of keratinocytes activation (Waseem *et al.*, 1999), we measured the expression level of the *KRT16* gene in primary and immortalized keratinocytes. The results obtained show an increase in gene expression in both immortalized and primary keratinocytes and confirm the theory of keratinocytes activation. Tissue response to a skin lesion leads to the activation of Th1 and Th2 pathways and to the production of growth factors, which promote the completion keratinocytes differentiation. This differentiation leads to the halt of the transcription of K5, K14 and K15, in response to unknown stimuli (Kupper, 1990), and to the production of a large number of cytokines such as IL-1 (Ristow, 1987) and IL-6 (Grossman *et al.*, 1989) which have an effect on the keratin gene expression. As an example, Jiang *et al.* (1993), have reported that EGF and *transforming growth factor* (TGF- $\alpha$ ) mediate the up regulation of *KRT6* and *KRT16* in psoriasis (Jiang *et al.*, 1993). In our study, *KRT15* is down-regulated in primary and immortalized keratinocytes suggesting that activated cells by IFN- $\gamma$  produce cytokines and growth factors leading to the suppression of *KRT15* expression. The regulatory sequences of K15 would be a good target for the identification of cellular factors involved in the suppression of its expression. K15 is regulated by the AP-1 and NF- $\kappa$ B proteins. AP-1 stimulates the expression of all keratin genes but it reduces K15 in activated keratinocytes (Waseem *et al.*, 1990; Werner and Munz, 2000). It was also reported that in the activated keratinocytes, NF- $\kappa$ B suppresses the basal keratins K5 and K14 in addition to K15. IL-1 and TNF- $\alpha$  are the activators of NF- $\kappa$ B where the loss of the expression of K15 is observed (Kaufman and Fuchs, 2000; Radoja *et al.*, 2004). IFN- $\gamma$  also activates NF- $\kappa$ B which will decrease the phosphorylation of STAT1/3 in tumorigenic mouse lung epithelial (LM2) cells (Tyagi *et al.*, 2011). IL-1 activates keratinocytes and makes

them hyperproliferative and migratory causing the keratinocytes to deposit a fibronectin-rich basement membrane, to express K16 and to produce cytokines (IFN- $\gamma$ ) and growth factors. These cytokines and growth factors maintain the keratinocytes activated (Freedberg *et al.*, 2001). In late stages of wound healing, keratinocytes contract to form the extracellular matrix by fibroblasts. IFN- $\gamma$  plays an important role in this contraction as it induces the production of K17 (Freedberg *et al.*, 2001). The production of IFN- $\gamma$  by Th1 lymphocytes is mainly responsible for the activation of K17 in several inflammatory diseases (de Jong *et al.*, 1991). The arrest of keratinocyte's growth by TGF- $\beta$  is reversible; it doesn't involve the terminal differentiation and may also modulate the regulators of differentiation. TGF- $\beta$  is a paracrine signal for keratinocytes, it communicates with the epidermis to give the signal to synthesize K5 and K14 (Freedberg *et al.*, 2001).

## **Conclusion**

In conclusion, the results presented here suggested that it isn't possible to stimulate the expression of keratin K15 by IFN- $\gamma$  in epidermal keratinocytes. We have shown that IFN- $\gamma$  downregulated the production of K15 in the cultured keratinocytes (immortalized and primary keratinocytes). This is explained by the previously mentioned assumptions. We have also shown that IFN- $\gamma$  stimulated the expression of the *KRT16* gene and the production of K17, but K17 cannot replace the mutated K14 due to its production in the suprabasal layer.

This model, the induction of the production of K15 by IFN- $\gamma$  in order to replace the mutated K14, is not a therapeutic approach for EBS.

## **Acknowledgments:**

We thank the patients and their families for their enthusiastic collaboration. This work was supported by « Groupe Riverin Inc and by La Campagne majeure de développement de l'Université du Québec à Chicoutimi ». We thank Thomas Magin to be provided the anti-boby and Baki Akgul for the retrovirus for immortalization keratinocytes. The authors thank Anne-Marie Madore for her precious technical support.



## References

- Baek, J.O., H.Y. Lee, S.W. Oh, J.S. Lee, S.C. Kim, J.R. Lee, and J.Y. Roh. 2010. A novel homozygous keratin 14 mutation in a patient with autosomal recessive epidermolysis bullosa simplex and squamous cell carcinoma of the tongue. *The British Journal Of Dermatology*. 162:880-882.
- Boguniewicz, M., H.S. Jaffe, A. Izu, M.J. Sullivan, D. York, R.S. Geha, and D.Y. Leung. 1990. Recombinant gamma interferon in treatment of patients with atopic dermatitis and elevated IgE levels. *The American Journal Of Medicine*. 88:365-370.
- Chamcheu, J.C., E.P. Loricé, B. Akgul, E. Bannbers, M. Virtanen, L. Gammon, A. Moustakas, H. Navsaria, A. Vahlquist, and H. Törmä. 2009. Characterization of immortalized human epidermolysis bullosa simplex (KRT5) cell lines: trimethylamine N-oxide protects the keratin cytoskeleton against disruptive stress condition. *Journal Of Dermatological Science*. 53:198-206.
- Chamcheu, J.C., M. Virtanen, H. Navsaria, P.E. Bowden, A. Vahlquist, and H. Törmä. 2010. Epidermolysis bullosa simplex due to KRT5 mutations: mutation-related differences in cellular fragility and the protective effects of trimethylamine N-oxide in cultured primary keratinocytes. *The British Journal Of Dermatology*. 162:980-989.
- de Jong, E.M., I.M. van Vlijmen, P.E. van Erp, F.C. Ramaekers, S.M. Troyanovski, and P.C. van de Kerkhof. 1991. Keratin 17: a useful marker in anti-psoriatic therapies. *Archives Of Dermatological Research*. 283:480-482.
- Freedberg, I.M., M. Tomic-Canic, M. Komine, and M. Blumenberg. 2001. Keratins and the keratinocyte activation cycle. *The Journal Of Investigative Dermatology*. 116:633-640.
- Grossman, R.M., J. Krueger, D. Yourish, A. Granelli-Piperno, D.P. Murphy, L.T. May, T.S. Kupper, P.B. Sehgal, and A.B. Gottlieb. 1989. Interleukin 6 is expressed in high levels in psoriatic skin and stimulates proliferation of cultured human keratinocytes. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*. 86:6367-6371.
- Horn, H.M., G.C. Priestley, R.A. Eady, and M.J. Tidman. 1997. The prevalence of epidermolysis bullosa in Scotland. *The British Journal Of Dermatology*. 136:560-564.
- Jerábková, B., J. Marek, H. Bucková, L. Kopecková, K. Veselý, J. Valicková, J. Fajkus, and L. Fajkusová. 2010. Keratin mutations in patients with epidermolysis bullosa simplex: correlations between phenotype severity and disturbance of intermediate filament molecular structure. *The British Journal Of Dermatology*. 162:1004-1013.
- Jiang, C.K., T. Magnaldo, M. Ohtsuki, I.M. Freedberg, F. Bernerd, and M. Blumenberg. 1993. Epidermal growth factor and transforming growth factor alpha specifically induce the activation- and hyperproliferation-associated keratins 6 and 16.

- Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*. 90:6786-6790.
- Jonkman, M.F., K. Heeres, H.H. Pas, M.J. van Luyn, J.D. Elema, L.D. Corden, F.J. Smith, W.H. McLean, F.C. Ramaekers, M. Burton, and H. Scheffer. 1996. Effects of keratin 14 ablation on the clinical and cellular phenotype in a kindred with recessive epidermolysis bullosa simplex. *The Journal Of Investigative Dermatology*. 107:764-769.
- Kaufman, C.K., and E. Fuchs. 2000. It's got you covered. NF-kappaB in the epidermis. *The Journal Of Cell Biology*. 149:999-1004.
- Lane, E.B., and W.H.I. McLean. 2004. Keratins and skin disorders. *The Journal Of Pathology*. 204:355-366.
- Premaratne, C., S. Klingberg, I. Glass, K. Wright, and D. Murrell. 2002. Epidermolysis bullosa simplex Dowling-Meara due to an arginine to cysteine substitution in exon 1 of keratin 14. *The Australasian Journal Of Dermatology*. 43:28-34.
- Radoja, N., O. Stojadinovic, A. Waseem, M. Tomic-Canic, V. Milisavljevic, S. Teebor, and M. Blumenberg. 2004. Thyroid hormones and gamma interferon specifically increase K15 keratin gene transcription. *Molecular And Cellular Biology*. 24:3168-3179.
- Rheinwald, J.G., and H. Green. 1975. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell*. 6:331-343.
- Ristow, H.J. 1987. A major factor contributing to epidermal proliferation in inflammatory skin diseases appears to be interleukin 1 or a related protein. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*. 84:1940-1944.
- Roth, W., U. Reuter, C. Wohlenberg, L. Bruckner-Tuderman, and T.M. Magin. 2009. Cytokines as genetic modifiers in K5-/- mice and in human epidermolysis bullosa simplex. *Human Mutation*. 30:832-841.
- Rugg, E.L., H.M. Horn, F.J. Smith, N.J. Wilson, A.J.M. Hill, G.J. Magee, C.S. Shemanko, D.U. Baty, M.J. Tidman, and E.B. Lane. 2007. Epidermolysis bullosa simplex in Scotland caused by a spectrum of keratin mutations. *The Journal Of Investigative Dermatology*. 127:574-580.
- Schuilenga-Hut, P.H.L., P.v.d. Vlies, M.F. Jonkman, E. Waanders, C.H.C.M. Buys, and H. Scheffer. 2003. Mutation analysis of the entire keratin 5 and 14 genes in patients with epidermolysis bullosa simplex and identification of novel mutations. *Human Mutation*. 21:447-447.
- Sobue, S., T. Nomura, T. Ishikawa, S. Ito, K. Saso, H. Ohara, T. Joh, M. Itoh, and S. Kakumu. 2001. Th1/Th2 cytokine profiles and their relationship to clinical features in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Journal Of Gastroenterology*. 36:544-551.
- Tyagi, A., C. Agarwal, L.D. Dwyer-Nield, R.P. Singh, A.M. Malkinson, and R. Agarwal. 2011. Silibinin modulates TNF-alpha and IFN-gamma mediated signaling to regulate COX2 and iNOS expression in tumorigenic mouse lung epithelial LM2 cells. *Mol Carcinog*.
- Waseem, A., C.M. Alexander, J.B. Steel, and E.B. Lane. 1990. Embryonic simple epithelial keratins 8 and 18: chromosomal location emphasizes difference from other keratin pairs. *The New Biologist*. 2:464-478.

