



HAL
open science

Rôle du facteur de transcription HIF-1 dans la physiologie cutanée et dans la réponse à l'exposition UV

Nsrein Ali

► To cite this version:

Nsrein Ali. Rôle du facteur de transcription HIF-1 dans la physiologie cutanée et dans la réponse à l'exposition UV. Autre. Institut National Polytechnique de Lorraine, 2010. Français. NNT : 2010INPL041N . tel-01748832

HAL Id: tel-01748832

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748832>

Submitted on 29 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

ÉCOLE DOCTORALE : RP2E

Laboratoire Mixte INSERM/Université de Bordeaux U876

THÈSE

Présentée et soutenue publiquement le 04/10/2010 pour l'obtention du
grade de Docteur de l'INPL

Par

Nsrein ALI

**Rôle du facteur de transcription HIF-1 α dans la
physiologie cutanée et dans la réponse à
l'exposition UV**

Directeur de thèse : Hubert DE VERNEUIL Pr (Université Bordeaux)

Composition du jury :

Président du jury : Alain TAIEB Pr (Université Bordeaux)

Rapporteurs : Guerrino MENEGUZZI Dr (Université de Nice)

Marie-Dominique GALIBERT Pr (Université de Rennes)

Examineurs : Jean Claude LECRON Pr (Université de Poitiers)

Michel FICK Pr (Nancy-Université-INPL)

Hubert DE VERNEUIL Pr (Université Bordeaux)

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Ministère des Etudes Supérieures de la Syrie qui m'a accordé le soutien financier sans lequel je n'aurais pu réaliser ce travail.

Je voudrais remercier le Professeur Hubert de Verneuil pour m'avoir accueillie au sein de son équipe, INSERM U876, et ainsi permis d'effectuer ce travail dans les meilleures conditions.

Je tiens à remercier,

Le Pr. Alain Taïeb de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury, pour son soutien et aussi pour ses idées qui ont enrichi ce travail

Le Dr. Guerrino Meneguzzi et le Pr Marie-Dominique Galibert d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse.

Le Pr. Jean Claude LECRON et le Pr Michel FICK d'avoir accepté d'être membres de ce jury.

Mes plus sincères remerciements vont également à Hamid Rezvani qui m'a suivie quotidiennement pendant trois ans avec ses conseils et son soutien.

Je voudrais également exprimer mes remerciements à Frédéric Mazurier qui a activement participé à ce travail.

Enfin, mes chaleureux remerciements s'adressent à Catherine Pain qui m'a beaucoup aidée dans l'apprentissage des techniques. Je voudrais aussi remercier tous les membres du laboratoire pour leur soutien durant ces années.

Remerciements

A celle et à celui qui m'ont donné la vie et fait de nombreux sacrifices pour subvenir aux besoins de leurs enfants

A ma mère et mon père

A celles et ceux qui m'ont donné la force et apporté beaucoup de joies

A mes sœurs et mes frères

A toute ma famille,

A ma deuxième famille qui m'a accueillie les bras ouverts et qui m'a soutenue pendant trois ans

A la personne qui a accompli tous les devoirs d'un véritable frère, à toi Hamid et ta magnifique épouse Maryame

A toi Fater, je dédie cette thèse car grâce à toi j'ai pu apprécier cette jolie ville dans mes rares moments de libre

Je remercie toutes les personnes rencontrées au cours de ces dernières années, qui, sans avoir participé directement à ce travail, ont ensoleillé les longues journées au labo !

Je ne sais comment exprimer tous mes remerciements vers l'homme qui a su par toutes ses attentions, sa tendresse, et sa patience m'apporter la force de finaliser mon projet et donner un sens profond à ma vie

A Emmanuel

Sommaire

PREMIERE PARTIE : Exposé bibliographique

Chapitre I : La Peau

1. Epiderme	10
1.1. Kératinocytes	11
1.2. Mélanocytes	11
1.3. Cellules Langerhans	12
1.4. Cellules de Merkel	12
2. Derme	12
3. Hypoderme	13
4. Membrane basale	14
4.1. Généralité	14
4.2. Formation de la membrane basale	15
4.3. Membrane basale épidermique	17
4.3.1. Structure	17
4.3.1.1. Hémidésmosomes	17
4.3.1.1.1. Structure et fonction.....	17
4.3.1.1.2. Nidogènes	18
4.3.1.1.2.1. Nidogène-1	18
4.3.1.1.2.2. Nidogène-2	19
4.3.1.1.2.3. Fonctions	19
4.3.1.1.3. Perlécane.....	19
4.3.1.2. Lamina lucida.....	20
4.3.1.3. Lamina densa	20
4.3.1.4. Zone fibrillaire	21
4.3.2. Composition	21
4.3.2.1. Collagènes.....	21
4.3.2.1.1. Structure.....	21
4.3.2.1.2. Biosynthèse du collagène	22
4.3.2.1.3. Collagènes fibrillaires	23
4.3.2.1.4. Collagènes non fibrillaires.....	23
4.3.2.1.4.1. Collagène IV.....	23
4.3.2.1.4.2. Collagène XVII	27
4.3.2.1.4.3. Collagène VII.....	28
4.3.2.2. Laminines.....	30

4.3.2.2.1. Isoformes et distribution	30
4.3.2.2.2. Ligands et fonctions.....	34
4.3.2.2.3. Laminines dans les modèles de souris	36
4.3.2.2.4. Laminines dans l'épiderme.....	38
4.3.2.2.5. Laminines dans les tumeurs.....	41
4.3.2.3. Intégrines.....	42
4.3.2.3.1. Structure et fonctions	42
4.3.2.3.2. Intégrines dans l'épiderme.....	46
4.3.2.3.3. Intégrines dans les kératinocytes	47
4.3.2.3.3.1. <i>Expression dans les kératinocytes</i>	47
4.3.2.3.3.2. <i>Rôle dans l'adhésion et la migration</i>	49
4.3.2.3.3.3. <i>Rôle dans la différenciation et l'apoptose</i>	51
4.3.2.3.3.4. <i>Rôle dans l'hyperprolifération et l'inflammation</i>	52
4.3.2.3.4. Intégrines dans le cancer épithélial.....	53
4.3.2.3.5. Intégrines dans l'angiogenèse.....	55
4.4. Epidermolyse bulleuse	58
4.4.1. Type simple.....	58
4.4.2. Type jonctionnelle.....	59
4.4.3. Type dystrophique.....	59
5. Métalloprotéinases.....	60
5.1. Structure et fonctions.....	60
5.2. Classification.....	61
5.2.1. Collagénases.....	61
5.2.2. Gélatinases	62
5.2.3. Stromélysines	64
5.2.4. Matrilysines.....	65
5.2.5. Métalloprotéinases de type transmembranaire	65
5.3. Inhibiteurs de métalloprotéinases	67
6. Cicatrisation	68
6.1. Hémostase	69
6.2. Inflammation	69
6.3. Prolifération	69
6.3.1. Granulation.....	69
6.3.2. Contraction.....	70
6.3.3. Réépithélialisation.....	70
6.3.3.1. Rôle des intégrines et protéines de la MEC.....	71
6.3.3.2. Rôle des métalloprotéinases.....	72
6.3.3.3. Rôle des facteurs de croissance	74
7. Rayonnement solaire	77
7.1. Introduction	77
7.2. Effets des UV sur la peau	78
7.3. Principaux acteurs de la réponse aux UV	80
7.3.1. Dommages de l'ADN induits par les UV	80

7.4. Espèces réactives de l'oxygène et réponse aux UV	82
7.4.1. Introduction	82
7.4.2. Production physiologique des radicaux libres dans l'organisme et en réponse aux UV	84
7.4.3. Rôle des ROS dans la réponse cellulaire aux UV	85
7.4.3.1. Effets oxydatifs des ROS	85
7.4.3.2. ROS comme second messenger	85
7.5. Facteurs de croissance et leurs récepteurs dans la réponse cellulaire aux UV	86
7.6. Système immunitaire et UV	86
7.7. Réparation de l'ADN	88
7.7.1. Systèmes de réparation de l'ADN	88
7.7.1.1. Réparation par excision de base (BER)	88
7.7.1.2. Réparation des mésappariements (MMR)	89
7.7.1.3. Réparation des cassures double brin (DSBR)	89
7.7.1.4. Réparation par excision de nucléotides (NER)	89
7.7.1.4.1. Réparation globale du génome (GGR)	90
7.7.1.4.2. Réparation couplée à la transcription (TCR)	90
7.7.2. Importance physiopathologique des systèmes de réparation	92
7.7.2.1. Xeroderma pigmentosum (XP)	92
7.8. Apoptose	95
7.8.1. Généralité	95
7.8.2. Apoptose UV-induit	96
7.9. Photoprotection par adaptation naturelle	98
7.9.1. Pigmentation	98

Chapitre II : Le facteur de transcription HIF-1 α

1. Hypoxie, situation où intervient le facteur HIF-1	100
2. Structure de HIF-1	102
2.1. Isoformes de HIF-1 α	103
3. Régulation de HIF-1α	106
3.1. Régulation O ₂ dépendante	106
3.1.1. Hydroxylation	106
3.2. Régulation O ₂ indépendante	108
3.2.1. Acétylation	108
3.2.2. Phosphorylation	108
3.2.3. SUMOylation	109
3.2.4. S-nitrosation	110
3.3. Cofacteurs impliqués dans la régulation de HIF-1 α	112
3.4. Rôle des ROS dans l'activation de HIF-1 α	113

4. Rôle de HIF-1α dans la peau	116
4.1. HIF-1 α , cancer et angiogenèse tumorale	116
4.2. HIF-1 α et cicatrisation.....	119
4.3. HIF-1 α et molécules d'adhésion	120
4.3.1. HIF-1 α et intégrines.....	120
4.3.2. HIF-1 α et laminine-332	122
4.3.3. HIF-1 α , collagènes et d'autres molécules d'adhésions	122
4.4. HIF-1 α et métalloprotéinases.....	124

DEUXIEME PARTIE : Travaux personnels

Chapitre I : Introduction..... 125

1. Présentation générale	125
2. Résumé du premier article	126
3. Premier article : HIF-1 α régule l'expression des protéines de la réparation par excision de nucléotides dans les kératinocytes	128

Chapitre II : Matériels et Méthodes 142

1. Etudes in vitro sur les kératinocytes	142
1.1. Origine des prélèvements	142
1.2. Culture cellulaire.....	142
1.3. Transduction des kératinocytes	143
2. Constructions plasmidiques et lentivirales	143
2.1. Amplification des plasmides.....	144
2.1.1. Culture bactérienne	144
2.1.2. Transformation des bactéries	144
2.1.3. Amplification des clones et extraction plasmidique.....	144
2.1.4. Quantification et vérification	144
2.2. Production de vecteurs lentiviraux.....	145
3. Préparation des épidermes reconstruits	146
4. Etudes morphologiques.....	147
4.1. Histologie	147
4.2. Immunohistochimie.....	148
4.3. Immunofluorescence	148
5. Analyse par cytométrie en flux.....	149
6. Analyse des protéines par Western Blot.....	149
6.1. Préparation des échantillons	149

6.2. Migration sur gel de polyacrylamide	149
6.3. Transfert	150
6.4. Révélation.....	150
7. Caractérisation des lignées de souris transgéniques.....	150
7.1. Origine des lignées de souris	150
7.2. Croisement des lignées	150
7.2.1. KO inductible de HIF-1 α	150
7.2.2. KO constitutif de HIF-1 α	152
7.3. Génotypage	152
7.4. Test de cicatrisation	153

Chapitre III : Résultats..... 154

1. Etude du rôle de HIF-1α chez la souris	156
1.1. Génération des lignées de souris transgéniques	156
1.2. La souris K14-Cre/HIF-1 $\alpha^{\text{flox/flox}}$ développe des symptômes cutanés au fur et à mesure de son vieillissement.....	158
1.3. L'absence d'expression de HIF-1 α au niveau de l'épiderme entraîne chez la souris une diminution de la laminine-322 ainsi que de l'intégrine β 1.....	161
1.4. L'inactivation de HIF-1 α au niveau de l'épiderme entraîne chez la souris un retard de la cicatrisation.....	162
1.5. L'inactivation de HIF-1 α (induite par injection du tamoxifène) entraîne brusquement une mortalité chez les souris K14-CreER ^{T2} /HIF-1 $\alpha^{\text{flox/flox}}$	164
2. Etude du rôle de HIF-1α, <i>in vitro</i>, dans les cellules humaines	166
2.1. L'inhibition de HIF-1 α dans les kératinocytes humains entraîne une diminution d'expression de la laminine-332 ainsi que des intégrines qui lui sont liées	166
2.2. L'inhibition de HIF-1 α dans les kératinocytes humains conduit à l'incapacité de former des épidermes reconstruits (ER).....	171
2.3. L'inhibition de HIF-1 α aboutit à un arrêt du cycle cellulaire et à l'apoptose des kératinocytes.....	176

Chapitre IV : Discussion Générale et Perspectives

1. Rôle de HIF-1α dans la physiologie cutanée	179
1.1. Rôle de HIF-1 α dans la régulation des molécules d'adhésion	179
1.2. Rôle de HIF-1 α dans la cicatrisation.....	183

1.3. Rôle de HIF-1 α dans la régulation de l'homéostasie épidermique	184
2. Rôle de HIF-1 α dans la réponse aux UVB	185
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	189
ANNEXES.....	248

Chapitre I : La Peau

Chez l'homme, la peau est l'enveloppe protectrice du corps, c'est une barrière physique souple qui protège les tissus et les organes de la plupart des agressions extérieures. La peau comprend trois tissus principaux : épiderme, derme et hypoderme (Figure 1).

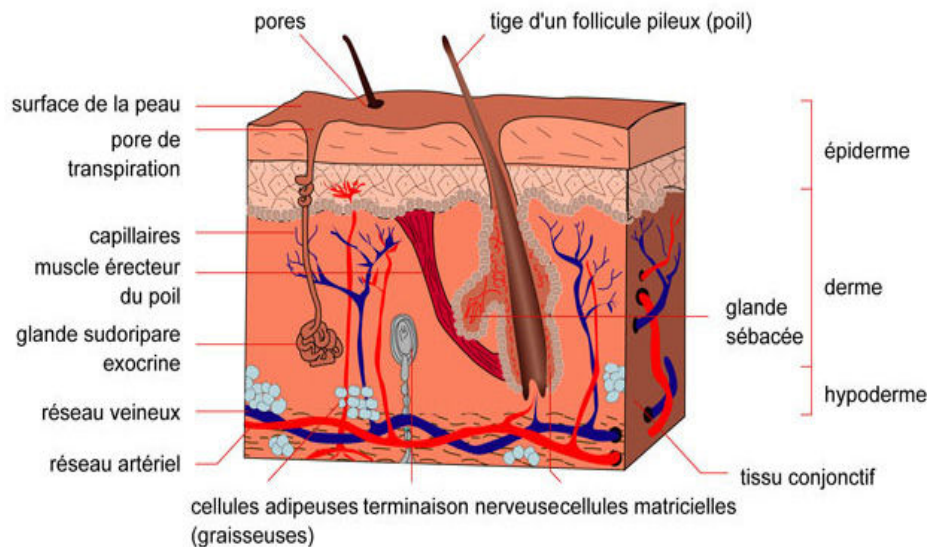


Figure 1. Coupe schématique de la peau

1. Epiderme

C'est la couche la plus superficielle et également la plus mince de la peau. Son épaisseur varie en fonction de la partie du corps recouverte, de 50 μm pour les paupières jusqu'à 1,5 mm pour la plante du pied. Bien qu'il soit riche en terminaisons nerveuses, l'épiderme n'est irrigué par aucun vaisseau sanguin. L'épiderme est un épithélium pavimenteux (les cellules de la couche superficielle sont plates), stratifié (composé de différentes couches), kératinisé (en raison de la synthèse d'une protéine particulière, la kératine). Cet épithélium est donc divisé sur des bases morphologiques en 4 couches superposées (Figure 2), qui sont, en partant de l'extérieur : la couche cornée (*stratum corneum*), la couche granuleuse (*stratum granulosum*), la couche épineuse (*stratum spinosum*) et la couche basale (*stratum basal*). Elles se différencient à partir des kératinocytes de la couche basale. Ceux-ci ont la capacité de se diviser afin de renouveler totalement l'épiderme tous les 25 à 50 jours. En plus des kératinocytes, trois autres catégories cellulaires composent

principalement l'épiderme : les mélanocytes, les cellules de Langerhans et les cellules Merkel (Figure 2).

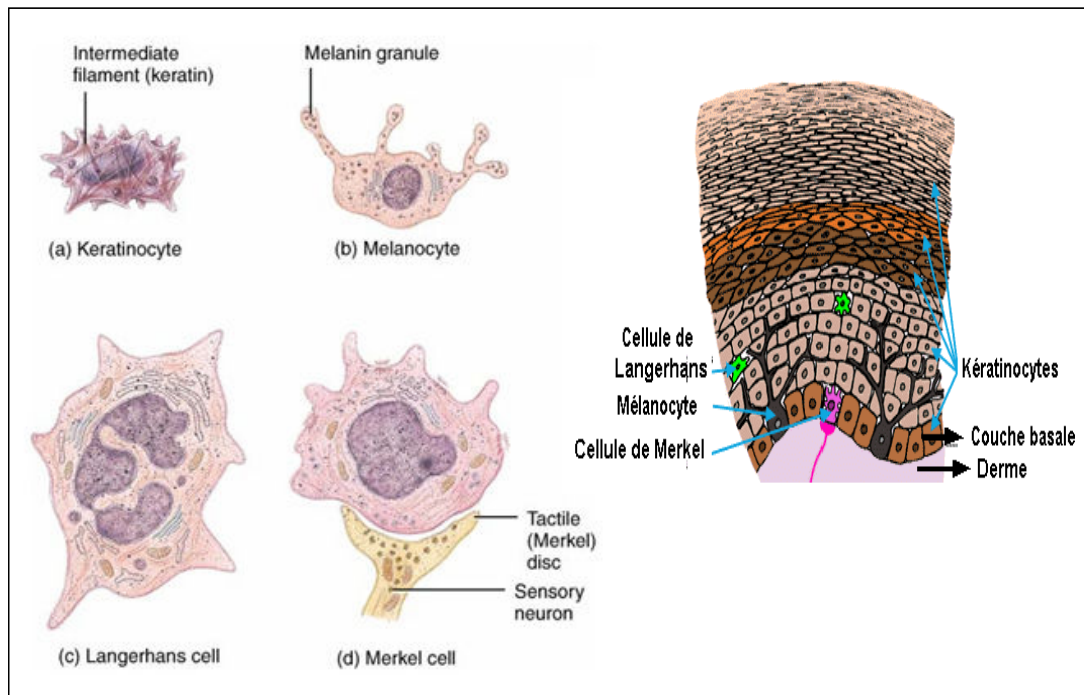


Figure 2. Structure de l'épiderme avec les différentes cellules

1.1. Kératinocytes

Ils constituent 90 % des cellules de l'épiderme. Ils synthétisent la kératine, une protéine fibreuse et insoluble dans l'eau, qui assure à la peau sa propriété d'imperméabilité et de protection extérieure. Après leur division, les kératinocytes basaux migrent vers la surface de l'épiderme. Plus ils s'en approchent, plus ils s'aplatissent, se kératinisent et finalement desquament. Ce processus de différenciation progressif donne naissance aux quatre couches de l'épiderme.

1.2. Mélanocytes

Ce sont les cellules qui pigmentent la peau. Ils sont présents surtout dans la couche basale dans de faibles proportions (5 à 10%). Ce sont des cellules dérivées de la crête neurale. Elles produisent un polymère stocké dans des organites spécifiques appelés mélanosomes. Ce polymère connu sous le nom de mélanine remplit comme fonction de pigmenter la peau afin

de la protéger du rayonnement solaire. Ce pigment foncé colore également les cheveux et l'iris de l'œil. L'accumulation locale de la mélanine et des mélanocytes aboutit à l'apparition de tâches de rousseur et de grains de beauté. Au sein d'une structure appelée unité épidermique de mélanisation, des mélanosomes sont transférés des mélanocytes vers les kératinocytes voisins.

1.3. Cellules de Langerhans

Situées dans la partie moyenne de l'épiderme (*stratum spinosum*), les cellules de Langerhans ne représentent que 2 à 8% des cellules épidermiques. Elles sont primordiales dans le système immunitaire de la peau. Ces cellules dendritiques sont produites dans la moelle osseuse d'où elles migrent, via la voie sanguine, afin de coloniser l'épiderme et de contribuer à l'activation des cellules du système immunitaire adaptatif. En effet, elles sont capables d'ingérer des particules étrangères et des micro-organismes, et de présenter leurs déterminants antigéniques aux lymphocytes T afin d'initier la réponse immunitaire spécifique. Pour cela, elles peuvent migrer de l'épiderme aux ganglions lymphatiques de drainage, dans le compartiment cutané considéré.

1.4. Cellules de Merkel

Ce sont des cellules neuroendocrines présentes en petite quantité dans la couche basale (1%). Elles sont distribuées de façon irrégulière à la surface corporelle (isolées ou regroupées en amas). Une des principales caractéristiques de ces cellules est leur richesse en granules neurosécrétoires. Le nombre de molécules contenues dans ces granules donne la capacité aux cellules de Merkel de communiquer avec de nombreux types cellulaires en plus des neurones, ce qui leur vaut l'attribution du titre de "cellule neuroendocrine".

2. Derme

Le derme est une enveloppe résistante et souple qui donne à la peau la majeure partie de ses propriétés biomécaniques. Tout comme l'épiderme, son épaisseur est variable selon son emplacement sur le corps (très épais à la paume des mains et la plante de pieds, et très mince sur les paupières). En revanche, il est en moyenne quatre fois plus épais que l'épiderme. Le

derme est fortement vascularisé et joue un rôle dans le contrôle de la température du corps par le contrôle de la dilatation ou la constriction des vaisseaux. Il est riche en fibres conjonctives de collagène qui assure soutien, extensibilité et résistance à la peau. Ces fibres sont très abondantes dans la peau cicatricielle. Sont également présentes des fibres d'élastine, plus fines, responsables de l'élasticité et de la souplesse de la peau saine. Ces fibres sont pratiquement inexistantes dans le tissu cicatriciel. Ces deux types de fibres, produites par les cellules résidentes principales du derme, les fibroblastes, se raréfient progressivement au cours du vieillissement. Morphologiquement, le derme est constitué par deux zones de tissu conjonctif dense :

- La zone papillaire ou adventitielle : c'est la couche située sous la membrane basale de l'épiderme et des annexes épidermiques, dans lesquelles sont présents les récepteurs de la douleur (les terminaisons nerveuses libres) et les récepteurs du toucher (les corpuscules lamellaires de Meissner). Certaines régions comme les extrémités des doigts, la paume de la main et la plante des pieds sont parsemées de petites projections papillaires du derme qui confèrent à la surface externe de la peau un relief accidenté fait de crêtes et de sillons.
- La zone réticulaire: C'est la couche la plus profonde du derme. Elle contient des vaisseaux sanguins, des glandes sudoripares et sébacées, des récepteurs de pression (les corpuscules de Pacini) et de nombreuses cellules phagocytaires qui empêchent la pénétration bactérienne. On y trouve aussi des fibres de collagène qui confèrent à la peau sa résistance et son hydratation, et des fibres élastiques qui lui confèrent son élasticité.

3. Hypoderme

C'est un tissu conjonctif lâche richement vascularisé qui contient selon les endroits plus ou moins de tissu adipeux divisé en lobules graisseux par de fines membranes conjonctives. C'est à ce niveau que se trouvent les fibres nerveuses et les racines des poils, de même que les glandes sébacées et sudoripares. Il sert d'interface entre le derme et les structures mobiles situées en dessous comme les muscles et les tendons. Il protège également l'organisme des chocs physiques, des variations de température et sert de réserve adipeuse. Il a une épaisseur variable selon les localisations (mince au front et épais au niveau des zones devant supporter un impact telles que les fesses ou les talons). Il représente 15 à 30% du poids corporel.

4. Membrane basale

4.1. Généralité

La membrane basale est une matrice extracellulaire particulière que l'on trouve à l'interface entre un épithélium ou un endothélium et un autre tissu. Elle mesure de 50 à 100 nm. Elle est composée principalement de laminines, de collagène IV, de nidogènes, et de perlécane (heparan protéoglycane sulfate ou HPSG). Mais on peut également y trouver de l'agrine (un autre HPSG), du SPARC (composant ubiquitaire de la matrice extracellulaire), de la fibuline et de la fibronectine. Dans cette membrane, on peut également distinguer une zone riche en collagènes tels que les collagènes XV, XVIII ainsi que le collagène XIX riche en cystéine (Myers *et al.*, 1996 ; Myers *et al.*, 1997 ; Saarela *et al.*, 1998 ; Tomono *et al.*, 2002). Trois caractères essentiels distinguent cette matrice:

- Les composants présents dans la membrane basale sont pratiquement identiques dans tous les organismes chez les vertébrés.
- Le collagène IV et la laminine-1 sont polymérisés séparément dans des réseaux avec de fines ramifications.
- Des études ont démontré que le nidogène-1 forme des complexes ternaires soit avec la laminine et le collagène soit avec la perlécane et la fibuline, ce qui suggère que les nidogènes jouent un rôle central dans l'intégration de la membrane basale (Adam *et al.*, 1997 ; Battaglia *et al.*, 1992 ; Fox *et al.*, 1991).

Les membranes basales ont diverses fonctions structurelles dans le renforcement et la délimitation des tissus et servent de barrière sélective. En outre, elles jouent un rôle fondamental dans la différenciation, la migration, la prolifération et la survie cellulaire en activant les voies de signalisation par des interactions avec des récepteurs transmembranaires et en servant de réservoir pour des facteurs de croissance et des cytokines (Iozzo, 2005). L'importance de ce rôle a été révélée au cours de certaines maladies génétiques caractérisées par des membranes basales structurellement défectueuses (Hudson *et al.*, 1993). Parmi ces maladies, les plus connues sont le syndrome d'Alport et le syndrome de Knobloch qui ont été associés respectivement à des mutations du collagène IV (chaîne $\alpha 5$) et du collagène XVIII (chaîne $\alpha 1$) (Barker *et al.*, 1990 ; Hudson *et al.*, 1992 ; Cosgrove *et al.*, 1996 ; Kalluri *et al.*, 1997).

4.2. Formation de la membrane basale

La formation de la membrane basale est initiée par l'auto-assemblage intermoléculaire de la laminine et du collagène afin de former des structures semblables à des échafaudages (Yurchenco *et al.*, 2002). Ensuite, ces échafaudages constitués indépendamment interagissent les uns avec les autres. Les interactions entre les réseaux du collagène IV et de la laminine sont, cependant, facilitées par le nidogène (Aumailley *et al.*, 1993 ; Aumailley *et al.*, 1989). Des études ont montré que la laminine forme des polymères à la surface des cellules à l'aide de récepteurs tels que la $\beta 1$ intégrine et le dystroglycane (Aumailley *et al.*, 2000 ; Sasaki *et al.*, 1998 ; Utani *et al.*, 1995). On peut notamment remarquer que lors d'expériences *in vitro*, les corps embryoides manquant d'intégrine $\beta 1$ ou de dystroglycane déposent une quantité plus réduite de la laminine, que les cellules témoins (Aumailley *et al.*, 2000 ; Andac *et al.*, 1999 ; Talts *et al.*, 1999). Bien que sa synthèse soit normale, le collagène IV est incapable de se regrouper dans la membrane basale en l'absence de laminine (Yurchenco *et al.*, 2002 ; Aumailley *et al.*, 2000).

Les récepteurs de la surface cellulaire tels que les intégrines (en particulier $\beta 1$) ou les dystroglycanes facilitent donc le dépôt initial de polymères de laminines. Ces derniers se lient ensuite à des polymères de collagène IV sur la surface cellulaire via l'intervention du nidogène (Willem *et al.*, 2002). Toutes ces interactions sont nécessaires à la génération d'une membrane basale fonctionnelle (Figure 3).

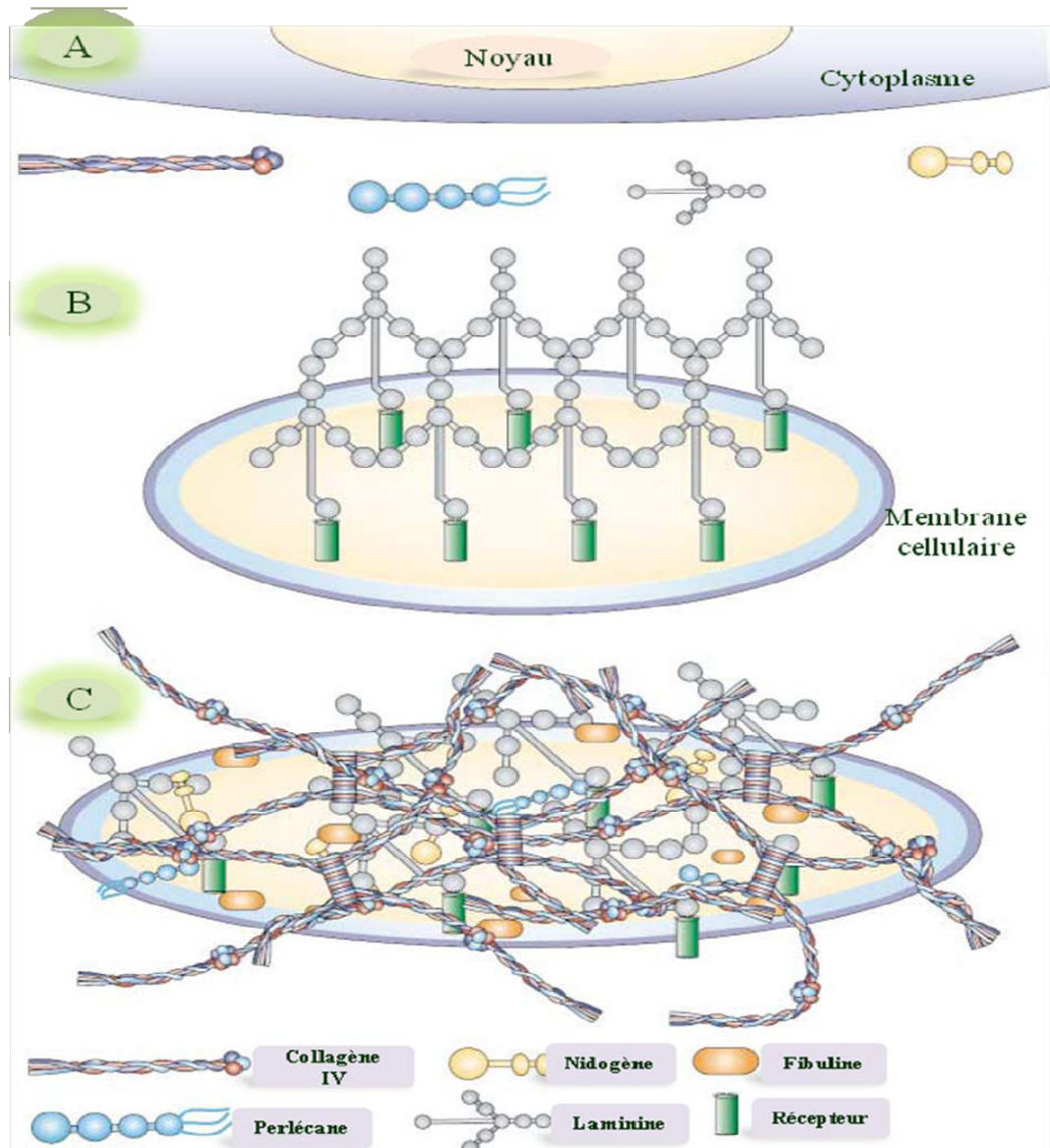


Figure 3. Schéma représentant la formation de la membrane basale (MB). A) Sécrétion de composants de la MB : collagène IV, laminine, nidogène et perlécane. B) Polymérisation de la laminine et interaction avec la surface cellulaire via intégrines et dystroglycannes. C) Assemblage de la MB.

4.3. Membrane basale épidermique

4.3.1. Structure

Dans la peau, la membrane basale forme la jonction dermo-épidermique, assurant la séparation entre l'épiderme et le derme tout en offrant une interface adhésive et dynamique. Elle peut être divisée en 4 zones, en allant de l'épiderme vers le derme : les hémidesmosomes, la lamina lucida, la lamina densa et la zone fibrillaire.

4.3.1.1. Hémidesmosomes

4.3.1.1.1. Structure et fonction

Les hémidesmosomes (HD) sont des complexes multiprotéiques spécialisés dans l'adhésion des cellules basales à la membrane basale que ce soit dans les épithéliums simples ou complexes (Margadant *et al.*, 2008). En se basant sur leurs composants, on distingue deux types de HD :

Le type I (classique) qui se trouve dans les épithéliums stratifiés, par exemple la peau, se compose de l'intégrine $\alpha 6\beta 4$, de plectine, et de deux antigènes de la pemphigoïde bulleuse (BP) [l'antigène 180 (également appelé BPAG2 ou collagène de type XVII) et l'antigène 230 (BPAG1)] (Litjens *et al.*, 2006 ; Wilhelmsen *et al.*, 2006) (Figure 4). La stabilisation intracellulaire des HD se fait par l'association de plectine et de BP230 avec des filaments intermédiaires de kératine, créant ainsi un ancrage stable (Litjens *et al.*, 2006 ; Wilhelmsen *et al.*, 2006 ; Tasanen *et al.*, 2004). L'importance des HD dans le maintien de l'intégrité épithéliale est illustrée par plusieurs données :

- L'ablation des gènes codant pour l'intégrine $\alpha 6$, l'intégrine $\beta 4$ ou la plectine entraîne, chez la souris, l'apparition de bulles sur la peau, causant la mort néonatale. En revanche, les souris knockout BP180 ou BP230 présentent des lésions érosives bénignes (Litjens *et al.*, 2006 ; Wilhelmsen *et al.*, 2006).
- Chez l'homme, les patients porteurs de mutations dans l'un des composants des HD souffrent de maladies de gravité variable connues sous le nom d'épidermolyse bulleuse. La gravité de ces maladies dépend de la nature des mutations, de leur localisation et leur conséquence sur l'expression de l'ARNm et des protéines (Pulkkinen et Uitto, 1999 ; Pfindner *et al.*, 2005).

Le type II se trouve dans les épithéliums simples de l'intestin, par exemple, et se compose d'intégrine $\alpha 6 \beta 4$ et de plectine.

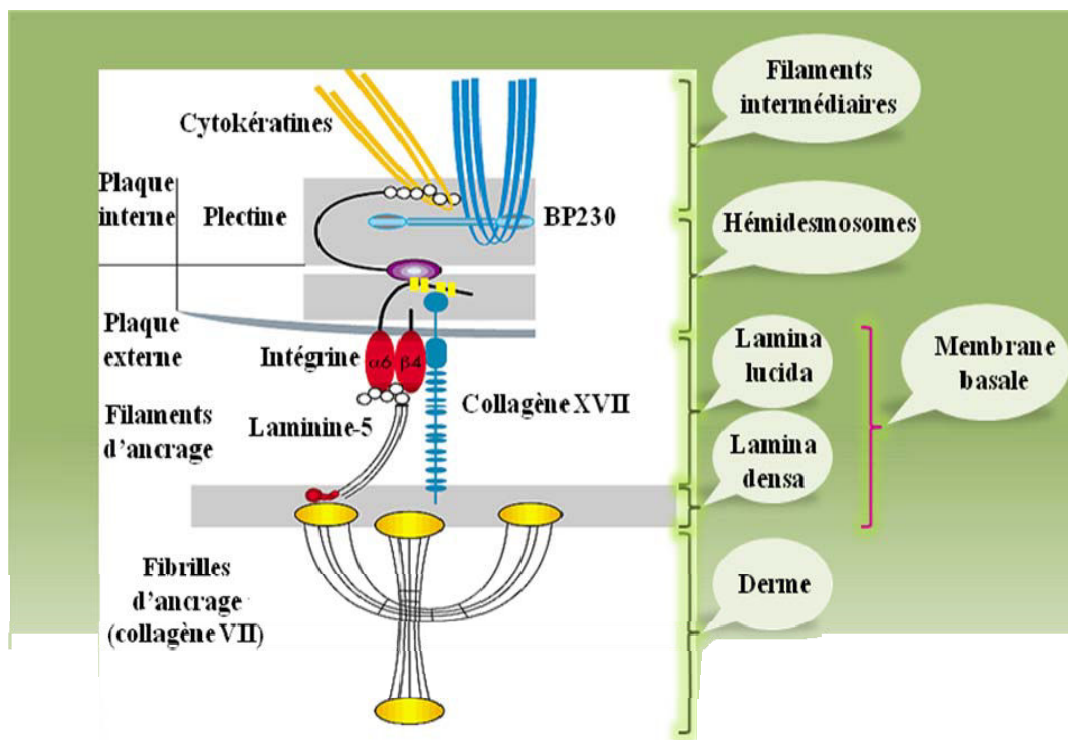


Figure 4. Représentation schématique de l'organisation des complexes hémidesmosomes-filaments.

4.3.1.1.2. Nidogènes

La famille des nidogènes est composée de deux isoformes, le nidogène-1 et le nidogène-2.

4.3.1.1.2.1. Nidogène-1

C'est une glycoprotéine sulfate exprimée de façon ubiquitaire par toutes les membranes basales. Elle comprend trois domaines globulaires reliés par des segments de forme allongée (Fox *et al.*, 1991 ; Kohfeldt *et al.*, 1998). Deux domaines globulaires (G1, G2), séparés par un petit site de liaison, sont situés dans la région N-terminale et un domaine globulaire (G3) est situé dans la région C-terminale. Le domaine G3 se lie fermement aux

laminines, tandis que le domaine G2 a une forte affinité avec le collagène IV et le perlécane, ce qui permet la formation de complexes ternaires entre les principales protéines de la membrane basale (Fox *et al.*, 1991 ; Mayer *et al.*, 1995 ; Hopf *et al.*, 1999).

4.3.1.1.2.2. Nidogène-2

L'expression de nidogène-2 est plus limitée, en particulier dans les membranes basales des muscles cardiaques et striés dans lesquelles il se présente en faible quantité. Son arrangement structural et sa capacité à former des complexes ternaires sont similaires à celui du nidogène-1 (Kohfeldt *et al.*, 1998 ; Salmivirta *et al.*, 2002). Il est impliqué dans l'adhésion cellulaire en liant les intégrines $\alpha3\beta1$ et $\alpha6\beta1$ (Salmivirta *et al.*, 2002).

4.3.1.1.2.3. Fonctions

Les fonctions de ces deux isoformes ont été révélées par plusieurs études utilisant des souris *knock-out* d'un ou de deux nidogènes. Les animaux *knock-out* en nidogène-1 ou nidogène-2 sont viables, fertiles et les membranes basales examinées sont intactes (Murshed *et al.*, 2000 ; Schymeinsky *et al.*, 2002). Seules les souris *knock-out* en nidogène-1 montrent des anomalies neurologiques (Dong *et al.*, 2002 ; Vasudevan *et al.*, 2009). Les souris manquant simultanément des deux isoformes meurent peu après la naissance consécutivement à des anomalies au niveau des poumons, du cœur et du développement des membres. Toutes ces anomalies sont directement liés à des défauts dans l'assemblage de la membrane basale (Bader *et al.*, 2005 ; Bose *et al.*, 2006). Paradoxalement, certains tissus montrent des structures normales au niveau de cette dernière : par exemple les reins (Bader *et al.*, 2005) et la peau (Mokkapatil *et al.*, 2008). On peut donc supposer que, *in vivo*, la membrane basale peut encore être formée sans le nidogène, indiquant le recrutement spécifique tissulaire de ce dernier.

4.3.1.1.3. Perlécane

Le perlécane, une protéine HPSG présente dans les membranes basales, est un des polypeptides à une seule chaîne les plus importants découvert chez les vertébrés et les invertébrés (Iozzo, 1998 ; Iozzo *et al.*, 1994). Il est constitué de cinq domaines liés à des molécules impliquées dans le métabolisme, la division et l'adhésion cellulaire. Ces molécules sont variées (intégrines, dystroglycanes, facteur de croissance FGF...) (Hopf *et al.*, 1999, 2001 ; Mongiat *et al.*, 2001). Ces données suggèrent que le perlécane est impliqué dans

l'assemblage de la membrane basale mais aussi dans l'adhésion cellulaire. Il est incorporé dans la membrane basale de la plupart des cellules endothéliales et épithéliales, mais peut aussi être associé à la surface cellulaire par des interactions de haute affinité avec les intégrines, notamment $\alpha 2\beta 1$ qui est le principal récepteur du collagène fibrillaire (Bix et Iozzo, 2005). En outre, le perlécane est exprimé dans les tissus avasculaires comme le cartilage (SundarRaj *et al.*, 1995 ; Melrose *et al.*, 2004 ; Govindraj *et al.*, 2002) et divers tissus conjonctifs de stroma (Iozzo et Murdoch, 1996). Il n'est donc pas surprenant que le perlécane soit impliqué dans un certain nombre de processus pathologiques, y compris l'athérosclérose, l'angiogenèse et le cancer (Nugent *et al.*, 2000 ; Tapanadechopone *et al.*, 2001 ; Jiang *et al.*, 2004).

Le phénotype des animaux dépourvus de perlécane est complexe et montre des malformations dans la circulation cardiaque et des anomalies dans le développement de l'artère coronaire (Costell *et al.*, 2002 ; Gonzalez-Iriarte *et al.*, 2003).

Chez l'homme, la mutation au niveau du perlécane aboutit à une maladie génétique létale (*Dyssegmental dysplasi Silverman-Handmaker/DDSH*). C'est une maladie autosomique récessive du squelette qui se caractérise par des vertèbres anormales et des membres courts.

4.3.1.2. Lamina lucida

Elle est traversée par des filaments d'ancrage riches en laminine-1, -5 et -6. Ces filaments forment un complexe d'adhésion continu avec les hémidesmosomes en se liant à la portion extracellulaire de l'intégrine $\alpha 6\beta 4$, à la surface des kératinocytes.

4.3.1.3. Lamina densa

La lamina densa est majoritairement constituée de collagène IV mais également de laminine-1, de nidogène et de protéoglycanes. Elle forme la zone d'ancrage des filaments issus de l'épiderme et des fibres issus de la zone fibrillaire.

4.3.1.4. Zone fibrillaire

La zone fibrillaire contient des fibres d'ancrages reliant la lamina densa de la membrane basale à des plaques d'ancrage dans le derme papillaire. Les fibres d'ancrage sont constituées de collagène de type VII (Burgeson, 1993).

4.3.2. Composition

4.3.2.1. Collagènes

4.3.2.1.1. Structure

Les collagènes sont des molécules trimériques de la matrice extracellulaire utilisées par les cellules afin d'assurer l'intégrité structurale. De récentes études offrent un éclairage sur les membres de la famille des collagènes, leurs structures, leurs fonctions et les maladies associées (Kadler *et al.*, 2007 ; Myllyharju et Kivirikko, 2001 ; Myllyharju et Kivirikko, 2004 ; Brodsky et Persikov, 2005 ; Gelse *et al.*, 2003 ; Ortega et Werb, 2002).

Les chaînes α enroulées ensemble forment une triple hélice afin de construire des molécules trimériques caractéristiques des collagènes. Les trois chaînes α qui forment cette hélice sont composées d'une séquence triplet d'acides aminés glycine-X-Y. X et Y peuvent être n'importe quel acide aminé, bien que X soit souvent de la proline et Y de l'hydroxyproline.

Les collagènes sont donc extrêmement riches en proline et en glycine, tous les deux sont importants dans la formation et la stabilité de l'hélice à trois brins. La proline, du fait de sa structure cyclique, favorise la formation de l'hélice gauche des chaînes α et stabilise la conformation de la triple hélice. Du fait de sa taille et de sa position centrale à l'intérieur de la triple hélice, la glycine permet un contact étroit entre les trois chaînes hélicoïdales afin de former la super-hélice finale. Dans chaque chaîne α , les régions des triples hélices sont traversées par des régions non collagéniques, appelées domaines NC. Ces domaines contiennent souvent des peptides qui se trouvent dans d'autres molécules de la matrice.

4.3.2.1.2. Biosynthèse du collagène

La synthèse du collagène s'effectue à partir d'un précurseur présent dans les cellules, le procollagène. Celui-ci est constitué de brins beaucoup plus longs, rallongés par des structures polypeptidiques supplémentaires qui portent le nom de propeptides. Le procollagène est un assemblage de 3 chaînes α en une hélice droite. Les trois chaînes de procollagène sont synthétisées et transférées dans le lumen du réticulum endoplasmique. La région contenant la triple hélice est flanquée d'un peptide signal et de deux propeptides (un amino-terminal et un carboxy-terminal) qui sont importants pour la maturation de la protéine. Le peptide signal est clivé et cette étape est suivie par plusieurs étapes d'hydroxylation et glycosylations à l'intérieur de la cellule. Les différentes modifications post-traductionnelles et la formation de ponts disulfure entre les propeptides carboxy-terminaux de trois chaînes permettent ensuite leur alignement. La triple hélice s'enroule alors comme une fermeture éclair, en direction de l'extrémité amino-terminale.

Enfin, le procollagène peptidase, clive alors les deux propeptides, permettant la formation de tropocollagène mature. En tout dernier lieu, les faisceaux de tropocollagène s'assemblent à proximité de la surface cellulaire, s'interconnectent et forment des fibres de collagène matures (Boot-Handford et Tuckwell, 2003) (Figure 5).