- Waseem, A., B. Dogan, N. Tidman, Y. Alam, P. Purkis, S. Jackson, A. Lalli, M. Machesney, and I.M. Leigh. 1999. Keratin 15 expression in stratified epithelia: downregulation in activated keratinocytes. *The Journal Of Investigative Dermatology*. 112:362-369.
- Wei, L., R. Debets, J.J. Hegmans, R. Benner, and E.P. Prens. 1999. IL-1 beta and IFN-gamma induce the regenerative epidermal phenotype of psoriasis in the transwell skin organ culture system. IFN-gamma up-regulates the expression of keratin 17 and keratinocyte transglutaminase via endogenous IL-1 production. *The Journal Of Pathology*. 187:358-364.
- Weiss, R.A., R. Eichner, and T.T. Sun. 1984. Monoclonal antibody analysis of keratin expression in epidermal diseases: a 48- and 56-kdalton keratin as molecular markers for hyperproliferative keratinocytes. *The Journal Of Cell Biology*. 98:1397-1406.
- Werner, S., and B. Munz. 2000. Suppression of keratin 15 expression by transforming growth factor beta in vitro and by cutaneous injury in vivo. *Experimental Cell Research*. 254:80-9

---

## CHAPITRE 5

### DISCUSSION GÉNÉRALE

#### 5.1 Interprétation générale

L'objectif de l'étude était de vérifier l'effet de l'IFN- $\gamma$  sur la production de la K15 sur la base des travaux de Radoja *et al.*, (2004) qui avaient démontré qu'une concentration de 100ng/ml stimulerait la production de K15 dans les cellules HeLa. Selon cette équipe, K15 pourrait remplacer la K14 mutée en s'associant avec K5, puisque K15 est une kératine de type 1 comme la K14. Ceci pourrait constituer une approche thérapeutique pour l'EBS (Radoja *et al.*, 2004).

Les résultats obtenus sur les kératinocytes isolés de biopsies de peaux (lignées primaires et immortalisés) n'ont pas permis de démontrer que l'IFN- $\gamma$  stimule la production de K15. En effet la production de K15 diminue dans les kératinocytes de patients en augmentant la dose de l'IFN- $\gamma$ . Les résultats des qRT-PCR ont confirmé que l'IFN- $\gamma$  réduit également l'expression du gène *KRT15* à la suite d'un traitement de 1000 ng/ml, dose correspondant à une forte perte d'expression. La réduction de K15 par l'IFN- $\gamma$  est probablement due à plusieurs facteurs qui sont énumérés dans les sections suivantes.

##### 5.1.1 *Modèle cellulaire*

La différence entre les résultats de Radoja *et al.*, (2004) et ceux de cette étude pourrait être reliée au modèle cellulaire utilisé. Dans l'étude de Radoja *et al.*, les essais ont été réalisés sur des cellules HeLa, lesquelles sont transfectées par un

plasmide renfermant le gène *KRT15* alors que dans notre expérimentation, des kératinocytes isolés de la peau de patients puis immortalisés ont été utilisés. Ainsi, l'action de l'IFN- $\gamma$  pourrait être différente dans les deux lignées cellulaires. En effet, une lignée transfectée pour une mutation sévère dans la K5 par notre équipe permettait de voir de nombreuses cellules ayant des agrégats de kératines, alors que les cellules isolées de biopsies, puis immortalisées pour le patient ayant la même mutation que les cellules transfectées ne présentent pas d'agrégats protéiques.

### 5.1.2 *Immortalisation des kératinocytes*

Étant donné que l'échantillon de l'étude est composé de lignées immortalisées, cela pourrait être également un facteur modificateur de l'effet de la cytokine et du phénotype de la cellule. En effet il a été observé lors de travaux antérieurs sur des fibroblastes humains en culture que des aspects moléculaires et cellulaires peuvent différer avant et après immortalisation. En effet, l'expression du gène suppresseur de tumeur *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (CDKN2A, p16<sup>INK4a</sup>)* a subi une baisse significative dans les cellules immortalisées (Noble *et al.*, 2004). Cependant cette hypothèse est écartée car l'IFN- $\gamma$  réduit aussi l'expression du gène *KRT15* dans les kératinocytes primaires tel que démontré dans le cadre de ce projet (figure 12 de l'article au chapitre 4 du présent mémoire).

### 5.1.3 *Préactivation des kératinocytes*

Il a été également rapporté que la synthèse de la K15 change dans plusieurs maladies. En effet, sa production augmente dans le cas du carcinome basocellulaire mais elle est supprimée dans les carcinomes épidermoïdes, le psoriasis et dans des

conditions hyperproliférantes de l'épiderme (cicatrisation des plaies) (Porter *et al.*, 2000; Waseem *et al.*, 1999). La régulation à la baisse de K15 dans les maladies inflammatoires est liée à la réactivation des kératinocytes sous l'effet d'une production accrue de cytokines et de facteurs de croissance tel que *transforming growth factor-beta* (TGF- $\beta$ ), *tumor necrosis factor-alpha* (TNF- $\alpha$ ) et *epidermal growth factor* (EGF) (Werner and Munz, 2000). Sous l'effet de cette production, les kératinocytes migrent vers les couches supérieures de l'épiderme pour produire d'autres kératines (K1, K10, K16, K17) en réponse au signal d'activation (Waseem *et al.*, 1999). Il a été rapporté que TNF- $\alpha$  et IL-1 activent le facteur de transcription *nuclear factor-kappa binding* (NF- $\kappa$ B) qui inhibe la synthèse des kératines basales K5, K14 et K15 et permet la production de K6 et K16 protéines constituant des marqueurs de réactivation des kératinocytes (Beg *et al.*, 1993; Kaufman and Fuchs, 2000).

Les résultats obtenus dans cette étude nous ont permis de vérifier l'hypothèse de réactivation des kératinocytes. Des essais de qRT-PCR ont été réalisés afin de mesurer l'expression de *KRT16* dans les kératinocytes de patients EBS. Les résultats obtenus montrent que l'IFN- $\gamma$  stimule l'expression du gène *KRT16* dans les kératinocytes primaires et immortalisés tel qu'illustré dans la figure 13 de l'article (chapitre 4).

Cette étude a permis de rapporter que l'IFN- $\gamma$  régule négativement la production de K15 et l'expression de son gène dans les kératinocytes immortalisés et primaires. En effet, la stimulation avec différentes concentrations d'IFN- $\gamma$  pour différent temps d'incubation n'a pas permis de stimuler la production de la K15 afin de remplacer la K14 dans la formation de dimères avec la K5 tel qu'attendu. La présente étude a

également permis de vérifier certaines hypothèses émises quant à cette diminution (immortalisation, activation des kératinocytes).

Bien que l'IFN- $\gamma$  soit connu pour ses effets thérapeutiques dans plusieurs maladies, dans le cas de l'EBS il ne constitue pas une approche prometteuse favorisant la guérison.

Par ailleurs, plusieurs équipes de chercheurs ont tenté ou travaillent suivant diverses approches dans le but de parvenir à développer un traitement pour l'EBS causée par une mutation dans la K14 (thérapie génique, inactivation spécifique de l'allèle au niveau de l'ARNm ou stimulation d'autres kératines qui pourront remplacer les kératines mutées).

## 5.2 Thérapie génique

Une étude a évalué l'impact fonctionnel de la K14 dans deux lignées cellulaires issues de deux patients atteints d'EBS généralisé (EBS-gén) et de la forme la plus sévère (EBS-DM). L'ADNc de K14 de type sauvage a été ajouté dans les deux lignées en utilisant un vecteur rétroviral. Par la suite, par des essais d'immunofluorescence la K14 est marquée par un anticorps spécifique. Après l'addition de K14, la morphologie des cellules n'a pas changé par rapport aux cellules contrôles. Il y avait également formation d'un réseau de filaments intermédiaires bien défini et les cellules reprenaient leur phénotype normal (D'Alessandro *et al.*, 2011). Il a été rapporté dans la même étude que l'ajout de K14 n'a pas affecté la synthèse des autres kératines (K5, K17 et K18) et les protéines jonctionnelles (D'Alessandro *et al.*,

2011). La thérapie génique est conçue pour remplacer le gène muté par un gène de type sauvage. Elle semble être une voie prometteuse pour traiter l'EBS chez des patients mutés en *KRT14*. Cependant, il n'est pas toujours clair si l'inactivation du gène défectueux est moins néfaste que le phénotype de la protéine mutée (D'Alessandro *et al.*, 2011).

### 5.3 Utilisation de molécules thérapeutique

D'autres études se sont intéressées à l'utilisation de molécules thérapeutiques (sulforaphane, TMAO) afin de remédier à l'EBS causée par des mutations sur le gène de la K14.

#### 5.3.1 La voie de signalisation *Keap1/Nrf2/ARE*

Une étude sur un modèle de souris a rapporté que l'utilisation de sulforaphane (extrait du brocoli), dans le but de stimuler la production d'autres kératines qui pourront remplacer la K14 mutée, constitue également une voie prometteuse. Le sulforaphane semble stimuler la voie *Keap1/Nrf2/ARE* (Kerns *et al.*, 2007).

En effet, la voie de transcription *Keap1/Nrf2/ARE* joue un rôle important dans la reprogrammation de la synthèse des kératines dans un modèle de souris. Effectivement l'inactivation du gène *KEAP1* dont le produit protéique séquestre le facteur de transcription *Nrf2* dans le cytoplasme conduit à sa dégradation par la protéine riche en cystéine *Keap1* (Zhang and Gordon, 2004). L'addition du sulforaphane modifie le gène *KEAP1* et permet ainsi la transcription du gène *NRF2* (Kerns *et al.*, 2007).



Des kératinocytes de souris en cultures ont été prétraitées avec une dose de 1  $\mu$ M pendant douze heures et 24 heures. Le niveau d'ARNm des kératines a été mesuré par qRT-PCR. Les résultats obtenus après un traitement de douze heures montrent une augmentation de l'expression des gènes *KRT16* et *KRT17* dans les kératinocytes mutés en K14. Tandis que le niveau de *KRT14* et de *KRT15* n'a pas été affecté. La même expérience a été réalisée sur des souris ayant une mutation au niveau de la K5. Le prétraitement avec le sulforaphane n'a pas pu guérir les souris. Ceci suggère que l'induction de K16 et K17 par cette molécule joue un rôle important dans le traitement d'EBS causée par des mutations en K14 (Kerns *et al.*, 2007).

La voie de signalisation Keap1/Nrf2/ARE semble bénéfique pour l'EBS causée par des mutations en K14 mais à des doses élevées le sulforaphane induit l'apoptose et il reste toujours inefficace pour traiter l'EBS dans le cas de mutations en K5 (Gamet-Payastre, 2006).

### 5.3.2 Réduction d'agrégats de kératines

Étant donné que les kératinocytes mutés en K5 ou K14 répondent au stress par la formation d'agrégats protéiques, des chercheurs se sont intéressés aux molécules chaperonnes pour éliminer ces agrégats formés par le mauvais appariement des kératines. L'étude de Chamcheu *et al.*, a rapporté que le TMAO (crustacés et requins) réduit les agrégats protéiques dans les kératinocytes issus de patients EBS mutés en K5. Les cellules en culture ont été prétraitées avec le TMAO à deux doses différentes (50 mMol et 100 mMol). Par la suite, les kératinocytes ont été soumis à un stress thermique pendant 30 minutes afin de reproduire la maladie. Le nombre de cellules présentant des agrégats a été mesuré par immunofluorescence par comparaison aux

cellules contrôles. Les résultats obtenus montrent une réduction significative du pourcentage d'agrégats dans les conditions de traitement et les cellules reprennent leur phénotype normal. Ceci suggère que le TMAO augmente la stabilité des filaments intermédiaires sous une contrainte thermique (Chamcheu *et al.*, 2010b). Le mécanisme par lequel le TMAO agit n'est pas encore élucidé mais des hypothèses ont été émises sur la synthèse de protéines de choc (HSP70) qui interviennent dans ce mécanisme de réparation (Santoro, 2000).

Toutes les approches utilisées à ce jour, que ce soit la thérapie génique ou l'utilisation de molécules thérapeutiques ont rapporté qu'il existe plusieurs moyens palliatifs pour remédier à l'EBS mais une thérapie définitive n'est pas encore approuvée. En effet, chaque approche est spécifique à corriger un défaut moléculaire ou génétique uniquement sur l'une ou l'autre des deux kératines mutées.

## CONCLUSION

La présente étude a permis de démontrer que l'IFN- $\gamma$  réduit la production de K15 et ne semble pas être une approche thérapeutique pour le traitement de l'EBS causé par une mutation de la *KTR14*.

Un long travail reste à faire afin de trouver un moyen curatif. Ces dernières années, plusieurs efforts ont été placés à documenter la biologie des épidermolyses bulleuses simplex, que ce soit la détermination des gènes et mutations responsables, les études cellulaires pour documenter les modifications quant à l'architecture cellulaire (distribution de la kératine), ou encore le développement d'approches thérapeutiques. Il n'existe encore aucune thérapie efficace et l'approche actuelle repose sur la diminution de la symptomatologie qui se résume essentiellement à éviter les infections et à réduire la douleur.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abe, M., D. Sawamura, M. Goto, H. Nakamura, A. Nagasaki, Y. Nomura, H. Kawasaki, R. Isogai, and H. Shimizu. 2007. ITGB4 missense mutation in a transmembrane domain causes non-lethal variant of junctional epidermolysis bullosa with pyloric atresia. *J. Dermatol. Sci.* 47:165-167.
- Aberdam, D., M.F. Galliano, J. Vailly, L. Pulkkinen, J. Bonifas, A.M. Christiano, K. Tryggvason, J. Uitto, E.H. Epstein, Jr., and J.P. Ortonne. 1994. Herlitz's junctional epidermolysis bullosa is linked to mutations in the gene (LAMC2) for the gamma 2 subunit of nicein/kalinin (LAMININ-5). *Nature Genetics.* 6:299-304.
- Aguet, M., Z. Dembic, and G. Merlin. 1988. Molecular cloning and expression of the human interferon-gamma receptor. *Cell.* 55:273-280.
- Alberts, D.S., C. Marth, R.D. Alvarez, G. Johnson, M. Bidzinski, D.R. Kardatzke, W.Z. Bradford, J. Loutit, D.H. Kirn, M.C. Clouser, and M. Markman. 2008. Randomized phase 3 trial of interferon gamma-1b plus standard carboplatin/paclitaxel versus carboplatin/paclitaxel alone for first-line treatment of advanced ovarian and primary peritoneal carcinomas: results from a prospectively designed analysis of progression-free survival. *Gynecologic Oncology.* 109:174-181.
- Anton-Lamprecht, I., and U.W. Schnyder. 1982. Epidermolysis bullosa herpetiformis Dowling-Meara. Report of a case and pathomorphogenesis. *Dermatologica.* 164:221-235.
- Arin, M.J. 2009. The molecular basis of human keratin disorders. *Human Genetics.* 125:355-373.
- Baccala, R., D.H. Kono, and A.N. Theofilopoulos. 2005. Interferons as pathogenic effectors in autoimmunity. *Immunological Reviews.* 204:9-26.
- Bach, E.A., M. Aguet, and R.D. Schreiber. 1997. The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annual Review Of Immunology.* 15:563-591.
- Baek, J.O., H.Y. Lee, S.W. Oh, J.S. Lee, S.C. Kim, J.R. Lee, and J.Y. Roh. 2010. A novel homozygous keratin 14 mutation in a patient with autosomal recessive epidermolysis bullosa simplex and squamous cell carcinoma of the tongue. *The British Journal Of Dermatology.* 162:880-882.
- Baran, W., J.C. Szepietowski, G. Mazur, and E. Baran. 2008. IFN-gamma promoter gene polymorphism in psoriasis vulgaris. *Biomarkers: Biochemical Indicators Of Exposure, Response, And Susceptibility To Chemicals.* 13:52-58.
- Baribault, H., J. Price, K. Miyai, and R.G. Oshima. 1993. Mid-gestational lethality in mice lacking keratin 8. *Genes & development.* 7:1191-1202.
- Baroli, B. 2009. Penetration of nanoparticles and nanomaterials in the skin: fiction or reality? *Journal Of Pharmaceutical Sciences.* 99:21-50.
- Bchetnia, M., T. Farez, J. Lacroix, G. Leclerc, J. Powell, C. McCuaig, V. Legendre-Guillemain, A. Dupérée, C. Morin, and C. Laprise. 2012. Gene expression analysis of epidermolysis