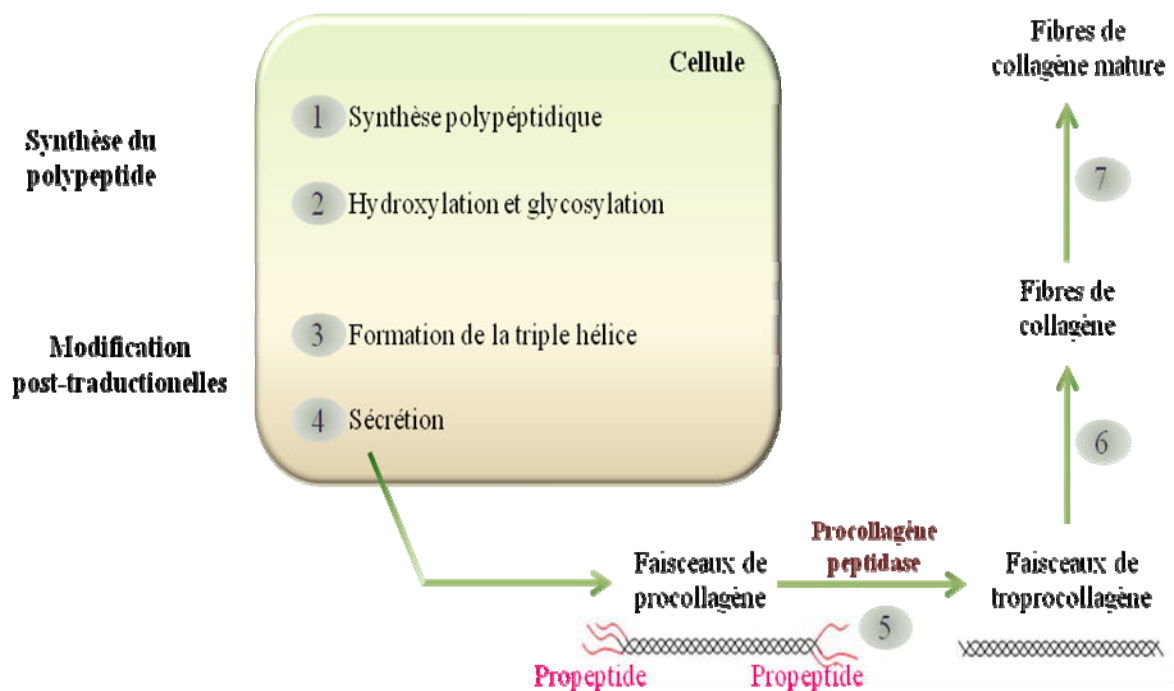


Figure 5. Schéma représentant la formation du collagène

Le génome humain contient au moins 43 chaînes α distinctes qui sont assemblées en 28 types de collagène (Myllyharju et Kivirikko, 2004 ; Veit *et al.*, 2007). Les collagènes sont divisés en deux sous-familles:

4.3.2.1.3. Collagènes fibrillaires

Cette sous-famille rassemble les collagènes I, II, III, V, XI, XXIV, XXVII qui sont capables de former des fibrilles, grâce à l'assemblage de différents trimères formés par les chaînes α . Après avoir été sécrétées dans l'espace extracellulaire, ces molécules de collagène s'assemblent en polymères. Les fibrilles de collagènes sont de fines structures (10 à 300 nm de diamètre) longues de plusieurs centaines de micromètres dans les tissus matures et sont clairement visibles sur les photographies en microscopie électronique. Les fibres de collagène que l'on peut observer en microscopie optique sont, en fait, l'agrégation de ces fibrilles en faisceaux plus larges (semblable à des câbles) de plusieurs micromètres de diamètre.

4.3.2.1.4. Collagènes non fibrillaires

Plusieurs groupes appartiennent à cette sous-famille:

- Les collagènes associés aux fibres ou FACITs (fibril-associated collagens with interrupted triple helices) : sont des collagènes non fibrillaires qui, en s'associant à des collagènes fibrillaires, permettent des interactions avec les autres protéines de la matrice extracellulaire. 8 membres font partie de ce groupe: collagènes VII, IX, XII, XIV, XVI, XIX, XXI et XXII.
- Les collagènes en réseaux sont les collagènes IV, VI, VIII et X et ne s'assemblent pas en fibrilles mais en réseaux.
- Les collagènes transmembranaires (XIII, XVII, XXIII, et XXV) sont insérés dans la membrane plasmique. Ils participent à la formation des sites d'interaction entre la cellule et la matrice extracellulaire tels que les hémidesmosomes ou les plaques focales d'adhésion.

4.3.2.1.4.1. Collagène IV

Le collagène IV est une protéine trimérique, autrement connu sous le nom de « collagène de la membrane basale ». En effet, le collagène IV n'est produit qu'au niveau de la membrane basale ce qui le distingue des autres collagènes. Il est également appelé « réseau de collagènes » en raison de sa capacité à s'auto-assembler dans des réseaux organisés, ce qui

le différencie des collagènes fibrillaires (types I, II et III). Il existe six chaînes α de $\alpha 1(\text{IV})$ à $\alpha 6(\text{IV})$ qui peuvent être utilisées pour créer les trimères du collagène IV (Hudson *et al.*, 1993 ; Khoshnoodi *et al.*, 2008). Malgré l'existence de 6 chaînes α différentes, et donc de nombreuses combinaisons potentielles, on constate qu'elles ne forment que trois hétérotrimères distincts ($\alpha 1\alpha 1\alpha 2$, $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ et $\alpha 5\alpha 5\alpha 6$). Les chaînes $\alpha 1(\text{IV})$ et $\alpha 2(\text{IV})$, appelées chaînes classiques car ayant été les premières découvertes, sont présentes dans la membrane basale de tous les tissus. A l'inverse, les quatre autres chaînes ont une distribution tissulaire limitée dans la membrane basale. Par exemple, les chaînes $\alpha 3(\text{IV})$, $\alpha 4(\text{IV})$ et $\alpha 5(\text{IV})$ sont présentes dans la membrane basale glomérulaire des reins, des poumons, des testicules, et des yeux. Les chaînes $\alpha 5(\text{IV})$ et $\alpha 6(\text{IV})$, quant à elles, se trouvent dans la membrane basale de la peau, des muscles lisses et des reins. L'expression des chaînes du collagène IV est également soumise à une régulation temporelle. Par exemple, dans la membrane basale glomérulaire du rein humain, les gènes codant pour les chaînes $\alpha 1(\text{IV})$ et $\alpha 2(\text{IV})$ sont exprimées au cours du développement embryonnaire précoce (jusqu'aux 75 jours), puis leur niveau d'expression baisse progressivement. Cette régulation de l'expression est essentielle à la maturation de la membrane en tant que barrière de filtration spécialisée du rein. Par conséquent, la plupart des mutations identifiées dans les gènes codant soit pour $\alpha 1(\text{IV})$ soit pour $\alpha 2(\text{IV})$ sont létales à l'état embryonnaire.

Chez les mammifères, la famille des collagène IV comprend six chaînes α hautement homologues, mais génétiquement distinctes (Figure 6). Chaque chaîne contient trois domaines structurellement distincts, un domaine N-terminal riche en cystéine et en lysine, un domaine répété Gly-X-Y de 1.400 résidus et enfin un domaine C-terminal (NC1/non collagenous) de 230 résidus (Hudson *et al.*, 2003). La présence dans le domaine N-terminal de résidus riches en cystéine et en lysine est essentielle pour la réticulation interchaîne de quatre triple hélices via des ponts disulfure et des jonctions lysine-hydroxylysine. Une autre caractéristique du collagène IV est la présence de 21 à 26 interruptions dans le domaine tripeptide répété Gly-X-Y. Ces interruptions servent, d'une part, à la flexibilité moléculaire des réseaux du collagène, et d'autre part, à la liaison cellulaire et à la réticulation interchaîne (Vandenberg *et al.*, 1991). Les domaines NC1 sont les sites de reconnaissance moléculaire dans lesquels l'assemblage de triples hélices est initié. Une fois sécrétées dans la matrice extracellulaire (MEC), les triples hélices s'auto-assemblent pour former des réseaux distincts constituant un échafaudage moléculaire qui permet la liaison avec d'autres composants de MEC tels que les laminines, les

perlécane et les nidogènes pouvant se lier et ainsi former l'assemblage de la membrane basale.

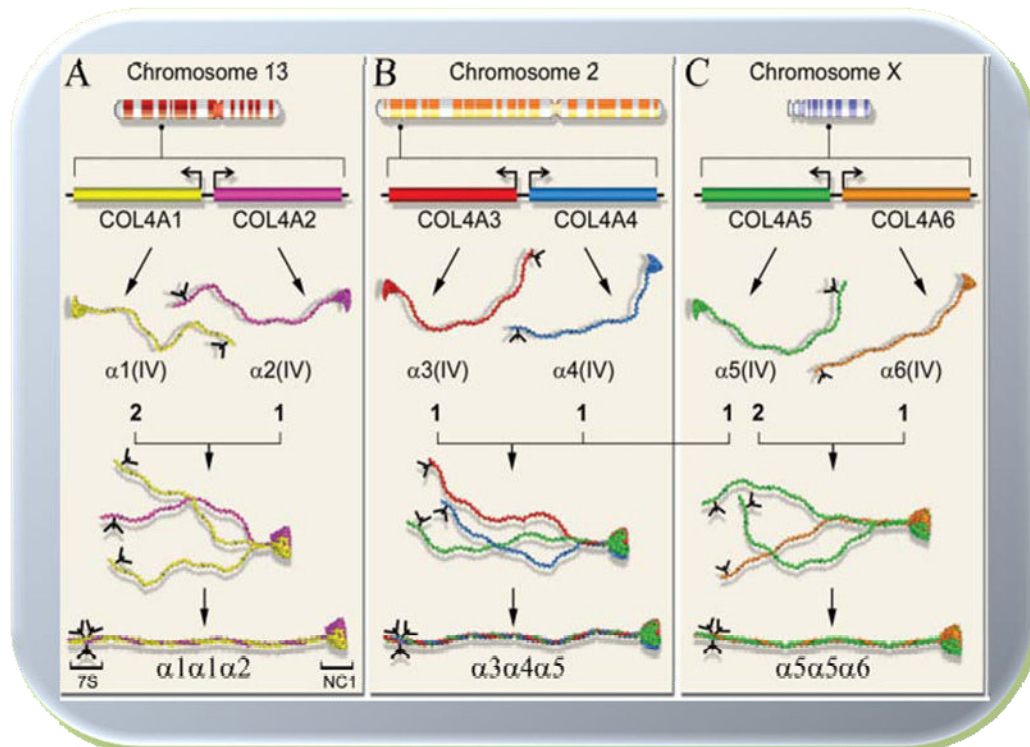


Figure 6. Schéma montrant l'origine de différentes chaînes de collagène IV. (A) Les gènes, COL4A1/COL4A2 présents sur le chromosome 13, (B) COL4A3/COL4A4 sur le chromosome 2, et (C) COL4A5/COL4A6 sur le chromosome X. Ces gènes sont organisés en paires (tête-à-tête) et séparés par une région promotrice courte que les deux gènes partagent. Les gènes jumelés sont transcrits de façon bidirectionnelle et traduits en chaînes α . Chaque chaîne commence par un domaine N-terminal (7S), un domaine collagénique long, et un domaine C-terminal non collagénique (NC1). L'assemblage des isoformes commence par la formation de trimères dans le domaine NC-1, suivi par un superenroulement de triples hélices continuant jusqu'au domaine 7S. Ainsi les trois isoformes $\alpha1\alpha1\alpha2$, $\alpha3\alpha4\alpha5$, et $\alpha5\alpha5\alpha6$ sont formées.

➤ Les récepteurs du collagène IV:

En plus de son rôle dans la formation en échafaudage qui assure la stabilité mécanique de la membrane basale, le collagène IV est un élément important dans l'interaction des cellules avec la membrane basale. Cette interaction est essentielle pour une variété de processus biologiques, y compris l'adhésion, la migration, la survie, la prolifération et la différenciation cellulaire. Des études, *in vitro*, ont montré que le collagène IV sert de substrat de fixation pour un grand nombre de types cellulaires, y compris pour les plaquettes (Santoro, 1986 ; Staatz *et al.*, 1990), les hépatocytes (Rubin *et al.*, 1981), les kératinocytes (Murray *et al.*, 1979), les cellules endothéliales (Cheng and Kramer, 1989 ; Herbst *et al.*, 1988), les cellules mésangiales (Setty *et al.*, 1998) et les cellules du pancréas (Kaido *et al.*, 2004). Il sert également de substrat pour les cellules tumorales, telles que les cellules cancéreuses du sein et de la prostate (Abecassis *et al.*, 1987 ; Dedhar *et al.*, 1993), du mélanome (Chelberg *et al.*, 1989), du fibrosarcome et du gliome (Aumailley et Timpl, 1986 ; Knight *et al.*, 2000). L'attachement de ces cellules au collagène est réalisé par des récepteurs, principalement les intégrines mais aussi d'autres récepteurs nommés les non-intégrines.

- Les intégrines: on peut les diviser en deux groupes: celles qui sont liées à la triple hélice et celles que sont liées au domaine NC-1. Les récepteurs principaux du collagène incluent le sous-groupe d'intégrine $\beta 1$ comprenant $\alpha 1\beta 1$ et $\alpha 2\beta 1$ (Leitinger et Hohenester, 2007). Le site majeur de liaison avec les intégrines $\alpha 1\beta 1$ et $\alpha 2\beta 1$ a été identifié comme un fragment de la triple hélice nommé CB3 (*cyanogen bromide-derived*) et situé à 100 nm du N-terminal du collagène (Vandenberg *et al.*, 1991). En plus de ces deux intégrines, les cellules peuvent également s'attacher au collagène IV en impliquant d'autres intégrines telles que $\alpha 3\beta 1$.

Les domaines NC1 peuvent aussi se lier aux intégrines : NC1 de la chaîne $\alpha 1$ se lie à l'intégrine $\alpha 1\beta 1$, tandis que NC1 de la chaîne $\alpha 2$ se lie aux intégrines $\alpha \nu\beta 3$, $\alpha \nu\beta 5$, et $\alpha 3\beta 1$ et NC1 de la chaîne $\alpha 3$ et $\alpha 6$ se lient à l'intégrine $\alpha \nu\beta 3$. D'autres résultats ont été obtenus en utilisant des cellules de mélanomes et de cancer de l'ovaire prouvant que le domaine NC1 de la chaîne $\alpha 2$ interagit avec les intégrines $\alpha 1\beta 1$ et $\alpha \nu\beta 3$ (Roth *et al.*, 2005). Le domaine NC1 de la chaîne $\alpha 3$ interagit directement avec les intégrines $\alpha \nu\beta 3$ et $\alpha \nu\beta 5$ (Pedchenko *et al.*, 2004) (Figure 7).

- Les récepteurs non-intégrines: on distingue plusieurs familles dans ces récepteurs telles que les protéoglycanes à sulfate d'héparine (*heparin sulfate proteoglycans*), la glycoprotéine VI et la famille des récepteurs du mannose (Leitinger and Hohenester, 2007).

➤ Maladies liées à des anomalies du collagène IV:

Les deux principaux exemples dans lesquels le collagène IV est directement impliquée dans des pathologies sont le syndrome d'Alport et le syndrome de Goodpasture. Ces maladies génétiques se produisent suite à l'absence d'une seule chaîne de collagène IV (Khoshnoodi *et al.*, 2008).

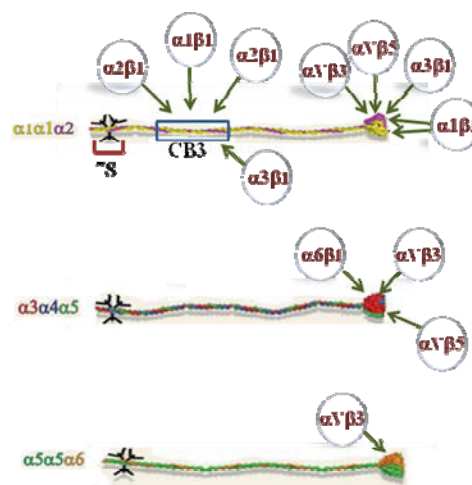


Figure 7. Sites du collagène IV liant les intégrines

4.3.2.1.4.2. Collagène XVII

C'est un composant structural des hémidesmosomes réglant l'adhésion des kératinocytes épidermiques et d'autres cellules épithéliales, à la membrane basale. Son extrémité N-terminale est incorporée dans la plaque hémidesmosomale, alors que le domaine extracellulaire est localisé dans la région des filaments d'ancrage de la membrane basale. Le collagène XVII codé par le gène COL17A1 est un homotrimère de trois chaînes $\alpha 1$ (180 kDa) avec un domaine N-terminal intracellulaire de 466 aa, un domaine transmembranaire court de 23 aa et un domaine C-terminal extracellulaire de 1008 aa de long (Giudice *et al.*, 1992). Il interagit avec deux types des ligands : les ligands extracellulaires comprenant l'intégrine $\alpha 6$ et la laminine-5 (Hopkinson *et al.*, 1995), et les ligands intracellulaires comprenant l'intégrine $\beta 4$, la plectine et le BP230 dans la plaque hémidesmosomale (Koster *et al.*, 2003). Étant

donné que d'autres partenaires liant cette protéine restent encore inconnus, il est clair que le collagène XVII est impliqué dans le maintien de l'adhésion des cellules épithéliales par des interactions multiples protéine-protéine. Le rôle de BP180 est démontré par le biais de maladies génétiques et acquises de la peau dans lesquelles l'absence ou la perte des fonctions du collagène XVII conduit à une diminution de l'adhésion épidermique et à l'apparition de cloques sur la peau (McGrath *et al.*, 1995 ; Floeth *et al.*, 1998 ; Schumann *et al.*, 1997 ; Schumann *et al.*, 2000).

4.3.2.1.4.3. Collagène VII

C'est la composante principale des fibres d'ancrage qui lient la lame basale et les fibres de collagène dermiques (Bruckner-Tuderman, 2009 ; Uitto, 2008 ; Aumailley *et al.*, 2006 ; Uitto et Pulkkinen, 1996). Le gène codant pour cette protéine est COL7A1 situé sur le chromosome 3p21 (Ryynanen *et al.*, 1991). Le procollagène VII est un homotrimère composé de trois chaînes pro $\alpha 1$ (VII). Chaque chaîne polypeptidique (VII) pro $\alpha 1$ contient une triple hélice centrale de 145 kDa accolée à deux domaines non collagéniques, un N-terminal de 145 kDa (NC domaine-1) et un C-terminal de 30 kDa (NC-2) (Christiano *et al.*, 1994). Par la suite, le collagène VII mature subit plusieurs étapes de polymérisation pour former des fibrilles d'ancrage (Burgeson, 1993).

En effet, des mutations dans le gène du collagène VII, COL7A1, provoquent l'épidermolyse bulleuse dystrophique (EBD) (Fine *et al.*, 2008). EBD est une affection cutanée héréditaire caractérisée par la fragilité mécanique de la peau et des muqueuses. A ce jour plus de 400 mutations différentes du gène COL7A1 sont connues possédant un large éventail de présentations cliniques (Fine *et al.*, 2008). Plusieurs stratégies thérapeutiques ont été tentées afin d'améliorer la quantité du collagène VII dans les cellules pour augmenter la production des fibrilles d'ancrage fonctionnelle. Une de ces stratégies a été réalisée par la transduction des kératinocytes et/ou des fibroblastes avec l'ADNc de la forme sauvage du collagène VII en utilisant les rétrovirus ou les vecteurs lentiviraux (Baldeschi *et al.*, 2003 ; Gache *et al.*, 2004 ; Mavilio *et al.*, 2006). Récemment, une étude amenée par Anja et son groupe a montré la possibilité de sauvegarder l'expression de collagène VII en recombinant ses deux formes, sauvage (WT) et mutée, qui forment des triples hélices hétérotrimériques. De façon intéressante, la surexpression contrôlée de la forme WT du collagène VII améliore

progressivement la stabilité thermique du collectif des molécules du collagène VII (Fritsch *et al.*, 2009).

4.3.2.2. Laminines

Les laminines sont des molécules d'adhésion essentiellement situées dans la membrane basale qui sont des glycoprotéines hétérotrimériques α , β et γ . Ces molécules de grande taille sont vitales pour de nombreuses fonctions physiologiques. Elles sont essentielles pour le développement embryonnaire précoce, l'organogenèse et d'autres fonctions dans plusieurs tissus, dont les muscles, les nerfs, la peau, les reins, les poumons et le système vasculaire. On dénombre actuellement plus de 12 isoformes de laminine. Les différentes isoformes ont une expression spécifique et sont reconnues différemment par les intégrines selon les cellules et les tissus dans lesquels elles se trouvent.

4.3.2.2.1. Isoformes et distribution

Les laminines sont constituées de grands multidomains (α , β et γ) hétérotrimériques avec trois fonctions différentes : l'adhésion, la migration et la signalisation (Aumailley et Smyth, 1998 ; Colognato et Yurchenco, 2000). Les trimères sont nommés en fonction de la composition de leurs chaînes α , β , γ . Par exemple, la laminine-111 est composée de chaînes $\alpha 1$, $\beta 1$, et $\gamma 1$. Cette dernière est la première laminine à avoir été isolée il y a 20 ans à partir de la matrice d'une tumeur chez la souris *Engelbreth-Holm-Swarm* (EHS). Cette laminine forme une croix de chaînes d'une masse moléculaire comprise entre 200 et 400 kDa (Figure 8). Après leur clonage, plusieurs homologues des trois chaînes $\alpha 1$, $\beta 1$, et $\gamma 1$ ont été isolés, révélant ainsi une hétérogénéité insoupçonnée dans les laminines. Cinq chaînes α , trois chaînes β et trois chaînes γ , ont été identifiées à ce jour (Figure 9) (Aumailley et Smyth, 1998 ; Colognato et Yurchenco, 2000 ; Miner *et al.*, 1997).

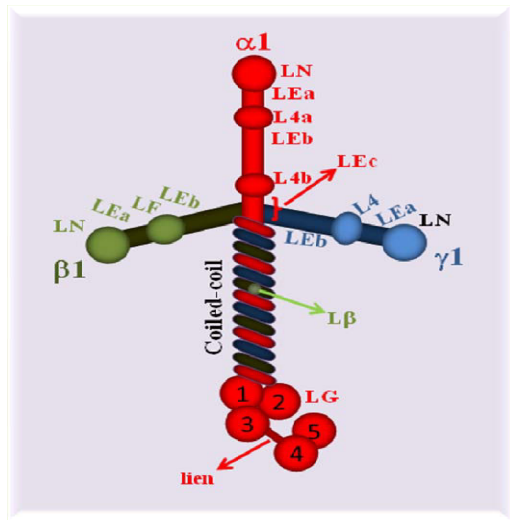


Figure 8. Schéma représentant la structure de la laminine-111. Cette laminine est composée de trois chaînes $\alpha 1$, $\beta 1$ et $\gamma 1$. Chaque chaîne débute par un domaine N-terminal (LN) suivi par les domaines LE (*laminin epidermal growth factor-like*), ces domaines sont interrompus par des domaines globulaires L4. Le domaine globulaire dans la chaîne $\beta 1$ est nommé LF (*Laminin Four*), cette chaîne contient aussi le domaine $L\beta$ (*laminin h-knob*). La chaîne α se termine par le domaine C-terminal nommé LG qui est composé de 5 domaines globulaires (1-5). Les deux domaines 3 et 4 sont liés par un lien non globulaire appelé : Lien.

Les chaînes polypeptidiques de α , β , et γ (100 - 400 kDa), s'agrègent en triple hélice coiled-coil et sont reliées entre elles par des ponts disulfures, pour constituer une grande glycoprotéine hétérotrimérique (400-800 kDa). Toutes les chaînes de laminine sont structurellement similaires notamment dans les petits domaines globulaires (L4 et LF), le domaine LE (*laminin epidermal-growthfactor-like*) et l' α -hélice coiled-coil (I et II) (Aumailley et Smyth, 1998 ; Colognato et Yurchenco, 2000). Les chaînes α sont définies par un grand domaine globulaire (G-domaines) au niveau C-terminal (Aumailley *et al.*, 2005 ; Scheele *et al.*, 2007 ; Tzu and Marinkovich, 2008). Les chaînes β sont caractérisées par une petite interruption dans le domaine coiled-coil, appelé « $L\beta$ ». Des activités biologiques spécifiques ont été associées à chaque domaine de laminines. Par exemple, le domaine LN, qui est présent dans l' $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3B$, $\alpha 5$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\gamma 1$, et $\gamma 3$, est essentiel pour la polymérisation et l'incorporation dans les membranes basales. C'est pourquoi les laminines, contenant la chaîne $\alpha 4$ ne possédant pas ce domaine, ne peuvent pas s'auto-assembler. On retrouve cette incapacité à s'auto-polymériser pour la laminine-332, mais il a été suggéré qu'elle puisse être intégrée dans la membrane basale via la liaison avec la laminine-311, la laminine-321 et en se liant à d'autres composants de la matrice extracellulaire (Miner et Yurchenco, 2004). Le domaine coiled-coil est impliqué dans la formation du domaine triple hélice α coiled-coil, mais d'autres fonctions restent à déterminer pour ce domaine. Les domaines LG lient plusieurs récepteurs de la surface cellulaire et d'autres molécules de la matrice extracellulaire (Timpl *et al.*, 2000). Le rôle du domaine LE reste inconnu jusqu'à

présent, bien qu'il soit particulièrement important dans les chaînes $\gamma 1$ et $\gamma 3$ car il héberge le site de liaison avec le nidogène.

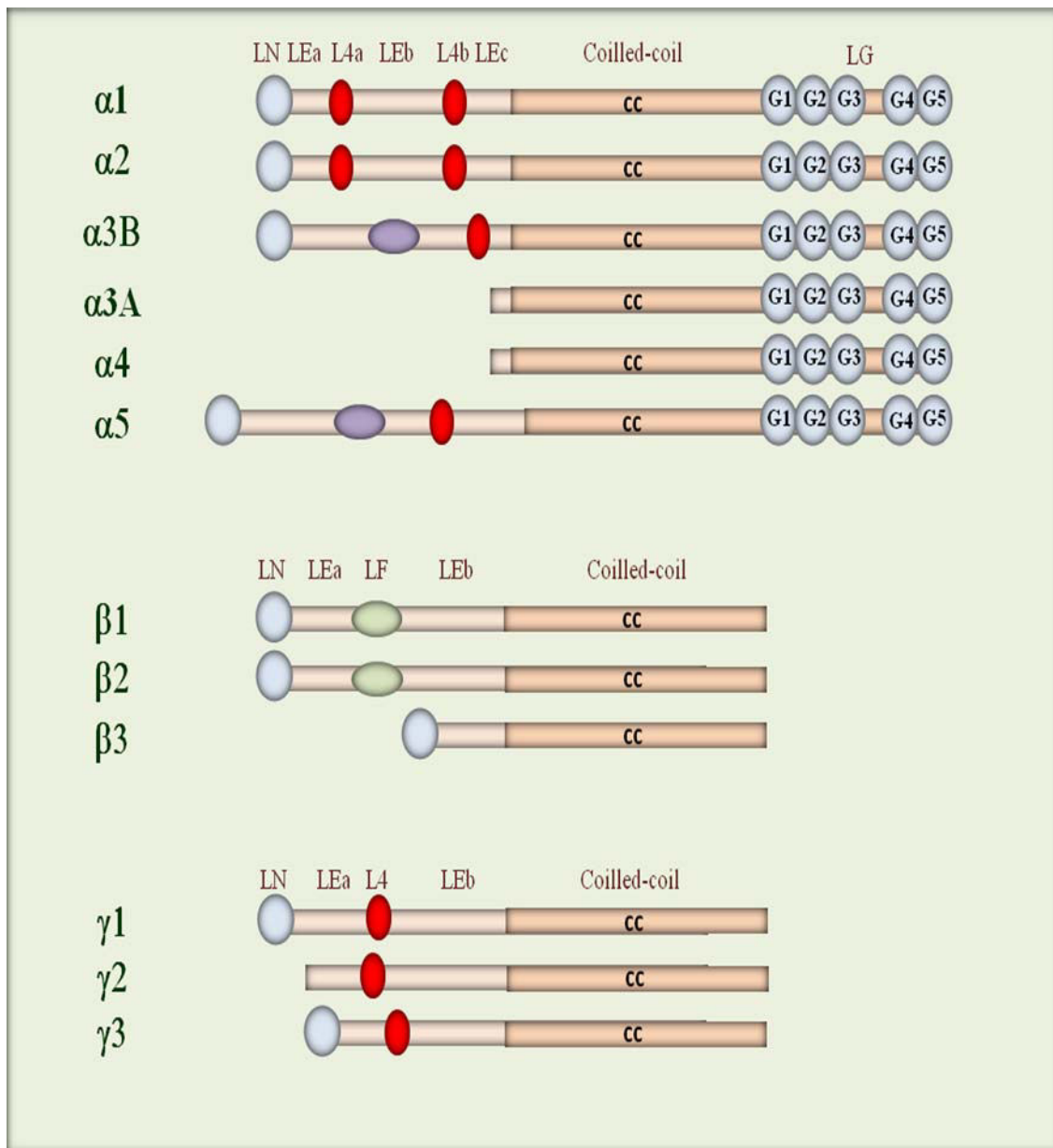


Figure 9. Structure de différents domaines des laminines. Domaine LN : N-terminal, L4 et LF : domaines globulaires, domaine LE : *laminin epidermal growth factor-like*, domaine cc : Coiled-coil, domaine LG : C-terminal contenant 5 domaine G.

Les différentes sous-unités de laminine (α , β et γ) sont capables de se combiner pour donner naissance à 16 isoformes différentes (Figure 10).

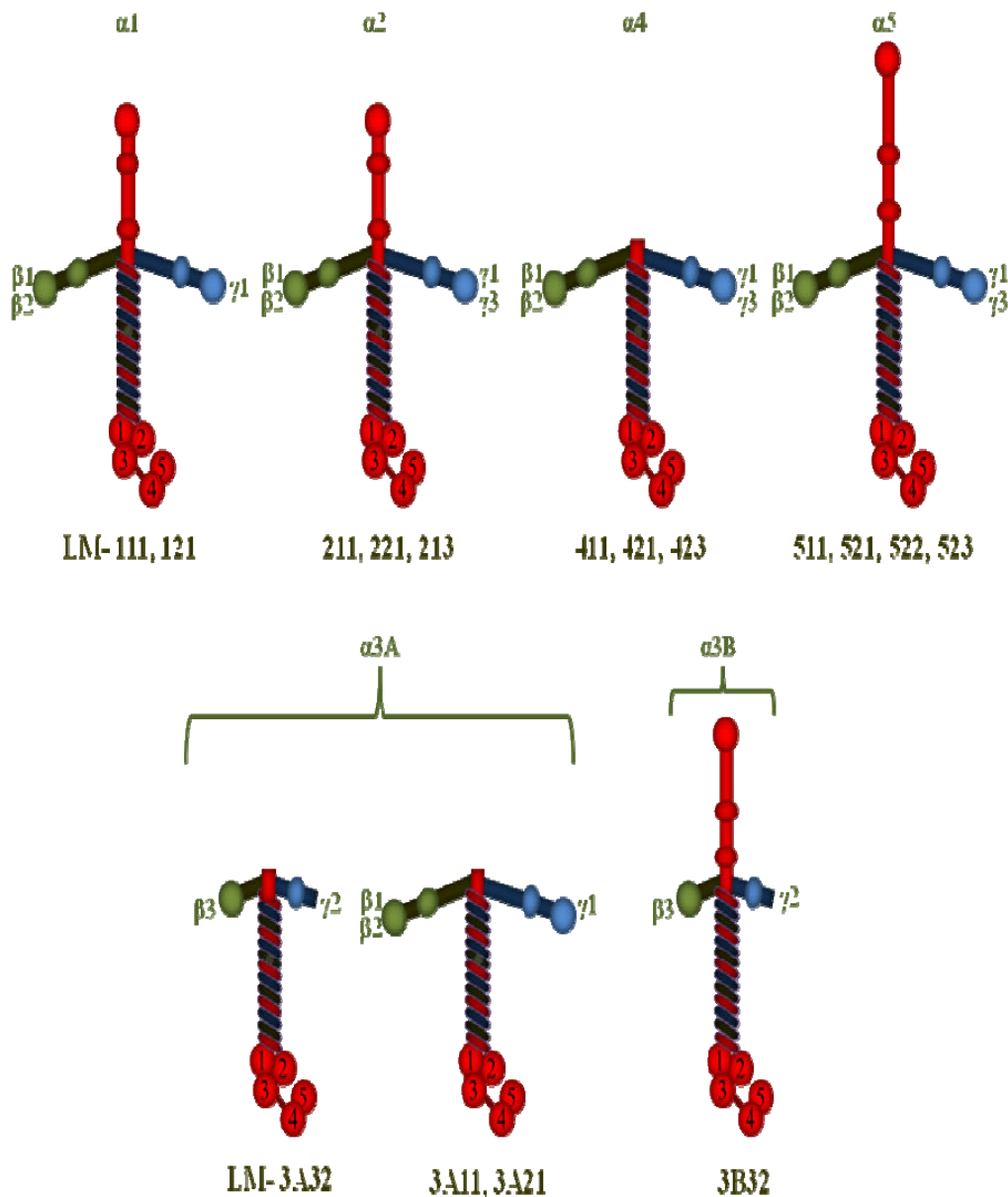


Figure 10. Schéma de 16 laminines (humaines ou murines). Les numéros indiquent la composition trimérique des laminines, les lettres grecques suivies des chiffres indiquent les chaînes. D'après Aumailley *et al.*, 2005.

Les laminines ont une distribution tissu-spécifique et cette expression différentielle est principalement déterminée par les variations de l'expression des chaînes α . La chaîne $\alpha 1$ est exprimée dans la membrane basale au cours du développement embryonnaire précoce. En outre, la chaîne $\alpha 1$ est exprimée par les cellules épithéliales développées au cours de l'organogenèse. Chez l'adulte, elle est exprimée dans quelques membranes basales épithéliales (les reins, la prostate, le placenta, les ovaires et les glandes mammaires). La chaîne $\alpha 2$ est principalement exprimée dans le système neuromusculaire et certains autres tissus. La chaîne $\alpha 3$ se trouve essentiellement dans l'épiderme. La chaîne $\alpha 4$ est associée à l'endothélium, aux muscles lisses, aux cellules adipeuses, aux cellules de Schwann, à la jonction neuromusculaire, et à la moelle osseuse. La chaîne $\alpha 5$ est largement exprimée dans la membrane basale embryonnaire, l'épithélium mature, l'endothélium mature, les muscles lisses et la jonction neuromusculaire (Hallmann *et al.*, 2005 ; Scheele *et al.*, 2007 ; Miner, 2008 ; Tzu et Marinkovich, 2008).

4.3.2.2.2. Ligands et fonctions

Les laminines jouent un rôle important dans l'adhésion, la migration et la différenciation via leurs interactions avec les intégrines. Ces dernières reconnaissent principalement les chaînes α de la laminine ce qui permet une adhésion spécifique. De nombreuses intégrines, dont $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 7\beta 1$, $\alpha V\beta 3$ et $\alpha 6\beta 4$, sont connues comme récepteurs de différentes isoformes de la laminine (Aumailley et Smyth, 1998 ; Colognato et Yurchenco, 2000 ; Mercurio, 1995 ; Nishiuchi *et al.*, 2006) (Tableau 1). Par exemple, les intégrines $\alpha 1\beta 1$ et $\alpha 2\beta 1$ reconnaissent le domaine VI de la chaîne α , alors que les intégrines $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 7\beta 1$ et $\alpha 6\beta 4$ lient le domaine G. Récemment, il a été montré que l'intégrine $\alpha V\beta 3$ est capable d'interagir avec les deux motifs RGD du domaine IV de la chaîne $\alpha 5$ laminine (Sasaki et Timpl, 2001). Les intégrines peuvent également reconnaître les chaînes β et γ , mais ces interactions restent moins connues à ce jour (Underwood *et al.*, 1995 ; Ponce *et al.*, 2001 ; Decline et Rousselle, 2001).

D'autres protéines de la surface cellulaire sont en mesure de lier les laminines : l' α -dystroglycane, la protéoglycane heparan sulfate, les sulfatides, les syndecanes et la glycoprotéine du groupe sanguin Lutheran (Tableau 1).

Isoformes	Expression	Récepteurs
111	épithélium embryonnaire, certains épithéliums adultes (rein, foie, testicules, ovaires), vaisseaux sanguins du cerveau	Intégrines ($\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 7\beta 1$ et $\alpha 9\beta 1$), α -DG, syndecans, protéoglycane à sulfate
121	Placenta	Comme 111
211	Muscle, cœur, nerfs périphériques, testicules	Intégrines ($\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 7\beta 1$ et $\alpha 3\beta 1$), α -DG, syndecans, protéoglycane à sulfate, sulfatides
221	Muscle, cœur, nerfs périphériques, jonction neuromusculaire	Comme 211
212/222a	nerfs périphériques	Comme 211
3A11	Épiderme, amnios	Intégrines ($\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$), syndecans, protéoglycane heparan à sulfate, sulfatides
3A21	Épiderme, amnios	Comme 3A11
3A32	Épiderme, placenta, gland mammaire	Comme 3A11
3A33b	Testicules	Comme 3A11
3B32	Skin, utérus, poumon	Comme 3A11
411	Endothélium, muscle lisse, graisse, nerveuses périphériques	Intégrines ($\alpha 6\beta 1$, $\alpha 7\beta 1$), syndecans, protéoglycane heparan à sulfate
421	Endothélium, muscle lisse, graisse, jonction neuromusculaire	Comme 411
423	Système central rétinale / nerveux	Comme 411
511	Epithélium mature, endothélium mature, muscle lisse	Intégrines ($\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$, $\alpha 7\beta 1$, $\alpha v\beta 3$), α -DG, syndecans, Lutheran
521	Epithélium mature, mature endothélium, muscle lisse, jonction neuromusculaire, membrane basale glomérulaire	Comme 511
523	Système central rétinale / nerveux	Comme 511

Tableau 1: Différentes isoformes de laminines et leurs récepteurs. D'après Durbeej *et al.* 2010

4.3.2.2.3. Laminines dans les modèles de souris

La génération et la caractérisation des modèles de souris déficientes en laminine ont conduit à une meilleure compréhension des fonctions de ces laminines (Tableau 2). Tous les gènes codant pour les différentes chaînes de laminines ont été expérimentalement mutés chez la souris. Les résultats révélés par ces études confirment le rôle crucial de la laminine-111 et de la laminine-511 au cours du développement embryonnaire. En outre, les souris déficientes en $\alpha 3$, $\beta 3$, et $\gamma 2$ meurent prématurément (quelques jours après la naissance) à cause de l'apparition de sévères blessures sur la peau, alors que l'apparition des défauts chez les souris déficientes en $\alpha 2$, $\alpha 4$ et $\beta 2$ apparaissent après la naissance (Scheele *et al.*, 2007 ; Miner, 2008 ; Tzu et Marinkovich, 2008). Les souris déficientes en $\alpha 1$ meurent au cours du 7^{ème} jour du développement embryonnaire, probablement à cause de défauts dans la membrane de Reichert (Miner et Yurchenco, 2004). La seule souris knock-out qui ne montre aucun phénotype est celle qui est déficiente en $\gamma 3$. On peut néanmoins constater de sensibles différences entre ces souris et des souris de type sauvage (Denes *et al.*, 2007) (Tableau 2).

Chaîne de laminine	Modèle de souris	Phénotypes et références
$\alpha 1$	Knock-out	Létal (E6.5-E7). Absence de la membrane de Reichert (Miner et Yurchenco, 2004)
$\alpha 2$	Mutation spontanée non identifiée	Létal avant les 6 mois. Modérée de dystrophie musculaire, neuropathie périphérique (Xu <i>et al.</i> , 1994 ; Sunada <i>et al.</i> , 1994), perte d'audition (Pillers <i>et al.</i> , 2002) et développement thymocytaire aberrant (Magner <i>et al.</i> , 2000).
$\alpha 3$	<i>Knock-out</i>	Létal dans les 3 jours suivant la naissance. Graves cloques cutanées (Ryan <i>et al.</i> , 1999) et glomerulogénèse anormale (Abrass <i>et al.</i> , 2006)
$\alpha 4$	<i>Knock-out</i>	20% meurent pendant la période prénatale. Anomalies dans les vaisseaux (Thyboll <i>et al.</i> , 2002), les jonctions neuromusculaires (Patton <i>et al.</i> , 2001), le système nerveux périphérique (Wallquist <i>et al.</i> , 2005), et le cœur (Wang <i>et al.</i> , 2006)
$\alpha 5$	<i>Knock-out</i>	Létal avant E16.5. (Miner <i>et al.</i> , 1998). Glomerulogénèse défectueuse (Miner et Li, 2000), anomalie du développement des lobes pulmonaires (Nguyen <i>et al.</i> , 2002), des follicules pileux (Li <i>et al.</i> , 2003), l'épithélium dentaire (Fukumoto <i>et al.</i> , 2006) et de la morphogénèse de la glande submandibulaire (Rebustini <i>et al.</i> , 2007)
$\beta 1$	<i>Knock-out</i>	Létal à E5.5. Absence de membrane basale (Miner et Yurchenco, 2004)
$\beta 2$	<i>Knock-out</i>	Létal dans les 3 premières semaines. Défauts dans les synapses neuromusculaires (Noakes <i>et al.</i> , 1995a), les glomérules rénaux (Noakes <i>et al.</i> , 1995b) et pathologie rétinienne (Libby <i>et al.</i> , 1999)
$\beta 3$	<i>Knock-out</i>	Létal dans les 24 h après la naissance. Blessures sur la peau (Kuster <i>et al.</i> , 1997)
$\gamma 1$	<i>Knock-out</i>	Létal à E5.5. Absence de membrane basale (Smyth <i>et al.</i> , 1999)
$\gamma 2$	<i>Knock-out</i>	Létal pendant 5 jours après la naissance. Blessures extensives sur la peau (Meng <i>et al.</i> , 2003) et hémidesmosomes trachéaux anormaux (Nguyen <i>et al.</i> , 2006)
$\gamma 3$	<i>Knock-out</i>	Pas de phénotype observé (Denes <i>et al.</i> , 2007)

Tableau 2 : Modèles de souris déficientes en laminine. D'après Durbeej, 2010

4.3.2.2.4. Laminines dans l'épiderme

L'intégrité des cellules dans les tissus nécessite une interaction cellule-cellule ainsi qu'une interaction entre cellule et matrice extracellulaire. Dans les tissus épithéliaux tels que l'épiderme, l'ensemble des cellules interagit avec la matrice extracellulaire dans un tissu conjonctif, la membrane basale. Les composants principaux de la MEC comprennent différents types de collagènes, d'élastines, de fibronectines, de laminines, de fibrines, de perlécane, d'entactines et de nidogènes (Charonis *et al.*, 2005). Les laminines-5A ($\alpha3A\beta3\gamma2$), -5B ($\alpha3B\beta3\gamma2$) et -6 ($\alpha3A\beta1\gamma1$) sont exprimées dans la membrane basale de la jonction dermo-épidermique (Figure 10). Une autre laminine exprimée dans la membrane basale est la laminine-10 (Champlaud *et al.*, 1996 ; Aumailley et Rousselle, 1999 ; Garbe *et al.*, 2002).

Dans la suite du mémoire, seule la laminine-5A ($\alpha3A\beta3\gamma2$) sera exposée et nommée **laminine-332**.

➤ Rôle de la Laminine-332 dans l'épiderme

Le rôle principal de la laminine-332, encore appelée laminine-5, kalinine, nicéine, ladsine ou épiligrine, dans l'épiderme est le maintien de la cohésion épithélio-mésenchymateuse des tissus exposés aux forces perturbatrices extérieures comme la peau, la muqueuse squameuse stratifiée, l'amnios et la cornée (Ryan *et al.*, 1996). L'absence de laminine-332 causée par des anomalies génétiques d'un des gènes codant pour l'une des sous-unités (Pulkkinen *et al.*, 1994 ; Aberdam *et al.*, 1994) conduit chez les patients à une maladie sévère, l'épidermolyse bulleuse jonctionnelle de type Herlitz (EBJH) (Marinkovich *et al.*, 1993 ; Meneguzzi *et al.*, 1992), ce qui souligne l'importance de cette laminine. Cette protéine joue un rôle clé dans l'adhésion des cellules épidermiques en interagissant avec l'intégrine $\alpha3\beta1$ et $\alpha6\beta4$ (Nishiuchi, 2006).

➤ Interaction entre laminine-332 et intégrine $\alpha3\beta1$

L'interaction entre l'intégrine $\alpha3\beta1$ et la laminine-332 initie et soutient la migration cellulaire au cours de la cicatrisation et joue un rôle important dans le rassemblement de la matrice de la laminine-332 (deHart *et al.*, 2003 ; Goldfinger *et al.*, 1999 ; Nguyen *et al.*, 2000a ; Nguyen *et al.*, 2001). La liaison de l'intégrine à la laminine-332 génère des signaux qui activent les MAP kinases (MAPK), régulateurs essentiels de la prolifération des kératinocytes (Figure 11). Certains résultats suggèrent aussi que cette signalisation comprend

l'interaction du récepteur à l'EGF avec l'intégrine $\beta 1$ (Gonzales *et al.*, 1999). De plus, cette interaction régule la voie Src kinases par FAK (*Focal Adhesion kinase*), ce qui favorise l'activation de Rac1 et l'extension de lamellipodes polarisés (une structure cellulaire clé régulant la motilité cellulaire) (Choma *et al.*, 2004 ; Choma *et al.*, 2007). En effet, le traitement par un inhibiteur de Rac atténue considérablement la migration cellulaire dans les kératinocytes HaCat cultivés avec des fibroblastes (Laeq et Faust, 2007). L'activation de Rac1 sert aussi probablement à la translocation du facteur nucléaire Nf-kB et des MAP kinases telle que MEK, ERK, JNK et p38 (Nikolopoulos *et al.*, 2005). D'autre part, les MAP kinases exercent un effet inhibiteur sur l'apoptose des kératinocytes (Jost *et al.*, 2001), indiquant ainsi l'importance potentielle de l'interaction entre la laminine-332 et l'intégrine $\alpha 3\beta 1$ dans la survie des kératinocytes.