- bullosa simplex with mottled pigmentation. *Journal Of Dermatological Science*. 68:1-70.
- Beg, A.A., T.S. Finco, P.V. Nantermet, and A.S. Baldwin, Jr. 1993. Tumor necrosis factor and interleukin-1 lead to phosphorylation and loss of I kappa B alpha: a mechanism for NF-kappa B activation. *Molecular And Cellular Biology*. 13:3301-3310.
- Betz, R.C., L. Planko, S. Eigelshoven, S. Hanneken, S.M. Pasternack, H. Bussow, K. Van Den Bogaert, J. Wenzel, M. Braun-Falco, A. Rutten, M.A. Rogers, T. Ruzicka, M.M. Nothen, T.M. Magin, and R. Kruse. 2006. Loss-of-function mutations in the keratin 5 gene lead to Dowling-Degos disease. *American journal of human genetics*. 78:510-519.
- Boguniewicz, M., H.S. Jaffe, A. Izu, M.J. Sullivan, D. York, R.S. Geha, and D.Y. Leung. 1990. Recombinant gamma interferon in treatment of patients with atopic dermatitis and elevated IgE levels. *The American Journal Of Medicine*. 88:365-370.
- Bonifas, J.M., A.L. Rothman, and E.H. Epstein, Jr. 1991. Epidermolysis bullosa simplex: evidence in two families for keratin gene abnormalities. *Science (New York, N.Y.)*. 254:1202-1205.
- Bowcock, A.M., and J.G. Krueger. 2005. Getting under the skin: the immunogenetics of psoriasis. *Nature Reviews. Immunology*. 5:699-711.
- Bowden, P.E., A.G. Knight, and M. Liovic. 2009. A novel mutation (p.Thr198Ser) in the 1A helix of keratin 5 causes the localized variant of epidermolysis bullosa simplex. *Experimental Dermatology*. 18:650-652.
- Browning, J.C., and B. Mohr. 2012. Epidermolysis bullosa simplex with mottled pigmentation. *Dermatology Online Journal*. 18:9-9.
- Catherinot, E., C. Fieschi, J. Feinberg, J.L. Casanova, and L.J. Couderc. 2005. [Genetic susceptibility to mycobacterial disease: Mendelian disorders of the interleukin-12 - interferon-gamma axis]. *Revue Des Maladies Respiratoires*. 22:767-776.
- Caulin, C., C.F. Ware, T.M. Magin, and R.G. Oshima. 2000. Keratin-dependent, epithelial resistance to tumor necrosis factor-induced apoptosis. *The Journal Of Cell Biology*. 149:17-22.
- Cavet, J., A.M. Dickinson, J. Norden, P.R. Taylor, G.H. Jackson, and P.G. Middleton. 2001. Interferon-gamma and interleukin-6 gene polymorphisms associate with graft-versus-host disease in HLA-matched sibling bone marrow transplantation. *Blood*. 98:1594-1600.
- Chamcheu, J.C., E.P. Lorie, B. Akgul, E. Bannbers, M. Virtanen, L. Gammon, A. Moustakas, H. Navsaria, A. Vahlquist, and H. Törmä. 2009. Characterization of immortalized human epidermolysis bullosa simplex (KRT5) cell lines: trimethylamine N-oxide protects the keratin cytoskeleton against disruptive stress condition. *Journal Of Dermatological Science*. 53:198-206.
- Chamcheu, J.C., H. Navsaria, I. Pihl-Lundin, M. Liovic, A. Vahlquist, and H. Torma. 2011a. Chemical chaperones protect epidermolysis bullosa simplex keratinocytes from heat stress-induced keratin aggregation: involvement of heat shock proteins and MAP kinases. *The Journal Of Investigative Dermatology*. 131:1684-1691.
- Chamcheu, J.C., I.A. Siddiqui, D.N. Syed, V.M. Adhami, M. Liovic, and H. Mukhtar. 2010a. Keratin gene mutations in disorders of human skin and its appendages. *Archives Of Biochemistry And Biophysics*. 508:123-137.

- Chamcheu, J.C., I.A. Siddiqui, D.N. Syed, V.M. Adhami, M. Liovic, and H. Mukhtar. 2011b. Keratin gene mutations in disorders of human skin and its appendages. *Archives Of Biochemistry And Biophysics*. 508:123-137.
- Chamcheu, J.C., M. Virtanen, H. Navsaria, P.E. Bowden, A. Vahlquist, and H. Torma. 2010b. Epidermolysis bullosa simplex due to KRT5 mutations: mutation-related differences in cellular fragility and the protective effects of trimethylamine N-oxide in cultured primary keratinocytes. *The British Journal Of Dermatology*. 162:980-989.
- Chan, Y., I. Anton-Lamprecht, Q.C. Yu, A. Jackel, B. Zabel, J.P. Ernst, and E. Fuchs. 1994. A human keratin 14 "knockout": the absence of K14 leads to severe epidermolysis bullosa simplex and a function for an intermediate filament protein. *Genes & development*. 8:2574-2587.
- Chan, Y.M., Q.C. Yu, J.D. Fine, and E. Fuchs. 1993. THE GENETIC-BASIS OF WEBER-COCKAYNE EPIDERMOLYSIS-BULLOSA SIMPLEX. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90:7414-7418.
- Chiang, Y.Y., S.C. Chao, W.Y. Chen, W.R. Lee, and K.H. Wang. 2008. Weber-Cockayne type of epidermolysis bullosa simplex associated with a novel mutation in keratin 5 and amyloid deposits. *The British Journal Of Dermatology*. 159:1370-1372.
- Chopra, V., S.K. Tying, L. Johnson, and J.D. Fine. 1990. Patients with severe forms of inherited epidermolysis bullosa exhibit decreased lymphokine and monokine production. *Journal Of Clinical Immunology*. 10:321-329.
- Christiano, A.M., M. Ryyanen, and J. Uitto. 1994. dominant dystrophic epidermolysis-bullosa - identification of a gly- ser substitution in the triple-helical domain of type-vii collagen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91:3549-3553.
- Condos, R., B. Raju, A. Canova, B.-Y. Zhao, M. Weiden, W.N. Rom, and R. Pine. 2003. Recombinant gamma interferon stimulates signal transduction and gene expression in alveolar macrophages in vitro and in tuberculosis patients. *Infection And Immunity*. 71:2058-2064.
- Condos, R., W.N. Rom, and N.W. Schluger. 1997. Treatment of multidrug-resistant pulmonary tuberculosis with interferon-gamma via aerosol. *Lancet*. 349:1513-1515.
- Conway, J.F., and D.A.D. Parry. 1988. Intermediate filament structure: 3. Analysis of sequence homologies. *International Journal of Biological Macromolecules*. 10:79-98.
- Coulombe, P.A., M.E. Hutton, R. Vassar, and E. Fuchs. 1991. A function for keratins and a common thread among different types of epidermolysis bullosa simplex diseases. *The Journal Of Cell Biology*. 115:1661-1674.
- D'Alessandro, M., S.E. Coats, M.F. Jonkmann, I.M. Leigh, and E.B. Lane. 2011. Keratin 14-null cells as a model to test the efficacy of gene therapy approaches in epithelial cells. *The Journal Of Investigative Dermatology*. 131:1412-1419.
- de Jong, E.M., I.M. van Vlijmen, P.E. van Erp, F.C. Ramaekers, S.M. Troyanovski, and P.C. van de Kerkhof. 1991. Keratin 17: a useful marker in anti-psoriatic therapies. *Archives Of Dermatological Research*. 283:480-482.
- Deb, D.K., A. Sassano, F. Lekmine, B. Majchrzak, A. Verma, S. Kambhampati, S. Uddin, A. Rahman, E.N. Fish, and L.C. Plataniias. 2003. Activation of protein kinase C delta by IFN-gamma. *Journal Of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. 171:267-273.

- Devos, R., H. Cheroutre, Y. Taya, W. Degraeve, H. Van Heuverswyn, and W. Fiers. 1982. Molecular cloning of human immune interferon cDNA and its expression in eukaryotic cells. *Nucleic Acids Research*. 10:2487-2501.
- Dhar, S., and R. Banerjee. 2010. Atopic dermatitis in infants and children in India. *Indian Journal Of Dermatology, Venereology And Leprology*. 76:504-513.
- Ealick, S.E., W.J. Cook, S. Vijay-Kumar, M. Carson, T.L. Nagabhushan, P.P. Trotta, and C.E. Bugg. 1991. Three-dimensional structure of recombinant human interferon-gamma. *Science (New York, N.Y.)*. 252:698-702.
- Farrar, M.A., and R.D. Schreiber. 1993. The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. *Annual Review Of Immunology*. 11:571-611.
- Fine, J.-D., L.B. Johnson, M. Weiner, and C. Suchindran. 2008. Gastrointestinal complications of inherited epidermolysis bullosa: cumulative experience of the National Epidermolysis Bullosa Registry. *Journal Of Pediatric Gastroenterology And Nutrition*. 46:147-158.
- Fischer, T., and T. Gedde-Dahl, Jr. 1979. Epidermolysis bullosa simplex and mottled pigmentation: a new dominant syndrome. I. Clinical and histological features. *Clinical Genetics*. 15:228-238.
- Freedberg, I.M., M. Tomic-Canic, M. Komine, and M. Blumenberg. 2001. Keratins and the keratinocyte activation cycle. *The Journal Of Investigative Dermatology*. 116:633-640.
- Frucht, D.M., T. Fukao, C. Bogdan, H. Schindler, J.J. O'Shea, and S. Koyasu. 2001. IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge. *Trends In Immunology*. 22:556-560.
- Galligan, P., P. Listwan, G.M. Siller, and J.A. Rothnagel. 1998. A novel mutation in the L12 domain of keratin 5 in the Köbner variant of epidermolysis bullosa simplex. *The Journal Of Investigative Dermatology*. 111:524-527.
- Gamet-Payraastre, L. 2006. Signaling pathways and intracellular targets of sulforaphane mediating cell cycle arrest and apoptosis. *Current Cancer Drug Targets*. 6:135-145.
- Garcia, M., J.L. Santiago, A. Terron, A. Hernandez-Martin, A. Vicente, C. Fortuny, R. De Lucas, J.C. Lopez, N. Cuadrado-Corrales, A. Holguin, N. Illera, B. Duarte, C. Sanchez-Jimeno, S. Llames, E. Garcia, C. Ayuso, L. Martinez-Santamaria, D. Castiglja, N. De Luca, A. Torrelo, D. Mehan, D. Baty, G. Zambruno, M.J. Escamez, and M. Del Rio. 2011. Two novel recessive mutations in KRT14 identified in a cohort of 21 Spanish families with epidermolysis bullosa simplex. *The British Journal Of Dermatology*. 165:683-692.
- Georges-Labouesse, E., N. Messaddeq, G. Yehia, L. Cadalbert, A. Dierich, and M. Le Meur. 1996. Absence of integrin alpha 6 leads to epidermolysis bullosa and neonatal death in mice. *Nature Genetics*. 13:370-373.
- Giannopoulos, A., C. Constantinides, E. Fokaeas, C. Stravodimos, M. Giannopoulou, A. Kyroudi, and A. Gounaris. 2003. The immunomodulating effect of interferon-gamma intravesical instillations in preventing bladder cancer recurrence. *Clinical Cancer Research: An Official Journal Of The American Association For Cancer Research*. 9:5550-5558.

- Gilbert, S., A. Loranger, N. Daigle, and N. Marceau. 2001. Simple epithelium keratins 8 and 18 provide resistance to Fas-mediated apoptosis. The protection occurs through a receptor-targeting modulation. *The Journal Of Cell Biology*. 154:763-773.
- Greenbaum, D., C. Colangelo, K. Williams, and M. Gerstein. 2003. Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale. *Genome Biology*. 4:117-117.
- Grossman, R.M., J. Krueger, D. Yourish, A. Granelli-Piperno, D.P. Murphy, L.T. May, T.S. Kupper, P.B. Sehgal, and A.B. Gottlieb. 1989. Interleukin 6 is expressed in high levels in psoriatic skin and stimulates proliferation of cultured human keratinocytes. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*. 86:6367-6371.
- Gu, L.H., S.C. Kim, Y. Ichiki, J. Park, M. Nagai, and Y. Kitajima. 2003. A usual frameshift and delayed termination codon mutation in keratin 5 causes a novel type of epidermolysis bullosa simplex with migratory circinate erythema. *The Journal Of Investigative Dermatology*. 121:482-485.
- Hamada, T., Y. Kawano, W. Szczecinska, K. Wozniak, S. Yasumoto, C. Kowalewski, and T. Hashimoto. 2005. Novel keratin 5 and 14 gene mutations in patients with epidermolysis bullosa simplex from Poland. *Archives Of Dermatological Research*. 296:577-579.
- Harel, A., R. Bergman, M. Indelman, and E. Sprecher. 2006. Epidermolysis bullosa simplex with mottled pigmentation resulting from a recurrent mutation in KRT14. *The Journal Of Investigative Dermatology*. 126:1654-1657.
- Hemmi, S., R. Bohni, G. Stark, F. Di Marco, and M. Aguet. 1994. A novel member of the interferon receptor family complements functionality of the murine interferon gamma receptor in human cells. *Cell*. 76:803-810.
- Herrmann, H., and U. Aebi. 1998. Intermediate filament assembly: fibrillogenesis is driven by decisive dimer-dimer interactions. *Current Opinion In Structural Biology*. 8:177-185.
- Herrmann, H., and U. Aebi. 2004. Intermediate filaments: molecular structure, assembly mechanism, and integration into functionally distinct intracellular Scaffolds. *Annual Review Of Biochemistry*. 73:749-789.
- Hilal, L., A. Rochat, P. Duquesnoy, C. Blanchet-Bardon, J. Wechsler, N. Martin, A.M. Christiano, Y. Barrandon, J. Uitto, and M. Goossens. 1993. A homozygous insertion-deletion in the type VII collagen gene (COL7A1) in Hallopeau-Siemens dystrophic epidermolysis bullosa. *Nature Genetics*. 5:287-293.
- Horn, H.M., G.C. Priestley, R.A. Eady, and M.J. Tidman. 1997. The prevalence of epidermolysis bullosa in Scotland. *The British Journal Of Dermatology*. 136:560-564.
- Inada, H., I. Izawa, M. Nishizawa, E. Fujita, T. Kiyono, T. Takahashi, T. Momoi, and M. Inagaki. 2001. Keratin attenuates tumor necrosis factor-induced cytotoxicity through association with TRADD. *The Journal Of Cell Biology*. 155:415-426.
- Irvine, A.D., E.L. Rugg, E.B. Lane, S. Hoare, C. Peret, A.E. Hughes, and A.H. Heagerty. 2001. Molecular confirmation of the unique phenotype of epidermolysis bullosa simplex with mottled pigmentation. *The British Journal Of Dermatology*. 144:40-45.



- Isaacs, A., and J. Lindenmann. 1987. Virus interference. I. The interferon. By A. Isaacs and J. Lindenmann, 1957. *Journal Of Interferon Research*. 7:429-438.
- Izawa, I., and M. Inagaki. 2006. Regulatory mechanisms and functions of intermediate filaments: A study using site- and phosphorylation state-specific antibodies. *Cancer Science*. 97:167-174.
- Jaquemar, D., S. Kupriyanov, M. Wankell, J. Avis, K. Benirschke, H. Baribault, and R.G. Oshima. 2003. Keratin 8 protection of placental barrier function. *The Journal Of Cell Biology*. 161:749-756.
- Jerábková, B., J. Marek, H. Bucková, L. Kopecková, K. Veselý, J. Valicková, J. Fajkus, and L. Fajkusová. 2010. Keratin mutations in patients with epidermolysis bullosa simplex: correlations between phenotype severity and disturbance of intermediate filament molecular structure. *The British Journal Of Dermatology*. 162:1004-1013.
- Jiang, C.K., T. Magnaldo, M. Ohtsuki, I.M. Freedberg, F. Bernerd, and M. Blumenberg. 1993. Epidermal growth factor and transforming growth factor alpha specifically induce the activation- and hyperproliferation-associated keratins 6 and 16. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*. 90:6786-6790.
- Jonasch, E., and F.G. Haluska. 2001. Interferon in oncological practice: review of interferon biology, clinical applications, and toxicities. *Oncologist*. 6:34-55.
- Kadowaki, N., S. Antonenko, and Y.J. Liu. 2001. Distinct CpG DNA and polyinosinic-polycytidylic acid double-stranded RNA, respectively, stimulate CD11c- type 2 dendritic cell precursors and CD11c+ dendritic cells to produce type I IFN. *J Immunol*. 166:2291-2295.
- Kanitakis, J. 2002. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *European Journal Of Dermatology: EJD*. 12:390-399.
- Kaufman, C.K., and E. Fuchs. 2000. It's got you covered. NF-kappaB in the epidermis. *The Journal Of Cell Biology*. 149:999-1004.
- Kerns, M.L., D. DePianto, A.T. Dinkova-Kostova, P. Talalay, and P.A. Coulombe. 2007. Reprogramming of keratin biosynthesis by sulforaphane restores skin integrity in epidermolysis bullosa simplex. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*. 104:14460-14465.
- Ko, J.H., B.G. Jung, Y.S. Park, and B.J. Lee. 2011. Inhibitory effects of interferon-gamma plasmid DNA on DMBA-TPA induced mouse skin carcinogenesis. *Cancer Gene Ther*.
- Komine, M., I.M. Freedberg, and M. Blumenberg. 1996. Regulation of epidermal expression of keratin K17 in inflammatory skin diseases. *The Journal Of Investigative Dermatology*. 107:569-575.
- Kovarik, P., D. Stoiber, P.A. Eyers, R. Menghini, A. Neininger, M. Gaestel, P. Cohen, and T. Decker. 1999. Stress-induced phosphorylation of STAT1 at Ser727 requires p38 mitogen-activated protein kinase whereas IFN-gamma uses a different signaling pathway. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*. 96:13956-13961.
- Kowalewski, C., T. Hamada, K. Wozniak, Y. Kawano, W. Szczecinska, S. Yasumoto, R.A. Schwartz, and T. Hashimoto. 2007. A novel autosomal partially dominant mutation