➤ Interaction laminine-332 / intégrine $\alpha 6\beta 4$

Dans la peau saine, l'interaction entre la laminine-332 et l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ prédomine sur celle entre la laminine-332 et l'intégrine $\alpha 3\beta 1$. Les complexes laminine-332 et intégrines $\alpha 6\beta 4$ sont des composants essentiels des hémidesmosomes (Jones *et al.*, 1998). En outre, l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ et la laminine-332 interagissent avec la protéine transmembranaire collagène XVII (Parikka *et al.*, 2001 ; Franzke *et al.*, 2006). Le rôle de ce dernier est de renforcer la structure des hémidesmosomes, à travers ses interactions avec la laminine-332.

Par le biais de son interaction avec l'intégrine $\alpha 6\beta 4$, la laminine-332 est capable de jouer le rôle d'un transducteur de signaux en dehors de la structure des hémidesmosomes. Par exemple, la liaison entre la laminine-332 et l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ conduit, par le domaine cytoplasmique de l'intégrine $\beta 4$, à l'activation de deux voies de signalisation (Figure 11) :

- la voie MAP kinase (Ras/Raf/MEK/Erk).
- la voie Ras/Rac/JNK/c-Jun (Mainiero *et al.*, 1995 ; Mainiero *et al.*, 1996 ; Mainiero *et al.*, 1997).

In vivo, l'importance de ces voies dans la prolifération des cellules épithéliales est également démontrée par le modèle de souris KO dans le domaine cytoplasmique de l'intégrine $\beta 4$. Ce dernier développe des défauts de la peau et des tissus intestinaux (Murgia *et al.*, 1998). De plus, de récents travaux ont montré que l'interaction entre l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ et la laminine-332 joue un rôle déterminant dans la migration des kératinocytes (Sehgal *et al.*, 2006 ; Kligys *et al.*, 2007).

La laminine-332 interagit directement avec le collagène VII par l'extrémité N-terminale de sa sous-unité $\beta 3$ et, dans une moindre mesure, par sa sous-unité $\gamma 2$ (Chen *et al.*, 1999). La chaîne $\gamma 2$ a été décrite comme la chaîne par laquelle la laminine-332 peut interagir avec le collagène IV, la perlécane et la fibuline (Sasaki et Timpl, 2001). La laminine-332 se lie également à d'autres isoformes de laminines telles que la laminine-311 et la laminine-321 (Champlaud *et al.*, 1996).

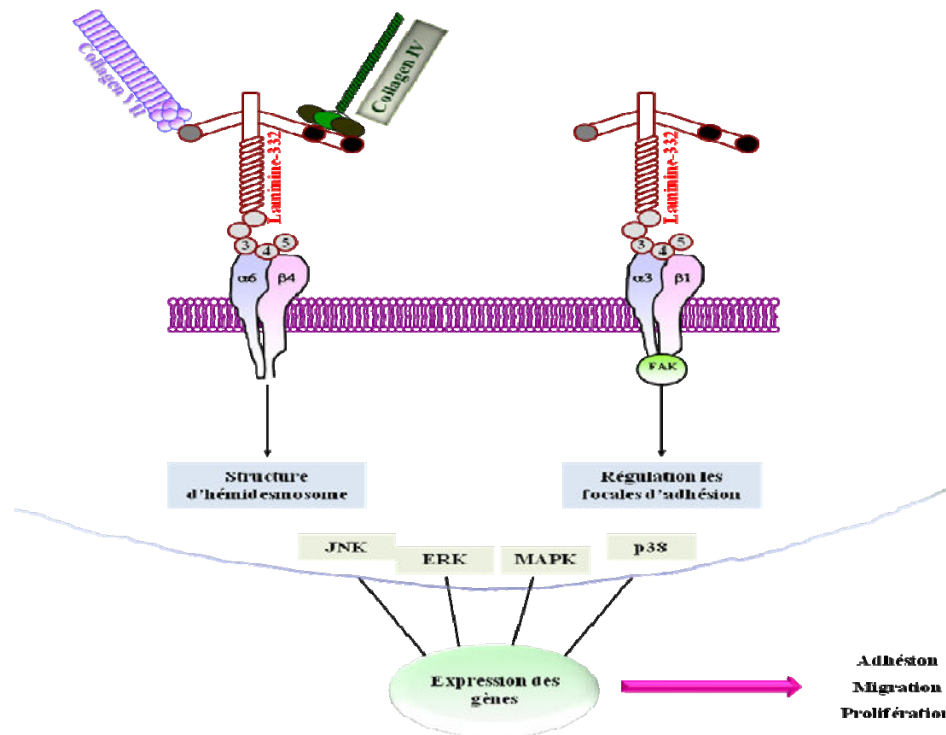


Figure 11. Schéma représentant les interactions entre le laminine-332 et ses récepteurs (les intégrines $\alpha 6 \beta 4$ et $\alpha 3 \beta 1$).

4.3.2.2.5. Laminine-332 dans les tumeurs

La laminine-332 est impliquée dans la migration cellulaire tumorale et les métastases. La laminine-332 est sur-exprimée dans diverses tumeurs épithéliales, notamment cutanées, orales, œsophagienne, du larynx, de la trachée, du col utérin et du cancer du colon (Mizushima *et al.*, 1996 ; Pyke *et al.*, 1995 ; Tani *et al.*, 1997 ; Berndt *et al.*, 1997 ; Orian-Rousseau *et al.*, 1998 ; Skyldberg *et al.*, 1999 ; Ono *et al.*, 1999 ; Nordemar *et al.*, 2001 ; Lenander *et al.*, 2001 ; Calaluce *et al.*, 2001 ; Giannelli *et al.*, 2003). L'expression de cette protéine est corrélée avec l'invasion tumorale (Berndt *et al.*, 1997 ; Ono *et al.*, 1999 ; Nordstrom *et al.*, 2002) et aussi dans les différents types de carcinomes squameux (SCC : *Squamous Cell Carcinoma*) (Ono *et al.*, 1999 ; Nordemar *et al.*, 2001 ; Lenander *et al.*, 2001 ; Giannelli et Antonaci, 2000 ; Shinto *et al.*, 2005). En règle générale, les tumeurs dérivées de tissus qui expriment la laminine-332 présentent une expression élevée, tandis que celles de tissus qui ne l'expriment pas, tels que les sarcomes, ne l'expriment pas non plus. Toutefois, il existe quelques exceptions notables. Par exemple, l'expression de la laminine-332 est généralement diminuée dans les cellules basales de carcinome spinocellulaire (SCC) (Savoia *et al.*, 1993), ainsi que dans les cancers avancés du sein (Holler, 2005) et de la prostate (Hao *et al.*, 2001). L'expression des récepteurs de la laminine-332, notamment l'intégrine $\alpha 6\beta 4$, a également montré un rôle important dans la progression des SCC (Janes et Watt, 2006).

Pour les tumeurs de la peau, il a été prouvé que la présence dans le sang de fragments $\gamma 2$ suite au clivage de la laminine-332 est un marqueur tumoral (Katayama *et al.*, 2003). Ce clivage est assuré soit directement par MT1-MMP et MMP-19, soit indirectement par MMP-2 (Koshikawa *et al.*, 2000 ; Koshikawa *et al.*, 2005 ; Sadowski *et al.*, 2005).

4.3.2.3. Intégrines

Les intégrines sont des récepteurs cellulaires exprimés par les cellules adhérentes des organismes multicellulaires, de manière constitutive ou après activation par certains constituants de la matrice extracellulaire. Ce sont des hétérodimères composés de deux sous-unités associées α et β (Hynes, 2002). Chez les vertébrés, la famille est composée de 18 sous-unités α et 8 sous-unités β qui peuvent se combiner pour former 24 hétérodimères différents (Takada *et al.*, 2007). Les intégrines sont indispensables aux liaisons entre les cellules et la matrice extracellulaire, mais aussi pour les liaisons intercellulaires (Barczyk *et al.*, 2010). Le nom «intégrine» a été donné pour désigner l'importance de ces récepteurs dans le maintien de l'intégrité de la liaison du cytosquelette (Hynes, 2004).

4.3.2.3.1. Structure et fonctions

La famille des intégrines est composée de plusieurs groupes qui sont déterminés en fonction des ligands qu'elles sont capables de lier (Figure 12). Le premier groupe comprend les intégrines possédant un site de liaison pour la séquence RGD (une séquence de trois acides aminés, arginine-glycine-aspartique), capables de lier des molécules comme la fibronectine et la vitronectine. Le deuxième comprend les intégrines liant les laminines. Le troisième, regroupe les récepteurs de collagènes ($\alpha1$, $\alpha2$, $\alpha10$, $\alpha11$) et une paire d'intégrines ($\alpha4\beta1$, $\alpha9\beta1$) qui se lient aux composants de la matrice extracellulaire tels que la fibronectine et d'autres ligands de la superfamille des immunoglobulines, par exemple. Les vertébrés possèdent également un ensemble d'intégrines leucocytaires spécifiques qui reconnaissent la superfamille des immunoglobulines et participent aux interactions hétérotypiques d'adhésion entre cellules.

Chaque sous unité possède :

- un domaine extracellulaire court permettant les liaisons avec les multiples ligands de la matrice (par exemple, la fibronectine, la vitronectine, la tenascin-C et les fibrilles).
- un domaine transmembranaire court
- un domaine intracellulaire long dans lequel les intégrines maintiennent les interactions avec les protéines du cytosquelette (l'actine, la vinculine) (Tableau 3).

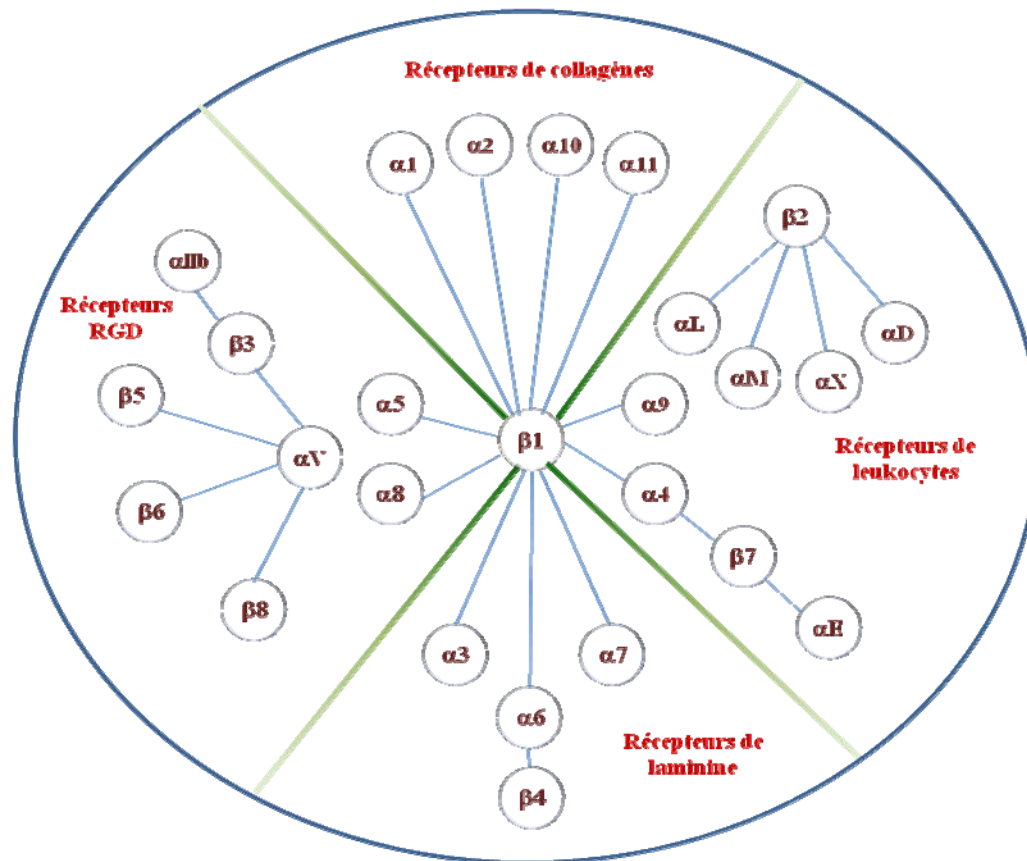


Figure 12. La famille des intégrines. Barczyk *et al.*, 2010

Plusieurs fonctions ont été attribuées aux intégrines en dehors de leurs rôles dans l'attachement des protéines de la matrice. Elles participent à l'intégration des réponses cellulaires de l'extérieur vers l'intérieur dans un mode bi-directionnel et régulent les processus cellulaires tels que la prolifération, la migration et l'assemblage de la membrane basale (Giancotti et Ruoslahti, 1999 ; Berrier et Yamada, 2007) (Figure 13).

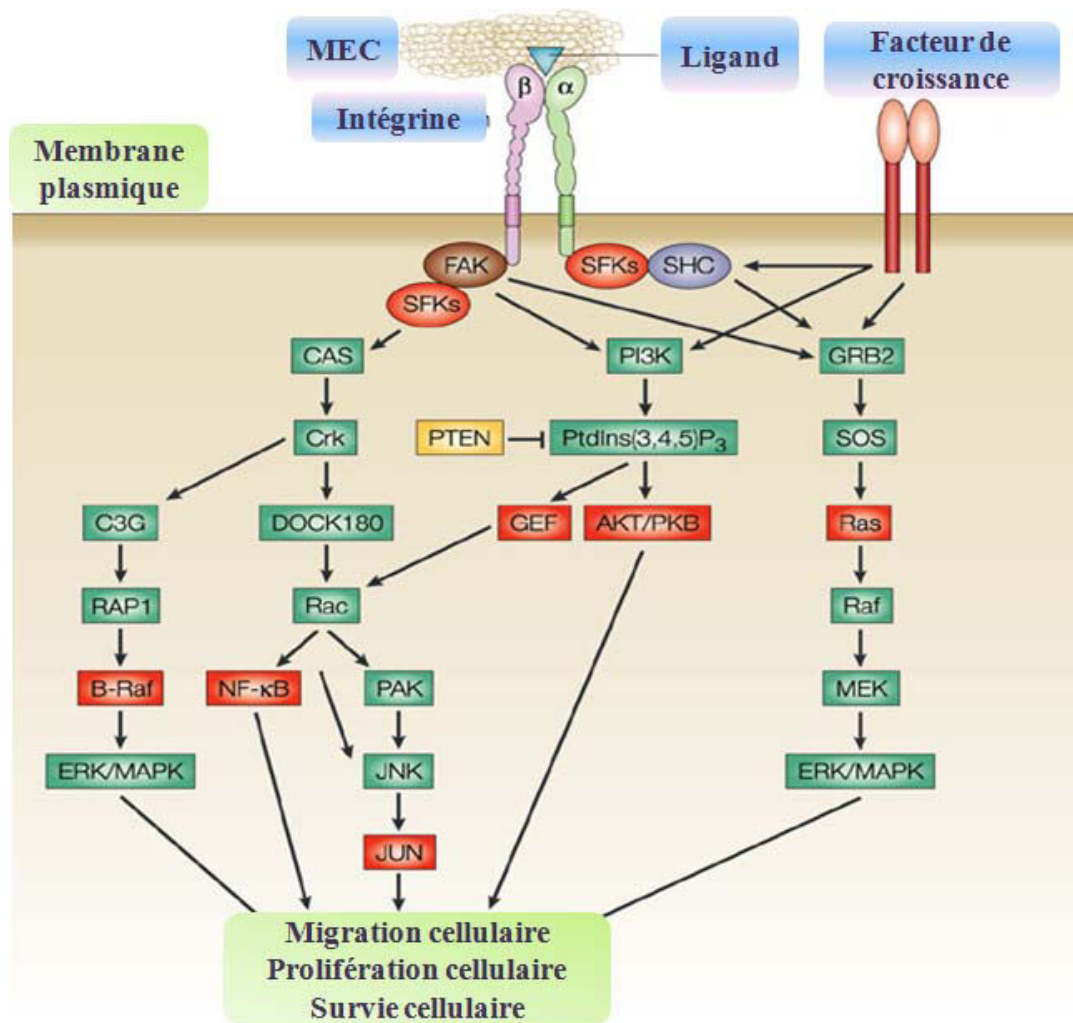


Figure 13. Voies de signalisation mise en jeu par les intégrines. Les intégrines avec leurs ligands induit l'activation : la voie JNK (est activée par PI3K-AKT ou de SFKs-Rac) et la voie ERK/MAPK (est activée par FAK-Ras ou FAK-Raf). L'activation de ces deux voies conduit à la migration, la prolifération et la survie cellulaire. Selon Guo et Giancotti, 2004.

Sous-unité α	Sous-unité β	Ligands
$\alpha 1$	$\beta 1$	Laminine, collagène
$\alpha 2$	$\beta 1$	Laminine, collagène, $\alpha 3\beta 1$
$\alpha 3$	$\beta 1$	Laminine, collagène, fibronectine, épiligrine, entactine, $\alpha 2\beta 1$
$\alpha 4$	$\beta 1$	Fibronectine, VCAM
$\alpha 5$	$\beta 1$	Fibronectine (RGD), L1-CAM, fibrinogène
$\alpha 6$	$\beta 1$	Laminine, mérosine, kalinine
$\alpha 7$	$\beta 1$	Laminine
$\alpha 8$	$\beta 1$	Fibronectine
$\alpha 9$	$\beta 1$	Ténascine
$\alpha 10$	$\beta 1$	Collagène
$\alpha 11$	$\beta 1$	Collagène
αv	$\beta 1$	Fibronectine, vitronectine
αL	$\beta 2$	ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3
αM		iC3b, fibrinogène, facteur X, ICAM-1
αX		iC3b, fibrinogène
αv	$\beta 1$	Fibronectine, vitronectine
αv	$\beta 3$	Fibronectine, vitronectine, facteur de von Willebrand (fvW),
αv	$\beta 3$	collagène dénaturé, thrombospondine, Del-1
αv	$\beta 5$	Vitronectine, ostéopontine, Del-1
αv	$\beta 6$	Fibronectine
αv	$\beta 8$	Fibronectine
αII	$\beta 3$	Fibronectine, fibrinogène, fvW, thrombospondine, vitronectine
$\alpha 6$	$\beta 4$	Laminine
$\alpha 4$	$\beta 7$	Fibronectine, VCAM, MADCAM
αE	$\beta 7$	E- Cadherine

Tableau 3. Famille des intégrines et leurs ligands. D'après Jin et Varner, 2004

4.3.2.3.2. Intégrines dans l'épiderme

Dans un épiderme normal, l'expression des intégrines est limitée à la couche basale et à la racine des follicules pileux (une exception étant $\alpha\beta8$, telle que décrite dessus). $\alpha6\beta4$ est principalement concentrée dans la zone de la membrane basale et est une composante des hémidesmosomes. Les autres intégrines sont réparties sur la lame basale, les surfaces latérales et apicales des cellules basales (Watt et Hertle, 1994).

In vivo : des études sur l'épiderme humain ont révélé des clusters de $\beta1$ intégrines entrecoupés d'hémidesmosomes sur la surface des cellules basales. Mais la majorité des $\beta1$ intégrines semblent former un « O » (joint torique) à la périphérie de la cellule (Jensen *et al.*, 1999).

In vitro : les intégrines $\beta1$ se trouvent dans les plaques focales d'adhésion, mais aussi, comme *in vivo*, concentrées en « O » à la périphérie de la cellule (Braga *et al.*, 1998).

In vitro, $\alpha6\beta4$ se trouve :

- dans les hémidesmosomes rudimentaires associés à des filaments intermédiaires
- sur les lamellipodes des kératinocytes, en liaison avec l'actine filamenteuse (Adams et Watt, 1991 ; Mercurio *et al.*, 2001).

Outre la sur-expression de certaines intégrines se produisant lors de la culture, de la cicatrisation ou de certaines maladies, on observe fréquemment deux changements dans l'expression des intégrines épidermiques :

- Le premier est l'expression des intégrines dans la couche suprabasale, généralement associée à une hyperprolifération bénigne (par exemple dans les lésions psoriasiques ou dans la muqueuse buccale) (Watt et Hertle, 1994) (Figure 14).
- Le second est la perte locale ou générale des intégrines qui caractérise les cellules cancéreuses SCC (Jones *et al.*, 1993 ; Bagutti *et al.*, 1998). La perte focale des intégrines dans les tumeurs semble être corrélée à une perte de protéines de la membrane basale (Downer *et al.*, 1993 ; Jones *et al.*, 1993).

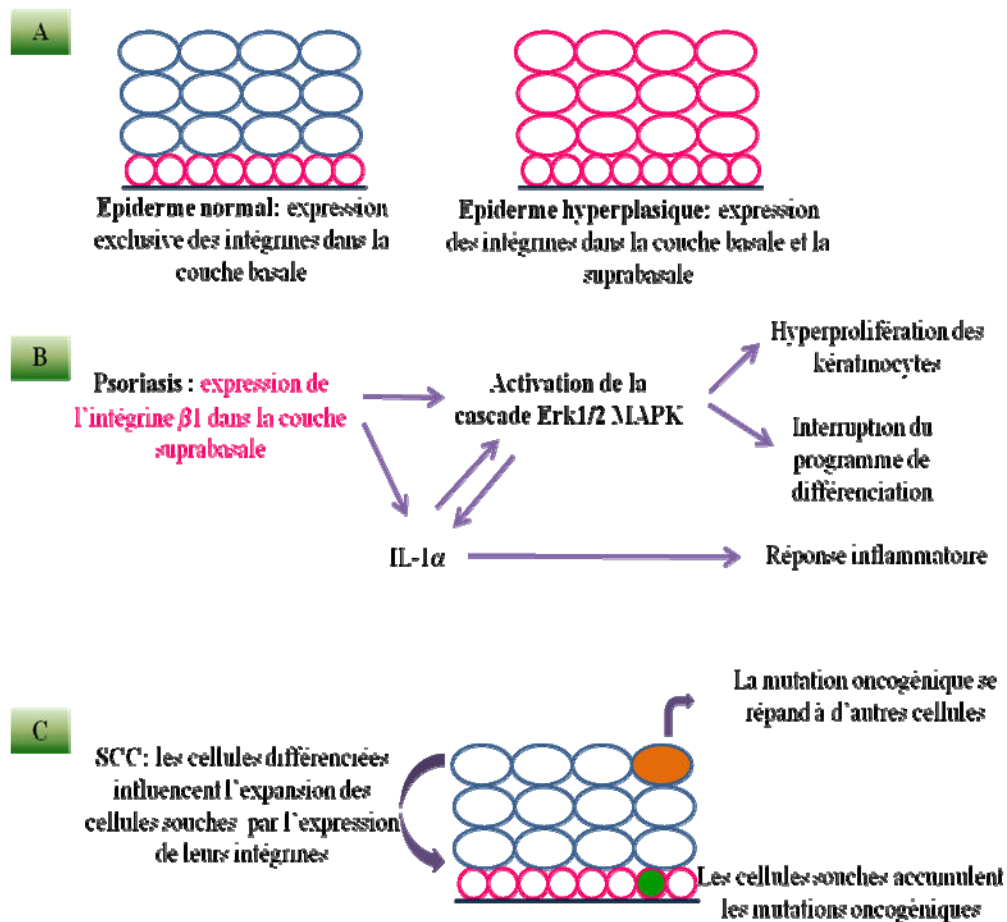


Figure 14. Schéma représentant l'expression des intégrines. (A) dans l'épiderme, (B) le psoriasis, (C) et le SCC (*Squamous Cell Carcinoma*)

4.3.2.3.3. Intégrines dans les kératinocytes

4.3.2.3.3.1. Expression dans les kératinocytes

Les intégrines exprimées par les kératinocytes peuvent être placées dans différentes catégories selon qu'elles sont abondantes ou faiblement exprimées, de façon constitutive ou induite par des traumatismes ou des maladies (Tableau 4). Les intégrines les plus abondantes et constitutivement exprimées dans l'épiderme sont $\alpha 2\beta 1$ (récepteur du collagène), $\alpha 3\beta 1$ (essentiellement un récepteur de la laminine-5) et $\alpha 6\beta 4$ (récepteur de la laminine-5) (Watt et Hertle, 1994). $\alpha v\beta 5$ (récepteur de la vitronectine) est aussi une intégrine constitutivement exprimée dans l'épiderme, mais elle est exprimée à des niveaux plus bas que les autres (Adams et Watt, 1991 ; Watt et Hertle, 1994).

Intégrine	Ligand majoritaire	Expression
$\alpha 2\beta 1$	Collagène	Constitutive
$\alpha 3\beta 1$	Laminine	Constitutive
$\alpha 6\beta 4$	Laminine	Constitutive
$\alpha v\beta 5$	Vitronectine	Faible
$\alpha 5\beta 1$	Fibronectine	Induit dans la cicatrisation et dans les conditions pathologiques
$\alpha v\beta 6$	Fibronectine, Tenascine	Comme $\alpha 5\beta 1$
$\alpha 9\beta 1$	Tenascine	Surexprimée pendant la cicatrisation
$\alpha v\beta 8$	Vitronectine	Supra-basale

Tableau 4. Les intégrines exprimées par les kératinocytes avec leurs ligands

Les intégrines $\alpha 5\beta 1$ (récepteur de la fibronectine) et $\alpha v\beta 6$ (récepteur de la fibronectine et de la ténascine) sont induites par la culture ou des plaies (Watt et Hertle 1994 ; Breuss *et al.*, 1995 ; Zambruno *et al.*, 1995 ; Hakkinen *et al.*, 2000). $\alpha v\beta 6$ est souvent exprimée dans les carcinomes épidermiques (Jones *et al.*, 1997). $\alpha 9\beta 1$ (récepteur de la ténascine) (Palmer *et al.*, 1993) est exprimée dans l'épiderme intact (Stepp *et al.*, 1995) et est sur-exprimée au cours de la cicatrisation, mais avec une cinétique différente de $\alpha v\beta 6$ (Hakkinen *et al.*, 2000). Deux autres intégrines ont été découvertes dans l'épiderme, ce sont $\alpha 8\beta 1$ (récepteur de la ténascine, de la fibronectine et de la vitronectine) (Schnapp *et al.*, 1995) et $\alpha v\beta 8$ (récepteur de la vitronectine et, éventuellement, de la laminine, du collagène et de la fibronectine) (Nishimura *et al.*, 1994 ; Venstrom et Reichardt, 1995).

4.3.2.3.3.2. Rôle dans l'adhésion et la migration

Des études utilisant des anticorps bloquant l'adhésion ont démontré le rôle des intégrines dans la motilité des kératinocytes (Watt et Hertle 1994 ; Nguyen *et al.*, 2000b). Parmi ces intégrines, il a été montré que les deux récepteurs $\alpha3\beta1$ et $\alpha6\beta4$ ont des rôles complémentaires dans l'adhésion et la motilité des kératinocytes sur la laminine ($\alpha3\beta1$ étant nécessaire pour la formation des lamellipodes initiant la migration et $\alpha6\beta4$ servant à la stabilisation) (DiPersio *et al.*, 1997 ; Goldfinger *et al.*, 1999 ; Nguyen *et al.*, 2000b). Ces deux molécules participent à la cicatrisation (Nguyen *et al.*, 2000b ; Mercurio *et al.*, 2001). $\alpha6\beta4$ favorise la migration grâce à l'activation de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) (Mercurio *et al.*, 2001), mais aussi via la signalisation de Rac et de Rho (O'Connor *et al.*, 2000) ou des MAPK (Mainiero *et al.*, 1997).

La génération de souris KO en intégrines a confirmé l'importance de ces composés dans l'adhésion des kératinocytes à la membrane basale (Tableau 5). Les souris avec une délétion ciblée de la sous-unité $\alpha6$ ou $\beta4$ meurent peu après leur naissance. On observe l'apparition de érosions sévères sur la peau et d'autres épithéliums pavimenteux stratifiés, le manque d'hémidesmosomes (Dowling *et al.*, 1996 ; Georges-Labouesse *et al.*, 1996 ; van der Neut *et al.*, 1996). Les patients qui ont une atrésie pylorique avec épidermolyse bulleuse jonctionnelle ont des mutations soit dans le gène $\beta4$ soit dans le gène $\alpha6$ intégrine. Le degré de sévérité du phénotype dépend de la nature de la mutation (Ashton *et al.*, 2001 ; Margadant *et al.*, 2009). Paradoxalement, le double knock-out $\alpha3\beta1$ et $\alpha6\beta4$ ne révèle pas un phénotype épidermique aussi sévère que la mutation d'un seul gène (DiPersio *et al.*, 2000). Les souris KO $\alpha2$ (Chen *et al.*, 2002 ; Holtkotter *et al.*, 2002), $\alpha9$ (Huang *et al.*, 2000b) et $\beta5$ (Huang *et al.*, 2000a) n'ont aucune anomalie cutanée. Cependant, *in vitro*, on constate que les kératinocytes déficients en $\beta5$ montrent une diminution importante de la migration (Huang *et al.*, 2000a). De manière étonnante, l'ablation de l'intégrine $\alpha3$ augmente l'adhésion et la migration des kératinocytes sur le collagène IV (Hodivala-Dilke *et al.*, 1998).

Intégrine	Phénotype du KO	Références
$\alpha 3$	Désorganisation de la membrane basale, apparition de cloques épidermiques/cutanée principalement sur les jambes et les coussinets	DiPersio <i>et al.</i> , 1997
$\beta 6$	Perte de cheveux due à l'infiltration de macrophages dans la peau; cicatrisation normale	Huang <i>et al.</i> , 1996b
$\alpha 9$	Aucun défaut constaté	Huang <i>et al.</i> , 2000b
$\beta 5$	Cicatrisation normale	Huang <i>et al.</i> , 2000a
$\beta 1$	$\beta 1 \times K5Cre$ Follicules pileux anormaux, perte de poils avec l'enlèvement des follicules et infiltration des macrophages; cloques épidermiques cutanées; rupture de la membrane basale; diminution de l'expression $\alpha 6\beta 4$; hémidesmosomes réduits; fibrose dermique; défaut de la cicatrisation	Brakebusch <i>et al.</i> , 2000 ; Grose <i>et al.</i> , 2002
	$\beta 1 \times K14Cre$ Cloques épidermiques cutanés; rupture de la membrane basale; hémidesmosomes réduits; épiderme fin; réduction du nombre de follicules pileux; diminution de l'expression $\alpha 6\beta 4$	Raghavan <i>et al.</i> , 2000
$\alpha 6$	Sévère érosions épidermiques	Georges-Labouesse <i>et al.</i> , 1996
$\beta 4$	Sévère érosions épidermiques; hémidesmosomes absents	Van der Neut <i>et al.</i> , 1996
$\alpha 3 + \alpha 6$	Erosions épidermiques; la prolifération, la stratification et la morphogénèse des follicules pileux sont normales dans les épidermes	DiPersio <i>et al.</i> , 2000
$\alpha 2$	Aucun défaut n'est détecté dans l'épiderme, cicatrisation normale	Chen <i>et al.</i> , 2002 ; Holtkotter <i>et al.</i> , 2002

Tableau 5. Différents phénotypes chez les souris KO pour les intégrines dans l'épiderme

4.3.2.3.3. Rôle dans la différenciation et l'apoptose

L'initiation de la différenciation terminale des kératinocytes peut être partiellement inhibée par la fibronectine ou par des anticorps bloquants anti- $\beta 1$ (Adams et Watt, 1989 ; Watt *et al.*, 1993 ; Levy *et al.*, 2000). En se basant sur des expériences *in vitro* utilisant des kératinocytes humains, des études *in vivo* ont montré que l'ablation de $\beta 1$ dans l'épiderme favorisait la différenciation. Les souris, chez lesquelles le gène $\beta 1$ a été retiré spécifiquement des kératinocytes (K5-CRE), survivent au-delà de 6 semaines après la naissance (Brakebusch *et al.*, 2000). Elles subissent une importante perte de poils due à une prolifération réduite des kératinocytes puis, à 7 semaines, une perte des follicules pileux et des glandes sébacées. La prolifération est également réduite dans l'épiderme interfolliculaire. Les souris $\beta 1$ K14-Cre, qui meurent peu après la naissance, montrent également des anomalies des poils, des cloques et des troubles de la prolifération épidermique. La différenciation en elle-même est normale, mais la proportion de cellules différenciées n'a pas été déterminée (Raghavan *et al.*, 2000). Les principaux effets de la suppression de $\alpha 6$ ou $\beta 4$ sont des blessures massives dans l'épiderme. Les régions qui restent attachées à la membrane de ces blessures montrent une différenciation normale (Georges-Labouesse *et al.*, 1996 ; van der Neut *et al.*, 1996). Elles sont également normales pour l'épiderme ne possédant pas de $\alpha 6\beta 4$ et de $\alpha 3\beta 1$ (DiPersio *et al.*, 2000).

Bien qu'il existe des parallèles évidents entre la différenciation terminale et l'apoptose de l'épiderme, les deux processus sont distincts et les kératinocytes humains primaires subissent ce que l'on appelle l'anoikis (quand les cellules ne sont adhérentes) (Gandarillas *et al.*, 1999) (Figure 15). Dowling a suggéré que, dans l'épiderme de la souris, la perte de l'intégrine $\beta 4$ conduit à l'apoptose, mais cela n'a pas été confirmé dans l'épiderme $\alpha 6$ -nul ou manquant à la fois d' $\alpha 3$ et d' $\alpha 6$ (DiPersio *et al.*, 2000). La suppression ciblée de toutes les intégrines $\beta 1$ ne stimule pas l'apoptose épidermique (Brakebusch *et al.*, 2000). Les intégrines non liées sont impliquées dans la stimulation de l'apoptose dans les cellules adhérentes en recrutant la caspase-8 à la membrane plasmique (Stupack *et al.*, 2001) (Figure 15). Ce processus n'a cependant pas été constaté dans l'épiderme des souris transgéniques dans lequel une variété d'intégrines est exprimée sous leur forme non liée (Carroll *et al.*, 1995 ; Romero *et al.*, 1999 ; Owens et Watt, 2001). Ainsi, les intégrines ne semblent pas jouer un rôle primordial dans la régulation de l'apoptose de l'épiderme, ce qui peut s'expliquer par le fait que les cellules qui ont quitté la couche basale de la peau humaine restent viables et métaboliquement

actives pendant plusieurs jours voire plusieurs semaines avant de disparaître de la surface de l'épiderme.

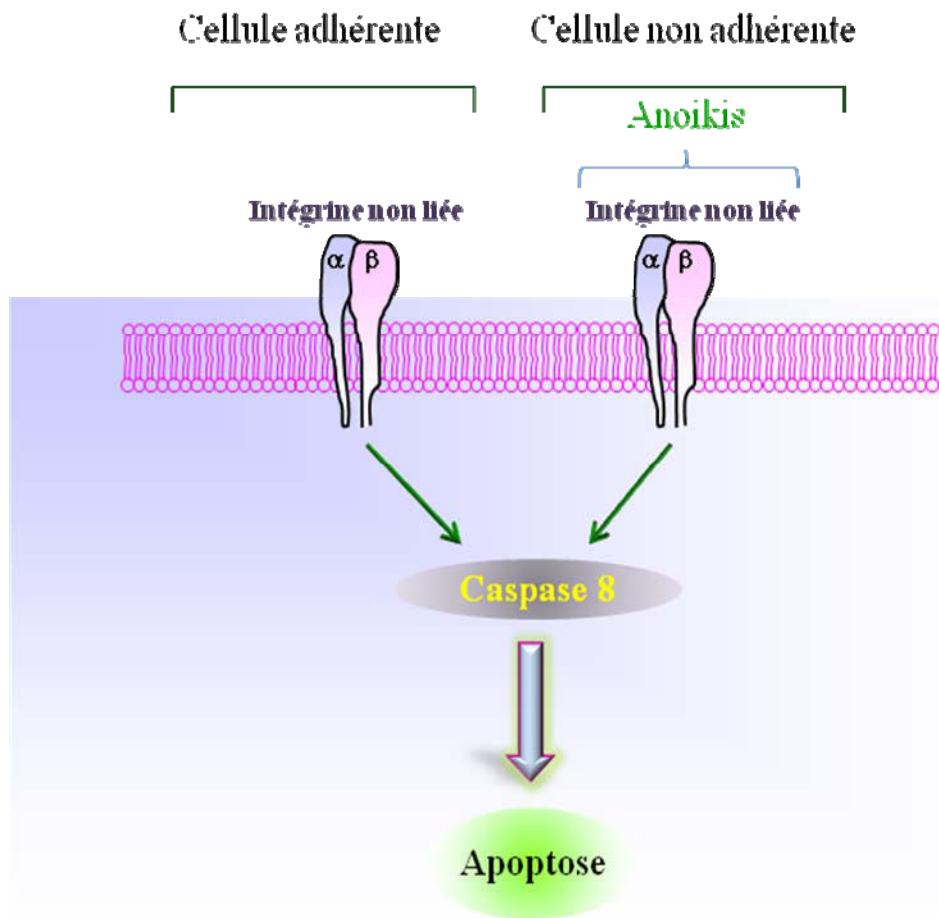


Figure 15. Voie de l'apoptose dans les kératinocytes. D'après Desgrosellier et Cheresch, 2010

4.3.2.3.3.4. Rôle dans l'hyperprolifération et l'inflammation

L'expression des intégrines dans la couche suprabasale, une caractéristique de l'épiderme hyperprolifératif (Figure 14), peut contribuer à l'apparition du psoriasis. Cela a été démontré par la création des souris transgéniques chez lesquelles différentes sous-unités d'intégrines ont été exprimées sous le contrôle de promoteur de l'involucrine (Carroll *et al.*, 1995 ; Romero *et al.*, 1999). Les souris montrent une hyperprolifération épidermique intermittente ainsi que d'autres caractéristiques histologiques du psoriasis comme des infiltrats lymphocytaires.

Des expériences récentes suggèrent un rôle de l'activation de l'intégrine $\beta 1$ dans l'activation de MAPK chez les sujets atteints par le psoriasis (Haase *et al.*, 2001) (Figure 14 B). Dans un épiderme psoriasique humain et murin ou dans le cas de la cicatrisation hyperproliférative MAPK est activée dans les kératinocytes basaux et suprabasaux. L'activation constitutive de MAPK dans les kératinocytes humains en culture révèle une prolifération accrue et certaines anomalies de la différenciation terminale caractéristiques du psoriasis.

Comme la plupart des ligands potentiels de la matrice extracellulaire ne sont pas exprimés dans la suprabasale (Hertle *et al.*, 1992), un second mécanisme par lequel les intégrines peuvent activer MAPK se met en place en stimulant les kératinocytes et en libérant de l'interleukine IL-1 α (Haase *et al.*, 2001) (Figure 14 B). Bien que l'expression suprabasale $\beta 1$ puisse stimuler l'inflammation par l'IL-1 α (Haase *et al.*, 2001), $\alpha \beta 6$ peut contribuer à l'inflammation de la peau grâce à son interaction avec le facteur de croissance TGF- β . On peut constater chez les souris $\beta 6$ -nulles une calvitie mineure et la dégénérescence des follicules pileux qui sont entourés par des foyers de monocytes et des macrophages (Huang *et al.*, 1996b). L'intégrine $\alpha \beta 6$ lie et active TGF- $\beta 1$, tout en restreignant spatialement son activation (Munger *et al.*, 1999). Cette activation pourrait avoir un effet important sur la prolifération de l'épiderme et l'inflammation de la peau.

4.3.2.3.4. Intégrines dans le cancer épithélial

Une grande variété d'intégrines contribue à la progression tumorale. Comme de nombreuses tumeurs solides proviennent des cellules épithéliales, les intégrines exprimées par ces cellules (y compris $\alpha 6 \beta 4$, $\alpha 6 \beta 1$, $\alpha \nu \beta 5$, $\alpha 2 \beta 1$ et $\alpha 3 \beta 1$) sont généralement conservées dans les tumeurs, bien que les niveaux d'expression puissent être différents. Ces intégrines participent généralement à l'adhésion des cellules épithéliales au niveau de la membrane basale et contribuent également à la migration, la prolifération et la survie des cellules tumorales. Toutefois, l'expression des intégrines peut également varier considérablement entre les tissus sains et tumoraux. L'intégrine qui est la plus fortement impliquée dans la carcinogenèse épithéliale est $\alpha 6 \beta 4$ (Mercurio et Rabinovitz, 2001). Sa surexpression est observée, chez l'homme ou la souris atteint par le SCC, dans les kératinocytes suprabasaux ou présents à l'extérieur de la couche la plus proche du stroma tumoral. Dans la périphérie des tumeurs, on peut observer à la fois la surexpression et une perte focale de $\alpha 6 \beta 4$ dans les

couches suprabasales qui est en corrélation avec la perte de la membrane basale (Downer *et al.*, 1993).

L'expression d' $\alpha 6\beta 4$ est stable dans de nombreux cancers invasifs même en l'absence d'hémidesmosomes. Dans certaines cellules cette intégrine est associée à l'actine du cytosquelette (Mercurio et Rabinovitz, 2001). L' $\alpha 6\beta 4$ est mobilisée dans les hémidesmosomes en réponse à des facteurs chimiotactiques comme le facteur de croissance épidermique (EGF) qui est associé à la phosphorylation accrue du domaine cytoplasmique de $\beta 4$ (Mainiero *et al.*, 1996). $\alpha 6\beta 4$ coopère avec les récepteurs de facteur de croissance dans l'activation de la PI3-K, ce qui est essentiel pour l'invasion (Mercurio et Rabinovitz, 2001), d'autres kinases y sont également impliquées (Giancotti, 2000). Pour étudier le rôle de $\alpha 6\beta 4$ dans les tumeurs, une attention particulière doit être accordée, non seulement à son expression, mais aussi à sa localisation (dans les hémidesmosomes ou dehors) et à son état (liée ou non) (Mercurio et Rabinovitz, 2001). Des données ont montré que certaines intégrines peuvent jouer le rôle de suppresseurs de tumeurs : par exemple $\alpha 2\beta 1$. La diminution de l'expression de cette intégrine peut accroître la diffusion des cellules tumorales (Kren *et al.*, 2007). De plus, la réexpression de $\alpha 2\beta 1$ dans les cellules du cancer du sein diminue la capacité invasive et restaure la différenciation des cellules malignes, ce qui suggère que $\alpha 2\beta 1$ pourrait fonctionner comme un suppresseur de tumeur (Zutter *et al.*, 1995). Les autres intégrines $\alpha \nu \beta 3$, $\alpha 5\beta 1$ et $\alpha \nu \beta 6$, sont faiblement exprimées ou indétectables dans les épithéliums adultes, mais peuvent être fortement induites dans certaines tumeurs. Plusieurs études ont montré que dans les tumeurs humaines, il existe une corrélation entre les niveaux d'expression des intégrines et des facteurs de pronostic, tels que la survie des patients et l'apparition de métastases. L'expression des certaines intégrines par les cellules tumorales telles que $\alpha \nu \beta 3$, $\alpha \nu \beta 5$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$, $\alpha 4\beta 1$ et $\alpha \nu \beta 6$ est corrélée avec la progression de la maladie dans divers types de tumeurs (Tableau 6).

Type de tumeur	Intégrines	Phénotypes
Mélanome	$\alpha v\beta 3$, $\alpha 5\beta 1$	Phase de croissance et métastase de ganglion lymphatique
Sein	$\alpha 6\beta 4$, $\alpha v\beta 3$	$\alpha 6\beta 4$: augmentation de la taille tumorale et diminution de la survie $\alpha v\beta 3$: augmentation de métastases osseuses
Prostate	$\alpha v\beta 3$	Augmentation de métastases osseuses
Le cancer du pancréas	$\alpha v\beta 3$	Métastase de ganglion lymphatique
Le cancer de l'ovaire	$\alpha 4\beta 1$, $\alpha v\beta 3$	$\alpha 4\beta 1$: augmentation de métastases péritonéales, $\alpha v\beta 3$: augmentation de la prolifération tumorale
Cervical	$\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 6$	Diminution de la durée de survie des patients
Glioblastome	$\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$	Expression à la périphérie du tissu tumoral et un rôle possible dans l'invasion
Le cancer du poumon	$\alpha 5\beta 1$	Diminution de la durée de survie des patients avec de tumeurs des ganglions lymphatiques sans envahissement ganglionnaire
Colon	$\alpha v\beta 6$	Diminution de la durée de survie des patients

Tableau 6. Les intégrines impliquées dans le cancer. D'après Desgrosellier et Cheresch, 2010

4.3.2.3.5. Intégrines dans l'angiogenèse

Des études *in vitro* et *in vivo* ont montré le rôle d'un certain nombre d'intégrines dans la régulation de la croissance cellulaire, la survie et la migration des cellules endothéliales au cours de l'angiogenèse. Ces intégrines sont $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$, $\alpha 9\beta 1$, $\alpha v\beta 3$ et $\alpha v\beta 5$ (Avraamides *et al.*, 2008).

$\alpha v\beta 3$ a été la première intégrine régulant l'angiogenèse à être découverte (Brooks *et al.*, 1994a). Cette intégrine, fortement exprimée, est localisée dans les vaisseaux sanguins de biopsies tumorales, et n'est pas présente sur les vaisseaux des tissus normaux. Son expression au niveau des cellules endothéliales est stimulée par des facteurs de croissance angiogéniques

tels que le β FGF, $TNF\alpha$ et IL8. $\alpha v\beta 3$ est surexprimée dans l'endothélium des tumeurs, des blessures et des sites d'inflammation (Brooks *et al.*, 1994a).

Plusieurs approches expérimentales indiquent que $\alpha v\beta 3$ a un rôle clé dans la migration et la survie des cellules endothéliales au cours de l'angiogenèse (Brooks *et al.*, 1994a ; Brooks *et al.*, 1994b). L' $\alpha v\beta 3$ intégrine est exprimée en réponse à des facteurs de croissance angiogéniques et tumoraux dans la membrane chorio-allantoïde de plusieurs modèles de tumeurs (la souris, le lapin et l'homme). Les antagonistes d' $\alpha v\beta 3$ inhibent l'angiogenèse et la croissance tumorale dans une variété de cancers de modèles animaux (Brooks *et al.*, 1994a ; Brooks *et al.*, 1994b ; Brooks *et al.*, 1995 ; Friedlander *et al.*, 1995). Ses antagonistes induisent l'apoptose des cellules endothéliales, en augmentant l'activité de p53 (suppresseur de tumeur), l'activité de p21 (inhibiteur du cycle cellulaire) et en diminuant le niveau de l'expression des protéines anti-apoptotiques BAX (BCL2-associated protein X) (Stromblad *et al.*, 1996). D'autres études montrent que les antagonistes d' $\alpha v\beta 3$ activent l'apoptose par une voie dépendante de la caspase 8 (Stupack *et al.*, 2001).

L'intégrine $\alpha 5\beta 1$ est faiblement exprimée au niveau de l'endothélium normal mais son expression augmente significativement au cours de l'angiogenèse tumorale chez la souris et l'homme (Kim *et al.*, 2000). L'expression d' $\alpha 5\beta 1$ est induite en réponse à une variété de facteurs angiogéniques tels que le β FGF, l'IL8 et DEL1 (une protéine de la matrice extracellulaire, également connue sous le nom EDIL3), mais pas par VEGF (Kim *et al.*, 2000 ; Boudreau et Varner, 2004). Les antagonistes d' $\alpha 5\beta 1$ inhibent les tumeurs (Kim S *et al.*, 2000), l'angiogenèse de la cornée (Muether *et al.*, 2007) et de la choroïde (Umeda *et al.*, 2006) chez les poussins et les souris, ce qui conduit à l'inhibition de la croissance tumorale.

L' $\alpha 4\beta 1$ est exprimée au niveau des néo-vaisseaux des tumeurs humaines et murines et en réponse à VEGF, bFGF, IL1 β et TNF. Les antagonistes de cette intégrine bloquent la néo-vascularisation tumorale et conduit à une diminution de la croissance tumorale chez les souris et les poussins (Garmy-Susini *et al.*, 2005).

L'intégrine $\alpha 9\beta 1$ est exprimée dans les épithéliums, les ostéoclastes, les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales. De récentes études montrent que cette intégrine favorise l'angiogenèse par un mécanisme unique en se liant directement à VEGFA.

Les anticorps bloquant $\alpha 9\beta 1$ suppriment l'angiogénèse induite par VEGFA (Vlahakis *et al.*, 2007).

Des donnés ont montré que chez les animaux normaux, le traitement VEGFA aboutit à la surexpression d' $\alpha 1\beta 1$ et $\alpha 2\beta 1$ sur les cellules endothéliales vasculaires. Les anticorps bloquant ces intégrines réduisent l'angiogénèse induite par VEGFA et la croissance tumorale *in vivo* (Senger *et al.*, 1997).

In vivo, $\alpha 6\beta 1$ est exprimée à des niveaux élevés dans les cellules endothéliales des capillaires (Lee *et al.*, 2006). *In vitro*, les inhibiteurs de la sous-unité $\alpha 6$ empêchent la formation de tubes de cellules endothéliales suggérant un rôle de $\alpha 6$ dans l'angiogénèse.

L'intégrine $\alpha 6\beta 4$ n'a pas d'incidence sur la prolifération des cellules endothéliales, mais est nécessaire à leur adhésion et leur migration. Par ailleurs, la perte spécifique de $\beta 4$ dans les cellules endothéliales supprime la translocation du facteur nucléaire NF- κ B induit par la voie phospho-ERK (Nikolopoulos *et al.*, 2004). Ces études suggèrent que l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ est une nouvelle cible pour les thérapies anti-angiogéniques. Les antagonistes d' $\alpha 6$ et de petits ARN interférents inhibant l'angiogénèse, il est possible que l'intégrine $\alpha 6\beta 1$ favorise l'angiogénèse.

4.4. Epidermolyses bulleuses

Les épidermolyses bulleuses (EB) sont des affections cutanées héréditaires qui se caractérisent par un décollement de la peau et/ou des muqueuses sous forme de bulles lors du moindre frottement ou traumatisme. En se basant sur des caractéristiques cliniques et le niveau de clivage des lésions, on dénombre 3 principaux groupes : l'EB simple, l'EB jonctionnelle et l'EB dystrophique. Ces dernières peuvent varier d'une forme peu sévère à des formes mutilantes, voire mortelles. Elles sont causées par des mutations dans plusieurs gènes (Fine *et al.*, 2000).

4.4.1. Type simple

Il est divisé en deux formes : dominante et récessive. La plupart des types dominants sont associés à des mutations faux-sens des gènes codants pour une kératine (K5 ou K14) dans les cellules basales. Ces mutations entraînent la formation de bulles ainsi que des perturbations dans les cellules. Les principaux sous-types ont des caractéristiques cliniques distinctives :

- Type Weber-Cockayne avec des lésions localisées au niveau des pieds et des mains,
- Type Koebner avec atteinte plus diffuse,
- Type Dowling-Meara ou herpétiforme, parfois grave en période néonatale,
- EB simple avec une pigmentation mouchetée, des taches brunes apparaissent alternées avec des zones hypopigmentées, particulièrement au niveau du tronc ou des mains. Ces troubles de la pigmentation disparaissent à l'âge adulte (Moog *et al.*, 1999).

Les autres types dominants incluent un type superficiel, avec une perturbation de la couche granuleuse (Fine *et al.*, 1989) et un type acantholytiques, avec une hyperkératose, des bulles sur la plante des pieds et la paume des mains et des caractéristiques histologiques de l'acantholyse (Hoffman *et al.*, 1995).

Les types récessifs incluent :

- Un type avec dystrophie musculaire du à une anomalie dans la plectine, une protéine impliquée dans la formation d'hémidesmosomes (Shimizu *et al.*, 1999 ; Rouan *et al.*, 2000),
- Un type sans dystrophie musculaire, causé par une mutation homozygote non-sens de K14 (Corden *et al.*, 1998).

4.4.2. Type jonctionnelle

La plupart des EB jonctionnelles sont de transmission autosomique récessive avec une perturbation de la jonction dermo-épidermique. Elles sont divisées en deux types principaux:

- Type Herlitz, associé à la mort prématurée, est du à des anomalies du gène de la laminine-5, principalement par des mutations homozygotes de type codon stop prématuré (CSP) (Fine *et al.*, 1991 ; Kon *et al.*, 1998 ; Takizawa *et al.*, 2000a ; Nakano *et al.*, 2000).
- Type non-Herlitz, relativement bénin associé à un bon pronostic, est du à des anomalies génétiques de la laminine-5 (Takizawa *et al.*, 2000b) soit du collagène XVII (Pulkkinen et Uitto, 1998 ; Tasanen *et al.*, 2000).

Un autre type EB récessif jonctionnel est associé à une atrésie pylorique. La cause de cette maladie est le gène codant pour l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ (Takizawa *et al.*, 1997). D'autres anomalies génétiques telles que les mutations CSP, les combinaisons entre ces mutations et des délétions ou des mutations faux-sens ont également été décrites.

4.4.3. Type dystrophique

Le type dystrophique est divisé en deux formes : autosomique dominante et autosomique récessive. Tous ces types sont causés par des anomalies au niveau d'ancrage fibrillaire de la protéine collagène VII, et dans la plupart des cas, des mutations dans le gène COL7A1.

- Les formes dominantes de ces anomalies consistent principalement en des substitutions de glycine (Lee *et al.*, 2000).
- Les formes récessives sont des dérivées de plusieurs anomalies telles que des mutations CSP, des suppressions, des mutations faux-sens, des substitutions de glycine et diverses autres anomalies homozygotes (Tamai *et al.*, 1997 ; Tamai *et al.*, 1999 ; Masunaga *et al.*, 2000).

5. Métalloprotéinases

Les métalloprotéinases (MMP) sont une famille de 25 enzymes, dont 24 présentes chez les mammifères (Birkedal-Hansen *et al.*, 1993 ; Parks *et al.*, 2004). Ce sont des enzymes qui possèdent une activité protéolytique dépendante d'un ion zinc et des ions calcium (Huxley-Jones *et al.*, 2007). Chacune de ces enzymes est capable de dégrader au moins un composant de la matrice extracellulaire. Pour cette raison on les a appelées : les métalloprotéinases de la matrice extracellulaire.

5.1. Structure et fonctions

Les MMP peuvent être subdivisées en huit groupes structuraux distincts : cinq correspondent à des MMP sécrétées et trois à des MMP membranaires. Cette subdivision correspond à la classification basée sur la structure de ces protéinases (Figure 16). Les MMP ont :

- un domaine commun avec :
 - un peptide signal les dirigeant vers le réticulum endoplasmique,
 - un propeptide qui contient un groupement thiol (SH) interagissant avec un ion Zn^{2+} conférant à l'enzyme sa nature zymogène inactive,
- un domaine catalytique possédant un site de fixation pour le zinc (Zn),
- un domaine C-terminal de type hémopexine (*hemopexin-like domain*) lequel est connecté au domaine catalytique par une région charnière.

Cette famille a plusieurs fonctions :

- Effets anti-angiogéniques via la dégradation de la matrice extracellulaire, mais également la libération d'inhibiteurs de l'angiogenèse.
- Régulation de la croissance cellulaire par le clivage des récepteurs, les facteurs de croissance de la surface cellulaire, la libération des facteurs de croissance séquestrés dans le MEC ou le déclenchement de la signalisation des intégrines.
- Régulation de l'apoptose.
- Régulation de la motilité cellulaire en révélant des signaux cryptique à la matrice, ou en clivant des molécules d'adhésion.
- Dans le système immunitaire et la défense de l'hôte, modulation de la bioactivité des chimiokines.

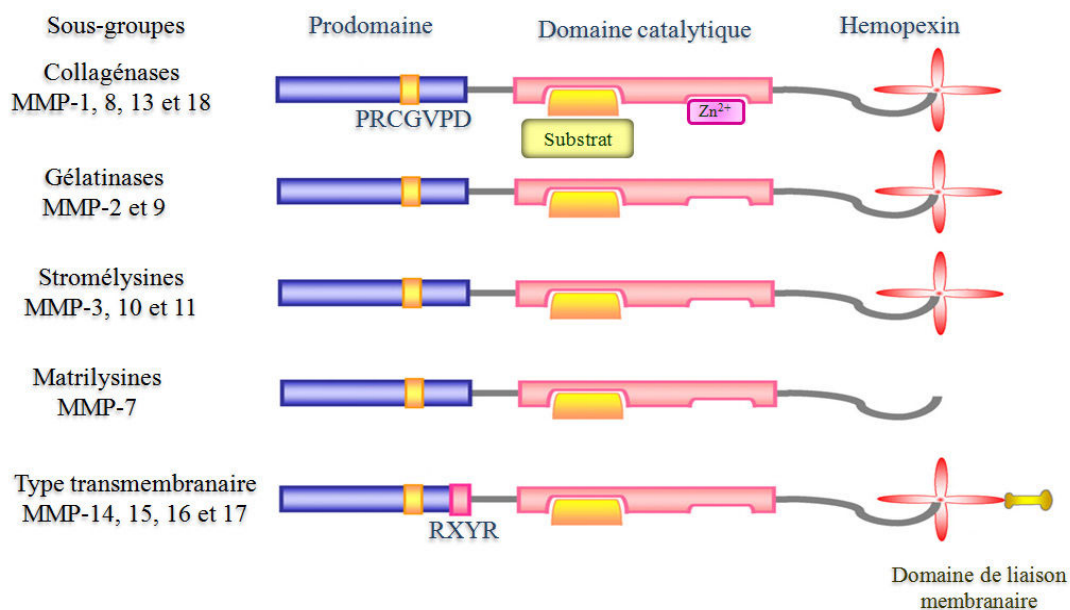


Figure 16. Famille des Métalloprotéinases. D'après Gill et Parks, 2008. PRCGXPD : motif cystéine (maintient les MMP dans leur forme zymogène proMMP)

5.2. Classification

5.2.1. Collagénases

Le sous-groupe des collagénases comprend la MMP-1, la MMP-8, la MMP-13 et la MMP-18 (chez *Xenopus*). Ces collagénases sont capables de cliver les collagènes de type I, II et III mais également d'autres molécules de la matrice extracellulaire et des protéines solubles. Elles sont composées de trois chaînes polypeptidiques disposées en triple hélice rigide, ce domaine les rendant résistant à la dégradation par les protéases (Owen *et al.*, 2004). La MMP-1 (collagénase-1) fut le premier membre identifié des MMP. Elle est produite par différents types cellulaires, par exemple, les fibroblastes, les kératinocytes, les cellules endothéliales, les macrophages, les hépatocytes, les chondrocytes, et les ostéoblastes (Visse et Nagase, 2003). L'expression de MMP-1 est détectée au cours de nombreux processus physiologiques incluant le développement embryonnaire et la réparation, ainsi qu'au cours de processus pathologiques comme les ulcères cutanés chroniques et de nombreux types de tumeurs malignes. La MMP-1 clive les collagènes de types I, II, III, VII, VIII et X, l'aggrécane, ainsi que les inhibiteurs de sérines protéases et de la macroglobuline- α (Ala-aho et Kahari, 2005). La MMP-1 peut aussi activer PAR-1 (*Protease Activated Receptor-1*) par

clivage du dipeptide Arg-Ser, clivé également par la thrombine, ce qui permettrait la croissance et l'invasion de cellules de carcinome du sein (Boire *et al.*, 2005).

La MMP-8 (collagénase-2) est synthétisée par les neutrophiles lors de leur maturation dans la moelle osseuse, stockée dans leurs granules intracellulaires et libérée en réponse à des stimuli externes (Hasty *et al.*, 1990). De plus, la MMP-8 est exprimée par les chondrocytes du cartilage articulaire, les cellules épithéliales bronchiques et les monocytes lors de bronchites. Les substrats majeurs de MMP-8 sont les collagènes I, II et III et des protéines non matricielles telles que les serpinines, la bradykinine, l'angiotensine I, et la substance P (Nguyen *et al.*, 1994).

La MMP-13 (collagénase-3) a été clonée à partir de tissus de cancer du sein (Freije *et al.*, 1994). Par rapport aux autres MMP, elle possède un large spectre de spécificité de substrats et un profil d'expression restreint. Elle clive les collagènes fibrillaires de type I, II et III, la gélatine, les collagènes de type IV, IX, X et XIV, la tenascine C, la fibronectine, l'aggrécane, le versicane, et l'ostéonectine (Ala-aho et Kahari, 2005). La MMP-13 peut activer des chimiokines comme MCP-3 (*monocyte chemoattractant protein-3*) et SDF-1 (*stromal cell-derived factor-1*) (McQuibban *et al.*, 2000 ; McQuibban *et al.*, 2001) et semble impliquée dans l'activation du TGF- β 3 (Deng *et al.*, 2000). Son expression est limitée au remodelage de la matrice extracellulaire, le développement osseux foetal et post-natal, la réparation et certains processus pathologiques mettant en jeu la destruction du collagène (paradontite, athérosclérose, ulcères cutanés) (Ala-aho et Kahari, 2005).

5.2.2. Gélatinases

Les gélatinases correspondent à MMP-2 (gélatinase A) et MMP-9 (gélatinase B). Elles comprennent dans leur domaine catalytique trois séquences répétitives de type fibronectine II (FN II) qui permet la liaison à la gélatine et aux collagènes (Folgueras *et al.*, 2004). Ces deux gélatinases sont capables de dégrader les collagènes IV, V, VII, X, XI et XIV, la gélatine, l'élastine, le noyau protéique des protéoglycanes, la protéine basique de la myéline, la fibronectine, la fibrilline-1, et les précurseurs de TNF- α et d'IL-1 β . Les gélatinases ont un rôle important dans le remodelage de la matrice extracellulaire dans divers états physiologiques, tels que l'implantation et la cicatrisation (Hashizume, 2007).

La MMP-2 présente la particularité de digérer le collagène IV, ainsi que certaines glycoprotéines non collagéniques de la matrice extracellulaire (Patterson *et al.*, 2001 ; Aimes and Quigley, 1995). La MMP-2 est unique parmi les MMP puisqu'elle est exprimée de manière constitutive par un grand nombre de cellules différentes, y compris les fibroblastes, les kératinocytes, cellules endothéliales, les chondrocytes, les ostéoblastes et les monocytes (Hashizume, 2007). Elle possède une distribution tissulaire ubiquitaire et un mode d'activation qui diffère de celui des autres MMP. La forme active de la MMP-2 a une masse moléculaire de 62 kDa alors que la pro-MMP 2 a une masse moléculaire de 72 kDa. Dans la majorité des cancers, la MMP-2 serait sécrétée par les fibroblastes, puis recrutée au niveau des cellules tumorales par le biais de l'intégrine $\alpha\beta3$. En plus des composants matriciels qu'elle dégrade, la MMP-2 est aussi capable d'activer le précurseur du TNF- α (Gearing *et al.*, 1995) et de dégrader l'IL-1 β (Ito *et al.*, 1996). La MMP-2 est capable d'activer la MMP-9 et la MMP-13 (Fridman *et al.*, 1995). Son rôle dans l'invasion tumorale et la dissémination métastatique a été largement décrit (Stetler-Stevenson, 1994 ; Chang et Werb, 2001 ; Egeblad et Werb, 2002). L'implication de la MMP-2 dans l'invasion tumorale a été renforcée par l'étude d'Itoh et al. qui a montré que des souris déficientes en MMP-2 ont une angiogenèse et une progression tumorale réduites (Itoh *et al.*, 1998). La MMP-2 joue aussi un rôle dans la prolifération et la différenciation, l'adhérence et la migration (Yu *et al.*, 1997). Cette protéine semble jouer un rôle important dans l'ostéogenèse chez l'homme. Ce dernier a été confirmé par l'apparition d'une forme autosomique récessive de l'ostéolyse multicentrique suite à une mutation au niveau de MMP-2 entraînant l'absence d'enzyme active. Cette maladie rare provoque la destruction et la résorption des os touchés (Visse et Nagase, 2003).

La MMP-9 a une spécificité de substrat très semblable à celle de la MMP-2 dans les neutrophiles (Sopata et Danciewicz, 1974). En dehors des nombreux composés matriciels qu'elle dégrade, la MMP-9 régule aussi l'activité de cytokines et d'hormones clivant l'IL-1 β et la substance P (Backstrom et Tokes, 1995 ; Ito *et al.*, 1996). Elle clive également le peptide amyloïde β (Backstrom *et al.*, 1996). Un grand nombre de facteurs de croissance et de cytokines modifient l'expression de la MMP-9 dans de nombreux types cellulaires, comme le TGF- β , l'EGF, l'IL-1 β , l'IL-2, le TNF- α (Mook *et al.*, 2004). MMP-9 joue un rôle important dans divers processus comme l'implantation trophoblastique, le développement osseux, l'inflammation, la réparation (Buisson *et al.*, 1996), l'arthrite et la maladie d'Alzheimer (Lim *et al.*, 1997). Elle a aussi été impliquée dans la progression du cancer, en régulant les processus physiologiques au cours des métastases, tels que l'adhésion cellulaire, la migration,

l'invasion tissulaire, intra et extravasation, et l'angiogenèse (Bernhard *et al.*, 1994 ; Legrand *et al.*, 1999 ; McCawley et Matrisian, 2001). Ainsi, l'expression de MMP-9 est retrouvée augmentée dans les tumeurs cutanées, du poumon, du sein, du foie, de la prostate, du cerveau, de la moelle osseuse et de l'os (Turpeenniemi-Hujanen, 2005). Des expériences menées avec des souris KO a permis de montrer son rôle *in vivo* : les souris déficientes sont résistantes aux pemphigoïdes bulleuses expérimentales et sont moins susceptibles de développer une encéphalomyélite par rapport aux souris sauvages (Liu *et al.*, 1998 ; Dubois *et al.*, 1999).

5.2.3. Stromélysines

Les stromélysines (MMP-3, -10 et -11) ont une organisation en domaine similaire à celle des collagénases.

Les MMP-3 (stromélysine-1) et -10 (stromélysine-2) ont une structure identique, un spectre large et similaire de substrats (collagènes de type III, IV, IX, et X, gélatine, laminine et protéoglycane), et participent toutes les deux à l'activation des pro-MMP (Visse et Nagase, 2003). La MMP-3 est produite préférentiellement par les cellules stromales et sa surexpression est associée à l'invasion et aux métastases de divers types de cancer ainsi qu'à la progression des plaques d'athérosclérose (Sternlicht *et al.*, 2000).

La MMP-10 semble exprimée par les cellules tumorales elles-mêmes dans différents carcinomes (Kerkela *et al.*, 2001 ; Mathew *et al.*, 2002).

La MMP-11, pour sa part, a une activité plus faible sur les molécules de la matrice extracellulaire (Murphy *et al.*, 1993) mais est capable de cliver les serpinines de façon plus efficace (Pei *et al.*, 1994). Une isoforme intracellulaire de 40 kDa de MMP-11 (β -stromélysine-3) a été identifiée dans des cellules en culture et dans le placenta mais sa fonction demeure méconnue (Luo *et al.*, 2002). L'expression de la MMP-11 est associée au remodelage durant l'embryogenèse, la réparation, l'involution des tissus et la métamorphose. MMP-11 semble posséder une fonction anti-apoptotique qui permet la survie des cellules cancéreuses (Boulay *et al.*, 2001 ; Wu *et al.*, 2001). Ainsi, MMP-11 pourrait intervenir dans les étapes initiales du processus d'invasion (Rio, 2005).

5.2.4. Matrilysines

Les matrilysines MMP-7 et 26 ne possèdent pas de domaine hémapexine.

La MMP-7 (matrilysine-1) dégrade à la fois des composants de la matrice extracellulaire (collagène de type IV, laminine, entactine, ténascines C, vitronectine, fibronectine, protéoglycane) (Wilson et Matrisian, 1996) et des molécules présentes à la surface cellulaire telles que la pro- α -défensine, le Fas-ligand, le pro-TNF- α et l'E-cadhérine (Remy et Trespeuch, 2005). Présente dans certains tissus à caractère glandulaire exocrine comme la glande mammaire, la prostate, le foie ou le pancréas, elle intervient dans la réparation tissulaire et la différenciation osseuse mais est surtout remarquable par sa présence ubiquitaire dans divers cancers notamment digestifs. MMP-7 est notamment impliquée dans la formation des tumeurs et dans la dégradation tissulaire consécutive à l'extravasation des cellules tumorales (Remy et Trespeuch, 2005). Contrairement aux autres MMP principalement stromales, elle est synthétisée par les cellules épithéliales et participe à l'invasion et la production de métastases (Yamashita *et al.*, 1998).

La MMP-26 (ou endométrase ou matrilysine-2) est exprimée dans les cellules normales de l'endomètre et dans certains carcinomes (endomètre, prostate, sein) (Zhao *et al.*, 2003 ; Zhao *et al.*, 2004). Elle digère quelques molécules de la matrice extracellulaire (collagène de type IV, gélatine, fibronectine) mais, à la différence des autres MMP, elle est stockée en grande quantité dans la cellule (Marchenko *et al.*, 2004).

5.2.5. Métalloprotéinases de type transmembranaire

Les MT-MMP incluent six MMP de type transmembranaire: quatre sont des protéines transmembranaires de type I (MMP-14, 15, 16, et 24) et deux sont ancrées au glycosyl phosphatidyl inositol (GPI) (MMP- 17 et 25) (Visse et Nagase, 2003). Toutes les MT-MMP hormis la MT4-MMP sont capables d'activer la pro-MMP-2. Ces enzymes peuvent aussi digérer un certain nombre de molécules de matrice extracellulaire, et MT1-MMP possède également une activité collagénase sur les collagènes de type I, II et III (Ohuchi *et al.*, 1997 ; Tam *et al.*, 2002).

La MT1-MMP (MMP-14) induit l'invasion et la prolifération des cellules tumorales dans une matrice de collagène (Hotary *et al.*, 2003 ; Sabeh *et al.*, 2004). La forme tronquée

privée de la partie C-terminale contenant la partie transmembranaire (MT1-MMP soluble) en est incapable. Le site catalytique de la protéine est responsable de son activité protéolytique (Ohuchi *et al.*, 1997). Cependant, son activité collagénase est modulée par d'autres domaines de la protéine. Notamment, le domaine hémopexine dans la partie C-terminale permettrait de lier le collagène de type I et de dérouler la triple hélice pour le clivage (Tam *et al.*, 2002 ; Tam *et al.*, 2004). D'autre part, l'unique cystéine présente dans le domaine cytoplasmique est palmitoylée de manière post-traductionnelle et cette modification est essentielle pour la fonction de la MT1-MMP dans la migration cellulaire (Anilkumar *et al.*, 2005). Une fois apparue à la surface cellulaire, MT1-MMP est rapidement internalisée. La MT1-MMP a été identifiée comme un activateur spécifique de la pro-MMP-2 dans les tumeurs et joue un rôle important dans l'invasion de la membrane basale par les cellules tumorales (Sato *et al.*, 1994). De par son rôle dans l'activation de la MMP-2, MT1-MMP est associée à un certain nombre de cancers : adénocarcinomes de sein, cancers broncho-pulmonaires et cancers cervicaux (Gilles *et al.*, 1996 ; Nawrocki *et al.*, 1997 ; Polette *et al.*, 1997; Polette et Birembaut, 1998). En outre, la MT1-MMP joue un rôle crucial dans l'angiogenèse tumorale (Sounni *et al.*, 2002). Les souris déficientes en MT1-MMP présentent des anomalies du squelette au cours du développement post-natal. Ces anomalies sont très probablement liées au manque de l'activité collagénase de la MT1-MMP (Holmbeck *et al.*, 1999).

MT5-MMP est spécifique du cerveau et principalement exprimée dans le cervelet (Sekine-Aizawa *et al.*, 2001). MT6-MMP (MMP-25) est exprimée presque exclusivement dans les leucocytes du sang périphérique et dans certaines tumeurs du cerveau (Velasco *et al.*, 2000 ; Pei, 1999).

➤ Autres MMP

Sept membres MMP ne sont classés dans aucune des catégories ci-dessus. La métalloélastase (MMP-12) est principalement exprimée dans les macrophages (Shapiro *et al.*, 1993) et est essentielle à leur migration (Shipley *et al.*, 1996). En plus de l'élastine, MMP-12 digère aussi un certain nombre des molécules de la matrice extracellulaire. MMP-19, aussi appelée RASI (*Rheumatoid arthritis Synovial Inflammation*), est trouvée dans les lymphocytes et le plasma de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde ou de lupus érythémateux (Sedlacek *et al.*, 1998). Elle est également exprimée dans des kératinocytes en prolifération lors de la cicatrisation (Sadowski *et al.*, 2003). L'énamélysine (MMP-20) est

exprimée dans l'émail néo-synthétisé des dents et digère l'amélogénine (Ryu *et al.*, 1999). Un trouble génétique (la formation défectueuse de l'émail) est provoqué par des mutations aux sites de clivage de la MMP-20 (Li *et al.*, 2001). La MMP-21 a été découverte à l'origine chez le xénope (Yang *et al.*, 1997) et plus récemment chez la souris et l'homme (Marchenko *et al.*, 2003). Elle est exprimée invariablement dans les tissus fœtaux et adultes ainsi que dans les cellules de carcinomes squameux et basaux (Ahokas *et al.*, 2003). Elle digère la gélatine mais aucun autre substrat de la matrice extracellulaire n'a encore été identifié. La MMP-22 a été clonée à partir de fibroblastes de poulet, puis la protéine homologue humaine identifiée. Peu de choses sont connues au niveau de son activité. La MMP-23 est la seule qui possède un domaine riche en cystéine suivi par un domaine immunoglobuline-like. La dernière ajoutée à la famille MMP est l'épilysine ou MMP-28, principalement exprimée par les kératinocytes. Les différents niveaux de son expression dans la peau intacte et lésée suggèrent que MMP-28 peut avoir un rôle dans l'hémostase des tissus et la cicatrisation (Marchenko et Strongin, 2001 ; Lohi *et al.*, 2001 ; Saarialho-Kere *et al.*, 2002).

5.3. Inhibiteurs de métalloprotéinases

L'activité des métalloprotéinases est régulée par des inhibiteurs endogènes spécifiques, les TIMP (*Tissue Inhibitor of Metalloproteinase*), et non spécifiques comme l' α_2 -macroglobuline plasmatique et d'autres molécules telles que la thrombospondine-2 (TSP-2) RECK (*Reversion inducing Cysteine riche protein with Kasal motifs*) (Egeblad et Werb, 2002 ; Takahashi *et al.*, 1998).

Quatre TIMP (TIMP-1 à 4) ont été identifiés chez les vertébrés (Brew *et al.*, 2000). Leur expression est régulée au cours du développement et du remodelage tissulaire. Les TIMP sont constitués d'un domaine N-terminal et d'un domaine C-terminal contenant trois ponts disulfures. Les TIMP inhibent toutes les MMP à l'exception de TIMP-1 qui inhibe peu la MT1-MMP, la MT3-MMP la MT5-MMP et la MMP-19.

6. Cicatrisation

La cicatrisation est un processus biologique qui permet la réparation de tissus endommagés par une blessure. Sa progression comporte quatre phases interdépendantes : l'hémostase, l'inflammation, la prolifération (ou granulation) et le remodelage entrecroisé, (Martin, 1997) (Figure 18). La cicatrisation peut durer de 8 à 14 jours, voire 21 jours, selon la taille de la plaie. Toutefois, le résultat final ne permet pas de retrouver la fonctionnalité et l'esthétique initiale.

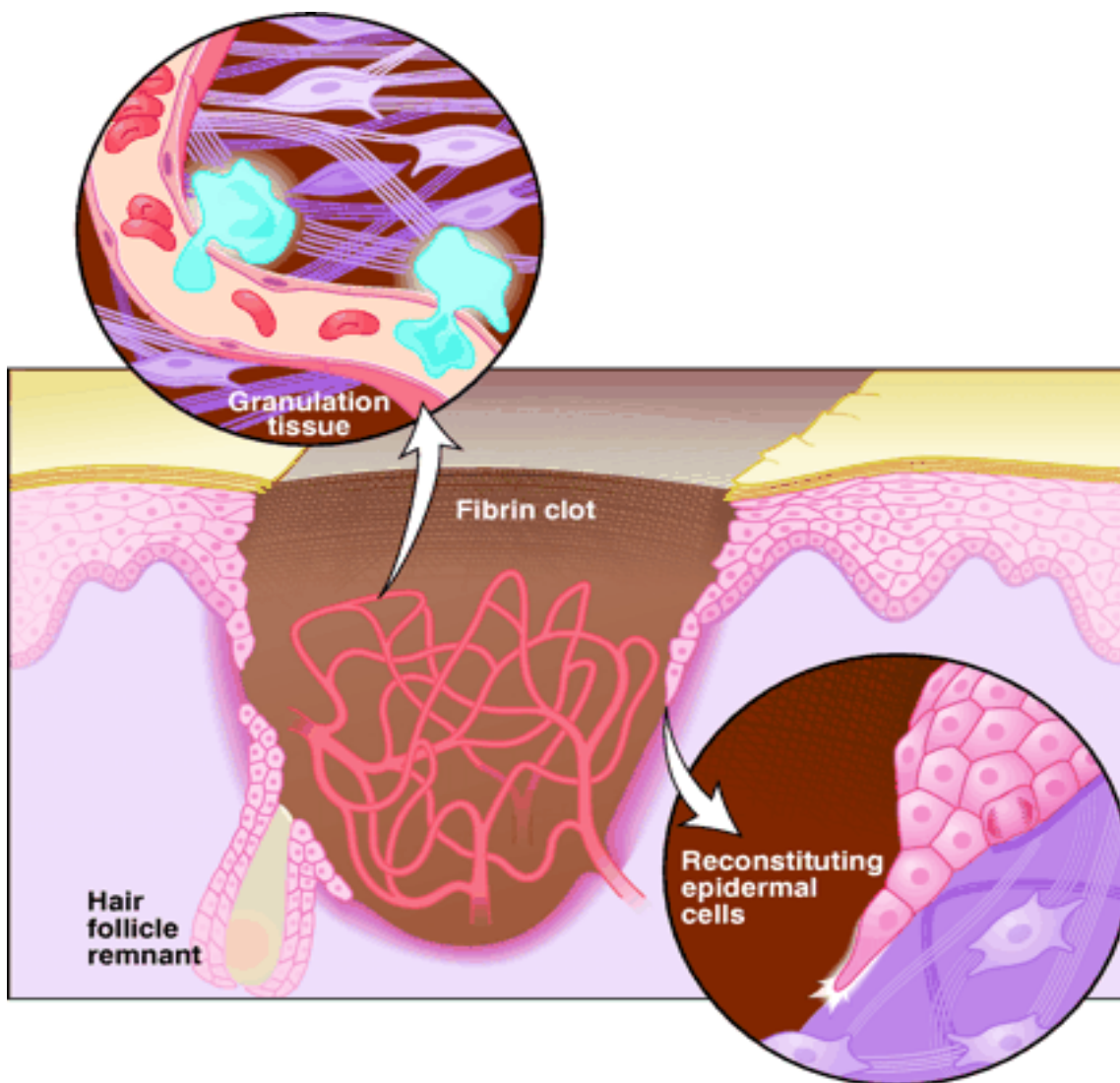


Figure 17. Schéma représentant les différentes phases de la cicatrisation. D'après Martin, 1997.

6.1. Hémostase

Au moment de la blessure, la rupture des vaisseaux sanguins entraîne l'épanchement des constituants du sang. La coagulation traduit la réaction cellulaire immédiate à l'agression du tégument. Cette réaction est amorcée par l'activation de l'agrégation de plaquettes ordonnant aux vaisseaux sanguins de former un caillot stable. Ce caillot rétablit l'hémostase et forme la matrice extracellulaire dans le lit de la plaie (une structure pour la migration des cellules) (Martin, 1997). Il est constitué de plaquettes intégrées dans un maillage de fibres obtenues par clivage du fibrinogène, avec de petites quantités de fibronectine plasmique, de vitronectine et de thrombospondine (protéine volumineuse provenant de la sécrétion des plaquettes et jouant un rôle important dans l'agrégation de celles-ci). Les plaquettes sécrètent des facteurs de croissance (PDGF, TGF- α et TGF- β), des cytokines et des protéines de la matrice extracellulaire. Ces médiateurs recrutent les macrophages et les neutrophiles qui sécrètent à leur tour une batterie de facteurs spécifiques nécessaires aux autres étapes (Santoro, 2005).

6.2. Inflammation

Les neutrophiles et les macrophages sont attirés par une grande variété de signaux chimiotactiques. Ils comprennent, non seulement, les facteurs de croissance libérés par les plaquettes, mais aussi des indices divers tels que des peptides bactériens, des produits dérivés de la protéolyse, de la fibrine et d'autres composants de la matrice (Santoro, 2005). La fonction attribuée à ces cellules est la destruction des bactéries, des corps étrangers et des débris cellulaires. Ces cellules sont ensuite éliminées de la plaie par les macrophages. Ces derniers font appel à différentes cellules telles que les fibroblastes et les cellules endothéliales.

6.3. Prolifération

Elle consiste en trois étapes différentes : la granulation, la contraction et la réépithélialisation.

6.3.1. Granulation

Cette étape est marquée par la prolifération et la migration des cellules qui interviendront dans le reste du processus de la réparation. Cette population cellulaire donne naissance à un tissu d'aspect granulaire (tissu de granulation). Ce tissu est composé de

plusieurs types cellulaires : de macrophages, de fibroblastes et de cellules endothéliales. Une fonction est attribuée à chaque type cellulaire :

- les macrophages libèrent constamment des facteurs chimiotactiques et des facteurs de croissance.
- les fibroblastes construisent une matrice cellulaire nécessaire pour accueillir de nouvelles cellules et favoriser ainsi la migration cellulaire.
- les cellules endothéliales déclenchent la formation de bourgeons vasculaires nécessaires à la construction de nouveaux vaisseaux capillaires.

6.3.2. Contraction

C'est un mécanisme par lequel la taille de plaie est réduite grâce au mouvement centripète du tissu entourant la plaie. Les fibroblastes jouent un rôle important dans cette étape.

6.3.3. Réépithélialisation

C'est la réapparition du nouvel épithélium lors de la cicatrisation. Elle consiste en la migration et la prolifération des kératinocytes à la périphérie de la plaie. La migration des kératinocytes subit différentes modifications (Singer et Clark, 1999) :

- des cassures au niveau des liaisons formées par les hémidesmosomes entre l'épiderme et la membrane basale,
- des rétractions des tonofilaments (filaments intermédiaires) intracellulaires et des filaments de kératine,
- Une dissolution de la plupart des desmosomes,
- la formation de lamellipodes (filaments cytoplasmiques d'actine) et d'autres contacts focaux.

La prolifération et la migration des kératinocytes sont régulées par trois principaux acteurs moléculaires: les facteurs de croissance, les intégrines et les métalloprotéinases. La migration des kératinocytes aboutit à l'activation des intégrines. Ces récepteurs interagissent avec des protéines de la matrice extracellulaire qui s'intercalent dans le centre ou à la périphérie de la plaie. En outre, l'expression et l'activation des MMP favorisent la dégradation et la modification des protéines de la matrice extracellulaire, facilitant la migration des cellules (Sternlicht et Werb, 2001). La réépithélialisation se termine par la migration des

cellules des lèvres vers l'intérieur de la plaie. Ainsi, les cellules de l'épiderme reprennent leur morphologie et leurs fonctions originales.

6.3.3.1. Rôle des intégrines et protéines de la matrice extracellulaire

Dans le but de réparer un épithélium endommagé, la dissociation des hémidesmosomes, initiée par la libération des contacts avec les membranes basales, est indispensable à la migration cellulaire. Comme cela a été mentionné auparavant, les intégrines et les protéines de la matrice cellulaire jouent un rôle crucial dans les interactions hémidesmosomes/membrane basale. Ceci permet de mettre en évidence certains rôles de ces protéines dans le processus de la cicatrisation :

- L'interaction entre ces intégrines et leurs ligands conduit à la formation de lamellipodes, de filopodes et de fibres d'actine. Ces formations ont un impact direct sur la cicatrisation des plaies, car les lamellipodes et filopodes sont nécessaires aux projections cytoplasmiques qui facilitent la migration, tandis que les filaments d'actine servent à tirer les bords de la plaie afin de les réunir (Larjava *et al.*, 1996). Les intégrines aident les kératinocytes à créer des liaisons avec les collagènes dermiques (O'Toole, 2001).

- Le désassemblage des hémidesmosomes est assuré par la laminine-332 présente dans la plaie. Le rôle de la laminine-332 est soutenu par l'expression du TGF- β et INF γ . La migration des kératinocytes est initiée par un basculement de liaison entre la laminine-332 et ses récepteurs : la laminine-332 se lie à $\alpha 3\beta 1$ au lieu de $\alpha 6\beta 4$. Au même moment, une phosphorylation de la sous unité $\beta 4$ intégrine se met en place. Ce processus conduit à l'initiation du désassemblage des hémidesmosomes et à la relocalisation de $\alpha 6\beta 4$ dans les lamellipodes. La présence de $\alpha 3\beta 1$ aboutit à l'étalement et à la migration par la création des contacts focaux avec l'actine. En conclusion, l'expression de la laminine-332 est responsable d'un changement dans la prépondérance des intégrines, et dans la modulation de la migration des kératinocytes au cours de la réépithélialisation (Nguyen *et al.*, 2000b).

Il faut noter que les kératinocytes migrants expriment d'autres récepteurs d'intégrines pendant la cicatrisation tels que $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha v\beta 1$, le $\alpha v\beta 5$, $\alpha v\beta 6$ et $\alpha 9\beta 1$ (Larjava *et al.*, 1996 ; Hakkinen *et al.*, 2000).

Les deux récepteurs de la fibronectine ($\alpha\text{v}\beta\text{6}$ et $\alpha\text{v}\beta\text{5}$) sont exprimés par les kératinocytes. L'augmentation de l'expression de $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ peut être observée dans les kératinocytes pendant la cicatrisation. Son expression au cours de la migration suggère que $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ intégrine peut réguler ce processus, *in vivo* (Clark, 1996). Toutefois, aucun changement n'est observé dans la cicatrisation chez les souris déficientes en intégrine β6 (Huang *et al.*, 2000a). L'expression maximale de $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ coïncide avec la formation de la membrane basale et du tissu granulaires. La localisation temporelle des intégrines $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ dans l'épithélium régénéré suggère qu' $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ peut également être impliquée dans la différenciation des cellules épithéliales, la régénération de la membrane basale, la régulation de la réaction inflammatoire et la formation de tissus granulaires.

La sous-unité β5 est connue pour s'associer seulement avec αv , formant ainsi le récepteur de la vitronectine $\alpha\text{v}\beta\text{5}$ (Kozlova *et al.*, 2001). Malgré la détection de l'immunoréactivité de l'intégrine β5 dans les couches suprabasales de l'épiderme régénéré (Leivo *et al.*, 2001), les souris déficientes pour cette intégrine ont une cicatrisation normale. Seuls les kératinocytes provenant de ces souris montrent un défaut de migration et d'adhésion à la fibronectine, *in vitro* (Huang *et al.*, 2000a). Chez l'homme, l'immunoréactivité de $\alpha\text{v}\beta\text{5}$ a été détectée principalement dans les kératinocytes basaux au cours de la cicatrisation (Clark, 1996).

6.3.3.2. Rôle des métalloprotéinases

Au cours de la cicatrisation, la dégradation des composants de la matrice extracellulaire par les MMP est nécessaire pour éliminer et réorganiser les matrices provisoires mais aussi pour permettre la migration des cellules (Ravanti et Kahari, 2000). Les kératinocytes basaux sont la source principale de MMP. Les kératinocytes humains synthétisent et sécrètent principalement MMP-1, 2, 9 et 10. Leur expression est nécessaire pour régénérer les tissus endommagés.

Suite à une blessure, MMP-1 est exprimée par les kératinocytes migrants localisés au bord de la blessure, mais elle n'est pas exprimée par les kératinocytes prolifératifs (Saarialho-Kere *et al.*, 1995). Cette expression est donc abondante au bord de la plaie et diminue

progressivement en s'éloignant (Inoue *et al.*, 1995). *In vitro*, il a été démontré que TNF- α et de TGF- β 1 induisent l'expression de la MMP-1 dans les kératinocytes par l'activation de la voie dépendante p38- MAPK (Johansson *et al.*, 2000).

Dans les kératinocytes, l'expression de MMP-1 est entraînée par l'interaction entre le collagène I et l'intégrine α 2 β 1 (Pilcher *et al.*, 1999). Lors de la réépithélialisation, les kératinocytes perdent leur interaction avec la membrane basale et migrent sur le tissu conjonctif dermique composé principalement de collagène I par le biais du récepteur intermédiaire α 2 β 1. Cette liaison entre le collagène I et α 2 β 1 entraîne l'expression de MMP-1 par les kératinocytes migrants. À son tour, l'expression de MMP-1 soutient la migration des kératinocytes sur le collagène de type I en s'associant avec l'intégrine α 2 β 1. Cette interaction induit une protéolyse contrôlée et localisée au niveau de la lésion, ce qui facilite la migration des cellules (Pilcher *et al.*, 1999 ; Dumin *et al.*, 2001).

Les MMP-2 et 9 jouent un rôle important dans la cicatrisation. L'expression MMP-2 est modulée dans les kératinocytes par le TGF- β 1 et la MSP (*Macrophage stimulating protein*) (Makela *et al.*, 1999). L'expression de MMP-2 est responsable de la protéolyse de la laminine-332, qui module la migration des kératinocytes (Giannelli *et al.*, 1999).

MMP-9 est exprimée sur les sites de la plaie par des kératinocytes migrants et des macrophages. Dans les kératinocytes, MMP-9 est exprimée de façon constitutive, mais peut être régulée par la stimulation de TGF- β , de TNF- α et d'IL1- β (Salo *et al.*, 1994).

Enfin, MMP-10 est exprimée par des kératinocytes migrant sur le front de l'épithélium, où il est colocalisé avec MMP-1 (Vaalamo *et al.*, 1996). MMP-10 apparaît afin d'aider la migration des kératinocytes vers le front épithélial et contribue également à la rénovation de la nouvelle matrice. MMP-10 peut également activer la MMP-9.

6.3.3.3. Rôle des facteurs de croissance

➤ Les facteurs de croissance épidermiques (EGF) :

Une série d'études ont démontré un effet positif de l'EGF, du TGF- α et du HB-EGF sur la réparation des plaies, ce qui suggère que les facteurs de croissance endogènes sont également impliqués dans le processus de guérison (Yanez-Mo *et al.*, 1998). Ils sont considérés comme des régulateurs clés de la prolifération des kératinocytes. Ils exercent leur fonction via la liaison à leur récepteur (EGFR), une protéine tyrosine kinase transmembranaire qui s'exprime sur de nombreux types cellulaires (Oda *et al.*, 2005).

L'EGF est exprimé principalement par les plaquettes, les fibroblastes et les macrophages (Shiraha *et al.*, 1999). Des études *in vitro* ont montré que la surexpression d'EGF après une blessure aiguë, accélère significativement la réépithélialisation (Brown *et al.*, 1986) et augmente la force de traction de la plaie (Brown *et al.*, 1988).