- designated G476D in the keratin 5 gene causing epidermolysis bullosa simplex Weber-Cockayne type: a family study with a genetic twist. *International Journal Of Molecular Medicine*. 20:75-78.
- Ku, N.O., S. Michie, E.Z. Resurreccion, R.L. Broome, and M.B. Omary. 2002. Keratin binding to 14-3-3 proteins modulates keratin filaments and hepatocyte mitotic progression. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*. 99:4373-4378.
- Kupper, T.S. 1990. Immune and inflammatory processes in cutaneous tissues. Mechanisms and speculations. *The Journal Of Clinical Investigation*. 86:1783-1789.
- Kurzrock, R., J.R. Quesada, M. Talpaz, E.M. Hersh, J.M. Reuben, S.A. Sherwin, and J.U. Gutterman. 1986. Phase I study of multiple dose intramuscularly administered recombinant gamma interferon. *Journal Of Clinical Oncology: Official Journal Of The American Society Of Clinical Oncology*. 4:1101-1109.
- Lane, E.B., and W.H.I. McLean. 2004. Keratins and skin disorders. *The Journal Of Pathology*. 204:355-366.
- Lane, E.B., E.L. Rugg, H. Navsaria, I.M. Leigh, A.H.M. Heagerty, A. Ishidayamamoto, and R.A.J. Eady. 1992. a mutation in the conserved helix termination peptide of keratin-5 in hereditary skin blistering. *Nature*. 356:244-246.
- Liovic, M., B. Podrumac, V. Dragos, K. Vouk, and R. Komel. 2000. K5 D328E: a novel missense mutation in the linker 12 domain of keratin 5 associated with epidermolysis bullosa simplex (Weber-Cockayne). *Human Heredity*. 50:234-236.
- Ma, X., S. Karra, D.J. Lindner, J. Hu, S.P. Reddy, A. Kimchi, J. Yodoi, and D.V. Kalvakolanu. 2001. Thioredoxin participates in a cell death pathway induced by interferon and retinoid combination. *Oncogene*. 20:3703-3715.
- Marionnet, C., C. Vioux-Chagnoleau, C.c. Pierrard, J. Sok, D. Asselineau, and F.o. Bernerd. 2006. Morphogenesis of dermal-epidermal junction in a model of reconstructed skin: beneficial effects of vitamin C. *Experimental Dermatology*. 15:625-633.
- Marth, C., H. Fiegl, A.G. Zeimet, E. MÄ¼ller-Holzner, M. Deibl, W. Doppler, and G.n. Daxenbichler. 2004. Interferon-gamma expression is an independent prognostic factor in ovarian cancer. *American Journal Of Obstetrics And Gynecology*. 191:1598-1605.
- Matsushita, K., T. Takenouchi, H. Shimada, T. Tomonaga, H. Hayashi, A. Shioya, A. Komatsu, H. Matsubara, and T. Ochiai. 2006. Strong HLA-DR antigen expression on cancer cells relates to better prognosis of colorectal cancer patients: Possible involvement of c-myc suppression by interferon-gamma in situ. *Cancer Science*. 97:57-63.
- McGrath, J.A., L. Pulkkinen, A.M. Christiano, I.M. Leigh, R.A.J. Eady, and J. Uitto. 1995. altered laminin-5 expression due to mutations in the gene encoding the beta-3 chain (lamb3) in generalized atrophic benign epidermolysis-bullosa. *J. Invest. Dermatol*. 104:467-474.
- Meyer, O. 2009. Interferons and autoimmune disorders. *Joint, Bone, Spine: Revue Du Rhumatisme*. 76:464-473.
- Milanes-Virelles, M.T., I. Garcia-Garcia, Y. Santos-Herrera, M. Valdes-Quintana, C.M. Valenzuela-Silva, G. Jimenez-Madrigal, T.I. Ramos-Gomez, I. Bello-Rivero, N.

- Fernandez-Olivera, R.B. Sanchez-de la Osa, C. Rodriguez-Acosta, L. Gonzalez-Mendez, G. Martinez-Sanchez, and P.A. Lopez-Saura. 2008. Adjuvant interferon gamma in patients with pulmonary atypical Mycobacteriosis: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *BMC Infect Dis.* 8:17.
- Moll, R., W.W. Franke, B. Volc-Platzer, and R. Krepler. 1982. Different keratin polypeptides in epidermis and other epithelia of human skin: a specific cytokeratin of molecular weight 46,000 in epithelia of the pilosebaceous tract and basal cell epitheliomas. *The Journal Of Cell Biology.* 95:285-295.
- Munder, M., M. Mallo, K. Eichmann, and M. Modolell. 1998a. Murine macrophages secrete interferon gamma upon combined stimulation with interleukin (IL)-12 and IL-18: A novel pathway of autocrine macrophage activation. *The Journal Of Experimental Medicine.* 187:2103-2108.
- Munder, M., M. Mallo, K. Eichmann, and M. Modolell. 2001. Direct stimulation of macrophages by IL-12 and IL-18 - a bridge built on solid ground. *Immunology Letters.* 75:159-160.
- Munder, M., M.s. Mallo, K. Eichmann, and M. Modolell. 1998b. Murine Macrophages Secrete Interferon  $\gamma$  upon Combined Stimulation with Interleukin (IL)-12 and IL-18: A Novel Pathway of Autocrine Macrophage Activation. *The Journal of Experimental Medicine.* 187:2103-2108.
- Nair, J.S., C.J. DaFonseca, A. Tjernberg, W. Sun, J.E. Darnell, Jr., B.T. Chait, and J.J. Zhang. 2002. Requirement of Ca<sup>2+</sup> and CaMKII for Stat1 Ser-727 phosphorylation in response to IFN-gamma. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America.* 99:5971-5976.
- Navarro, A., B. Anand-Apte, Y. Tanabe, G. Feldman, and A.C. Larner. 2003a. A PI-3 kinase-dependent, Stat1-independent signaling pathway regulates interferon-stimulated monocyte adhesion. *J Leukoc Biol.* 73:540-545.
- Navarro, A., B. Anand-Apte, Y. Tanabe, G. Feldman, and A.C. Larner. 2003b. A PI-3 kinase-dependent, Stat1-independent signaling pathway regulates interferon-stimulated monocyte adhesion. *Journal Of Leukocyte Biology.* 73:540-545.
- Newport, M.J., C.M. Huxley, S. Huston, C.M. Hawrylowicz, B.A. Oostra, R. Williamson, and M. Levin. 1996. A mutation in the interferon-gamma-receptor gene and susceptibility to mycobacterial infection. *The New England Journal Of Medicine.* 335:1941-1949.
- Nguyen, H., C.V. Ramana, J. Bayes, and G.R. Stark. 2001. Roles of phosphatidylinositol 3-kinase in interferon-gamma-dependent phosphorylation of STAT1 on serine 727 and activation of gene expression. *The Journal Of Biological Chemistry.* 276:33361-33368.
- Nguyen, K.B., L.P. Cousens, L.A. Doughty, G.C. Pien, J.E. Durbin, and C.A. Biron. 2000. Interferon alpha/beta-mediated inhibition and promotion of interferon gamma: STAT1 resolves a paradox. *Nature Immunology.* 1:70-76.
- Noble, J.R., Z.-H. Zhong, A.A. Neumann, J.R. Melki, S.J. Clark, and R.R. Reddel. 2004. Alterations in the p16(INK4a) and p53 tumor suppressor genes of hTERT-immortalized human fibroblasts. *Oncogene.* 23:3116-3121.