Le TGF- α est sécrété par les plaquettes, les kératinocytes, les macrophages, les fibroblastes et les lymphocytes. Des études *in vitro* montrent que le TGF- α a la capacité d'augmenter la migration et la prolifération des kératinocytes (Li *et al.*, 2006 ; Cha *et al.*, 1996).

Enfin, le HB-EGF (*heparin-binding-EGF-like growth factor*) est surexprimé dans la cicatrisation (Namiki *et al.*, 1995) et est sécrété par les kératinocytes. Il joue un rôle dans l'initiation de la migration des kératinocytes *in vivo*.

➤ Le FGF-2 :

Appelé aussi FGF basique, son expression augmente dans les plaies aiguës et joue un rôle dans la formation du tissu granulaire, la réépithélialisation et le remodelage de tissu (Powers *et al.*, 2000). Des études *in vitro* ont démontré que le FGF-2 régule la synthèse et le dépôt de divers composants de la matrice extracellulaire, et induit aussi l'augmentation de la motilité des kératinocytes au cours de la réépithélialisation (Sogabe *et al.*, 2006 ; Grellner *et al.*, 2000). Il favorise également la migration des fibroblastes et la production des collagénases. (Sasaki, 1992).

➤ Le TGF- β :

Il est important dans l'inflammation, l'angiogenèse, la réépithélialisation et la régénération des tissus conjonctifs. Le TGF- β 1 facilite le recrutement des cellules inflammatoires et des macrophages (Clark, 1996).

➤ Le PDGF :

Il joue un rôle important dans le processus de cicatrisation (Heldin et Westermark, 1999). Le rôle du PDGF pendant la cicatrisation de la peau semble être lié aux phases de réépithélisation. C'est un facteur chimiotactique produit par les neutrophiles, les monocytes et les fibroblastes. D'autre part, il augmente la prolifération des fibroblastes et la production de la matrice extracellulaire lors de la contraction des plaies et de la réorganisation de cette matrice. Enfin, il favorise la contraction des fibroblastes avec les matrices de collagène en induisant le phénotype myofibroblastique (Clark, 1996).

Il faut noter que d'autres facteurs de croissance sont impliqués dans la cicatrisation (Tableau 7).

Facteurs de croissance	Cellules	Fonction
EGF	Plaquettes Macrophages Fibroblastes	Réépithélialisation
FGF-2	Kératinocytes Fibroblastes Cellules endothélial Cellule musculaire lisse Chondrocytes	Formation de tissu Granulation Réépithélialisation Formation et remodelage de la matrice
TGF-α	Plaquettes Kératinocytes Macrophages Lymphocytes Fibroblastes	Réépithélialisation Formation et remodelage de la matrice
TGF-β	Plaquettes Kératinocytes Macrophages Lymphocytes Fibroblastes	Inflammation Formation de tissu Granulation Réépithélialisation Formation et remodelage de la matrice
PDGF	Plaquettes Kératinocytes Macrophages Cellules endothélial Fibroblastes	Inflammation Formation de tissu Granulation Réépithélialisation Formation et remodelage de la matrice
VEGF	Plaquettes Neutrophiles Macrophages Cellules endothélial Cellule musculaire lisse Fibroblastes	Formation de tissu Granulation
IL-1	Neutrophiles Monocytes Macrophages Kératinocytes	Inflammation Réépithélialisation
IL-6	Neutrophiles Macrophages	Inflammation Réépithélialisation
TNF-α	Neutrophiles Macrophages	Inflammation Réépithélialisation

Tableau 7. Facteurs de croissance impliqués dans la cicatrisation. D'après Barrientos *et al.*, 2009

7. Rayonnement solaire

7.1. Introduction

Le rayonnement solaire est constitué d'un mélange de radiations parmi lesquels on distingue :

- ✓ Le rayonnement ultraviolet dont la longueur d'onde est inférieure à 400 nm.
- ✓ La lumière visible constituée par les rayonnements de longueurs d'ondes comprises entre 400 et 700 nm.
- ✓ Le rayonnement infrarouge de longueur d'ondes supérieure à 700 nm.

De même que la lumière visible peut être divisée en plusieurs couleurs, les UV peuvent être classifiés en 3 subdivisions (Figure 18) :

1- Les **UVA** (320-400 nm) représentent la plus importante partie d'UV atteignant la surface de la terre. Ils provoquent sur la peau le bronzage et peuvent l'endommager en profondeur du fait de leur forte capacité de pénétration des tissus.

2- Les **UVB** (280-320 nm) représentent une plus petite proportion des rayons atteignant le sol, mais contribuent largement aux effets biologiques consécutifs aux expositions solaires. Ils peuvent provoquer bronzage, rougeurs, brûlures, lésions oculaires. Leur pénétration dans la peau est plus faible.

3- Les **UVC** (200-280 nm) sont presque entièrement absorbés par la couche d'ozone de l'atmosphère. Ils ne pénètrent que peu dans la peau mais peuvent provoquer des lésions oculaires.

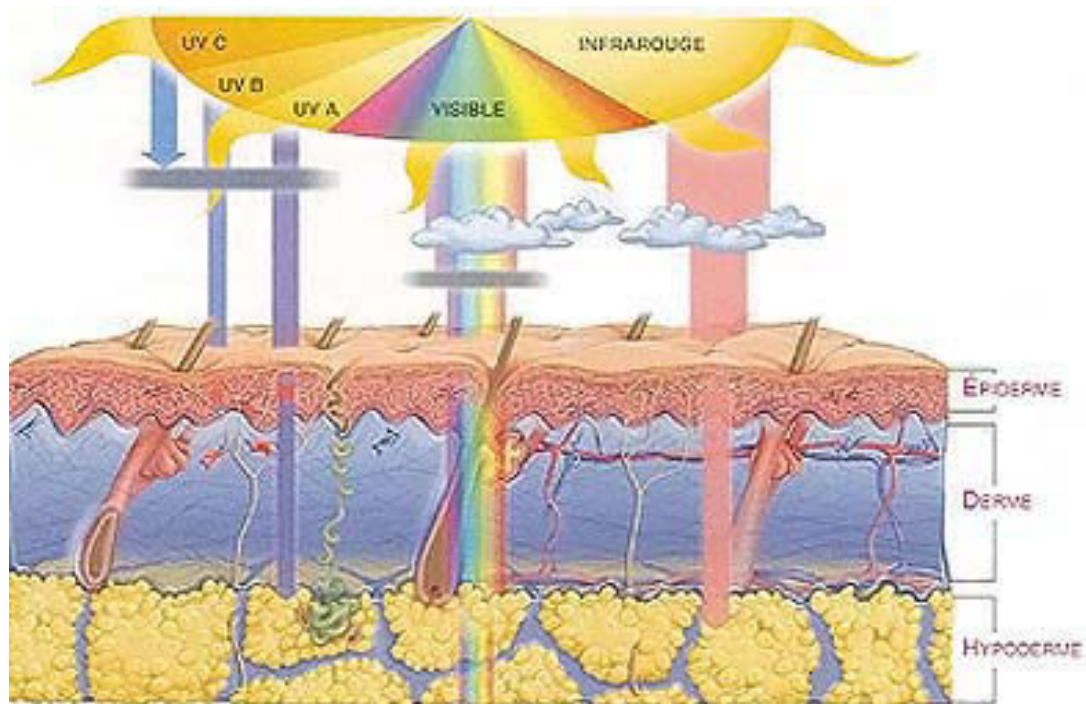


Figure 18. Pénétration du spectre solaire sur la peau. Les UVB sont bien atténués par les couches les plus superficielles de l'épiderme, mais atteignent néanmoins la couche basale.

7.2. Effets des UV sur la peau

L'exposition aux UV présente des effets bénéfiques ou néfastes en fonction de la dose reçue. Parmi les effets bénéfiques on peut citer la synthèse de la vitamine D dans les kératinocytes, nécessaire à la prévention du rachitisme (Holick, 1981). Du point de vue psychologique, la lumière du soleil est bénéfique contre le désordre affectif saisonnier. Enfin, On peut également citer l'utilisation thérapeutique des UVB ou UVA en traitement du psoriasis et de l'eczéma (Krutmann, 2000).

Cependant les UV ont aussi des effets nocifs et peuvent entraîner des lésions cutanées aiguës ou chroniques en fonction des facteurs tels que la dose, la longueur d'onde et les caractéristiques de la peau.

Les UVA comprennent plus de 95% du rayonnement solaire qui nous parvient. Ces rayonnements pénètrent en profondeur dans l'épiderme et le derme et sont environ 1000 fois plus efficace que les UVB dans l'acquisition d'un bronzage immédiat (causée par la synthèse

de la mélanine dans l'épiderme) (Clydesdale *et al.*, 2001). L'exposition intense ou prolongée aux UVA peut brûler la peau sensible et peut, à terme, causer un photovieillissement prématuré de la peau. Les premiers signes de photovieillissement sont les rides, le flétrissement, la laxité, la pigmentation inégale et la sécheresse. Les UVA provoquent aussi une nécrose des cellules endothéliales, endommageant ainsi les vaisseaux sanguins du derme. Après l'exposition aux UVA, les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont produites et vont oxyder les protéines, les lipides et les glucides. Les UVA peuvent produire des dommages structuraux à l'ADN, altérer le système immunitaire, et provoquer un cancer (67% des mélanomes malins) (Afaq et Mukhtar, 2001 ; Afaq et Mukhtar, 2002 ; Trautinger, 2001).

Le rayonnement **UVB** est mineur, mais il est l'élément le plus actif de la lumière solaire. Il représente de 4 à 5% de l'entrée de la lumière UV. Il est plus génotoxique et provoque environ 1000 fois plus de cellules apoptotiques (*sunburns cells*) que les UVA. Les UVB sont moins pénétrants et agissent principalement dans la couche basale épidermique. Ils induisent notamment des dommages directs de l'ADN (formation de dimères cyclobutane-pyrimidine (CPD) et 6-4 pyrimidine-pyrimidone photoproduits (6-4)-PP) et aux protéines (réaction avec les acides aminés aromatiques). Le rayonnement UVB participe également à des dommages indirects des macromolécules. Il provoque la production de radicaux libres et induit une diminution significative des antioxydants de la peau. Par ailleurs, les UVB causent la photo-isomérisation en trans de l'acide cis-urocanique (UCA), l'induction de l'activité de l'ornithine décarboxylase (ODC) et l'arrêt du cycle cellulaire, ou l'altération de la synthèse de l'ADN. Les effets biologiques néfastes directs et indirects des UVB peuvent donner lieu au photovieillissement et à la photocarcinogénèse. Les UVB sont considérés comme responsables de l'induction des carcinomes de type basocellulaire (CBC) et spinocellulaire (CSC) en raison des dommages de l'ADN. Ils sont également soupçonnés d'affaiblir les défenses immunitaires de la peau (De Gruijl, 2002 ; Pattison et Davies, 2006 ; Petit Frere *et al.*, 1996).

Les rayonnements **UVC** sont les plus énergiques et ils possèdent le plus grand potentiel pour provoquer des dommages biologiques à toutes formes de vie, y compris suite à une exposition très courte. Ces rayonnements sont hautement mutagènes et toxiques parce qu'ils sont absorbés par des protéines et des acides nucléiques. Heureusement, les rayonnements UVC sont absorbés par l'atmosphère terrestre. Dans la stratosphère, l'énergie des UVC permet de former l'ozone. Aucun rayonnement solaire de longueur d'onde inférieure

à 280 nm n'atteint la surface de la terre (Hussein, 2005 ; Afaq et Mukhtar, 2001 ; Van der Leun, 2004).

7.3. Principaux acteurs de la réponse aux UV

7.3.1. Dommages de l'ADN induits par les UV

Lorsque le rayonnement ultraviolet atteint la peau, son énergie peut être absorbée (**effet direct**). Il existe une variété de molécules dans la peau qui peuvent absorber cette énergie et être chimiquement modifiées, la principale molécule absorbant les UV est l'ADN lui-même. Au fil du temps, l'absorption des rayonnements ionisants par l'ADN d'une cellule entraîne l'accumulation de mutations génétiques et, éventuellement, la transformation maligne. Les UV peuvent aussi induire la production des ROS capables à leur tour d'endommager l'ADN (**effet indirect**) (Maverakis *et al.*, 2010).

Parmi les dommages de l'ADN induit directement par les UV. On peut distinguer cinq catégories :

A- Altérations des bases des nucléotides : Les CPD (cyclobutane-pyrimidine dimers) et 6-4 PP [pyrimidine-pyrimidone (6-4) photoproducts] sont les dommages directs les plus communs. Les 6-4 PP sont 5 à 10 fois moins répandus que les CPD (Tornaletti et Pfeifer, 1996). Les bases peuvent être hydroxylées et libérer la 7,8-dihydro-8-oxo-2'désoxyguanosine (8-oxo-dG), marqueur de ce processus. De plus, des pertes de bases peuvent aussi se produire (Ravanat *et al.*, 2001).

B- Ruptures de brins d'ADN. On distingue deux types de ruptures de brins :

- les cassures simple brin (CSB) sont produites par rupture des liaisons phosphodiester.

- les cassures double brin (CDB), chacune d'elles étant située en vis-à-vis sur un brin différent de l'ADN. Les CDB sont les lésions les plus graves et une large proportion ne peut être réparée par la cellule irradiée. En cas de non réparation, elles sont souvent létales pour la cellule.

Le nombre de cassures (CSB et CDB) peut être corrélé à la dose d'irradiation et à la sensibilité cellulaire (Matsumoto *et al.*, 1991 ; Dikomey *et al.*, 1998 ; Rapp et Greulich, 2004).

C- Formation de pontages entre brins d'ADN ou avec des protéines : Les radiations peuvent former des pontages intra ou inter-brins sur l'ADN, par fusion entre deux ruptures de brins. Ces ponts d'ADN aboutissent à des aberrations chromosomiques. Les radiations induisent également l'association covalente de protéines avec l'ADN (Jenner *et al.*, 1998). Cette association ADN/protéines implique surtout la thymine et la tyrosine mais parfois d'autres bases. De plus, certains composés, comme le malonyldialdéhyde provenant de la peroxydation de la membrane plasmique après irradiation (Morliere *et al.*, 1995 ; Perez *et al.*, 1995), peuvent également induire ces pontages (Cheeseman, 1993). Ces ajouts de protéines modifient la structure de la molécule et donc son fonctionnement.

D- Sites de dommages multiples (LMDS *locally multiply damages sites*) : Les LMDS consistent en un grand nombre de lésions simples (dommages des bases, CSB, CDB et associations ADN/protéines ou ADN/ADN), produites à proximité les unes des autres, sur une courte séquence de la molécule d'ADN (Goodhead, 1994 ; Sutherland *et al.*, 2001). Ces associations ou « clusters » de dommages sont la conséquence d'une accumulation de plusieurs lésions sublétales individuelles. Plus elles sont complexes, moins elles sont réparables par la cellule.

E- Aberrations chromosomiques : Les aberrations chromosomiques induites par les radiations sont de différents types : translocations, délétions, inversions, anomalies génétiques (anneaux dicentriques, centriques et acentriques). Elles proviennent soit de la liaison de deux extrémités de chromosomes résultant surtout d'une CDB (pontages), soit plus rarement de l'association d'une extrémité chromosomique libre avec d'autres molécules empêchant la réparation (Kemp et Jeggo, 1986). La nature des réarrangements chromosomiques produits dépend de la phase du cycle cellulaire dans laquelle se trouve la cellule au moment de l'irradiation responsable de l'aberration chromosomique. Si l'irradiation a lieu après la synthèse d'ADN, une seule chromatide est affectée (aberration chromatidienne).

Les lésions de l'ADN sont détectées par différentes protéines qui le surveillent. Ces protéines sont : la protéine ATM (*Ataxia-telangiectasia-mutated*), la ATR (*Ataxia-*

telangiectasia-RAD3-related) et DNA-PK (*phosphatidylinositol 3-kinase-like kinases*). Après avoir détecté les lésions de l'ADN, ces protéines peuvent activer p53 (une protéine suppresseur de tumeur que l'on nomme protéine gardienne de génome), suite à l'exposition aux irradiations.

7.4. Espèces réactives de l'oxygène et réponse aux UV

7.4.1. Introduction

Du fait de son électronégativité, la molécule O_2 est particulièrement sensible aux transferts d'électrons à partir de divers constituants cellulaires. Ces transferts peuvent aboutir à une réduction partielle de l'oxygène moléculaire, générant des dérivés hautement réactifs, les espèces réactives de l'oxygène (ROS). Parmi ces espèces susceptibles de se former dans les cellules, il convient de distinguer un ensemble restreint de composés radicalaires qui jouent un rôle particulier en physiologie appelés radicaux primaires. Les autres radicaux libres, dit radicaux secondaires, se forment par réaction de radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule. Ces radicaux primaires dérivent de l'oxygène, par des réductions à un électron comme l'anion superoxide $O_2^{\cdot-}$ et le radical libre hydroxyle OH^{\cdot} , ou de l'azote comme le monoxyde d'azote NO^{\cdot} (Valko *et al.*, 2007). D'autres dérivés de l'oxygène appelés aussi espèces réactives de l'oxygène, tels que l'oxygène singulet 1O_2 , le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou le nitroperoxyde ($ONOO^{\cdot}$), ne sont pas des radicaux libres, mais sont aussi réactifs et peuvent en être les précurseurs (Valko *et al.*, 2007) (Figure 19).

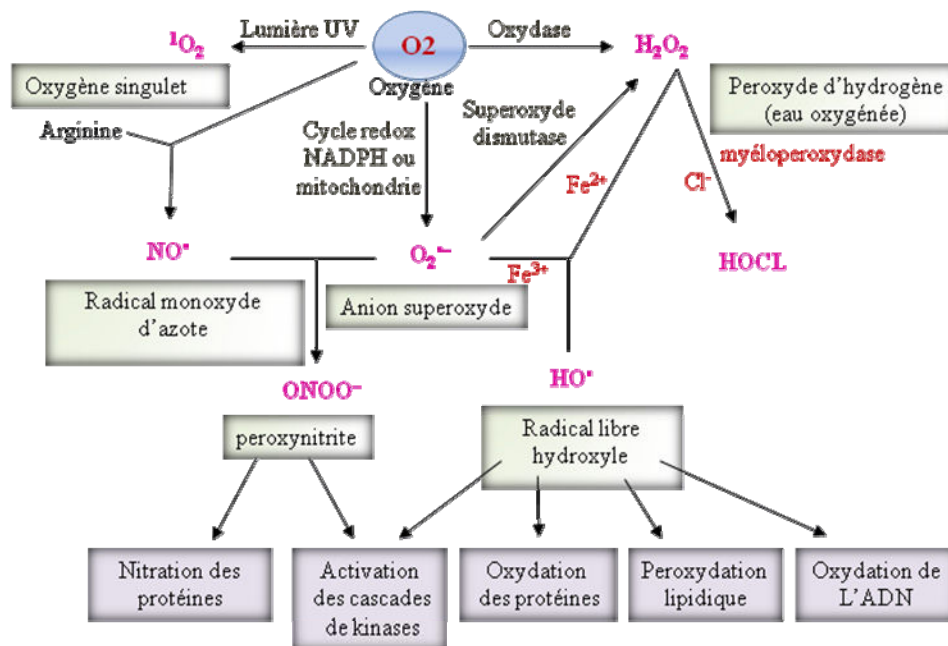
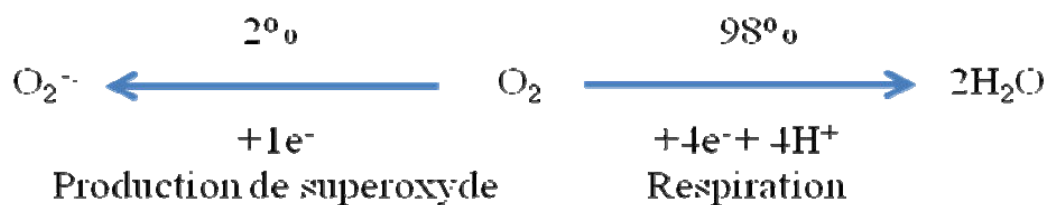


Figure 19. Origine des différents radicaux libres oxygénés et autres espèces réactives de l'oxygène impliqués en biologie (Valko *et al.* 2007). L'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) (O_2 à l'état non fondamental) est très instable et extrêmement réactif. Sa durée de vie est très limitée. L'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot-}$) est peu réactif. Sa charge électrique le rend incapable de diffuser à travers les membranes biologiques. En dépit d'une réactivité assez faible, l'anion superoxyde présente des dangers pour les structures biologiques réduisant des métaux comme le fer ou le cuivre qui deviennent réactifs. Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) peut être généré soit par dismutation de l'anion superoxyde $\text{O}_2^{\cdot-} + \text{O}_2^{\cdot-} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$, soit par réduction univalente de l'anion superoxyde : $\text{O}_2^{\cdot-} + \text{e}^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$ ou par réduction bi-électronique de l'oxygène catalysée par des enzymes comme la glucose oxydase $\text{O}_2 + 2\text{e}^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$. Le peroxyde d'hydrogène est potentiellement toxique car sa faible réactivité, associée à sa capacité de traverser les membranes biologiques, font qu'il peut se retrouver à une grande distance de son lieu de synthèse. Le radical hydroxyle (OH^{\cdot}) est généré dans les cellules soit par clivage réducteur du peroxyde d'hydrogène $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}^+ + \text{e}^- \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{OH}^{\cdot}$, soit par coupure homolytique du peroxyde d'hydrogène $\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{OH}^{\cdot} + \text{OH}^{\cdot}$, soit par décomposition du peroxyde d'hydrogène, catalysée par des métaux, en particulier le fer ou le cuivre (réaction de Fenton) $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} (\text{Cu}^+) \rightarrow \text{OH}^{\cdot} + \text{OH}^- + \text{Fe}^{3+} (\text{Cu}^{2+})$ ou par interaction de l'eau oxygénée avec l'ion superoxyde (réaction d'Haber-Weiss) $\text{HOOH} + \text{O}_2^{\cdot-} \rightarrow \text{OH}^{\cdot} + \text{OH}^- + \text{O}_2$. Il est le plus puissant réactif avec tous les substrats de son entourage et représente donc une source potentielle importante de lésions moléculaires, cellulaires et tissulaires.

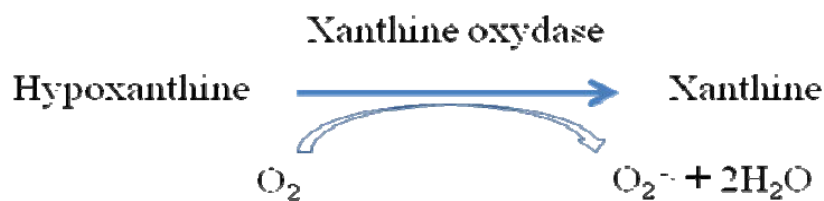
7.4.2. Production physiologique des radicaux libres dans l'organisme et en réponse aux UV

Les radicaux libres étant très réactifs, ils ont une durée de vie extrêmement courte. Il est donc difficile d'étudier leur métabolisme, c'est aussi pour cela que les connaissances sur leur production dans des conditions physiologiques et pathologiques sont encore restreintes. La formation de radicaux libres s'effectue au niveau de divers organites cellulaires (Lambeth, 2004 ; Valko *et al.*, 2007) :

- les mitochondries : la réduction de l'oxygène moléculaire par les cytochromes de la chaîne respiratoire s'accompagne d'une formation en parallèle d'environ 2% d'ions superoxyde, d'eau oxygénée et éventuellement de radicaux OH[•]



- le cytosol : diverses réactions enzymatiques peuvent produire des radicaux superoxyde et de l'eau oxygénée. La xanthine oxydase (responsable de la transformation de l'hypoxanthine en xanthine), l'aldéhyde oxydase et la galactose oxydase sont à l'origine de la formation de radicaux superoxyde O₂^{•-}.



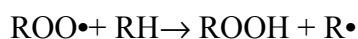
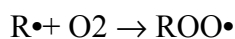
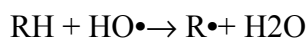
D'autres enzymes interviennent dans la production de radicaux libres, particulièrement dans les cellules immunitaires comme les monocytes-macrophages et les polynucléaires neutrophiles pour détruire les micro-organismes ou des macromolécules étrangères, en particulier par le complexe oxydo/réductase membranaire appelé NADPH oxydase.

7.4.3. Rôle des ROS dans la réponse cellulaire aux UV

Dans la régulation de la réponse cellulaire, les ROS agissent soit en oxydant les macromolécules biologiques (protéines, lipides et acides nucléiques) soit en jouant le rôle de second messenger qui va modifier l'activité de certains facteurs de transcription.

7.4.3.1. Effets oxydatifs des ROS

Les radicaux libres étant très réactifs réagissent avec les premières molécules qu'ils rencontrent et particulièrement les lipides, les acides nucléiques et les acides aminés. Les **acides gras** polyinsaturés, constituants principaux des membranes cellulaires (nucléaires, mitochondriales ou lysosomales), sont la première cible des ROS. Sans entrer dans le détail, HO• peut déclencher une réaction en chaîne de peroxydation lipidique en extrayant un atome H à un groupement méthylène d'un acide gras insaturé par exemple :



Les acides gras peroxydés altèrent la perméabilité membranaire, qui peut mener jusqu'à la désintégration de la membrane. De la même façon, les aminoacides d'une protéine, peuvent subir des phénomènes de carbonylation (>C=O), rendant les protéines ainsi modifiées sensibles aux protéases. Enfin les bases de l'ADN peuvent également être oxydées (cause de mutations) aboutissant à l'arrêt de réplication de l'ADN.

7.4.3.2. ROS comme second messenger

D'autres travaux ont montré que les ROS pouvaient moduler l'activité de certains facteurs de transcription. Schreck et ses collègues (1992) ont d'abord montré que certains facteurs de transcription de la famille NF-κB peuvent être activés par les agents oxydants et aussi par les radiations ionisantes. Plus tard, il a été montré que plusieurs facteurs de transcription et des protéines kinases possèdent des éléments sensibles à l'oxydo-réduction (Valko *et al.*, 2007). Les plus connus parmi ces facteurs activés par une irradiation sont : NF-κB, AP-1 (*Activator Protein-1*) (Bickers et Athar, 2006), AP-2 (Grether-Beck *et al.*, 1996), Sp1 (Wu *et al.*, 1996), NF-1 (*Nuclear Factor-1*) (Bandyopadhyay et Gronostajski, 1994), p53

(Parks *et al.*, 1997) et USF (*Upstream Stimulatory Factor*) (Pognonec *et al.*, 1992). Les ROS peuvent également activer HIF-1 α après irradiation.

7.5. Facteurs de croissance et leurs récepteurs dans la réponse cellulaire aux UV

La réponse des kératinocytes aux UV se traduit par la libération puis l'activation de plusieurs facteurs de croissance et de leurs récepteurs comme l'EGF (*epidermal growth factor*), le TNF- α (*tumor necrosis factor-a*) ou le TGF- β (*transforming growth factor- β*) (Muthusamy et Piva, 2010). La liaison des facteurs libérés avec leurs récepteurs spécifiques aboutit à l'activation de ces derniers. Cette activation résulte d'une phosphorylation des récepteurs sur leurs résidus tyrosine et déclenche différentes cascades de kinases. Ce système met en jeu une famille particulière de MAPK (*mitogen-activated protein kinases*) contenant trois sous-groupes : ERK (*extracellular signal regulated kinase*), p38MAPK et JNK/SAPK (*Jun Nterminal kinase/stress-activated protein kinase*). L'activation de ces kinases entraîne la phosphorylation de nombreux substrats (Bender *et al.*, 1997 ; Bode et Dong, 2003).

Les UV peuvent également déclencher la voie de signalisation de manière directe. En effet, plusieurs récepteurs comme ceux du TNF- α et Fas ou encore EGFR peuvent être activés directement, par irradiation, sans avoir besoin de leurs ligands (Rosette et Karin, 1996 ; Aragane *et al.*, 1998). Non seulement l'irradiation par les UV aboutit à une sous-expression des récepteurs de l'EGF et du TGF- β mais aussi à une diminution des liaisons récepteur/ligand (Heck *et al.*, 2004).

7. 6. Système immunitaire et UV

De nombreuses études expérimentales démontrent que les UV, en particulier les UVB, ont un effet suppresseur sur le système immunitaire (Schwarz, 2005). Différents mécanismes peuvent intervenir dans la photoimmuno-suppression :

- Les dommages de l'ADN causés par l'absorption des UV. L'immuno-suppression est induite par la production de cytokines immuno-suppressives, la modulation des gènes codant

pour des molécules impliquées dans la présentation de l'antigène et l'activation d'enzymes de réparation de l'ADN (Simon *et al.*, 1994 ; Nishigori *et al.*, 1996 ; Vink *et al.*, 1996).

- L'acide trans-urocanique (UCA) absorbe les UV, ce qui provoque son isomérisation et la production d'acide cis-urocanique (cis-UCA). UCA est un photorécepteur présent dans la couche cornée qui joue le rôle de capteur de molécules d'eau rendant la surface de la peau plus souple (Streilein *et al.*, 1994 ; Norval *et al.*, 1995). Une injection sous-cutanée de cis-UCA a le même effet inhibant de l'hypersensibilité de contact que les UVB (Kondo *et al.*, 1995).

- La production de cytokines immunosuppressives, dans les kératinocytes, induites par les UV, telles que TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-15 et les prostaglandines agissent sur la morphologie, les capacités de migration ou de présentation des cellules de Langerhans (Vermeer et Streilein, 1990 ; Kurimoto et Streilein, 1992 ; Moodycliffe *et al.*, 1994 ; Shreedhar *et al.*, 1998).

- L'apparition des cellules monocytaires dans l'épiderme après exposition aux UV (Cooper *et al.*, 1986).

- La peroxydation des lipides membranaires.
- La production de facteur activateur des plaquettes (PAF) à partir de phospholipides.
- La production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS).

L'importance relative de ces voies peut dépendre de la longueur d'onde des rayons UV et leur intensité.

Plusieurs études ont montré l'importance du système immunitaire dans les cancers cutanés photo-induits. Chez la souris, les tumeurs induites par les UV sont fortement antigéniques et font l'objet d'un rejet lorsqu'elles sont greffées sur la peau de souris syngéniques saines et non irradiées. En revanche, ces tumeurs ne sont pas rejetées lorsqu'elles sont greffées chez des animaux syngéniques irradiés par les UVB (Donawho et Kripke, 1991).

De plus, la croissance des cellules tumorales greffées sur une peau préalablement exposée aux UV est plus importante que celle survenant sur une peau saine. Cela confirme l'importance du système immunitaire au cours de la photocarcinogenèse (Donawho *et al.*, 1996). Chez l'homme, 90% des patients ayant un carcinome présentent une hypersensibilité de contact (HC) qui diminue après irradiation. Cependant 40% seulement des individus sains ont ce phénotype (Yoshikawa *et al.*, 1990), ce qui démontre indirectement les effets d'une

prédisposition à l'immunosuppression UV induite dans l'apparition des carcinomes. L'évolution de certaines affections virales, bactériennes ou parasitaires après exposition aux UVB montre que les personnes fréquemment exposées au soleil sont plus sensibles aux maladies infectieuses (McLelland et Chu, 1990 ; Langhoff et Haseltine, 1993 ; Vermeer et Hurks M, 1994).

7. 7. Réparation de l'ADN

7.7.1. Systèmes de réparation de l'ADN

Au cours de l'évolution, la cellule a sélectionné des mécanismes de réparation de l'ADN afin de traiter efficacement la grande variété des lésions de l'ADN induites par des sources exogènes et endogènes et maintenir l'intégrité du génome. Dans le génome humain, il existe plus de 130 gènes impliqués dans la réparation de l'ADN. La réparation comporte trois étapes : la détection des dommages, leur suppression et le remplacement de la séquence d'ADN supprimée (Perry *et al.*, 2010). Au moins quatre stratégies sont adoptées par la cellule afin de réparer ces lésions : la réparation par excision de base, la réparation des mésappariements, la réparation des cassures double brin et la réparation par excision de nucléotides (Jackson et Bartek, 2009 ; Chang *et al.*, 2006a ; Decordier *et al.*, 2007 ; Altieri *et al.*, 2008).

7.7.1.1. Réparation par excision de base (BER)

La réparation par excision de base est responsable de la réparation des lésions d'ADN résultant de dommages oxydant, d'alkylation, de désamination et de dépurination/depyrimidination, ainsi que de cassures d'ADN simple brin (Robertson *et al.*, 2009 ; Hoeijmakers, 2009). BER facilite la réparation par deux voies : la première est caractérisée par l'élimination d'un ou deux nucléotides (*short patch repair*) ayant pour conséquence l'apparition de petites brèches, la deuxième implique l'excision de plusieurs nucléotides (10 à 20) (*long patch repair*) provoquant de plus grandes brèches simple brin dans l'ADN.

7.7.1.2. Réparation des mésappariements (MMR)

La réparation des mésappariements est responsable de la suppression de mésappariements des bases causés par la désamination de façon spontanée ou provoquée, l'oxydation, la méthylation et les erreurs de la réplication (Kunz *et al.*, 2009). La reconnaissance du mésappariement est effectuée principalement par un hétérodimère appelé hMutS α .

7.7.1.3. Réparation des cassures double brin (DSBR)

Des cassures double brin de l'ADN sont induites par les attaques endogènes et exogènes, ainsi que par la conversion des cassures simple brin en cassures double brin lors de la réplication de l'ADN (Hoeijmakers, 2009 ; Pardo *et al.*, 2009). Il existe deux types de réparation de cassures doubles brins :

A- réparation par recombinaison homologue. Cette réparation utilise une partie homologue du génome (brin fils ou chromosomes homologues).

B- réparation par relégation non homologue. Ce système effectue une ligation des brins d'ADN après un « façonnage » des extrémités qui conduit à une reconstitution infidèle de l'ADN.

7.7.1.4. Réparation par excision de nucléotides (NER)

La réparation par excision de nucléotides corrige une grande variété de lésions causant des distorsions structurales de l'ADN, y compris celles induites par les rayons UV, les rayons ionisants, les mutagènes, les carcinogènes chimiques et certaines substances thérapeutiques. Ce processus s'applique à de nombreux adduits tels que les dimères de pyrimidines, les 6-4PP, les thymines glycols, les adduits psoralène-thymine, cis-platine-guanine, mitomycine-guanine ainsi que les pontages interbrins. Il implique l'action d'une vingtaine de protéines différentes (Eisen et Hanawalt, 1999). Les principaux gènes impliqués ont été découverts suite à l'identification des gènes impliqués dans les maladies héréditaires de la réparation comme le xeroderma pigmentosum (XP), la trichothiodystrophie (TTD) et le syndrome de Cockayne (CS) chez l'homme (Hoeijmakers, 2009 ; Nouspikel, 2009). La réparation NER se compose de deux branches distinctes : la réparation globale du génome (GGR) indépendante de la transcription, et celle couplée à la transcription (TCR).

7.7.1.4.1. Réparation globale du génome (GGR)

La distorsion de l'ADN endommagé est reconnue par les deux complexes UV-DDB (*DDB1-DDB2-containing E3-ubiquitin ligase complex*) et XPC-RAD23B. Une fois que la lésion est reconnue, toutes les étapes subséquentes de l'assemblage d'un complexe NER fonctionnel exigent les mêmes facteurs pour GG-NER ou pour TC-NER (Figure 21). Le facteur de transcription TFIIH a un rôle essentiel dans le système NER par ses deux sous-unités XPB et XPD qui déclenchent par leurs activités respectives ATPase dépendante d'ADN et hélicase dépendante d'ADN l'ouverture de l'hélice d'ADN autour de la lésion (Drapkin *et al.*, 1994 ; Wang *et al.*, 1995 ; Coin *et al.*, 2007). L'action combinée de XPC-RAD23B et TFIIH crée de courts segments d'ADN simple brin autour de la lésion et facilite le recrutement de deux protéines XPA et RPA afin de vérifier les dommages. Enfin, la structure ouverte est reconnue par deux endonucléases à spécificité de structure, XPG et ERCC1-XPF. L'incision par XPG qui s'effectue sur le simple brin du côté 3' de la lésion (Lieber, 1997) et ensuite par ERCC1-XPF du côté 5' de la lésion (Mu *et al.*, 1996) conduit à la libération d'un oligonucléotide de 24 à 32 paires de bases (Huang *et al.*, 1992 ; Moggs *et al.*, 1996). Les facteurs se dissocient alors de la bulle de réparation, à l'exception de la RPA qui stabilise la région simple brin. La brèche est comblée par une synthèse d'ADN réparatrice impliquant l'ADN polymérase δ et ϵ , l'action des facteurs de réplication RPA, RFC ainsi que PCNA (Shivji *et al.*, 1995). Enfin, la réparation du dommage est complétée par l'action de l'ADN ligase I qui effectue la jonction au niveau de la cassure restante (Figure 21).

7.7.1.4.2. Réparation couplée à la transcription (TCR)

La TCR est une voie de réparation fortement conservée identifiée chez de nombreux organismes incluant les bactéries, les levures et les mammifères. Les lésions situées sur le brin codant des gènes activement transcrits sont réparées de manière préférentielle (Bohr *et al.*, 1985 ; Mellon *et al.*, 1987). Le processus est identique à celui de la GGR excepté pour la reconnaissance initiale du dommage (Figure 20). En effet, le signal aboutissant au recrutement de la machinerie de la TCR n'est pas encore connu mais il semble que ce soit l'ARN Pol II elle-même bloquée au niveau d'une lésion. Le produit du gène CSB (protéine dont les mutations du gène sont responsables du syndrome de Cockayne) reconnaît l'ARN Pol II arrêtée et recrute la machinerie de réparation. Il a été montré que la CSA et la CSB pouvaient avoir un rôle dans l'ubiquitination de l'ARN Pol II après exposition à des radiations

UV ou au *cis*-platine (Bregman *et al.*, 1996), suggérant ainsi le rôle probable de cette ubiquitination dans la TCR qui favoriserait le recrutement des autres facteurs de la réparation. La CSA ne possède pas d'activité hélicase (Selby et Sancar A, 1997) et n'est pas capable de déplacer l'ARN Pol II (van Hoffen *et al.*, 1999) ce qui implique que d'autres protéines interviennent dans ce système.

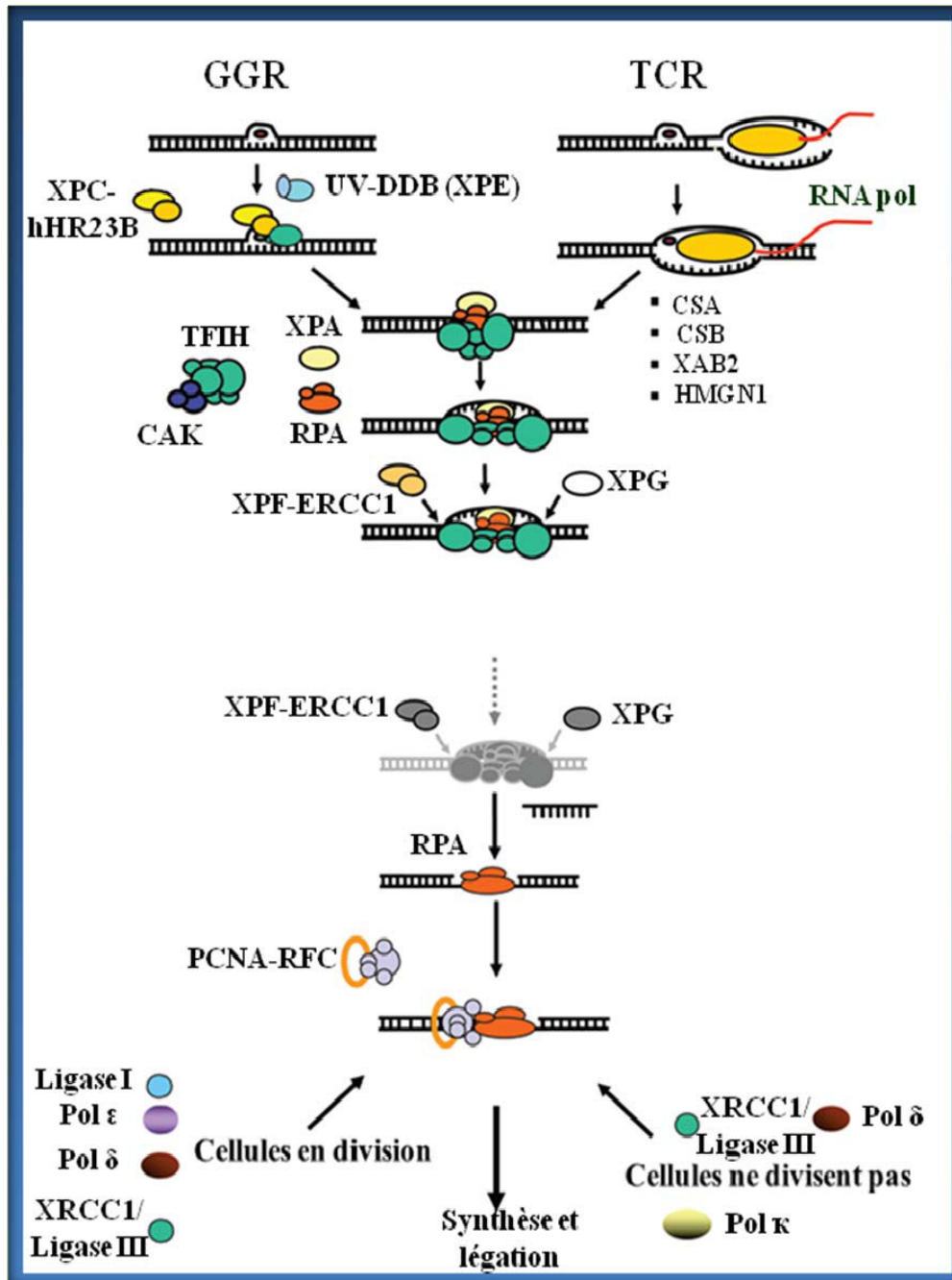


Figure 20. Schéma de la réparation par excision de nucléotides indiquant les voies de la réparation globale (GGR) et de la réparation couplée à la transcription (TCR) accompagnées par quelques protéines clé. CSA et CSB : *Cockayne Syndrome A et B*, ERCC1 : *Excision Repair Cross-Complementing 1 protein*, hHR23B : *human homologue of RAD23*, pol δ/ε : *ADN polymérase δ ou ε*, RPA : *replication protein A*, TFIIH: *transcription factor II H*, XP : *xeroderma pigmentosum*.

7.7.2. Importance physiopathologique des systèmes de réparation

La réparation NER implique environ 40 gènes, parmi lesquels il en existe une douzaine dont l'inactivation est associée à des pathologies humaines. Ces maladies incluent le xeroderma pigmentosum (XP), le syndrome de Cockayne (CS), la trichothiodystrophie (TTD), le syndrome cérébro-oculo-facial (COFS) et le syndrome de sensibilité aux UV (Friedberg, 2001 ; Lehmann, 2003). Une hétérogénéité génétique a été révélée chez les patients en se basant sur les études de la réparation de l'ADN dans les cellules hybrides somatiques obtenues par fusion de cellules provenant de différents malades (ou études de complémentation fonctionnelle). Ainsi les déficits XP ont été classés en huit groupes de complémentation génétique (A à G et XP-variant) (Scharer, 2008). Les cellules de patients CS ont été classées en cinq groupes de complémentation génétique. Les groupes CSA et CSB comprennent les patients ne présentant que les symptômes du CS (Tanaka *et al.*, 1981). Les patients XP également atteints des symptômes CS appartiennent aux groupes XPB, XPD ou XPG (Lehmann *et al.*, 1993). Les cellules des patients TTD photosensibles ont été classées en trois groupes de complémentation : TTDA (un seul patient), TTD/XPB (deux patients) et TTD/XPD (la majorité des patientes TTD photosensibles) (Stefanini *et al.*, 1993a ; Stefanini *et al.*, 1993b ; Weeda *et al.*, 1997). Ces maladies ont des signes offrant un chevauchement complexe entre elles : cancers multiples, retard de développement, anomalies immunologiques, neurodégénérescence cérébrale ou rétinienne et vieillissement prématuré (Moriwaki et Kraemer, 2001).

7.7.2.1. Xeroderma pigmentosum (XP)

Le xeroderma pigmentosum est une maladie rare transmise de façon autosomique récessive caractérisée par une photosensibilité sévère, des changements pigmentaires, un vieillissement prématuré de la peau et le développement de tumeurs cutanées (Figure 21). Bien que le XP soit très rare, la nature du défaut intrinsèque est d'un grand intérêt scientifique. Il est important de signaler que la peau des patients XP est normale, mais la plupart d'entre eux présentent une sensibilité accrue au soleil. L'exposition répétée conduit à des cancers cutanés, avec une fréquence accrue x1000. Près de 45% des patients développent des néoplasmes cutanés à un âge médian de 8 ans. Des tumeurs apparaissent, sous forme bénigne dans un premier temps, mais dégénèrent assez rapidement. Elles concernent le plus souvent le

visage et les autres parties du corps exposées au soleil (Daya-Grosjean et sarasin, 2005). Ces cancers sont de trois types :

- carcinome basocellulaires (BCC) qui a une malignité essentiellement locale,
- carcinome spinocellulaire (SCC) susceptible de métastaser (métastases ganglionnaires et profondes),
- mélanome à risque métastatique lymphatique et sanguin élevé.

Les patients XP développent également avec une fréquence élevée des tumeurs internes. Ces tumeurs internes sont localisées au niveau du cerveau et de la cavité buccale (Kraemer, 1984).

Les lésions oculaires sont fréquentes (Vaillant *et al.*, 1979 ; Mouly *et al.*, 1980 ; Kraemer *et al.*, 1987), elles touchent principalement les zones photoexposées, les paupières, la conjonctive et la cornée. De plus, les patients XP présentent des anomalies du système immunitaire. Ces anomalies semblent associées aux XP classiques et n'affectent que faiblement le XP variant. Certaines anomalies seraient liées à l'exposition solaire et d'autres liées au défaut de réparation par excision de nucléotide (dans les lymphocytes périphériques). Presque tous les patients du groupe A et certains patients du groupe D présentent des troubles neurologiques. Cependant, certains patients du groupe G et du groupe C peuvent aussi présenter des signes de neurodégénérence asymptomatique (Robbins *et al.*, 1991 ; Robbins *et al.*, 1993). Les affections neurologiques concernent notamment une baisse des capacités intellectuelles, une activité motrice anormale, une aréflexie, une audition diminuée, une diction anormale (Robbins *et al.*, 1991).



Figure 21. Une photo d'une patiente de XP montrant de nombreuses lésions pigmentées de taille variable.

7.8. Apoptose

7.8.1. Généralité

Les organismes vivants ont adapté un processus par lequel ils peuvent éliminer les cellules endommagées (en acquérant plusieurs mutations ou dommages induits par des stress). Ce processus nommé apoptose est une mort cellulaire programmée caractérisée par des changements morphologiques distincts qui comprennent : arrondissement des cellules, bourgeonnement de la membrane, démontage du cytosquelette, condensation de la chromatine et fragmentation de l'ADN (Kroemer *et al.*, 2009). Ces altérations dramatiques cellulaires, permettent l'emballage de la cellule morte et son ingestion ultérieure par les phagocytes. L'apoptose peut être attribuée à l'action des caspases, une famille de protéases à cystéine (*cysteinyll aspartate-directed proteases*) qui clivent un large éventail de protéines cellulaires (Luthi et Martin, 2007).

L'apoptose est complètement différente de la nécrose causée par des enzymes spéciales, produites par les lysosomes. La cassure de la membrane plasmique qui en résulte conduit à la libération du contenu cytoplasmique dans le milieu extérieur. La nécrose est accompagnée habituellement d'une réponse inflammatoire (présence de lymphocytes et de macrophages) (Figure 22). Cependant certains résultats récents suggèrent que la nécrose peut aussi être un processus programmé, au moins dans les conditions *in vitro* (Bizik *et al.*, 2004).

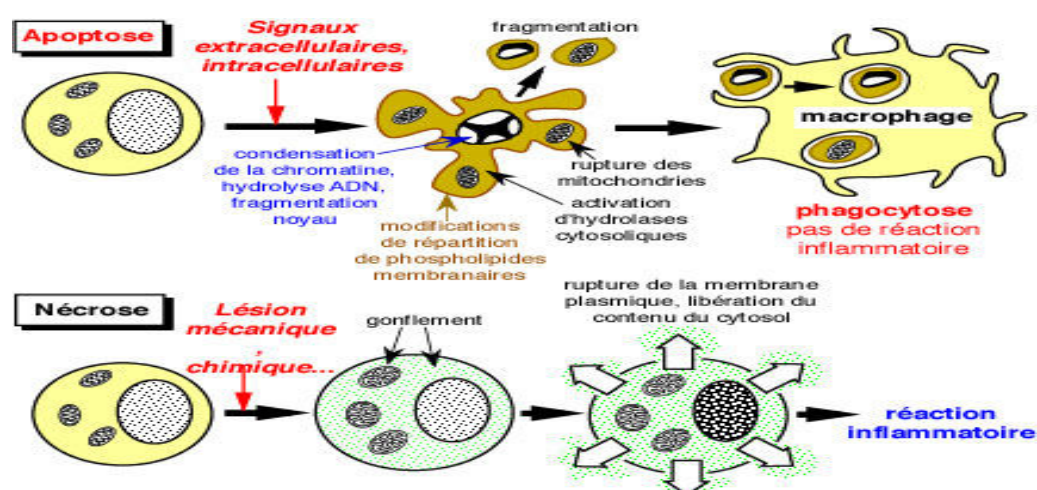


Figure 22. Représentation des événements associés à l'apoptose ou à la nécrose

Les acteurs moléculaires de l'apoptose sont :

- Les récepteurs membranaires « de mort »,
- Les protéines cytoplasmiques : les caspases, l'Apaf-1, l'IAP (protéine régulatrice des caspases) et cFLIP (protéine régulatrice de la voie extrinsèque),
- Les protéines mitochondriales : le cytochrome c, les protéines régulatrices des IAP (Smac/DIABLO, Omi/HtrA2) et les protéines pro-apoptotiques (AIF et endoG),
- Les protéines de la famille Bcl-2,
- La protéine p53

On distingue deux grandes voies de signalisation aboutissant à l'apoptose. La première, appelée voie intrinsèque, met en jeu la mitochondrie qui occupe une place centrale dans les mécanismes de l'apoptose. La deuxième voie est initiée à la surface de la cellule par des récepteurs membranaires, c'est la voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort.

7.8.2. Apoptose UV-induite

Le mécanisme de l'apoptose dans les kératinocytes en réponse aux UV passe par les deux voies de la mort cellulaire, intrinsèque et extrinsèque, qui sont particulièrement régulées par des MAPK et p53 (Figure 23). Les MAPK sont activées différemment, par exemple ERK est activée en réponse à de multiples stimuli mitogènes, alors que les JNK et p38 sont activés par le stress de l'environnement, en particulier les UV (Chang et Karin, 2001). Les dommages de l'ADN semblent être une cause de l'activation soutenue des MAPK (Christmann *et al.*, 2007). Les JNK et p38 contribuent de façon critique à l'apoptose induite par les UV. Ainsi, la perturbation ou la dérégulation de JNK et de p38 peuvent avoir des conséquences graves sur la peau en mettant fin à des réactions de stress. Des études basées sur la modification des gènes ont révélé que la JNK est requise pour l'apoptose induite par les UV (Tournier *et al.*, 2000). Un traitement avec un inhibiteur de p38 (SB202190) empêche la formation de cellules «sunburn» sur la peau des souris (Hildesheim *et al.*, 2004).

JNK et p38 peuvent activer directement les protéines pro-apoptotiques (Bcl-2) afin d'induire la voie apoptotique mitochondriale (Lei et Davis, 2003 ; Wang *et al.*, 2009) ce qui conduit à l'activation des caspases-3 et -9. La voie apoptotique la plus connue, induite par les UV, semble être produite par la phosphorylation de p53 suite à l'activation de JNK et p38 (Shimada *et al.*, 2003). L'activation de p53 entraîne la transcription de nombreux gènes, tels

que ceux codant pour les enzymes de la réparation, l'inhibiteur du cycle cellulaire p21, les récepteurs de mort (CD95, les récepteurs de TRAIL et les protéines Bcl-2 pro-apoptotiques comme Bax, Bid, Noxa, et PUMA) (Hofseth *et al.*, 2004).

En conclusion, l'activation de p53 résulte de la stimulation de la réparation suivie de l'arrêt de la prolifération cellulaire. Dans le cas de dommages soutenus de l'ADN, p53 déclenche à la fois les voies apoptotiques extrinsèques et intrinsèques.

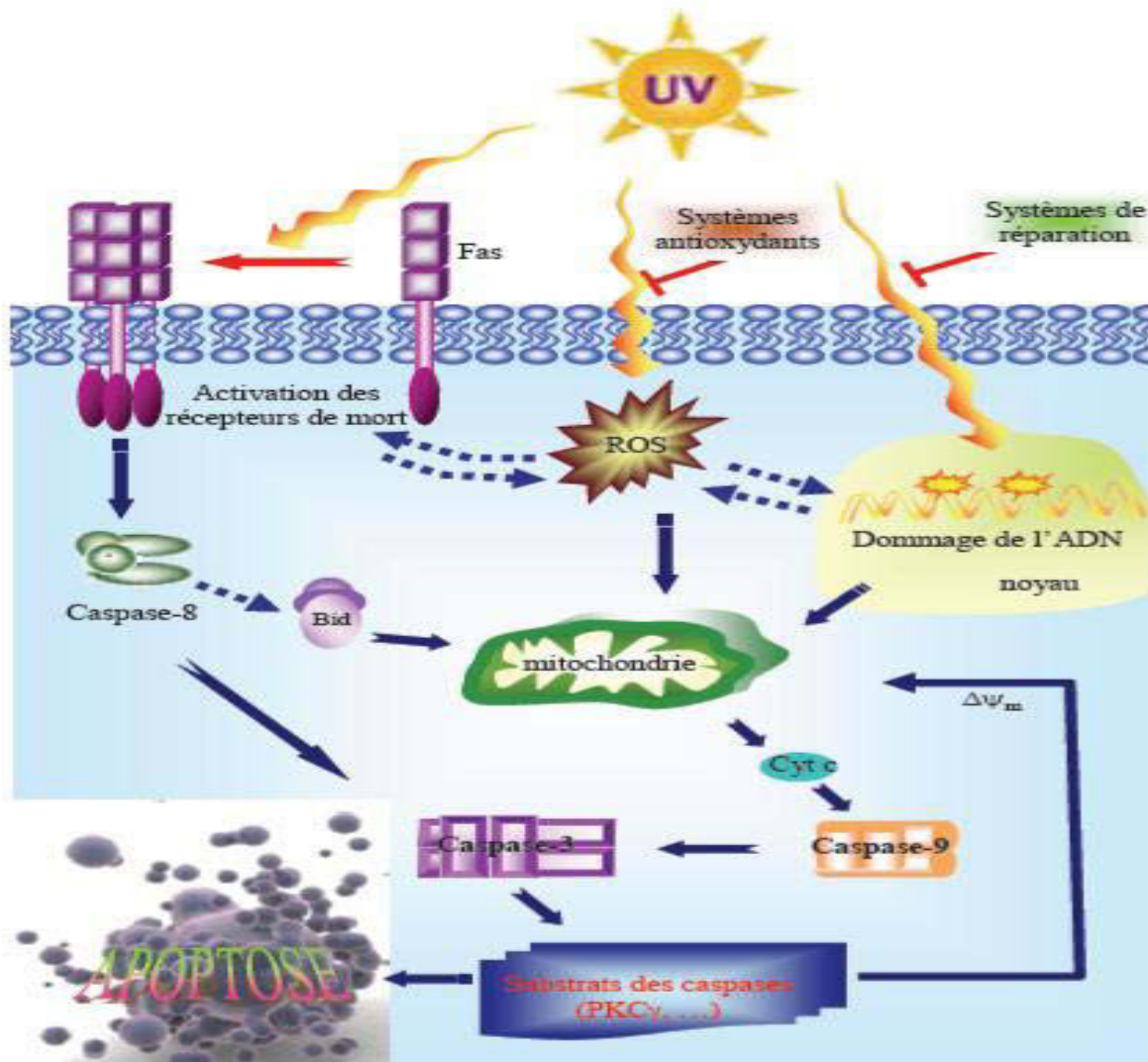


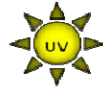
Figure 23. Signalisation apoptotique induite par les UV

7.9. Photoprotection par adaptation naturelle

7.9.1. Pigmentation

La pigmentation est un moyen de protection naturelle de la peau contre les rayonnements UV, la photo-cancérogenèse cutanée et le photovieillissement. Les effets néfastes provoqués par le soleil sont arrêtés par une barrière constituée par l'accumulation de mélanine qui est synthétisée au sein des mélanocytes, eux-mêmes présents dans les mélanosomes. La production de mélanine est le résultat d'un réseau complexe impliquant trois facteurs paracrines sécrétés par les kératinocytes : α -MSH (*α -melanocyte specific hormone*) codée par le gène de la pro-opiomélanocortine (POMC), l'endothéline et le FGF-2, mais aussi les récepteurs spécifiques de ces facteurs, respectivement : MC1R (*melanocortin 1 receptor*), EDNRB (*endothelin receptor type B*) et récepteur tyrosine kinase (Corre et Galibert, 2006). Ce réseau implique également plusieurs facteurs de transcription (Mitf et USF-1) ainsi que des gènes impliqués directement dans la synthèse du pigment (tyrosinase, TRP-1 et Dct) (Kadekaro *et al.*, 2003). Alors que le facteur de transcription Mitf intervient dans la pigmentation constitutive (Busca et Ballotti, 2000), le facteur de transcription USF-1, phosphorylé par la kinase p38 en réponse au stress UV, est impliqué dans la réponse pigmentaire (Figure 24) (Galibert *et al.*, 2001 ; Corre *et al.*, 2004). USF-1 augmente l'expression des gènes de la pigmentation (POMC, MC1R et tyrosinase) en réponse à une stimulation par les UV (Galibert *et al.*, 2001 ; Corre *et al.*, 2004). Ainsi, les mélanocytes USF-1^{-/-} préparés à partir des souris *knock-out* en USF-1 ne répondent plus aux stimulations UV. Enfin, différentes boucles d'amplification, faisant intervenir la kinase p38 et le facteur de transcription USF-1, permettent d'augmenter le processus de pigmentation pour une protection efficace de la peau.

A- Pigmentation physiologique



B- Pigmentation photo-induite

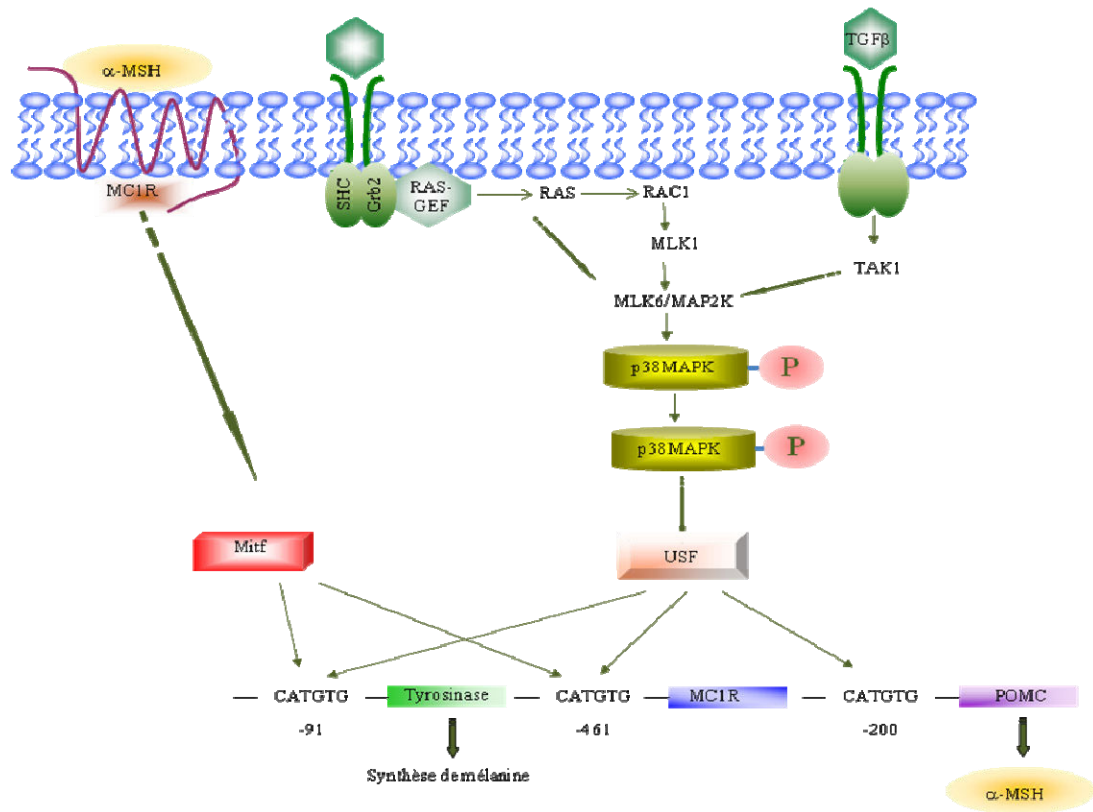


Figure 24. Voies principales de la pigmentation de la peau (d'après Corre et Galibert 2006).

Chapitre II : Le facteur de transcription HIF-1 α

1. Hypoxie, situation où intervient le facteur HIF-1

L'hypoxie est le terme attribué à la diminution de la concentration de l'oxygène en dessous d'un seuil critique, ce qui a pour conséquence, une modification ou altération des cellules, tissus ou organes (Hockel et Vaupel, 2001).

L'hypoxie peut être causée par une réduction de l'approvisionnement en oxygène (par exemple en altitude) ou par une interruption du flux sanguin vers une région donnée. Beaucoup de tumeurs solides contiennent des régions hypoxiques, en raison de l'incapacité de la vascularisation locale à fournir suffisamment d'oxygène à la tumeur (Pouyssegur *et al.*, 2006).

L'hypoxie a également un rôle important et bénéfique dans la physiologie des mammifères. Les conditions hypoxiques ont un rôle crucial dans l'embryogenèse. Au niveau cellulaire, la réponse à l'hypoxie comprend un changement du métabolisme aérobie en glycolyse anaérobie et l'expression de protéines de stress qui régulent la survie ou la mort cellulaire. Dans les tissus, la diminution de l'oxygène induit l'érythropoïèse et l'angiogenèse.

HIF-1 (*hypoxia-inducible factor-1*) est le régulateur majeur de la réponse à l'hypoxie avec l'activation de la transcription de plusieurs centaines de gènes impliqués dans des fonctions cellulaires aussi variées que la survie cellulaire, l'adhésion, la prolifération, l'apoptose, l'angiogenèse et la glycolyse (Semenza et Wang, 1992) (Figure 25). HIF-1 contribue également à la croissance des tumeurs (Semenza, 2004). Sa participation dans les physiopathologies telles que l'ischémie ou le cancer ainsi que potentiel en tant que cible thérapeutique ont suscité beaucoup d'intérêt pour la compréhension de sa régulation (Welsh SJ *et al.*, 2006).

L'identification d'HIF-1 a été réalisée par la découverte d'un élément de réponse à l'hypoxie (HRE; 5'-RCGTG-3') dans la séquence *enhancer en position 3'* non codante du gène de l'érythropoïétine (la cytokine principale pour la production de globules rouges surexprimée en conditions hypoxiques) (Goldberg *et al.*, 1988 ; Semenza *et al.*, 1991).

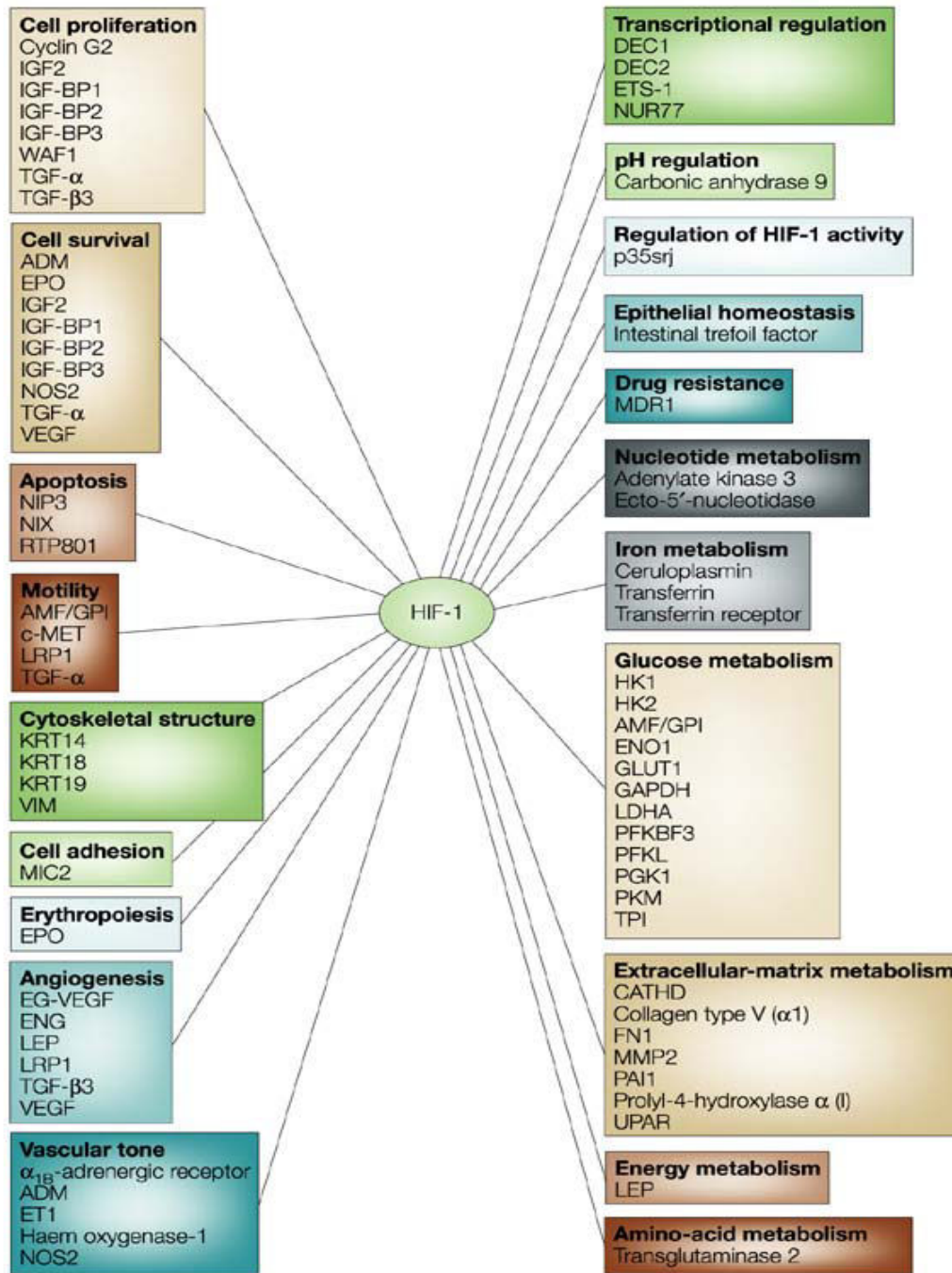


Figure 25. Les gènes cibles d'HIF-1 α . D'après Semenza, 2003

2. Structure de HIF-1

Le facteur de transcription HIF-1 est un hétérodimère composé d'une sous-unité HIF-1 α régulatrice et d'une seconde HIF-1 β , aussi appelé *Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator* (ARNT), constitutivement exprimée (Goldberg *et al.*, 1988). HIF-1 se lie à la séquence HRE contenue dans le promoteur des gènes cibles, initiant ainsi leur transactivation et une réponse adaptative à l'hypoxie (Michel *et al.*, 2000).

Le gène humain codant pour HIF-1 α est localisé sur le chromosome 14 (14q21-q24), tandis que celui qui code pour HIF-1 β est localisé sur le chromosome 1 (1q21) (Dery *et al.*, 2004).

HIF-1 α (826 acides aminés) et HIF-1 β (789 acides aminés) se partagent deux domaines bHLH (*base helix-loop-helix*) et PAS (acronyme référant aux premières protéines, PER, ARNT, SIM, dans laquelle ce motif a été identifié) (Jiang *et al.*, 1996). Les interactions entre les domaines HLH et PAS régulent la dimérisation des deux sous-unités ainsi que leurs interactions avec la séquence HRE de l'ADN (Michel *et al.*, 2000). La protéine HIF-1 α contient également deux domaines de transactivation (TAD). Le domaine N-TAD correspond à la région N-terminale (NAD) située entre les acides aminés 531 et 575, tandis que le domaine C-TAD correspond à la région C-terminale (CAD) située entre les acides aminés 786 et 826. Les fonctions principales de ces deux domaines sont de recruter les protéines co-activatrices, qui sont nécessaires à l'activation transcriptionnelle des gènes cibles de HIF-1 α . Ces domaines sont également importants dans les modifications post-traductionnelles que HIF-1 α subit telle que l'hydroxylation, la phosphorylation, et l'acétylation (Bruick et McKnight, 2001 ; Jeong *et al.*, 2002). La stabilité de HIF-1 α est régulée par le domaine ODD (*oxygen-dependent domain*) situé entre les acides aminés 401 et 608, en fonction de la concentration d'O₂ (Huang *et al.*, 1998 ; Pugh *et al.*, 1997). Deux séquences PEST (séquence riche en proline, acide glutamique, sérine ou thréonine qui se trouve dans plusieurs protéines ayant une durée de vie courte) composées de 20 acides aminés ont été décrites pour HIF-1 α , mais ne semblent pas être impliquées de façon claire dans la stabilité de cette protéine. Enfin deux séquences de localisation nucléaires (NLS, *nuclear localisation sequence*) ont été trouvées, une dans le domaine CAD (NLS-C) et une autre dans le domaine NAD (NLS-N) (Lee *et al.*, 2004 ; Brahimi-Horn *et al.*, 2005) (Figure 26).

La protéine HIF-1 β contient un domaine CAD en plus des domaines bHLH et PAS déjà cités (Figure 26).

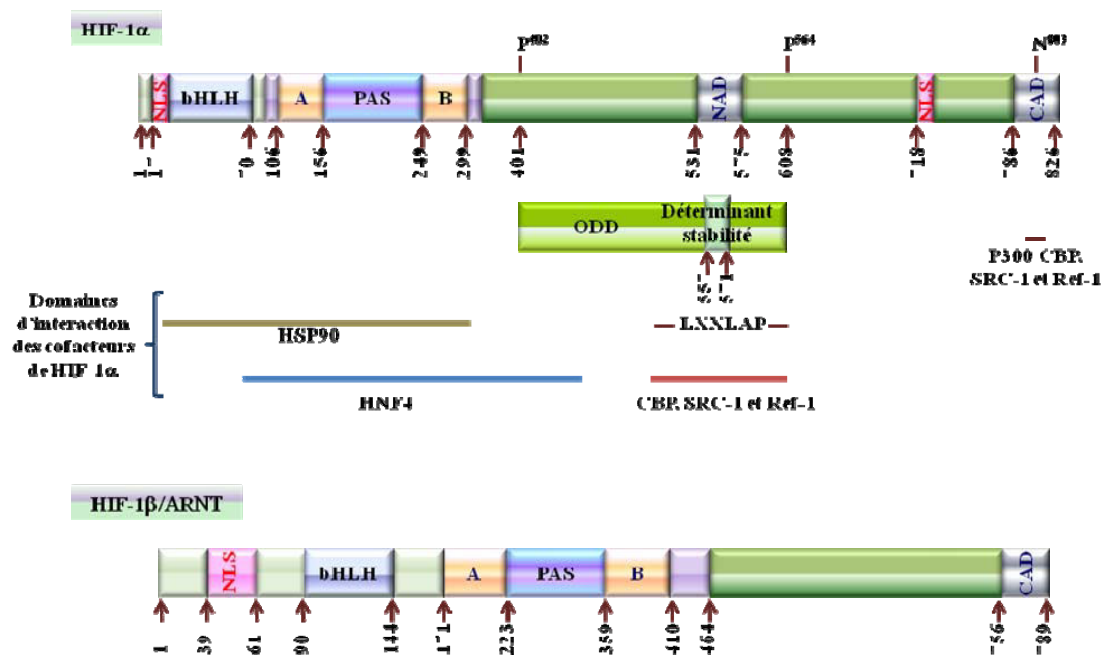


Figure 26. Schéma représentant la structure de HIF-1. bHLH : *basic helix-loop-helix*, ODD : *oxygen dependent degradation motif*, LXXLAP : motif conservé de *C. elegans* à l'homme, et reconnu par la HIF-proline hydroxylase, pVHL : protéine von Hippel Lindau, PAS : Per, Arnt, Sim motif, NAD et CAD : domaines de transactivation N- et C-terminal, NLS : séquence de localisation nucléaire.

2.1. Isoformes de HIF-1 α

À ce jour, trois isoformes d'HIF- α ont été décrites (HIF-1 α , HIF-2 α et HIF-3 α), chacune pouvant se dimériser avec HIF-1 β . L'expression de HIF-1 α est ubiquitaire, alors que HIF-2 α possède une expression tissulaire-spécifique (l'endothélium, le rein, le poumon, le cœur et l'intestin grêle) (Loboda *et al.*, 2010). HIF-3 α est exprimé par plusieurs tissus : le thymus adulte, le poumon, le cerveau, le cœur et le rein (Gu *et al.*, 1998).

Cinq isoformes de HIF-1 α ont été distingués (Figure 27).

- HIF-1 α ^{FL} est identique au type sauvage excepté pour les trois bases TAG entre les exons 1 et 2.

- HIF-1 α ⁷³⁶ ne possède pas l'exon 14, et par conséquent le domaine C-terminal. Les isoformes HIF-1 α ^{FL} et HIF-1 α ⁷³⁶ possèdent une activité transcriptionnelle et peuvent activer le promoteur du VEGF dans les conditions hypoxiques (Gothie *et al.*, 2000).
- HIF-1 α ⁵⁵⁷ (ou HIF-1 α Z) et HIF-1 α ⁵¹⁶, contrairement à HIF-1 α ^{FL} et HIF-1 α ⁷³⁶, fonctionnent comme des dominants négatifs de HIF-1 α . L'isoforme HIF-1 α Z ne possède pas l'exon 12 et HIF-1 α ⁵¹⁶ est dépourvu des exons 11 et 12 (Chun *et al.*, 2001 ; Chun *et al.*, 2002).
- L'isoforme la plus récemment identifiée est HIF-1 α ⁷⁸⁵. Elle contient tous les domaines fonctionnels mais est privé d'exon 11 (Chun *et al.*, 2003).

Il faut noter que le rôle de ces différentes isoformes reste à ce jour inconnu. De plus, un transcrit antisens de HIF-1 α (α HIF) a été découvert dans un grand nombre de tissus et de tumeurs qui l'expriment de manière constitutive (Thrash-Bingham et Tartof, 1999 ; Uchida *et al.*, 2004). Ce transcrit, formé d'une séquence complémentaire de l'ARNm de HIF-1 α , possède des séquences HRE au sein de son promoteur (Rossignol *et al.*, 2002). Il a été suggéré que ce transcrit était capable de réguler l'expression de HIF-1 α selon un rétrocontrôle négatif (*negative feedback loop*).

HIF-3 α possède cinq isoformes différentes issues d'épissages alternatifs qui peuvent fonctionner comme des inhibiteurs de HIF-1 α (Liu *et al.*, 1992). HIF-3 α et ces isoformes sont encore peu étudiés.

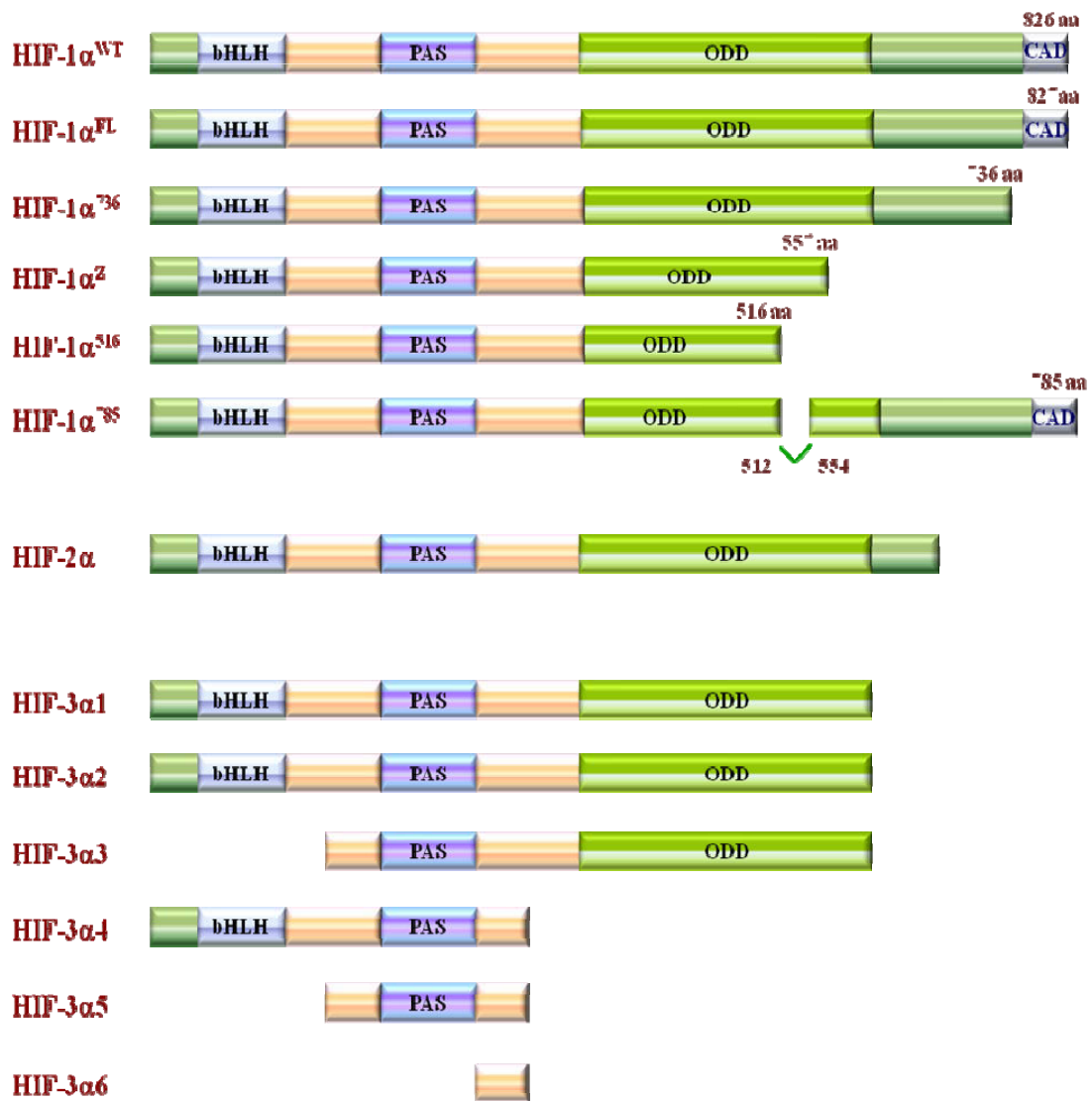


Figure 27. Les isoformes de HIF-1 α , -2 α et -3 α . bHLH : *basic helix-loop-helix*, PAS : *Per, Arnt, Sim motif*, ODD : *oxygen dependent degradation motif*, CAD : *domaines de transactivation C-terminal*.

3. Régulation de HIF-1 α

La protéine HIF-1 α a une demi-vie courte (à peu près 5 mn), son régulateur majeur est l'oxygène (Salceda et Caro, 1997). Au cours de l'hypoxie, HIF-1 α est stabilisé et transloqué du cytoplasme vers le noyau, où il forme un complexe avec HIF-1 β qui va activer les gènes cibles (Huang *et al.*, 1996a ; Kallio *et al.*, 1997). Il est maintenant admis que HIF-1 α peut aussi être régulé par des mécanismes indépendants de l'oxygène.

3.1. Régulation O₂ dépendante

3.1.1. Hydroxylation

En présence d'oxygène, HIF-1 α est hydroxylé sur des prolines spécifiques et des résidus asparagines par des enzymes qui nécessitent comme facteurs l'O₂, le Fe (II) et le 2-oxoglutarate (Schofield et Zhang, 1999 ; McNeil *et al.*, 2002). Quatre hydroxylases ont été décrites comme reconnaissant HIF-1 α : (i) trois prolyl-4-hydroxylase (PHD1-3), qui modifient les résidus de proline Pro402 et Pro564 chez l'homme, et (ii) FIH-1 (*factor inhibiting HIF-1*) qui modifie l'asparagine 803 (Asn803) (Walmsley *et al.*, 2008). Les prolines 402 et 564 sont situées dans le domaine ODD, tandis que l'Asn803 est située dans le domaine C-TAD de HIF-1 α (Figure 28).

Berra a récemment démontré, que l'inhibition de PHD2 en normoxie par la technique d'ARN interférant (siRNA) permettait de stabiliser HIF-1 α mais qu'en revanche, les siRNA dirigés contre PHD1 ou 3 n'entraînent pas la stabilisation dans les mêmes conditions. En conséquence, le PHD2 serait l'enzyme possédant la plus haute spécificité pour l'hydroxylation de HIF-1 α (Stiehl *et al.*, 2006). Ces PHD ont une activité optimale fonction de la concentration en dioxygène, Fe²⁺ et 2-oxoglutarate. Une diminution d'un de ces facteurs ou d'autres conditions telles que le traitement avec le CoCl₂ ou la déféroxamine (DFO) empêche les PHD d'hydroxyler HIF-1 α .

Une fois que HIF-1 α est hydroxylé sur les deux prolines, il peut être reconnu par le suppresseur de tumeur pVHL (*von Hippel-Lindau*). Le pVHL par son activité E3 ubiquitine ligase va diriger l'ubiquitinylation de HIF-1 α et sa dégradation par le protéasome (Figure 28). La perte ou la mutation de pVHL, *in vivo*, stabilise la protéine HIF-1 α en normoxie et peut conduire au syndrome de VHL et à des cancers héréditaires (Cockman *et al.*, 2000 ; Kamura

et al., 2000 ; Krieg *et al.*, 2000 ; Ohh *et al.*, 2000). Les mutations inactivant VHL dans les lignées cellulaires du cancer du rein montrent une surexpression de HIF-1 α en normoxie (Maxwell *et al.*, 1999). En normoxie, HIF-1 α peut aussi subir une hydroxylation sur l'asparagine 803 située dans le domaine C-TAD par FIH-1 (*factor inhibiting HIF-1a*). L'hydroxylation de ce domaine empêche l'interaction de HIF-1 α avec ses co-activateurs tels que les p300/CBP ce qui inhibe ainsi l'activité transcriptionnelle de HIF-1 (Lando *et al.*, 2002). FIH-1 n'influence pas la stabilité de HIF-1 α (Safran et Kaelin, 2003) et son hydroxylation, comme pour PHD, ne se fait qu'en normoxie. En revanche, l'hypoxie aboutit à l'activité transcriptionnelle de HIF-1 α .

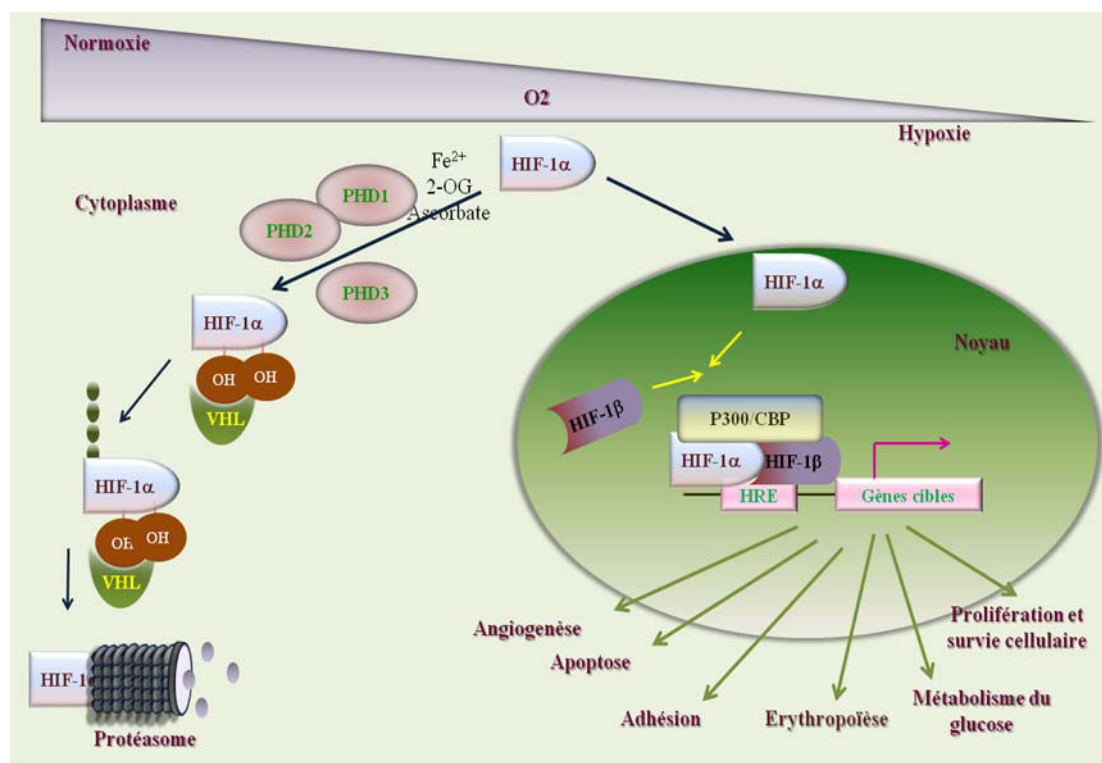


Figure 28. Régulation de HIF-1 α dépendante d' O_2 . En normoxie, HIF-1 α est rapidement dégradé par le protéasome après avoir été ubiquitinylé par pVHL. Ce dernier reconnaît HIF-1 α après son hydroxylation sur les prolines P403 et P564 par les PHD. En hypoxie, HIF-1 α est stable et transloqué dans le noyau où il se dimérise avec HIF-1 β . Le complexe ainsi formé recrute les cofacteurs tels que p300/CBP et conduit à l'activation des gènes cibles en se fixant sur les HRE de ces derniers.

3.2. Régulation O₂ indépendante

Un faisceau d'argument montre actuellement que l'activation de HIF-1 n'est pas un processus «tout ou rien» limité aux conditions hypoxiques. L'expression de l'ARNm et la synthèse de HIF-1 α ainsi que son activité transcriptionnelle sont également régulées en présence d'oxygène par divers mécanismes tels que l'acétylation, la phosphorylation, la SUMOylation et la S-nitrosation (Figure 29).

3.2.1. Acétylation

L'acétylation des histones est largement liée à l'activation transcriptionnelle et la désacétylation à la répression de la transcription (Carrozza *et al.*, 2003 ; Kouzarides, 2000). En plus de la modification des histones, un grand nombre de protéines sont connues pour être acétylées (par exemple : p53, p73 et c-Myb). Le résidu lysine 532 (Lys532) situé dans le domaine ODD de HIF-1 α est acétylé par une acétyltransférase nommé ARD-1 (*ARrest Defective-1 protein*) (Jeong *et al.*, 2002). L'acétylation de la Lys532 favorise l'interaction de HIF-1 α avec pVHL et déstabilise ainsi HIF-1. La mutation de cette lysine conduit à une stabilité accrue de HIF-1 α (Tanimoto *et al.*, 2000). En outre, le maintien ou l'augmentation artificielle de l'état acétylé de HIF-1 α par l'acide butyrique (un inhibiteur globale de désacétylases) provoque une diminution de la protéine HIF-1 α (Kim *et al.*, 2001). Etant donné que l'activité des acétyltransférases n'est pas influencée par l'oxygène, l'ARD1 est donc capable d'acétyler HIF-1 α en normoxie et en hypoxie. L'expression de l'ARNm et de la protéine ARD-1 diminue au cours de l'hypoxie, ce qui provoque moins d'acétylation de HIF-1 α qu'en normoxie (Jeong *et al.*, 2002).

3.2.2. Phosphorylation

La phosphorylation est cruciale dans le contrôle de l'activité des protéines. La phosphorylation directe de HIF-1 a été observée aussi bien en hypoxie qu'en normoxie. L'activation des voies PI3K et P42/P44 MAPK est suivie par la synthèse protéique de HIF-1 α et le renforcement de son activité transcriptionnelle (Bernardi *et al.*, 2006 ; Richard *et al.*, 1999). Il a été démontré que les kinases p38 et p42/44 sont capables de phosphoryler HIF-1 α *in vitro* ainsi que *in vivo* (Middleton *et al.*, 2000 ; Theodoropoulos *et al.*, 2004). La phosphorylation de HIF mène à son activation et finalement à la transcription des gènes cibles tels l'érythropoïétine et VEGF et son inhibition par des inhibiteurs de p38 et p42/44 bloque, au

contraire, leur expression (Triantafyllou *et al.*, 2007). La transfection des formes actives de p42/44 kinase stimule l'activité transcriptionnelle de HIF-1 α mais elle n'affecte pas sa stabilité. La surexpression de HIF-1 α par la voie ERK 1/2 est observée en hypoxie (Minet *et al.*, 2001). À l'inverse, la surexpression de p38 kinase en aval des kinases MKK3 et MKK6 (en hypoxie ou en normoxie) conduit à la stabilisation de HIF-1 α (Kietzmann *et al.*, 2003).

Plusieurs études ont montré que les UV combinés à l'hypoxie peuvent activer la cascade de signalisation MAPK incluant les voies ERK, p38 MAPK et JNK (Kietzmann et Gorchach, 2005 ; Michiels *et al.*, 2002 ; Bode et Dong, 2003 ; Gerald *et al.*, 2004). Rezvani et collaborateurs (2007) ont montré que l'inhibition des voies p38 MAPK et JNK dans les kératinocytes avant l'irradiation UVB empêche la surexpression de HIF-1 α dans ses formes phosphorylée et non phosphorylée. Dans cette étude, les kératinocytes non irradiés et traités avec des inhibiteurs de p38 ou de JNK possèdent une quantité plus faible de HIF-1 α phosphorylé en comparaison avec des cellules non traitées. Ces résultats suggèrent que les deux kinases sont aussi impliquées dans la phosphorylation de HIF-1 α . Le rôle clé des ROS dans la stabilisation de HIF-1 α , grâce à l'activation des MAPK en hypoxie (Bell *et al.*, 2005 ; Kwon *et al.*, 2005) ou en normoxie (Kietzmann et Gorchach, 2005 ; Michiels *et al.*, 2002 ; Semenza, 1999 ; Gerald *et al.*, 2004), a également été démontré. D'autres données prouvent que les UVB stimulent les voies JNK, p38 et ERK (Bode et Dong, 2003) et que les ROS induits par les UVB sont impliqués dans l'activation de voies de MAPK (Assefa *et al.*, 2005). Ces résultats sont confirmés par Rezvani et collaborateurs (2007). En effet, l'activation des ROS par des JNK et p38 MAPK après l'irradiation UVB est importante pour la phosphorylation et l'accumulation de HIF-1 α (Figure 31).