- Omary, M.B., N.O. Ku, G.Z. Tao, D.M. Toivola, and J. Liao. 2006. 'Heads and tails' of intermediate filament phosphorylation: multiple sites and functional insights. *Trends in Biochemical Sciences*. 31:383-394.
- Paller, A.S. 2004. In this issue: The complexities of epidermolysis bullosa "simplex". *The Journal Of Investigative Dermatology*. 122:vi-vii.
- Paller, A.S., A.J. Syder, Y.M. Chan, Q.C. Yu, E. Hutton, G. Tadini, and E. Fuchs. 1994. Genetic and clinical mosaicism in a type of epidermal nevus. *N Engl J Med*. 331:1408-1415.
- Parry, D.A. 1996. Hard alpha-keratin intermediate filaments: an alternative interpretation of the low-angle equatorial X-ray diffraction pattern, and the axial disposition of putative disulphide bonds in the intra- and inter-protofilamentous networks. *International Journal of Biological Macromolecules*. 19:45-50.
- Perez, C., J. Wietzerbin, and P.D. Benech. 1993. Two cis-DNA elements involved in myeloid-cell-specific expression and gamma interferon (IFN-gamma) activation of the human high-affinity Fc gamma receptor gene: a novel IFN regulatory mechanism. *Mol Cell Biol*. 13:2182-2192.
- Pfendner, E., and J. Uitto. 2005. Plectin gene mutations can cause epidermolysis bullosa with pyloric atresia. *J. Invest. Dermatol*. 124:111-115.
- Porter, R.M., and E.B. Lane. 2003. Phenotypes, genotypes and their contribution to understanding keratin function. *Trends In Genetics: TIG*. 19:278-285.
- Porter, R.M., D.P. Lunny, P.H. Ogden, S.M. Morley, W.H. McLean, A. Evans, D.L. Harrison, E.L. Rugg, and E.B. Lane. 2000. K15 expression implies lateral differentiation within stratified epithelial basal cells. *Laboratory Investigation; A Journal Of Technical Methods And Pathology*. 80:1701-1710.
- Premaratne, C., S. Klingberg, I. Glass, K. Wright, and D. Murrell. 2002. Epidermolysis bullosa simplex Dowling-Meara due to an arginine to cysteine substitution in exon 1 of keratin 14. *The Australasian Journal Of Dermatology*. 43:28-34.
- Pulkkinen, L., and J. Uitto. 1999. Mutation analysis and molecular genetics of epidermolysis bullosa. *Matrix Biol*. 18:29-42.
- Radoja, N., O. Stojadinovic, A. Waseem, M. Tomic-Canic, V. Milisavljevic, S. Teebor, and M. Blumenberg. 2004. Thyroid hormones and gamma interferon specifically increase K15 keratin gene transcription. *Molecular And Cellular Biology*. 24:3168-3179.
- Raj, D., D.E. Brash, and D. Grossman. 2006. Keratinocyte apoptosis in epidermal development and disease. *The Journal Of Investigative Dermatology*. 126:243-257.
- Ramana, C.V., M.P. Gil, Y. Han, R.M. Ransohoff, R.D. Schreiber, and G.R. Stark. 2001. Stat1-independent regulation of gene expression in response to IFN-gamma. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*. 98:6674-6679.
- Ramana, C.V., N. Grammatikakis, M. Chernov, H. Nguyen, K.C. Goh, B.R. Williams, and G.R. Stark. 2000. Regulation of c-myc expression by IFN-gamma through Stat1-dependent and -independent pathways. *The EMBO Journal*. 19:263-272.
- Ramsauer, K., I. Sadzak, A. Porras, A. Pilz, A.R. Nebreda, T. Decker, and P. Kovarik. 2002. p38 MAPK enhances STAT1-dependent transcription independently of Ser-727

- phosphorylation. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*. 99:12859-12864.
- Reinhold, U., S. Kukel, J. Brzoska, and H.W. Kreysel. 1993. Systemic interferon gamma treatment in severe atopic dermatitis. *Journal Of The American Academy Of Dermatology*. 29:58-63.
- Reinhold, U., W. Wehrmann, S. Kukel, and H.W. Kreysel. 1990. Recombinant interferon-gamma in severe atopic dermatitis. *Lancet*. 335:1282-1282.
- Rheinwald, J.G., and H. Green. 1975. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell*. 6:331-343.
- Ristow, H.J. 1987. A major factor contributing to epidermal proliferation in inflammatory skin diseases appears to be interleukin 1 or a related protein. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*. 84:1940-1944.
- Robitaille, H., R. Proulx, K. Robitaille, R. Blouin, and L. Germain. 2005. The mitogen-activated protein kinase kinase dual leucine zipper-bearing kinase (DLK) acts as a key regulator of keratinocyte terminal differentiation. *The Journal Of Biological Chemistry*. 280:12732-12741.
- Rogers, M.A., H. Winter, L. Langbein, R. Bleiler, and J. Schweizer. 2004. The human type I keratin gene family: characterization of new hair follicle specific members and evaluation of the chromosome 17q21.2 gene domain. *Differentiation; Research In Biological Diversity*. 72:527-540.
- Roth, W., U. Reuter, C. Wohlenberg, L. Bruckner-Tuderman, and T.M. Magin. 2009. Cytokines as genetic modifiers in K5<sup>-/-</sup> mice and in human epidermolysis bullosa simplex. *Human Mutation*. 30:832-841.
- Rozyńska, R., and T. Targowski. 2012. [Contemporary threat of tuberculosis]. *Polski Merkurusz Lekarski: Organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego*. 33:279-283.
- Rugg, E.L., H.M. Horn, F.J. Smith, N.J. Wilson, A.J.M. Hill, G.J. Magee, C.S. Shemanko, D.U. Baty, M.J. Tidman, and E.B. Lane. 2007. Epidermolysis bullosa simplex in Scotland caused by a spectrum of keratin mutations. *The Journal Of Investigative Dermatology*. 127:574-580.
- Sad, S., and T.R. Mosmann. 1995. Interleukin (IL) 4, in the absence of antigen stimulation, induces an anergy-like state in differentiated CD8<sup>+</sup> TC1 cells: loss of IL-2 synthesis and autonomous proliferation but retention of cytotoxicity and synthesis of other cytokines. *The Journal Of Experimental Medicine*. 182:1505-1515.
- Salazar-Mather, T.P., T.A. Hamilton, and C.A. Biron. 2000. A chemokine-to-cytokine-to-chemokine cascade critical in antiviral defense. *The Journal Of Clinical Investigation*. 105:985-993.
- Samudzi, C.T., L.E. Burton, and J.R. Rubin. 1991. Crystal structure of recombinant rabbit interferon-gamma at 2.7-Å resolution. *J Biol Chem*. 266:21791-21797.
- Santoro, M.G. 2000. Heat shock factors and the control of the stress response. *Biochemical Pharmacology*. 59:55-63.
- Sareneva, T., J. Pirhonen, K. Cantell, and I. Julkunen. 1995. N-glycosylation of human interferon-gamma: glycans at Asn-25 are critical for protease resistance. *The Biochemical Journal*. 308 ( Pt 1):9-14.

- Sawamura, D., M. Goto, K. Sakai, H. Nakamura, J.R. McMillan, M. Akiyama, O. Shirado, N. Oyama, M. Satoh, F. Kaneko, T. Takahashi, H. Konno, and H. Shimizu. 2007. Possible involvement of Exon 31 alternative splicing in phenotype and severity of epidermolysis bullosa caused by mutations in PLEC1. *J. Invest. Dermatol.* 127:1537-1540.
- Sawamura, D., H. Nakano, and Y. Matsuzaki. 2010. Overview of epidermolysis bullosa. *The Journal Of Dermatology.* 37:214-219.
- Sayama, K., Y. Hanakawa, Y. Shirakata, K. Yamasaki, Y. Sawada, L. Sun, K. Yamanishi, H. Ichijo, and K. Hashimoto. 2001. Apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) is an intracellular inducer of keratinocyte differentiation. *The Journal Of Biological Chemistry.* 276:999-1004.
- Schroder, K., P.J. Hertzog, T. Ravasi, and D.A. Hume. 2004. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal Of Leukocyte Biology.* 75:163-189.
- Schuilenga-Hut, P.H.L., P.v.d. Vlies, M.F. Jonkman, E. Waanders, C.H.C.M. Buys, and H. Scheffer. 2003. Mutation analysis of the entire keratin 5 and 14 genes in patients with epidermolysis bullosa simplex and identification of novel mutations. *Human Mutation.* 21:447-447.
- Schweizer, J., P.E. Bowden, P.A. Coulombe, L. Langbein, E.B. Lane, T.M. Magin, L. Maltais, M.B. Omary, D.A.D. Parry, M.A. Rogers, and M.W. Wright. 2006. New consensus nomenclature for mammalian keratins. *The Journal Of Cell Biology.* 174:169-174.
- Sheppard, P., W. Kindsvogel, W. Xu, K. Henderson, S. Schlutsmeyer, T.E. Whitmore, R. Kuestner, U. Garrigues, C. Birks, J. Roraback, C. Ostrander, D. Dong, J. Shin, S. Presnell, B. Fox, B. Haldeman, E. Cooper, D. Taft, T. Gilbert, F.J. Grant, M. Tackett, W. Krivan, G. McKnight, C. Clegg, D. Foster, and K.M. Klucher. 2003. IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nature Immunology.* 4:63-68.
- Shimomura, Y., M. Wajid, M. Kurban, N. Sato, and A.M. Christiano. 2010. Mutations in the keratin 85 (KRT85/hHb5) gene underlie pure hair and nail ectodermal dysplasia. *The Journal Of Investigative Dermatology.* 130:892-895.
- Sivori, S., M. Falco, M. Della Chiesa, S. Carlomagno, M. Vitale, L. Moretta, and A. Moretta. 2004. CpG and double-stranded RNA trigger human NK cells by Toll-like receptors: induction of cytokine release and cytotoxicity against tumors and dendritic cells. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America.* 101:10116-10121.
- Sobue, S., T. Nomura, T. Ishikawa, S. Ito, K. Saso, H. Ohara, T. Joh, M. Itoh, and S. Kakumu. 2001. Th1/Th2 cytokine profiles and their relationship to clinical features in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Journal Of Gastroenterology.* 36:544-551.
- Soh, J., R.J. Donnelly, S. Kotenko, T.M. Mariano, J.R. Cook, N. Wang, S. Emanuel, B. Schwartz, T. Miki, and S. Pestka. 1994. Identification and sequence of an accessory factor required for activation of the human interferon gamma receptor. *Cell.* 76:793-802.
- Steinert, P.M. 1993. Structure, function, and dynamics of keratin intermediate filaments. *The Journal Of Investigative Dermatology.* 100:729-734.