3.2.3. SUMOylation

La SUMOylation est une modification post-traductionnelle qui consiste à ajouter la protéine SUMO (*small ubiquitin-related modifier*) à des protéines cibles. La cascade enzymatique de la SUMOylation, similaire à celle de l'ubiquitination, conduit à la fixation du groupement SUMO à des résidus lysine. L'effet de la SUMOylation sur la fonction HIF-1 α est encore controversé. Une étude a montré que la SUMOylation renforce la stabilité de HIF-1 α ainsi que l'augmentation de son activité transcriptionnelle (Bae *et al.*, 2004). Une autre étude confirmant cette théorie a montré que la protéine identifiée récemment RSUME (*RWD-containing sumoylation enhancer*) induite par des conditions hypoxiques conduit à la

SUMOylation de HIF-1 α aboutissant à sa stabilisation et favorisant ainsi son activité transcriptionnelle (Carbia-Nagashima *et al.*, 2007). Une étude utilisant une approche siRNA contredit les deux précédentes en démontrant que la SUMOylation de HIF-1 α ne modifie pas sa stabilité mais aboutit à une diminution de son activité transcriptionnelle (Berta *et al.*, 2007).

3.2.4. S-nitrosation

La S-nitrosation a également été décrite comme un mécanisme régulant HIF-1 α . La nitrosation de Cys800 par le NO (exogène et endogène) stimule l'interaction entre HIF-1 α et la protéine p300 ce qui induit l'augmentation de son activité transcriptionnelle (Sumbayev *et al.*, 2003 ; Yasinska et Sumbayev, 2003). D'autre part, une autre étude suggère que le NO inhibe l'accumulation de HIF-1 α dans les conditions hypoxiques (Kozhukhar *et al.*, 2006). Cet effet peut être expliqué par différents mécanismes : la redistribution de l'oxygène intracellulaire qui est important pour la fonction des PHD et l'augmentation de la concentration de 2-oxoglutarate et du fer cytosolique (Sumbayev et Yasinska, 2006).

L'expression de l'ARNm, la synthèse protéique et l'activité transcriptionnelle de HIF-1 α sont également induites en normoxie par divers stimuli comme des facteurs de croissance (PDGF, EGF, HGF), des oncogènes (v-Src, RasV12, Her2/neu, Akt) et des facteurs d'inflammation (IL-1 β , TNF- α , NO) (Metzen et Ratcliffe, 2004). Ces facteurs induisent la liaison à l'ADN et l'expression de HIF-1 α , et par conséquent l'expression des gènes cibles en normoxie ou en hypoxie.

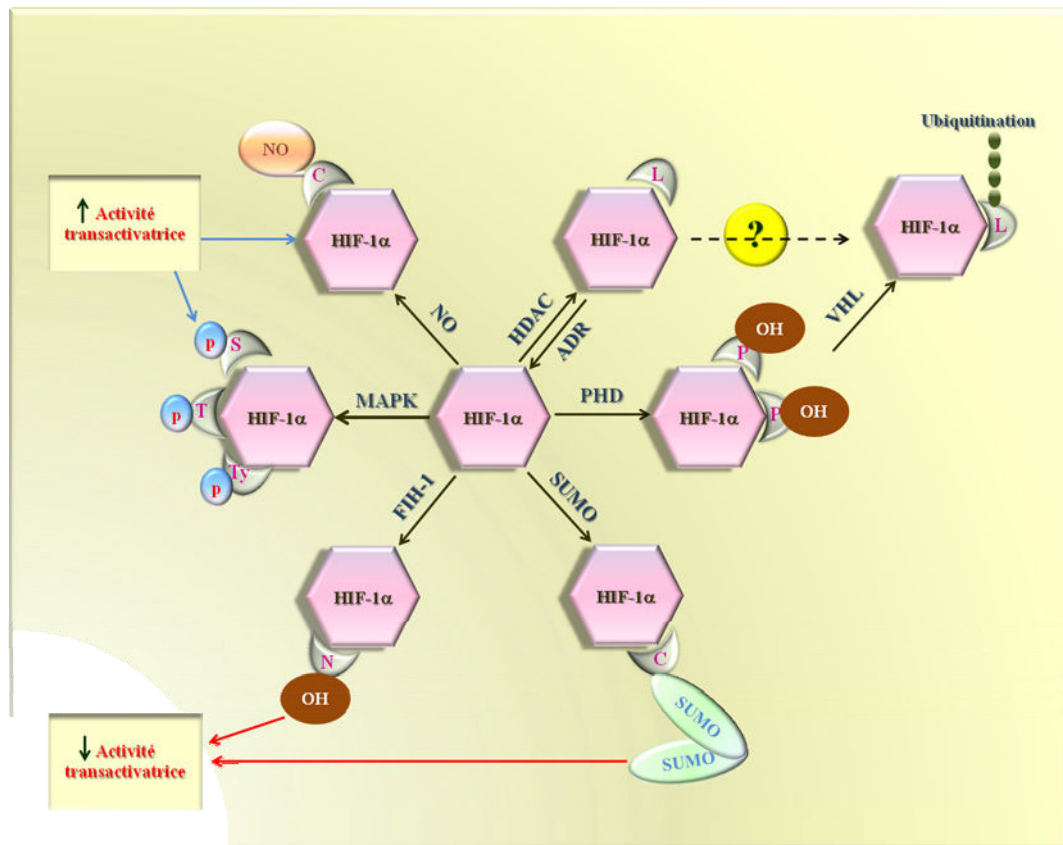


Figure 29. Modifications post-traductionnelles de HIF-1 α . L'hydroxylation par PHD (*prolyl hydroxylase*) et aussi l'acétylation par ARD-1 (*ARrest Defective-1 protein*) aboutissent à l'augmentation de l'interaction entre HIF-1 α et pVHL et par conséquent entraînent l'ubiquitination et la dégradation de HIF-1 α . L'activité transactivatrice de HIF-1 α est réduite *via* hydroxylation par FIH-1 (*Factor Inhibiting HIF-1*) mais aussi *via* la SUMOylation. L'activité transactivatrice de HIF-1 α est augmentée *via* la phosphorylation par les MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) mais aussi *via* la S-nitrosation par NO. C : Cystéine, L : Lysine, N : Asparagine, P : proline, S : Sérine, T : Thréonine, Ty : Tyrosine.

Les gènes suppresseurs de tumeur tels que p53 et PTEN (un antagoniste de PI-3K) influencent les niveaux d'expression et les fonctions de HIF-1 α . En hypoxie, la p53 est impliquée dans l'inhibition de l'activité de HIF-1 α (Perkins *et al.*, 1996) et l'induction des inhibiteurs de l'angiogenèse comme la thrombospondine-1 (Dameron *et al.*, 1994). La perte de p53 quant à elle, peut induire une accumulation de HIF-1 α en hypoxie et augmenter l'expression des ces gènes cibles (par exemple, VEGF) (Bouvet *et al.*, 1998). Le mécanisme par lequel p53 affecte l'activité transactivatrice de HIF-1 α est la compétition pour p300 (Schmid *et al.*, 2004).

La perte de la fonction de PTEN aboutit à une augmentation de l'expression des gènes cibles de HIF-1 α (Zundel *et al.*, 2000) tandis que la restauration de PTEN peut inhiber l'expression de HIF-1 α (Jiang *et al.*, 2001). D'autres protéines sont connues pour affecter la stabilité de HIF-1 α . L'oncogène E3 ligase MDM2 (*Murine Double Minute 2*) est impliqué dans l'ubiquitination de HIF-1 α en mode p53-dépendante (Treins *et al.*, 2002). Par ailleurs, l'augmentation de l'expression de HIF-1 α en normoxie serait également dépendante de la production des ROS (Kietzmann et Gorch, 2005). L'induction de HIF-1 α en réponse à la stimulation des cellules par les facteurs de croissance en conditions de normoxie est différente de celle dépendante de l'hypoxie par deux aspects (Semenza, 2003) :

- 1- L'hypoxie induit l'augmentation de HIF-1 α dans toutes les cellules alors que les facteurs de croissance stimulent HIF-1 α en fonction du type cellulaire,
- 2- L'augmentation de HIF-1 α en hypoxie est due à la stabilisation de la protéine et à la diminution de sa dégradation alors que la régulation de HIF-1 α suite à la stimulation par les facteurs de croissance se fait au niveau de l'expression de l'ARNm.

3.3. Cofacteurs impliqués dans la régulation de HIF-1 α

Il a été montré que le complexe p300/CBP est capable de se lier au domaine C-TAD de HIF-1 α et d'activer la transactivation du gène cible (Manolescu *et al.*, 2009). Cette interaction est favorisée par les inhibiteurs d'hydroxylase ou par la S-nitrosation de la Cys 800 de HIF-1 α . De plus, la phosphorylation de HIF-1 α ou de p300 peut faciliter cette interaction (Sang *et al.*, 2003). D'autres cofacteurs peuvent s'associer à p300 et HIF-1 α comme SRC-1 (*Steroid Receptor Coactivator-1*) et TIF2 (*transcription intermediary factor 2*). Ces deux facteurs en interagissant avec HIF-1 α vont augmenter son potentiel de transactivation de manière synergique avec p300 (Carrero *et al.*, 2000). Un autre coactivateur capable de se lier à p300 est le facteur de transcription HNF-4 (*Hepatocyte Nuclear Factor 4*) qui interagit avec p300 et HIF-1 α en réponse à l'hypoxie (Vo et Goodman, 2001 ; Bunn *et al.*, 1998). La protéine chaperonne Hsp90 a été identifiée comme un cofacteur de HIF-1 α régulant sa stabilité en normoxie et en hypoxie (Chan *et al.*, 2002 ; Isaacs *et al.*, 2002 ; Katschinski *et al.*, 2002). Le facteur HPTF (*HIF-1 α proteasome targeting factor*) est aussi un facteur impliqué dans la dégradation de HIF-1 α . Il fonctionne selon un mécanisme de régulation par

rétrocontrôle de la dégradation de HIF-1 α analogue à celui du couple p53/MDM2 (Berra *et al.*, 2001) (Figure 30). HPTF pourrait être en réalité le capteur de la PHD, mais cette hypothèse reste à démontrer (Brahimi-Horn *et al.*, 2001).

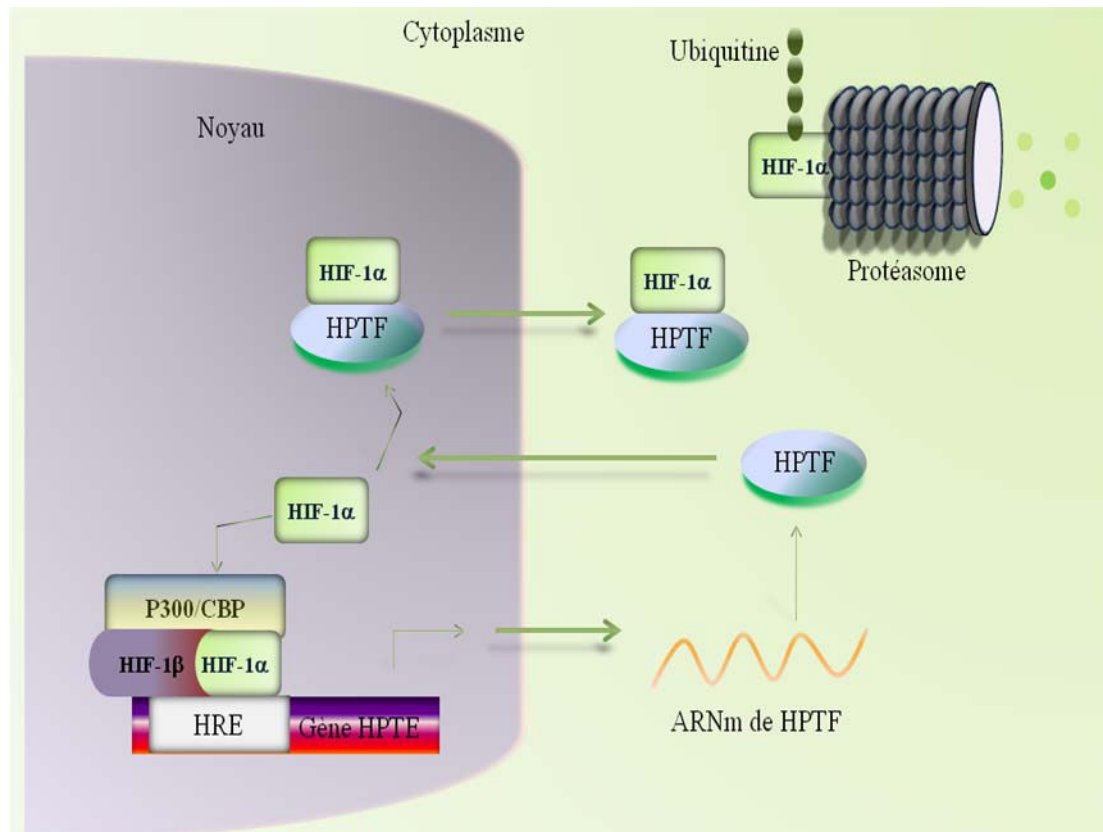


Figure 30. Régulation de HIF-1 α par HPTF (*HIF-1 α proteasome targeting factor*). En condition d'hypoxie, HIF-1 α s'accumule et le complexe HIF-1 entraîne l'expression de gènes cibles spécifiques parmi lesquels HPTF. Ce facteur s'accumule en hypoxie et participe avec pVHL à la dégradation rapide du HIF-1 α lors du retour en normoxie. D'après Berra *et al.* 2001.

3.4. Rôle des ROS dans l'activation de HIF-1 α

Le niveau des ROS intracellulaires est paradoxalement augmenté en hypoxie. Les mitochondries semblent être la principale source de production de ROS (Guzy et Schumacker, 2006). Les ROS (cytoplasmiques ou mitochondriaux) peuvent réguler HIF-1 α par plusieurs mécanismes (Kietzmann et Gorglach 2005) :

- La diminution de l'oxygène ou la réduction de Fe²⁺ en Fe³⁺ (par l'augmentation des ROS mitochondriaux) peut conduire à l'inhibition de l'activité de PHD qui aboutit à l'accumulation de HIF-1 α ,
- La production des ROS cytoplasmique par la NADPH oxydase conduit à la dégradation de HIF-1 α en normoxie.
- En hypoxie, les ROS mitochondriaux peuvent également activer HIF-1 *via* l'activation des composants en amont tels qu'ERK et p38 MAPK. Il a été démontré que, *in vitro* et *in vivo*, ERK2 activé induit la phosphorylation de HIF-1 α et augmente son activité transcriptionnelle (Richard *et al.*, 1999). p38 activé par les ROS mitochondriaux contribue à l'activation de HIF-1 α en inhibant son hydroxylation (Emerling *et al.*, 2005).

Plusieurs études ont montré que la production des ROS contribue à l'activation de PI3K-(PKB/Akt) et à l'induction de l'expression de HIF-1 α dans les cellules cancéreuses (Liu *et al.*, 2006 ; Zhou *et al.*, 2007 ; Gao *et al.*, 2002 ; Flugel *et al.*, 2007). Il a été montré que l'addition de H₂O₂ ou d'agents oxydants à HIF-1 α purifié inhibe sa liaison à l'ADN. L'interaction directe entre le domaine C-TAD de HIF-1 α et Ref-1 (*Redox Factor-1*) a été proposée comme étant le mécanisme responsable (Huang *et al.*, 1996a). L'autre facteur jouant un rôle important dans cette régulation est FIH qui peut être régulé par les ROS de manière semblable aux PHD.

On peut noter que les ROS induits par les UVB sont impliqués dans l'activation des voies de MAPK (Assefa *et al.*, 2005). Comme il a été mentionné précédemment, ces voies conduisent à l'activation de HIF-1 α . En accord avec ces résultats, Rezvani et collaborateurs (2007) ont constaté que l'activation des ROS suite à l'irradiation UVB est importante pour la phosphorylation et l'accumulation de HIF-1 α *via* les voies JNK et p38 MAPK. Ils ont également démontré que l'activation des MAPK a une origine mitochondriale, puisque la surexpression des enzymes antioxydants cytoplasmiques (catalase et CuZn-SOD) n'affecte pas la phosphorylation de HIF-1 α , JNK et p38 MAPK contrairement aux enzymes mitochondriales comme Mn-SOD. Il est probable que le signal mitochondrial soit transféré par un facteur non caractérisé à ce jour. Par ailleurs, ce facteur permet l'induction d'un activateur commun de JNK et p38 MAPK tel qu'ASK (*apoptosis- signaling kinase 1*), connu pour être activé à la fois par le stress oxydatif et l'irradiation UVB (Assefa *et al.*, 2005). Par

conséquent, l'activation de JNK et p38 MAPK conduit à la phosphorylation et probablement à la stabilisation de HIF-1 α , aboutissant ainsi à son accumulation. Parallèlement, l'activation des MAPK peut entraîner, par l'inactivation de la prolyl hydroxylase, l'augmentation renforcée de HIF-1 α (Figure 31).

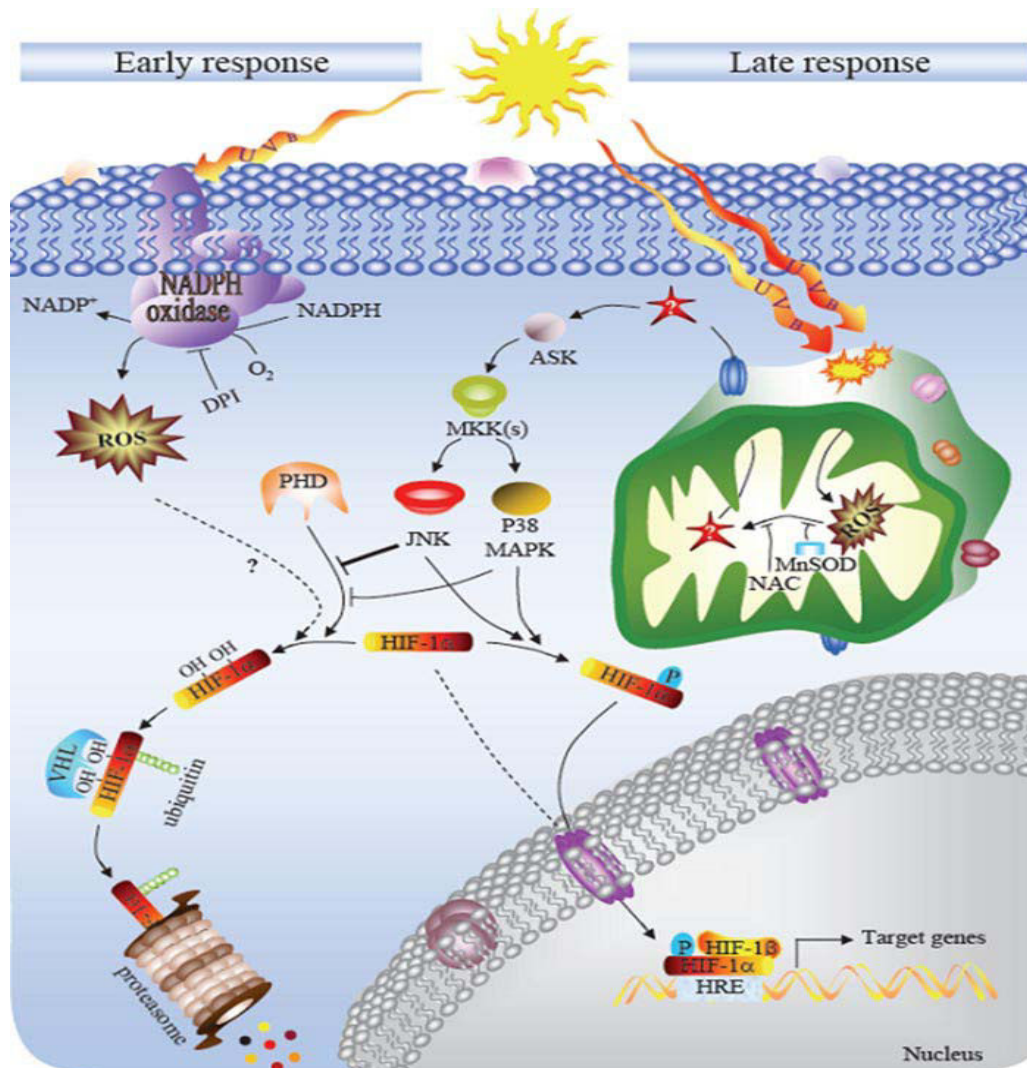


Figure 31. Régulation de l'activité de HIF-1 α par les ROS induits par UV. Les ROS mitochondriaux induits par les UVB conduisent à l'activation des voies JNK et p38 MAPK. Ces derniers induisent la phosphorylation de HIF-1 α et sa translocation dans le noyau afin d'activer les gènes cibles en interagissant avec les HRE. MAPK : *mitogen-activated protein kinase*, JNK : *c-Jun amino-terminal kinases*, ASK : (*apoptosis- signaling kinase 1*), D'après Rezvani *et al.*, 2007.

4. Rôle de HIF-1 α dans la peau

La peau est un micro-environnement hypoxique (Bedogni *et al.* 2005), ce qui suggère une expression élevée de HIF-1 α et un rôle spécifique de ce dernier dans la physiologie de la peau. En effet, l'importance de HIF-1 α dans la peau a été montrée par sa suppression dans les kératinocytes (Boutin *et al.*, 2008). Cela a permis de constater que l'inactivation de HIF-1 α dans l'épiderme inhibe la synthèse de l'érythropoïétine rénale (EPO) en réponse à l'hypoxie. L'augmentation de HIF-1 α dans la peau peut contribuer à l'expansion vasculaire, et donc à la modification des flux vasculaires cutanés (Elson *et al.*, 2001 ; Kim *et al.*, 2006). De plus, HIF-1 α est une cible de MITF (*Microphthalmia Associated Transcription Factor*), un facteur de transcription spécifique des mélanocytes participant à la survie et au développement des précurseurs mélanocytaires mais aussi à la croissance et la survie des mélanocytes matures et des cellules de mélanome (Busca *et al.* 2005). Le rôle de HIF-1 dans la peau concerne les domaines suivants : le cancer et l'angiogénèse tumorale, la cicatrisation, les molécules d'adhésion (intégrines, laminine et collagènes) et les métalloprotéinases.

4.1. HIF-1 α , cancer et angiogénèse tumorale

Des études ont montré une expression élevée de HIF-1 α dans les tumeurs malignes dérivées des kératinocytes en particulier dans le CSC (Lining *et al.*, 2009). Ces résultats suggèrent que HIF-1 α pourrait contribuer à l'apparition et à la progression des tumeurs dans les kératinocytes. Par contre, il a aussi été démontré que la surexpression de HIF-1 α est associée à la survie des patients qui sont atteints de carcinomes épidermoïdes de la tête, du cou et du poumon (Nakanishi *et al.*, 2005 ; Beasley *et al.*, 2002).

Selon Bedogni *et al.* en 2005, HIF-1 α pourrait jouer un rôle important dans la transformation des mélanocytes par l'activation d'AKT. Dans cette étude, ils ont montré qu'AKT est capable de transformer les mélanocytes uniquement dans un environnement hypoxique, que l'on trouve dans la peau normale. HIF-1 α s'avère nécessaire pour la transformation des mélanocytes (AKT-dépendante) et pour amplifier le potentiel oncogène d'AKT. L'inhibition de HIF-1 α en hypoxie, diminue la croissance tumorale *in vivo* ainsi que la capacité d'AKT à transformer les mélanocytes. En revanche, la surexpression de HIF-1 α , en normoxie, permet un développement tumoral plus agressif. Dans les mélanomes, on

peut observer une induction de l'expression de l'ARNm de Notch1 (protéine importante pour la communication cellulaire) dépendante de HIF-1 α . Cette induction aboutit à l'amplification de la signalisation de Notch1 qui conduit à la transformation des mélanocytes et facilite la croissance du mélanome (Bedogni *et al.* en 2008). L'activité Notch1 peut être régulée par FIH (Zheng *et al.*, 2008).

L'immunohistochimie sur les biopsies de plusieurs tumeurs humaines a révélé une surexpression de HIF-1 α (Zhong *et al.*, 1999 ; Talks *et al.*, 2000). Le niveau élevé de HIF-1 α dans les tumeurs reflète la présence de conditions hypoxiques intratumorales et le fait que de nombreuses altérations génétiques dans les cellules cancéreuses affectent l'expression de HIF-1 α (Tableau 8).

Variation génétique dans la tumeur	Mécanisme de l'induction de HIF-1 α
Perte de fonction de VHL	Diminution de l'ubiquitination
Perte de fonction de p53	Diminution de l'ubiquitination
Perte de fonction de PTEN	Augmentation de synthèse
Acivation de la cascade PI3K-AKT-mTOR	Augmentation de synthèse
Perte de fonction de SDH-B	Diminution de l'ubiquitination
Perte de fonction de SDH-C	Diminution de l'ubiquitination
Perte de fonction de SDH-D	Diminution de l'ubiquitination
Perte de fonction de FH	Diminution de l'ubiquitination
Gain de fonction de SRC	Augmentation de synthèse et diminution de l'ubiquitination

Tableau 8. Altérations génétiques tumorales et effet sur HIF-1 α (d'après Hirota K et Semenza GL, 2006). VHL : *von Hippel-Lindau protein*; SDH : *succinate dehydrogenase*; FH : *fumarate hydratase*; PTEN : *phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10*; TSC : *tuberous sclerosis*; PI3K : *phosphatidylinositol-3-kinase*; AKT : *protein kinase B*; mTOR : *mammalian target of rapamycin*.

La démonstration de l'importance de HIF-1 α dans la progression des tumeurs a été clairement établie par l'invalidation des gènes codant pour celui-ci dans les cellules ES (*embryonic stem cell*) (Ryan *et al.*, 1998 ; Carmeliet *et al.*, 1998). Les tumeurs induites chez la souris nude par injection de ces cellules ont un déficit de croissance et sont faiblement

vascularisées contrairement à celles issues des cellules ES HIF-1 $\alpha^{+/+}$ (Ryan *et al.*, 1998). Bien que l'effet pro-angiogénique de HIF-1 α ait été suggéré comme mécanisme-clé de ces manifestations, d'autres équipes ont montré que l'augmentation de la croissance des tumeurs dérivées des cellules ES HIF-1 $\alpha^{-/-}$ serait liée à l'inhibition de l'apoptose (Carmeliet *et al.*, 1998). L'effet inductible de HIF-1 α sur l'angiogenèse et la progression des tumeurs a été confirmé par l'injection intratumorale d'un plasmide codant pour un antisens de HIF-1 α qui aboutit à la régression des tumeurs et à la diminution de l'expansion vasculaire (Sun *et al.*, 2003). Néanmoins, l'augmentation de HIF-1 α dans certain types de cancers induit une mortalité accrue, alors que dans d'autres elle la diminue (Semenza, 2003) (Tableau 9).

Type de tumeur	Association
Col utérin (stade précoce)	Augmentation de mortalité
Col utérin (radiothérapie, RTX)	Augmentation de mortalité
Sein (\pm métastase ganglionnaire)	Augmentation de mortalité
Oligodendrocytome	Augmentation de mortalité
Carcinome oropharyngé (SCC)	Augmentation de mortalité
Ovarien	Augmentation de mortalité
Endométrial	Augmentation de mortalité
Poumon (NSCLC)	Diminution de mortalité
Carcinome Tête et Cou SCC	Diminution de mortalité

Tableau 9. Effet de l'augmentation d'HIF-1 α dans les cancers humains (d'après Semenza 2003). NSCLC : *non-small lung cancer* ; RTX : *radiation thérapie* ; SCC : *Squamous-cell carcinoma*.

HIF-1 α est un facteur pro-angiogénique important pendant la croissance normale et la formation de tumeurs puisqu'il active VEGF et ses récepteurs (VEGFR) en se liant aux séquences HRE présente dans le promoteur de ces gènes (Forsythe *et al.*, 1996 ; Olsson *et al.*, 2006). Récemment, des études ont montré que HIF-1 α est un médiateur de la voie de signalisation autocrine VEGF/VEGFR primordiale dans la régulation des fonctions des cellules endothéliales et des cellules tumorales (Tang *et al.*, 2004 ; Das *et al.*, 2005). La suppression de HIF-1 α dans les cellules endothéliales perturbe l'induction de VEGFR-1 et VEGFR-2 par VEGF (Tang *et al.*, 2004). La perturbation de la signalisation autocrine

VEGFR-1/VEGF/VEGFR-2 entraîne : *in vitro*, une baisse de la prolifération des cellules endothéliales et de la formation de tubes et, *in vivo*, une sévère diminution de l'angiogenèse et de la croissance tumorale (Tang *et al.*, 2004).

4.2. HIF-1 α et cicatrisation

L'hypoxie joue un rôle essentiel dans la physiopathologie de diverses maladies humaines, comme les maladies cardiovasculaires ischémiques, les accidents vasculaires cérébraux, les maladies pulmonaires chroniques, les blessures aiguës de la peau et le cancer (Semenza, 2000). Après une blessure aiguë, le microenvironnement devient hypoxique, probablement à cause des perturbations vasculaires et de la consommation élevée en oxygène des cellules du bord de la plaie et des tissus de granulation (Hunt *et al.*, 1972 ; Niinikoski *et al.*, 1972 ; Varghese *et al.*, 1986). Le rôle de HIF dans la réparation tissulaire est mis en évidence par différents travaux.

HIF **peut induire plusieurs cytokines** (VEGF, TGF- β et PDGF) qui interviennent dans différents étapes de la cicatrisation (Tandara et Mustoe, 2004 ; Albina *et al.*, 2001). Le VEGF est essentiel dans l'induction et le maintien de l'angiogenèse au niveau de la blessure assurant ainsi la nutrition des nouvelles cellules. Le TGF- β et le PDGF jouent un rôle dans la prolifération et la migration des fibroblastes. Ils jouent aussi le rôle de médiateurs qui recrutent les macrophages et les neutrophiles qui sécrètent à leur tour une batterie de facteurs spécifiques nécessaires aux autres étapes. De plus, le TGF- β induit par l'hypoxie peut augmenter la production de composants de la matrice cellulaire tels que les collagène I, IV et la fibronectine dans les fibroblastes du placenta (Chen *et al.*, 2005 ; Papakonstantinou *et al.*, 2003). La prolifération et la migration des cellules (fibroblastes et kératinocytes) représentent une étape importante de la cicatrisation. L'hypoxie aiguë augmente la prolifération des fibroblastes dermiques humains, leur migration (Falanga et Kirsner, 1993 ; Mogford *et al.*, 2002 ; Lerman *et al.*, 2003) et la migration des kératinocytes (O'Toole *et al.*, 1997; Xia *et al.*, 2001). Le mécanisme par lequel l'hypoxie peut induire la migration des fibroblastes est expliqué par l'accumulation de HIF-1 qui induit la sécrétion et l'activation de la protéine hsp90 α (*shock protein-90alpha*) et va renforcer la migration des fibroblastes (Li *et al.*, 2007). Une autre étude a montré que la migration des kératinocytes est initiée par la sécrétion de hsp90 (comme les fibroblastes) dépendante de HIF-1 (Woodley *et al.*, 2009). hsp90 α favorise la migration, des kératinocytes mais pas leur prolifération. Le récepteur LRP1 (*LDL-receptor-*

related1) intervient dans la signalisation de hsp90 α . L'inhibition de la liaison LRP1-hsp90 α par des anticorps neutralisants ou par l'inactivation de LRP1 par ARNi inhibe complètement la migration des kératinocytes, même en hypoxie.

Il est intéressant de noter que HIF-1 est présent au niveau des blessures pendant la réépithélisation (Elson *et al.*, 2001). Des études ont montré que l'induction et la stabilisation de HIF-1 α par l'inhibition de PHD favorise la réépithélisation intestinale *in vivo* (Cummins *et al.*, 2008 ; Robinson *et al.*, 2008). La stabilisation de HIF améliore la cicatrisation chez les souris diabétiques db/db en augmentant l'expression des gènes cibles de HIF qui sont importants dans la motilité, l'angiogenèse et le recrutement de CAG tels que le hsp90 α , le VEGF, le VEGFR1, le SDF-1 α (*stromal cell-derived factor*) et le SCF (*stromal cell factor*) (Botusan *et al.*, 2008).

Les modèles de cicatrisation *in vitro* suggèrent que l'induction de HIF augmente la contraction des fibroblastes dans une matrice de collagène (Robinson *et al.*, 2008).

Le rôle de HIF dans la **réaction inflammatoire** au cours de la cicatrisation est essentiel au niveau du recrutement des macrophages et des neutrophiles. Les macrophages et les neutrophiles vont produire les ROS qui servent principalement à tuer les bactéries et à prévenir l'infection des plaies (Babior *et al.*, 1973). Les ROS induits sur le site de la cicatrisation peuvent aussi favoriser l'angiogenèse en stimulant l'expression de VEGF par les kératinocytes et les macrophages (Sen *et al.*, 2002 ; Khanna *et al.*, 2001).

4.3. HIF-1 α et molécules d'adhésion

4.3.1. HIF-1 α et intégrines

Le rôle de HIF dans la régulation des intégrines a été largement étudié dans le domaine de la cancérologie. L'environnement hypoxique présent dans les tumeurs favorise la stabilisation de HIF qui régule la production des intégrines, ce qui aboutit à la capacité invasive des cellules cancéreuses.

L'expression des intégrines $\alpha v \beta 3$ et $\alpha v \beta 5$ augmente suite à l'hypoxie dans les cellules endothéliales microvasculaires rétinienne, bien que l'expression de $\beta 1$ soit, elle, inhibée

(Suzuma *et al.*, 1998). Il est aussi connu que l'hypoxie stimule l'expression de l'ARNm des intégrines αV et $\beta 3$ dans les cellules endothéliales humaines (HUVEC, *human umbilical vein endothelial cells*) (Walton *et al.*, 2000). Au contraire, l'inhibition de HIF-1 α aboutit à l'inhibition de $\beta 1$ dans les cellules cancéreuses du pancréas (Chang *et al.*, 2006b) suggérant une régulation complexe. Le promoteur de l'intégrine $\beta 1$ contient la séquence HRE reconnue et fonctionnelle (Keely *et al.*, 2009).

L'expression de l'ARNm de l'intégrine $\alpha 5$ (le récepteur de la fibronectine) est augmentée de manière dépendante de l'hypoxie ou de HIF-1 α dans différents types cellulaires cancéreux ou normaux : la lignée cellulaire du cancer du sein (Spangenberg *et al.*, 2006), la lignée cellulaire du cancer du colon (Koike *et al.*, 2004), les cellules OSCC (*oral squamous cell carcinoma*) (Ryu *et al.*, 2010) et les kératinocytes normaux et transformés (Denko *et al.*, 2003). Des résultats récents indiquent que l'hypoxie aboutit à la diminution de l'expression du récepteur E-cadhérine par la protéine Snail (*zinc-finger transcriptional repressor*) dans les cellules de placenta humaine (Arimoto-Ishida *et al.*, 2009). La perte d'E-cadhérine induit la surexpression de l'intégrine $\alpha 5$ qui conduit à la phosphorylation de FAK aboutissant à une augmentation de l'activité envahissante de ces cellules.

Contrairement aux précédents résultats, l'inhibition de HIF-1 α aboutit à une surexpression de l'intégrine $\alpha 5$ dans les cellules du cancer gastrique, alors que les autres intégrines ne sont aucunement affectées. En effet, la surexpression de $\alpha 5$ conduit les cellules déficientes en HIF-1 α à l'anoïkis (mort cellulaire programmé par détachement de la MEC) (Rohwer *et al.*, 2009).

L'intégrine $\alpha 6\beta 4$ est également augmentée par l'hypoxie *via* l'activation de la protéine Rab11, importante dans le trafic vésiculaire. Cette protéine conduit à l'invasion tumorale des cellules tumorales dans le cancer du sein (Yoon *et al.*, 2005). Récemment, une étude a montré que les intégrines peuvent réguler l'expression de HIF-1 α par l'activation de leur voie de signalisation. L'expression de $\alpha 6\beta 1$ aboutit à l'activation de protéines kinases PKC qui activent HIF-1 α (Chung *et al.*, 2004). L'expression induite de VEGF conduit ensuite à la survie des cellules cancéreuses en les protégeant de l'apoptose.

4.3.2. HIF-1 α et laminine-332

Très peu d'études ont montré la relation entre HIF et la laminine-332 et les résultats de ces études sont contradictoires. O'Toole et son groupe ont montré que l'expression de la laminine-332 diminue dans les kératinocytes présents lors de la réépithélialisation (O'Toole *et al.*, 1997). Cette diminution de l'expression favoriserait la motilité des kératinocytes en diminuant l'ancrage des kératinocytes. En accord avec ces résultats, Esco *et al.*, 2001 ont montré que les cellules épithéliales de la cornée en hypoxie chronique entrent en apoptose et déposent moins de laminine-332 fonctionnelle dans la matrice extracellulaire. De même l'utilisation d'anticorps bloquant la laminine-332, en hypoxie, provoque l'apoptose des cellules.

Au contraire, il a été récemment montré que HIF-1 α induit l'expression de la laminine-332 par les kératinocytes. La stabilisation de HIF-1 α par le CoCl₂ conduit à la surexpression de la laminine-332 qui se traduit par la migration des kératinocytes. Enfin, ces résultats ont montré que la laminine α 3 est un gène cible de HIF-1 α car il contient des HRE (GCGTG) dans la région promotrice du gène (Fitsialos *et al.*, 2008).

4.3.3. HIF-1 α , collagènes et autres molécules d'adhésions

Il a été rapporté que l'hypoxie conduit à l'augmentation de l'ARNm des procollagènes par les cellules pulmonaires *in vitro* (Berg *et al.*, 1998 ; Durmowicz *et al.*, 1994) et dans le cœur *in vivo* (Ostadal *et al.*, 1995). L'effet de l'hypoxie sur l'expression des gènes de procollagènes pourrait être spécifique selon l'isoforme et le type cellulaire. Ainsi, l'hypoxie stimule la formation de procollagène I dans les fibroblastes rénaux (Norman *et al.*, 2000), dermiques (Falanga *et al.*, 1993) et cardiaques (Tamamori *et al.*, 1997), mais pas dans les fibroblastes du poumon ou fœtaux (Horino *et al.*, 2002) ni dans les fibroblastes 3T3 (Tajima *et al.*, 2001). Les 3T3, comme les cellules mésangiales rénales montrent une augmentation de l'expression du gène du procollagène IV en réponse à l'hypoxie (Kim *et al.*, 1996). L'hypoxie peut induire l'expression des collagènes en stimulant l'activité des hydroxylases indispensables à la formation de fibres de collagènes. Ces enzymes sont prolyl-4-hydroxylase (PHD-4 ou P4H) et procollagène lysyl-hydroxylase (PLOD). L'augmentation de l'expression de ces enzymes induites par l'hypoxie a été montré dans les fibroblastes fœtaux de poumon de rat (Horino Y *et al.*, 2002), la lignée cellulaire As4.1 (lignée cellulaire juxtaglomérulaire

murine) et la lignée cellulaire d'hépatome murine (Hepa1) (Hofbauer *et al.*, 2003). L'expression de ces enzymes est également induite par l'hypoxie dans les fibroblastes embryonnaires de souris normaux mais pas ceux déficients en HIF-1 α (Hofbauer *et al.*, 2003).

D'autres études ont montré l'importance de HIF-1 α dans la synthèse des protéines de la matrice extracellulaire. En hypoxie, les chondrocytes murins déficients en HIF-1 α connaissent une diminution significative en agrécan (protéoglycane caractéristique du cartilage) (Pfander *et al.*, 2003). Une forte augmentation de l'expression de collagène II (ARNm et protéine) a été détectée dans les cellules en hypoxie. En outre, l'expression de l'ARNm et protéique du collagène II diminue fortement sous un faible niveau d'oxygène dans les chondrocytes déficientes en HIF-1 α .

Le rôle de HIF-1 α dans la fibrose a été démontré en utilisant des souris déficientes en HIF-1 α dans le foie (Moon *et al.*, 2009). Les souris déficientes en HIF-1 α possèdent une quantité moins importante de collagène I et d' α -SMA (*α -smooth muscle actin*) par rapport aux souris contrôles. Le mécanisme par lequel la fibrose a été réduite chez les souris déficientes en HIF-1 α semble lié à une diminution de l'expression des facteurs de croissance tels que PDGF (*Platelet-derived growth factor*), FGF-2 (*fibroblasts growth factor-2*) et PAI-1 (*plasminogen activator inhibitor-1*). Des éléments HRE sont retrouvés dans les promoteurs de l'ensemble de ces gènes (Calvani *et al.*, 2006 ; Kietzmann *et al.*, 1999 ; Yoshida *et al.*, 2006). Une autre étude menée par Higgins *et al.*, 2007 montre que HIF-1 peut induire le développement de la fibrose en stimulant la transition épithéliale-mésenchymateuse dans les cellules épithéliales rénales *in vitro*. L'ablation génétique de HIF-1 α dans ces cellules *in vivo* conduit à une réduction de la fibrose [diminution de dépôt de collagène, de l'infiltration de cellules inflammatoires et du nombre de fibroblastes exprimant la protéine FSP (*fibroblast-specific protein-1*)]. Cliniquement, la gravité des blessures chez les patients atteints d'une maladie rénale chronique est corrélée à l'expression de HIF-1 α . Une expression élevée de la lysyl oxydase-like 2 (LoxL2), un gène cible de HIF, est retrouvée chez les patients atteints de cette maladie. La lysyl oxydase joue un rôle dans la régulation de la motilité des cellules épithéliales, *in vitro*, et le développement de la fibrose, *in vivo*.

4.4. HIF-1 α et métalloprotéinases

L'expression des MMP est essentielle dans les cellules afin d'assurer l'adhésion, la migration et la prolifération. Il est intéressant de noter que les cellules cancéreuses possèdent une capacité d'invasion supérieure à celle des cellules normales. Cette capacité est liée à l'expression des MMP dans un environnement hypoxique. Le MMP-2 est un gène cible d'HIF-1 α (Semenza *et al.*, 2003). La surexpression d'HIF-1 α induit l'invasion des cellules du cancer du poumon par la régulation de l'expression et les activités de MMP-1 et MMP-2. L'induction de MMP-1 est également prépondérante dans l'activation de MMP2 induite par HIF-1 α (Shyu *et al.*, 2007). L'hypoxie ou l'hypoxie combinée à l'acide arachidonique induit l'activation de NF- κ b qui va stabiliser HIF-1 α . Cette stabilisation aboutit à une augmentation de l'expression de MMP-2 et de MMP-9 dans les cellules murines ES (*mouse embryonic stem cells*). L'expression de ces deux MMP conduit à la production d'IL-6 impliqué dans la prolifération des cellules ES (Lee *et al.*, 2010). En accord avec ces résultats, il a été récemment rapporté que l'inhibition de MMP-3 ou MMP-9 réprime significativement l'expression d'IL-6 dans les microglies (Woo *et al.*, 2008).

Il faut noter que la migration des kératinocytes au niveau du site des blessures est accompagnée par l'induction de l'expression des MMP. Parmi ces derniers, O'Toole et son groupe ont montré que l'expression des MMP-9 augmente dans les kératinocytes migrants.

DEUXIEME PARTIE : Travaux personnels

Chapitre I : Introduction

1. Présentation générale

Lors de mon arrivée dans l'unité U876, le groupe de dermatologie démarrait l'étude du rôle de HIF-1 α dans la physiologie cutanée. Ce facteur de transcription a longtemps été considéré comme ayant pour seule fonction la réponse cellulaire aux variations de la concentration en oxygène dans l'organisme. Certaines études ont montré qu'HIF-1 α était un acteur de la réponse cellulaire déclenchée par des facteurs de signalisation tels que des hormones ou des facteurs de croissance comme les cytokines.

Avant mon arrivée, le laboratoire venait juste de démontrer (Rezvani *et al.*, J Biol Chem, 282 : 16413-16422, 2007) que :

- 1) L'irradiation UVB a un effet biphasique sur l'expression de HIF-1 α : l'augmentation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) y joue un rôle essentiel.
- 2) HIF-1 α a un effet pro-apoptotique sur les kératinocytes.

Un premier travail, dans la continuité de ces résultats, auquel j'ai participé en début de thèse (Rezvani *et al.*, NAR, 38 : 797-809, 2010), a démontré l'implication de HIF-1 α dans la réparation de l'ADN en régulant l'expression des gènes XPC et XPD. Un résumé de ce travail ainsi que l'article sont présentés ci-dessous.

Mon travail principal, exposé dans les chapitres suivants II, III et IV, a consisté alors à étudier le rôle de HIF-1 α dans un système physiologiquement proche de la peau humaine, à savoir l'épiderme reconstruit. Dans le même temps, une étude *in vivo* a pu être menée par l'obtention de lignées de souris transgéniques spécifiquement déficientes en HIF-1- α dans les kératinocytes (souris K14-CRE/ HIF-1 $\alpha^{\text{flox/flox}}$). J'exposerai successivement les matériels et méthodes utilisés (chapitre II), les résultats obtenus (chapitre III) et une discussion générale sur le travail effectué (chapitre IV).

L'ensemble de ce travail est actuellement en soumission :

Nsrein Ali^{1,*}, Hamid Reza Rezvani^{1,*}, Pierre Dubus², Christine Varon³, Cécile Ged¹, Catherine Pain¹, Muriel Cario-André^{1,4}, Julien Seneschal^{1,4}, Alain Taïeb^{1,4}, Hubert de Verneuil¹, Frédéric Mazurier^{1,+} : “Loss of epidermal hypoxia-inducible factor-1alpha hastens skin aging (and wound healing) in human and mouse”.