- Steinert, P.M., W.W. Idler, and S.B. Zimmerman. 1976. Self-assembly of bovine epidermal keratin filaments in vitro. *Journal Of Molecular Biology*. 108:547-567.
- Steinert, P.M., L.N. Marekov, R.D. Fraser, and D.A. Parry. 1993. Keratin intermediate filament structure. Crosslinking studies yield quantitative information on molecular dimensions and mechanism of assembly. *Journal Of Molecular Biology*. 230:436-452.
- Suárez-Mendez, R., I. Garcia-Garcia, N. Fernandez-Olivera, M. Valdes-Quintana, M. Milanes-Virelles, D. Carbonell, D. Machado-Molina, C.M. Valenzuela-Silva, and P.A. Lopez-Saura. 2004. Adjuvant interferon gamma in patients with drug - resistant pulmonary tuberculosis: a pilot study. *BMC Infectious Diseases*. 4:44-44.
- Tang, H.Y., W.D. Du, Y. Cui, X. Fan, C. Quan, Q.Y. Fang, F.S. Zhou, F.M. Yao, J.F. Wang, S. Yang, and X. Zhang. 2009. One novel and two recurrent mutations in the keratin 5 gene identified in Chinese patients with epidermolysis bullosa simplex. *Clinical and Experimental Dermatology*. 34:957-961.
- Tang, M., A. Kemp, and G. Varigos. 1993. IL-4 and interferon-gamma production in children with atopic disease. *Clinical And Experimental Immunology*. 92:120-124.
- Tay, Y.K., and W.L. Weston. 1996. Epidermolysis bullosa simplex herpetiformis of Dowling-Meara with mottled pigmentation: the relationship between EBS herpetiformis and EBS with mottled pigmentation. *Pediatric Dermatology*. 13:306-309.
- Titeux, M., J. Mazereeuw-Hautier, S.I. Hadj-Rabia, C. Prost, L. Tonasso, S. Fraitag, Y. de Prost, A. Hovnanian, and C. Bodemer. 2006. Three severe cases of EBS Dowling-Meara caused by missense and frameshift mutations in the keratin 14 gene. *The Journal Of Investigative Dermatology*. 126:773-776.
- Tyagi, A., C. Agarwal, L.D. Dwyer-Nield, R.P. Singh, A.M. Malkinson, and R. Agarwal. 2011. Silibinin modulates TNF-alpha and IFN-gamma mediated signaling to regulate COX2 and iNOS expression in tumorigenic mouse lung epithelial LM2 cells. *Mol Carcinog*.
- Uitto, J., and G. Richard. 2005. Progress in epidermolysis bullosa: from eponyms to molecular genetic classification. *Clin. Dermatol*. 23:33-40.
- Uitto, J., G. Richard, and J.A. McGrath. 2007. Diseases of epidermal keratins and their linker proteins. *Experimental Cell Research*. 313:1995-2009.
- Uttam, J., E. Hutton, P.A. Coulombe, I. Anton-Lamprecht, Q.C. Yu, T. Gedde-Dahl, Jr., J.D. Fine, and E. Fuchs. 1996. The genetic basis of epidermolysis bullosa simplex with mottled pigmentation. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*. 93:9079-9084.
- van Boxel-Dezaire, A.H.H., and G.R. Stark. 2007. Cell type-specific signaling in response to interferon-gamma. *Curr Top Microbiol Immunol*. 316:119-154.
- Vanhaverbeke, C.c., J.-P. Simorre, R. Sadir, P. Gans, and H. Lortat-Jacob. 2004. NMR characterization of the interaction between the C-terminal domain of interferon-gamma and heparin-derived oligosaccharides. *The Biochemical Journal*. 384:93-99.
- Varinou, L., K. Ramsauer, M. Karaghiosoff, T. Kolbe, K. Pfeffer, M. Muller, and T. Decker. 2003. Phosphorylation of the Stat1 transactivation domain is required for full-fledged IFN-gamma-dependent innate immunity. *Immunity*. 19:793-802.

- Vidal, F., D. Aberdam, C. Miquel, A.M. Christiano, L. Pulkkinen, J. Uitto, J.P. Ortonne, and G. Meneguzzi. 1995. Integrin beta 4 mutations associated with junctional epidermolysis bullosa with pyloric atresia. *Nature Genetics*. 10:229-234.
- Waseem, A., C.M. Alexander, J.B. Steel, and E.B. Lane. 1990. Embryonic simple epithelial keratins 8 and 18: chromosomal location emphasizes difference from other keratin pairs. *The New Biologist*. 2:464-478.
- Waseem, A., B. Dogan, N. Tidman, Y. Alam, P. Purkis, S. Jackson, A. Lalli, M. Machesney, and I.M. Leigh. 1999. Keratin 15 expression in stratified epithelia: downregulation in activated keratinocytes. *The Journal Of Investigative Dermatology*. 112:362-369.
- Wei, L., R. Debets, J.J. Hegmans, R. Benner, and E.P. Prens. 1999. IL-1 beta and IFN-gamma induce the regenerative epidermal phenotype of psoriasis in the transwell skin organ culture system. IFN-gamma up-regulates the expression of keratin 17 and keratinocyte transglutaminase via endogenous IL-1 production. *The Journal Of Pathology*. 187:358-364.
- Weiss, R.A., R. Eichner, and T.T. Sun. 1984. Monoclonal antibody analysis of keratin expression in epidermal diseases: a 48- and 56-kdalton keratin as molecular markers for hyperproliferative keratinocytes. *The Journal Of Cell Biology*. 98:1397-1406.
- Wen, Z., Z. Zhong, and J.E. Darnell, Jr. 1995. Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell*. 82:241-250.
- Werner, S., and B. Munz. 2000. Suppression of keratin 15 expression by transforming growth factor beta in vitro and by cutaneous injury in vivo. *Experimental Cell Research*. 254:80-90.
- Yasukawa, K., D. Sawamura, M. Goto, H. Nakamura, S.Y. Jung, S.C. Kim, and H. Shimizu. 2006. Epidermolysis bullosa simplex in Japanese and Korean patients: genetic studies in 19 cases. *The British Journal Of Dermatology*. 155:313-317.
- Yuen, W.Y., H.H. Lemmink, K.K. van Dijk-Bos, R.J. Sinke, and M.F. Jonkman. 2011. Herlitz junctional epidermolysis bullosa: diagnostic features, mutational profile, incidence and population carrier frequency in the Netherlands. *The British Journal Of Dermatology*. 165:1314-1322.
- Zhang, Y., and G.B. Gordon. 2004. A strategy for cancer prevention: stimulation of the Nrf2-ARE signaling pathway. *Molecular Cancer Therapeutics*. 3:885-893.
- Zhu, K., J. Ye, M. Wu, and H. Cheng. 2010. Expression of Th1 and Th2 cytokine-associated transcription factors, T-bet and GATA-3, in peripheral blood mononuclear cells and skin lesions of patients with psoriasis vulgaris. *Arch Dermatol Res*. 302:517-523.
- Zhu, X., Z. Wen, L.Z. Xu, and J.E. Darnell, Jr. 1997. Stat1 serine phosphorylation occurs independently of tyrosine phosphorylation and requires an activated Jak2 kinase. *Molecular And Cellular Biology*. 17:6618-6623.
- Zimmermann, C.C., D. Sforza, P.M. Macedo, L. Azulay-Abulafia, F. Alves Mde, and S.C. Carneiro. 2011. Dowling-Degos disease: classic clinical and histopathological presentation. *Anais Brasileiros De Dermatologia*. 86:979-982.