2. Résumé du premier article

HIF-1 α régule l'expression des protéines de la réparation par excision de nucléotides dans les kératinocytes

Le rayonnement solaire atteignant la surface de la terre est le facteur de risque le plus important dans le développement des cancers de la peau. Parmi ces cancers, on distingue les carcinomes basocellulaires et spinocellulaires qui sont les plus répandus dans le monde. L'augmentation rapide de l'incidence de ces cancers justifie le développement de stratégies innovantes de photoprotection et donc de mieux comprendre la réponse de la peau aux UV. L'une des caractéristiques majeures des rayons ultraviolets, principalement des UVB, est l'induction de dommages de l'ADN. Ces dommages provoquent une série de réponses déclenchant la réparation des lésions de l'ADN, le retard du cycle cellulaire ou l'apoptose. Le destin des cellules dont l'ADN est endommagé dépend essentiellement de la nature de ces dommages. C'est pourquoi, il est à présent considéré indispensable de bien comprendre l'interaction entre les divers facteurs impliqués dans la régulation des réponses cellulaires aux UVB. Ces connaissances peuvent nous aider à améliorer la prévention et la thérapie des cancers cutanés.

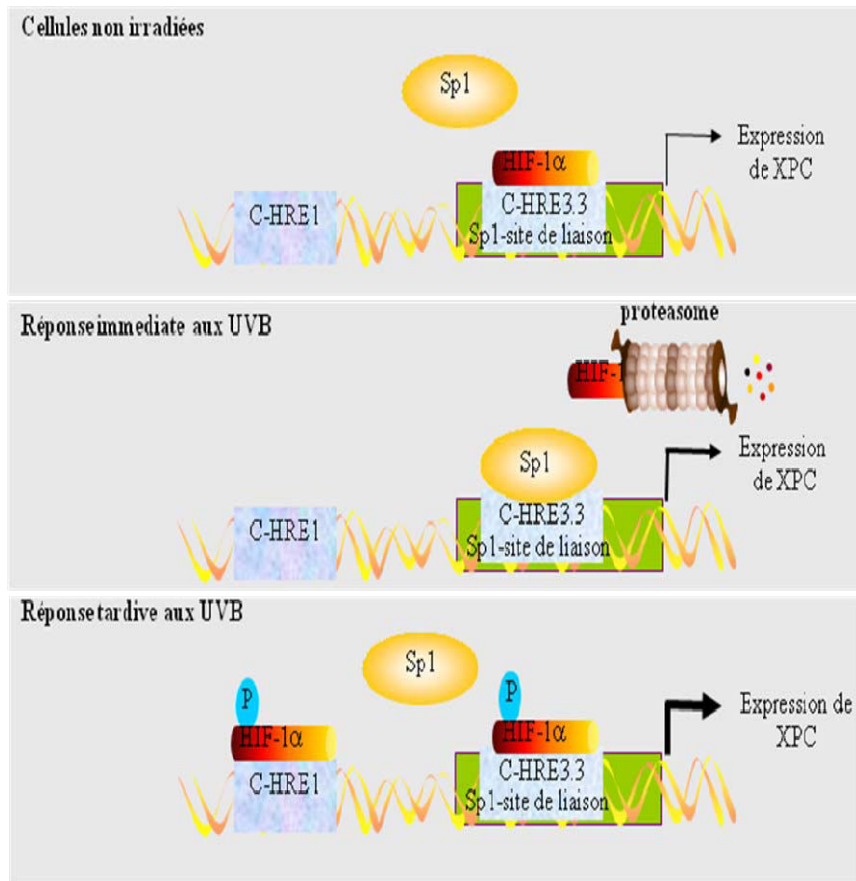
L'expression de HIF-1 α est modifiée suite à l'irradiation UVB et joue un rôle important dans la réponse cellulaire au stress génotoxique (Rezvani *et al.*, 2007 ; Wunderlich *et al.*, 2008). De plus HIF-1 α a un effet pro-apoptotique accompagné par une modulation de l'expression de p53 dans les kératinocytes après irradiation UVB. Ces données suggèrent un lien entre l'irradiation UVB, la modulation de l'expression de HIF-1 α et la réparation de l'ADN. Parmi les différents systèmes de réparation de l'ADN, on peut noter la réparation par excision de nucléotides (NER). Cette dernière est la voie de signalisation majeure dans la

réparation des dommages de l'ADN suite l'irradiation UVB tels que les CPD et les 6-4PP. Il est intéressant de noter que le défaut au niveau de NER est associé à plusieurs maladies humaines telles que XP.

Le but de ce premier travail auquel j'ai participé était de répondre à la question : est ce que HIF-1 α peut participer à la régulation de la réparation de l'ADN après irradiation UV?

Ce travail nous a permis de démontrer que :

1. HIF-1 α régule l'expression de XPC suite à l'irradiation UVB :
 - Avant l'irradiation, l'inactivation de HIF-1 α induit une augmentation significative de l'expression de XPC. Cela peut s'expliquer par une compétition entre HIF-1 α et Sp1 pour se lier aux sites de liaisons de l'ADN de XPC.
 - En revanche, l'expression de XPC est inhibée plus tardivement après l'irradiation par une liaison directe de HIF-1 α à un HRE distinct dans la région promotrice XPC (Figure 32).
2. HIF-1 α régule l'expression de XPD en se liant à sept HRE dans son promoteur.
3. L'inhibition de HIF-1 α induit une réparation des 6-4PP et CPD plus rapide dans les kératinocytes immédiatement après l'irradiation (0,5 h). Cette réparation devient beaucoup plus lente dans les cellules déficientes en HIF-1 α plus tardivement post-irradiation.



La présence de motifs HRE (repérés par bioinformatique) dans les gènes codant pour d'autres protéines de réparation de l'ADN suggère que HIF-1 α pourrait être un régulateur clé de la machinerie de la réparation.¹

En conclusion, il est bien accepté maintenant que HIF-1 α est un facteur non seulement régulé par le niveau d'oxygène, mais aussi par des signaux de différents stress. Nous pouvons vraiment envisager un rôle plus large de HIF-1 α dans le maintien de l'intégrité génomique en testant divers facteurs de stress.

3. Premier article : HIF-1 α régule l'expression des protéines de la réparation par excision de nucléotides dans les kératinocytes.

Chapitre II : Matériels et Méthodes

1. Etudes in vitro sur les kératinocytes

1.1. Origine des prélèvements

Les prélèvements de la peau (plasties mammaires et abdominales) ont été obtenus auprès du service de chirurgie de l'hôpital Pellegrin à Bordeaux. Les autres prélèvements (prépuces) ont été obtenus après circoncision d'enfants à l'hôpital des enfants de Bordeaux.

1.2. Culture cellulaire

Au préalable, la graisse éventuellement présente dans les prélèvements est retirée. Puis les échantillons sont coupés en petits carrés (5 x 5 cm) et sont placés (épiderme orienté vers le haut et derme vers le bas) dans un milieu trypsine-EDTA (TE) pendant 3 h à 37°C (atmosphère humide/ 5% CO₂) ou toute une nuit à 4°C afin de séparer l'épiderme du derme. L'activité de la trypsine est bloquée par l'ajout du même volume de sérum de veau foetal (SVF) par rapport à celui de la trypsine. Les morceaux de peau sont traités un par un afin de séparer le feuillet épidermique à l'aide d'une pince. Dans chaque cas, la surface de la peau est grattée à l'aide d'un scalpel dans une solution HBSS pour récupérer le maximum de cellules vivantes de la couche basale. La suspension obtenue est filtrée puis centrifugée cinq minutes à 200 x g. Le culot est remis en suspension et les kératinocytes dissociés sont ensemencés (3.10^5 cellules/cm²) dans du milieu MCDB153 complété par de l'hydrocortisone (0,5 mg/mL), du facteur de croissance épidermique (10 ng/mL), de l'insuline (5 mg/mL), de l'extrait hypothalamique bovin (70 mg/mL) et des antibiotiques pénicilline/streptomycine (1 µg/mL).

Les kératinocytes sont cultivés pendant 3 à 4 passages (maximum) dans des boîtes de Pétri (diamètre 10 cm) ou des flacons (25 ou 75 cm²) à 37°C en atmosphère humide contenant 5% de CO₂. Le milieu est changé trois fois par semaine et un repiquage est réalisé dès que les cellules atteignent 70 à 80% de confluence. Les cellules sont décollées et dissociées en TE pendant 5 à 10 mn à 37°C. La trypsine est neutralisée avec au moins un volume de sérum de veau foetal (SVF). Les cellules sont centrifugées 5 min, puis remises en suspension en MCDB153 à la dilution adéquate afin de les utiliser, soit pour la transduction, soit pour réaliser des épidermes reconstruits (RE).

Les fibroblastes humains dermiques sont obtenus selon le protocole décrit dans Gontier *et al.*, 2002 à partir des mêmes prélèvements décrits au dessus. Les cellules sont maintenues dans du milieu Dulbecco's Modified Eagles's Medium (MDEM) supplémenté avec 5% de SVF.

1.3. Transduction des kératinocytes

Les kératinocytes (3.10^5) sont mis en présence des particules virales (voir paragraphe ci-dessous) à MOI 30 (rapport virus/cellules) dans le milieu MCDB153 (5 mL) pendant 24 h à 37°C. Le lendemain, le milieu est renouvelé et les cellules sont cultivées pendant 5 jours avant de déterminer le pourcentage de transduction par cytométrie en flux (% de cellules exprimant la GFP). Les cellules transduites peuvent être utilisées pour la reconstruction épidermique ou d'autres expériences.

2. Constructions plasmidiques et lentivirales

Le vecteur Triplex-PGK-EGFP-DeltaU3 (TPE) est utilisé pour la construction des vecteurs TEEWHshRFP et TEEWHshHIF-1 α en remplaçant le promoteur PGK par celui d'EF-1 α (vecteur TEE). Ensuite, une cassette contenant le promoteur H1 et les séquences shRNA ciblant l'ARNm de RFP ou HIF-1 α a été insérée (Figure 33).

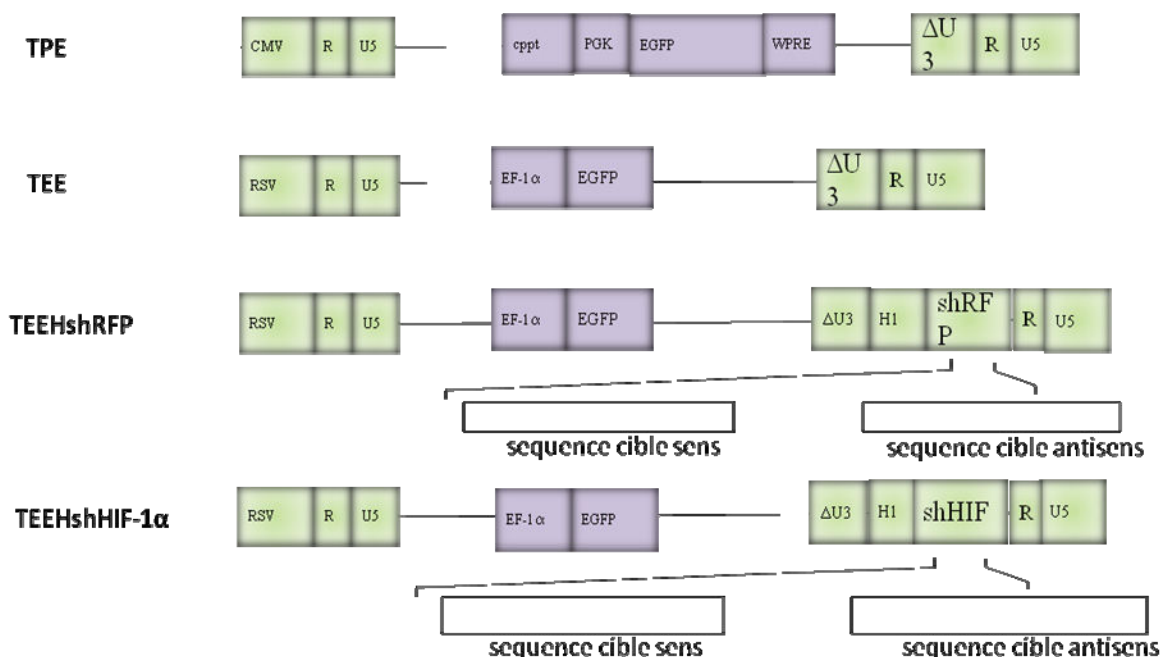


Figure 33. Schéma des différents vecteurs lentiviraux (forme provirale)

2.1. Amplification des plasmides

2.1.1. Culture bactérienne

Les bactéries électrocompétentes, STBL2 et XL10-Gold (Invitrogen) dérivées d'E. Coli sont cultivées en milieu Luria Broth (LB) contenant 1% de peptone, 1% d'extrait de levure, 0,5% de NaCl et pH 7,5. Le milieu solide est obtenu par addition de 2% d'agar avant la stérilisation (120°C, 20 min). L'antibiotique, ampicilline, est ajouté au milieu refroidi à une concentration finale de 50 à 100 µg/mL pour sélectionner les clones contenant le plasmide portant la résistance.

2.1.2. Transformation des bactéries

1 µg de plasmide est ajouté à 50 µl de bactéries électrocompétentes décongelées sur la glace, le tout est incubé dans la glace 30 sec. La transformation est induite par un pulse électrique (Bio-Rad). Après 5 min d'incubation sur glace, 200 µl de milieu nutritif SOC (20 g/L de peptone caséine, 5 g/L d'extrait de levure, 0,58 g/L de NaCl, 0,19 g/L de KCl, 0,95 g/L MgCl₂, 1,20 g/L MgSO₄ et 3,60 g/L de glucose) est ajouté sur les bactéries. Ces dernières sont ensuite étalées sur un milieu gélosé contenant l'ampicilline et incubées à 37°C pendant toute la nuit.

2.1.3. Amplification des clones et extraction plasmidique

Les colonies bactériennes isolées sont cultivées dans le milieu LB à 37°C toute la nuit en agitation à 200 x g. Le milieu est ensuite centrifugé à 6000 x g pendant 15 min à 4°C et les culots de bactéries sont repris pour l'extraction de l'ADN plasmidique. L'extraction de l'ADN est réalisée par la lyse alcaline à l'aide de kit MAXIprep Nucleobond (Macherey-Nagel). Les culots bactériens sont lysés par l'hydroxyde de sodium/SDS ce qui provoque la dénaturation des protéines, de l'ADN chromosomique et plasmidique. Un tampon de neutralisation contenant l'acétate de sodium, qui permet la précipitation du SDS et l'élimination des protéines et de l'ADN chromosomique, est ajouté. Le lysat est filtré et passé sur une colonne de chromatographie échangeuse d'anions. Après lavage, l'ADN plasmidique est élué en concentration élevée de sel (KCl), précipité par l'isopropanol, lavé par l'éthanol et resuspendu dans du tris-EDTA.

2.1.4. Quantification et vérification

La quantité et la qualité de l'ADN plasmidique sont mesurées par spectrométrie à 260 nm. Une électrophorèse en gel d'agarose permet de vérifier leur intégrité. L'ADN

(0,4 µg) est digéré par 2U d'enzyme de restriction (XhoI pour shHIF et shRFP) avec 2 µl de tampon 10x, 2 µl de BSA 10x et H₂O q.s.p. 20 µl à 37°C pendant 40 min. Selon la taille des fragments d'ADN attendus, un gel est préparé à une concentration d'agarose appropriée (2%) en tampon TBE (Tris-Borate 40 mM ; EDTA 1 mM, pH 8). Une goutte de bromure d'éthidium (10 mg/mL) est ajoutée. Avant le dépôt, 0,2 volume de tampon de charge (bleu de bromophénol 0,25% ; glycérol 30%) est ajouté aux échantillons. La migration s'effectue à 100 V pendant 20 min. La taille des fragments d'ADN est déterminée par comparaison avec un marqueur de taille et un plasmide contrôle.

2.2. Production des vecteurs lentiviraux

Les vecteurs sont produits par transfection transitoire des cellules HEK293T avec différents plasmides.

- Le plasmide d'encapsidation « PAX » fournit les protéines de structures et apporte les protéines nécessaires à la réplication du vecteur lentiviral,
- Le plasmide d'enveloppe « VSVG » qui code pour la protéine G d'enveloppe du virus de la stomatite vésiculeuse,
- Le plasmide vecteur qui contient les séquences d'intérêt.

Ces plasmides permettent la formation de particules infectieuses non répliquatives puisque la séquence U3 du LTR est partiellement délétée du plasmide vecteur (Figure 34).

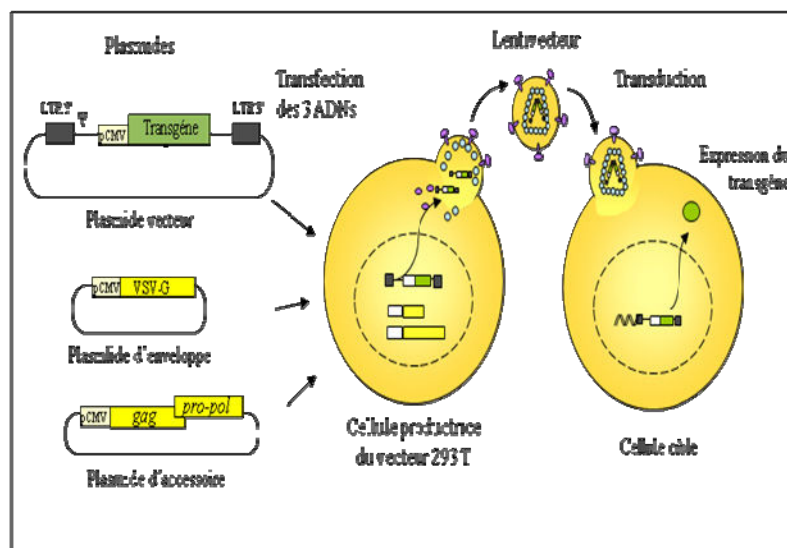


Figure 34. Production des lentivirus. Les plasmides codant pour le génome viral, les protéines de structure et l'enveloppe sont cotransfectées dans des cellules 293T. Les particules virales libérées serviront à la transduction de la cellule cible (kératinocytes).

Les cellules HEK293T sont cultivées dans des boîtes de Pétri préalablement recouvertes par de la poly-L-Lysine (Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) à raison de $5 \cdot 10^6$ cellules/boîte. Le jour suivant, le milieu de culture est renouvelé et les cellules sont transfectées avec une solution plasmidique contenant 10 µg de plasmide shHIF, ou TEE, 10 µg de plasmide PAX et 4 µg du plasmide VSVG dans un volume de 450 µl. 50 µl de CaCl₂ à 2,5 mM sont ajoutés, puis le mélange est stérilisé par passage sur un filtre 0,22 µm. Le filtrat est ajouté goutte à goutte dans 500 µl de HBS (pH 7,12, HEPES Buffer Saline, NaCl 280 mM, Na₂HPO₄ 1,5 mM, HEPES 100 mM) pour précipiter l'ADN. La solution est ensuite ajoutée au milieu de culture. Le milieu de culture est renouvelé après 8h à 37°C. 48h plus tard, le surnageant est centrifugé à 300 x g durant 10 min à 4°C afin d'éliminer les débris cellulaires puis à 22000 x g 4 h à 4°C afin de concentrer les particules virales. Le culot de particules virales est ensuite repris dans 300 µl de DMEM puis aliquoté et stocké à -80°C.

Le titre viral (nombre de particules infectieuses/mL) est déterminé par transduction de cellules 293T (à concentration $5 \cdot 10^4$) en utilisant différentes dilutions de solution virale. Le surnageant est dilué à 1/1000 puis ajouté aux cellules à raison de 1 à 30 µl. Après 3 à 5 jours de culture, le titre est évalué par cytométrie en flux grâce à la fluorescence de l'EGFP.

3. Préparation des épidermes reconstruits

La préparation des dermes morts dé-épidermisés s'appuie sur la technique de Pruniéras (1979) et est décrite dans Gontier et *al.*, 2002 (Figure 35). Chaque morceau de derme mort est préalablement rincé dans la solution HBSS puis placé dans une plaque à six puits, la lame basale vers le haut. Un anneau stérile de 0,6 cm² est déposé au milieu de chaque morceau. Les suspensions cellulaires sont ajoutées à une densité de $2 \cdot 10^5$ cellules pour 200µl de milieu dans les anneaux puis les dermes sont humidifiés avec le milieu MCDB153. Après 24h d'incubation permettant l'adhésion cellulaire, les anneaux sont enlevés, le milieu est éliminé puis le système est recouvert et incubé ainsi durant 3 jours avec le milieu IMDM. Cette phase dite de submersion permet la prolifération des cellules. Ensuite le système est mis en interface air-liquide. Le milieu de reconstruction contient 70% d'IMDM, 25% de MCDB153 et 5% de SVF. Après 14 jours d'interface air-liquide, les reconstructions sont ensuite analysées.

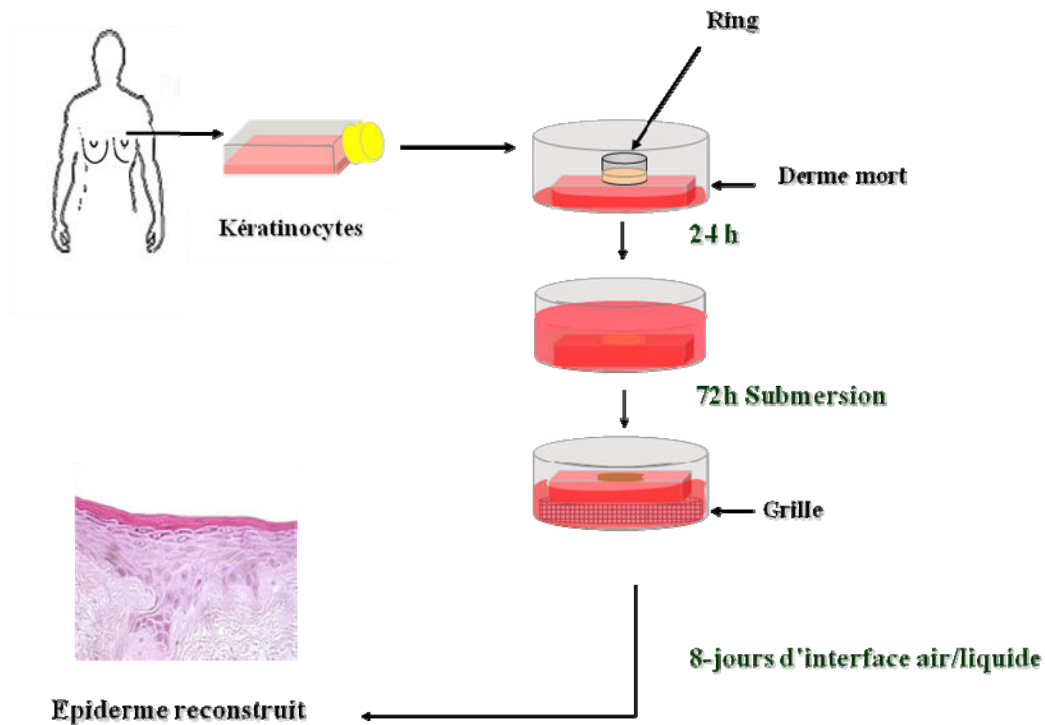


Figure 35. Préparation des épidermes reconstruits.

4. Etudes morphologiques

Une fois les épidermes reconstruits (après 12 jours), ces derniers sont fixés dans le formol puis ils sont inclus en paraffine et coupés en section de $5\mu\text{m}$. Avant la coloration, les coupes sont déparaffinées et hydratées.

4.1. Histologie

La technique utilisée, hématoxyline/éosine, est basée sur la coloration des noyaux en bleu et le cytoplasme en rouge. Les coupes sont déposées dans la solution d'hématoxyline pendant 2 mn, puis incubées dans de l'eau ammoniacuée pendant 5 mn. Enfin, les lames sont contre-colorées à l'éosine pendant 6 mn puis rincées à l'eau du robinet. Les lames sont alors déshydratées puis montées à l'Eukitt.

4.2. Immunohistochimie

Après réhydratation, une solution de trypsine à 1 mg/ml est déposée sur les coupes à raison de 200 µl par lame. De l' H₂O₂ 3% (Sigma) est ensuite déposée sur les coupes pour 60 mn. Le premier anticorps est dilué dans PBS-SVF (20%) selon les dilutions précisées dans le tableau 10, puis déposé à raison de 200 µl par lame. Une incubation d'une nuit à 4°C est alors réalisée en atmosphère humide afin d'éviter que les lames ne sèchent. Le lendemain, le second anticorps En-vision™ anti-souris ou anti-rat est déposé et l'ensemble est laissé 1h à température ambiante en atmosphère humide. La révélation est réalisée par la solution de DAB, suivi d'une contre-coloration à l'hématoxyline. Après rinçage, l'ensemble est monté directement au glycergel.

Tableau 10. Anticorps utilisés

Premier AC	Origine	Dilution
Anti-HIF-1α	NB100-131, Novus Biologicas	1/500
Anti-Laminine γ2	clone D4B5, Millipore	1/200
Anti-GFP	B-2 sc-9996 Santa Cruz Biotechnology	1/200

4.3. Immunofluorescence

Les cellules sont ensemencées sur une lamelle en verre (50 000 cellules) ou dans un puits d'une plaque six puits (100 000 cellules) et incubées pendant 6h à 37°C. Ensuite, les cellules sont lavées 2 fois avec PBS et fixées avec le PFA (4% dans PBS) pendant 10 mn. Un lavage en PBS est réalisé suivi par une perméabilisation avec Triton X-100 (0.1% en PBS) pendant 1 mn. Après 3 lavages en PBS, les cellules sont incubées avec une solution de blocage [(1% BSA/ 2% SVF dans TBS (Tris-buffered saline; 20 mM Tris, 150 mM NaCl, 2 mM EGTA et 2 mM MgCl₂, pH 7.5)] pendant 10 mn. Une incubation de 30 mn avec le premier anticorps dilué dans la solution de saturation est alors réalisée, puis une autre incubation avec le deuxième anticorps pendant 30 mn. 3 lavages en PBS suit chacune de ces deux étapes. Les lamelles ont été lavées à l'eau et montés sur des lames à l'aide du milieu de montage (Clinisciences). La fluorescence est détectée en utilisant un microscope de fluorescence (Eclipse TE2000, Nikon) et un appareil photo DXM 1200 (Nikon) (logiciel d'acquisition Lucia 5.0, Nikon). La fluorescence des trois fluorochromes Hoescht 33342,

Alexa Fluor® 488-anticorps marqués secondaire et rhodamine-phalloïdine a été obtenue par excitation laser à 350 nm, 488 nm et 543 nm, respectivement. Les images sont traitées à l'aide d'Adobe® Photoshop 7 (Adobe Systems).

5. Analyse par cytométrie en flux

Après quatre jours de transduction, les cellules sont récupérées par la trypsination, lavées avec PBS et fixées pendant 10 min en PBS-PFA (4%) puis lavées une nouvelle fois en PBS. Elles sont alors mises en contact avec l'anticorps primaire dilué dans une solution de saturation (PBS-sérum 5%) pendant 1h à température ambiante. Après un lavage en PBS, les cellules sont incubées 1h à température ambiante avec le deuxième anticorps couplé à un fluorochrome Alexa™ dilué dans la solution de saturation. Après un autre lavage, les cellules sont remises en suspension dans 200 µl de PBS avant analyse par cytométrie en flux. L'analyse des marqueurs (EGFP, RFP) est aussi effectuée grâce au cytomètre. Chaque acquisition a été effectuée sur un minimum de 10 000 cellules.

6. Analyse des protéines par Western Blot

6.1. Préparation des échantillons

Les culots cellulaires sont repris dans un tampon de lyse contenant 25 mM de HEPES (pH 7,4), 150 mM NaCl, 1% triton X-100 et 1% d'inhibiteurs de protéases, incubés 30 min à 4°C puis centrifugés 15 min à 12000 x g à 4°C. La concentration en protéines dans le surnageant est mesurée en utilisant le réactif acide BCA (Pierce, Bezons, France). La réaction conduit à la formation d'un complexe pourpre mesurable à $\lambda = 570$ nm. La concentration en protéines est déterminée par comparaison à une gamme étalon d'albumine de sérum de bœuf.

6.2. Migration sur gel de polyacrylamide

Les extraits protéiques sont analysés un gel de polyacrylamide dénaturant 10%. 70 mg de protéines sont mélangés au tampon de charge (β -mercaptoéthanol 0,5%, SDS 2%, 60 mM Tris-HCl pH 6,8, glycérol 50% et bleu de bromophénol 1/1000), chauffés à 100 °C 5 min, déposés dans les puits et migrés à 25V durant la nuit.

6.3. Transfert

Le transfert sur membrane de polyvinylidone s'effectue de façon semi-sèche (LKB Biochrom 2117 Multiphor, France). Le transfert s'effectue durant 1,5 h à 330 mA. Après transfert, la membrane est lavée dans du méthanol 15 sec, puis séchée et réhydratée dans du TBS-T (TBS, 0,05% de Tween-20).

6.4. Révélation

Les membranes sont saturées pendant 1 h à température ambiante dans la solution de blocage TBS-T additionné de 5% de lait écrémé. L'anticorps primaire anti-HIF-1 α est dilué au 1/500^e en TBS-T 5% et mis en contact avec la membrane sous agitation une nuit à 4°C. La membrane est rincée avec le TBS-T (3 x 10 min) puis incubée avec l'anticorps secondaire anti-IgG lié à la peroxydase dilué au 1/2000^e TBS-T 5% sous agitation pendant 1 h à température ambiante. La même série de lavages est répétée avec un dernier lavage dans le TBS. La révélation est effectuée avec le réactif de chimiluminescence ECL (GE Healthare).

7. Caractérisation des lignées de souris transgéniques

7.1. Origine des lignées de souris

Les lignées K14-Cre, K14-CreER^{T2} ont été transmises par D. Metzger (Strasbourg). La lignée HIF^{flox/flox} a été obtenue auprès de Johnson (Boutin *et al.*, 2008). Ces lignées ont été entretenues dans un fond génétique C57BL/6.

7.2. Croisement des lignées

Deux systèmes Cre/loxP ont été utilisés pour générer des souris où l'exon 2 de HIF-1 α , codant pour le domaine d'hétérodimérisation de HIF-1, est excisé dans les kératinocytes : un système inductible par le tamoxifène et un système constitutif (Figure 36).

7.2.1. KO inductible de HIF-1 α

Des animaux HIF^{flox/flox} dont le transgène contient l'exon 2 de HIF-1 α flanqué de sites loxP (floxé) à l'état homozygote ont été croisés avec des animaux K14-Cre^{+/-}ER^{T2} possédant la recombinaison Cre à l'état hétérozygote sous le contrôle d'un promoteur spécifique des

kératinocytes (promoteur K14 tronqué) et de la séquence ER^{T2} (Elément de Réponse au Tamoxifène). Les souris issues de ce premier croisement qui ont le génotype K14-Cre^{+/-} ER^{T2}/HIF^{flox/wt}, (ce qui correspond à des hétérozygotes pour les deux transgènes HIF-1 α floxé et K14-Cre^{+/-}ER^{T2}) sont conservées et croisées avec un individu HIF^{flox/flox} afin d'obtenir des animaux K14-Cre^{+/-}ER^{T2}/HIF^{flox/flox}, (ce qui signifie homozygotes pour l'allèle HIF-1 α floxé et hétérozygotes pour l'allèle K14-Cre^{+/-}ER^{T2}). Les kératinocytes de ces souris expriment la recombinaison Cre uniquement après induction par injection de tamoxifène (Sigma) qui permet l'inactivation de HIF-1 α de façon contrôlée.

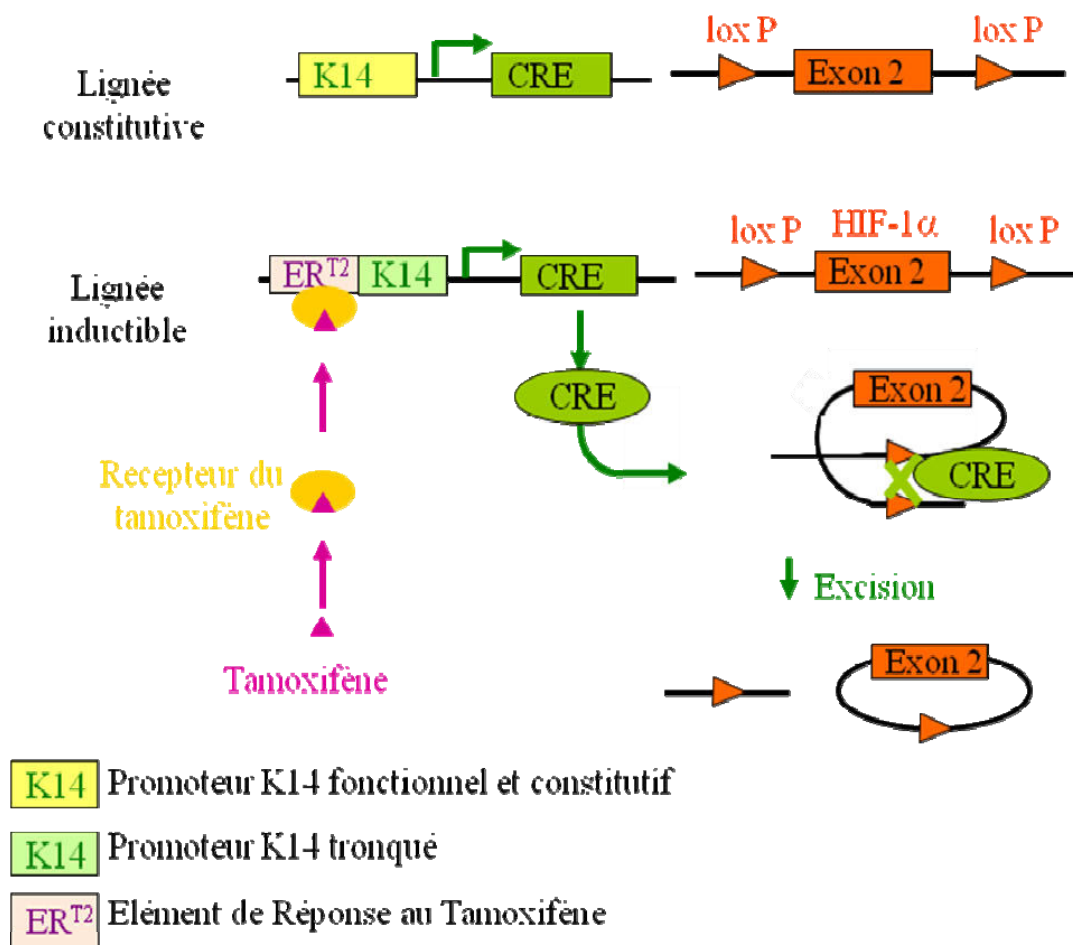


Figure 36. Principe de l'inactivation de HIF-1 α par le système Cre/loxP. La recombinaison Cre est sous le contrôle du promoteur K14 spécifique des kératinocytes de façon constitutive ou inducible par le tamoxifène. La recombinaison Cre reconnaît spécifiquement les sites loxP, induit un crossing-over et l'excision de l'exon 2 de HIF-1 α .

7.2.2. KO constitutif de HIF-1 α

Les animaux d'intérêt ont été obtenus en effectuant les mêmes croisements que pour le système inductible mais en utilisant des souris à double transgène où la recombinaison Cre est sous le contrôle du promoteur K14 fonctionnel. La recombinaison Cre est exprimée constitutivement dans les kératinocytes.

7.3. Géotypage

L'extraction d'ADN et les PCR ont été effectuées avec le kit REDEExtract-N-AmpTM Tissue (Sigma), en utilisant les amorces suivantes : amorce HIF^{flox} sens-5'GCA GTT AAG AGC ACT AGT TG 3', amorce HIF^{flox} antisens-5' GGA GCT ATC TCT CTA GAC C 3', amorce Cre sens-5' GCA GTT AAG AGC ACT AGT TG 3' et amorce Cre antisens-5' GGA GCT ATC TCT CTA GAC C 3'.

Les biopsies de queues sont effectuées chez des souriceaux âgés de 2 à 3 semaines. L'ADN est extrait par une technique de lyse rapide :

- ajouter 100 μ L d'un mélange contenant 80 μ L de solution d'extraction et 20 μ L de solution de lyse
- incuber à température ambiante 30 minutes.
- placer à 95°C 3 minutes.
- ajouter 80 μ L d'une solution de neutralisation.

La PCR a été réalisée en duplex en utilisant simultanément les amorces suivantes :

- HIF^{flox} sens et HIF^{flox} antisens pour identifier les allèles floxés (obtention d'un produit d'amplification de 250 pb) ou sauvage de HIF-1 α (obtention d'un produit d'amplification de 200 pb).
- Cre sens et Cre antisens pour détecter la présence de la recombinaison Cre (obtention d'un produit d'amplification de 400 pb).

Le kit fournit un mix (2X) prêt à l'emploi contenant les désoxy nucléotides, le tampon, la *Taq* polymérase, le MgCl₂, l'anticorps Jumpstart *Taq* et le colorant de dépôt. Il suffit

ensuite d'assembler 2 μL de lysat, 0,4 μL de chaque amorce (10 μM) et 5 μL de mix pour un volume final de 10 μL . La PCR est réalisée dans les conditions d'amplification suivantes :

1 cycle d'activation de la *Taq* polymérase (95°C, 3 min), 35 cycles à 3 étapes, dénaturation (94°C, 30 sec), hybridation des amorces (55°C, 30 sec), et extension des amorces (72°C, 1 min) puis 1 cycle d'extension finale (72°C, 5 min).

Les produits d'amplification obtenus sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 2%.

7.4. Test de cicatrisation

Les souris adultes ont été anesthésiées, rasées et la peau dorsale de chaque souris (pleine épaisseur) a été coupée (8 mm de diamètre) avec de petits ciseaux. La fermeture de la plaie a été déterminée en mesurant sa surface tous les deux jours après la blessure. Ces mesures ont été présentées en pourcentage afin d'indiquer l'avancement du processus de la cicatrisation. Pour l'analyse histologique et l'immunofluorescence, les blessures ainsi que les tissus autour de la peau normale adjacente ont été excisées à 2, 4, 6, 8, 10 et 12 jours après les blessures.

Chapitre III : Résultats

HIF-1 est un hétérodimère composé d'une sous unité α et d'une sous unité β (Wenger, 2002 ; Maxwell, 2004 ; Metzen and Ratcliffe, 2004 ; Semenza, 2004). La sous unité α subit une régulation post traductionnelle dépendante du taux d'oxygène cellulaire. En condition de normoxie, HIF-1 α est dégradé par le protéasome (Berra *et al.*, 2006 ; Ivan *et al.*, 2001 ; Maxwell *et al.*, 2001). En hypoxie, différentes modifications post traductionnelles conduisent à une translocation nucléaire puis à une hétérodimérisation avec la sous unité β . L'hétérodimère HIF-1 est ensuite capable de reconnaître une séquence consensus appelée HRE et de réguler l'expression de plus de 200 gènes cibles impliqués dans divers mécanismes cellulaires (Semenza, 2003 ; Pouyssegur *et al.*, 2006).

La participation de HIF-1 α comme facteur de transcription dans la régulation de plusieurs domaines concernant la peau (le cancer et l'angiogénèse tumorale, la cicatrisation, les molécules d'adhésion (intégrines, laminines et collagènes) et aussi les métalloprotéinases) a entraîné une attention particulière à l'étude de cette protéine. De plus, le micro-environnement hypoxique de la peau (Bedogni *et al.* 2005) permet une expression élevée de HIF-1 α et un rôle spécifique de ce dernier dans la physiologie de la peau. En effet, l'importance de HIF-1 α dans la peau a été montrée par sa suppression dans les kératinocytes (Johnson R *et al.*, 2008). De façon intéressante et surprenante, l'étude de la peau de ces souris chez ces auteurs n'a montré aucun phénotype spécial. En revanche, l'invalidité épidermique de HIF-1 α inhibe la synthèse d'EPO en réponse à l'hypoxie.

La peau est constituée de multiples couches de tissus épithéliaux (épiderme) et une couche sous-jacente du tissu conjonctif (le derme) qui sont séparées par une membrane basale. Cette dernière est composée de collagène (type IV et VII) et plusieurs types de laminines (tels que la laminine-5 (ou 332), -6 et -10) (Burgeson et Christiano, 1997). Les kératinocytes épidermiques basaux s'attachent à la membrane basale par des récepteurs de la famille des intégrines. Trois de ces intégrines ($\alpha3\beta1$, $\alpha4\beta6$ et $\alpha6\beta1$) sont les récepteurs spécifiques de la laminine-332 (Carter *et al.*, 1991 ; Rousselle *et al.*, 1991 ; Aumailley et Rousselle, 1999 ; Barczyk et Sergio, 2010). Plusieurs modèles animaux dans lesquels une ablation d'un des gènes codant pour ces intégrines mais aussi de la laminine-332 ont montré

l'importance de ces protéines dans la maintenance de la cohésion dermo-épidermique. Par exemple, l'inactivation de l'intégrine $\alpha 3$ spécifiquement dans la couche basale a montré plusieurs défauts de l'épiderme, y compris une inflammation locale, une perte de poils et des micro-blessures au niveau de la jonction dermo-épidermique (Margadant C, 2009). Les autres souris déficientes en intégrine $\alpha 6$ ou $\beta 4$ montrent de graves lésions épidermiques (Dowling *et al.*, 1996 ; Georges-Labouesse *et al.*, 1996 ; van der Neut *et al.*, 1996). De façon similaire, une mutation dans l'un des gènes codant pour les différentes chaînes de la laminine-332 ($\alpha 3$, $\beta 3$ et $\gamma 2$) provoque une maladie génétique appelée épidermolyse bulleuse jonctionnelle, caractérisée par des blessures sur la peau (Fine *et al.*, 2008).

Les blessures sont des agressions auxquelles la peau est confrontée. La cicatrisation est le processus biologique permettant la réparation de tissus endommagés par une blessure. Des données ont montré que la laminine-332 et les intégrines ($\alpha 6\beta 4$ et $\alpha 3\beta 1$) ont un rôle important dans la cicatrisation (O'Toole *et al.*, 1997 ; Nguyen *et al.*, 2000b ; Margadant *et al.*, 2009). Cette zone est caractérisée par une hypoxie locale nécessaire pour l'angiogenèse. L'hypoxie induit les cytokines (VEGF, le TGF- β et PDGF) qui sont importantes pour stimuler la prolifération et la migration des fibroblastes et des kératinocytes (Tandara et Mustoe, 2004 ; Albina *et al.*, 2001).

Dans le but d'étudier le rôle de HIF-1 α dans la peau, nous avons effectué deux types d'études regroupées dans deux chapitres distincts :

- Chapitre 1 :

Etudes *in vivo* : pour cette étude nous avons choisi le modèle de souris dans lequel HIF-1 α est inhibé de façon constitutive dans les kératinocytes (souris K14-Cre/HIF^{flox/flox}). En parallèle, nous avons aussi généré des souris inductibles (souris K14-CreER^{T2}/HIF^{flox/flox}). Nos résultats ont montré que les souris invalidées pour HIF-1 α développent avec l'âge un phénotype d'inflammation dans plusieurs endroits. Ces souris sont très sensibles au moindre stress tel que la cicatrisation et l'irradiation UVB. L'induction des souris inductible avec le tamoxifène indique un détachement de l'épiderme au niveau des couches supra-basales. Ces souris meurent deux semaines après injection de l'inducteur, à savoir le tamoxifène.

- Chapitre 2 :

Etudes *in vitro* : dans ces études nous avons utilisé les kératinocytes humains et les épidermes reconstruits (ER qui sont physiologiquement plus proches de la peau humaine). Nous avons prouvé que HIF-1 α est indispensable à l'adhésion des kératinocytes par sa régulation exercée sur la laminine-332 et les intégrines (α 6 et β 1) mais aussi à la formation des épidermes reconstruits.

1. Etude du rôle de HIF-1 α chez la souris

1.1. Génération des lignées de souris transgéniques

Les croisements entre un mâle K14-Cre^{-/-}/HIF^{flox/flox} ou K14-Cre^{-/-}ER^{T2}/HIF^{flox/flox} avec des femelles K14-Cre^{+/-}/HIF^{flox/wt} ou K14-Cre^{+/-}ER^{T2}/HIF^{flox/wt} respectivement, a donné naissance aux souris transgéniques utilisées dans nos expériences. Le génotypage des souris a été effectué par amplification spécifique (PCR) de l'ADN extrait à partir des queues de souris. 4 génotypes, identifiables par la taille de fragments de PCR spécifiques, peuvent être observés chez les souriceaux issus de ces croisements (Tableau 11). Les animaux d'intérêt sont les souris K14-Cre^{+/-}/HIF^{flox/flox} ou plus simplement K14-Cre/HIF^{flox/flox}.

Génotype	Taille des fragments (pb)	N° souris
K14-Cre ^{-/-} HIF ^{flox/flox}	250	1, 2, 5, 6, 7
K14-Cre ^{+/-} HIF ^{flox/flox}	250-400	9, 10, 11
K14-Cre ^{-/-} HIF ^{flox/wt}	200-250	3, 4
K14-Cre ^{+/-} HIF ^{flox/wt}	200-250-400	8, 12

Tableau 11. Les différents génotypes issus de croisements entre les lignées des souris transgéniques caractérisés par la taille des fragments de PCR obtenus. Les animaux d'intérêt sont surlignés en rouge.

Un exemple de génotypage est donné dans la figure 37. Le témoin (T) correspond au mélange réactionnel de la PCR en absence d'ADN : il n'y a pas eu d'amplification, donc le mélange réactionnel n'était pas contaminé.

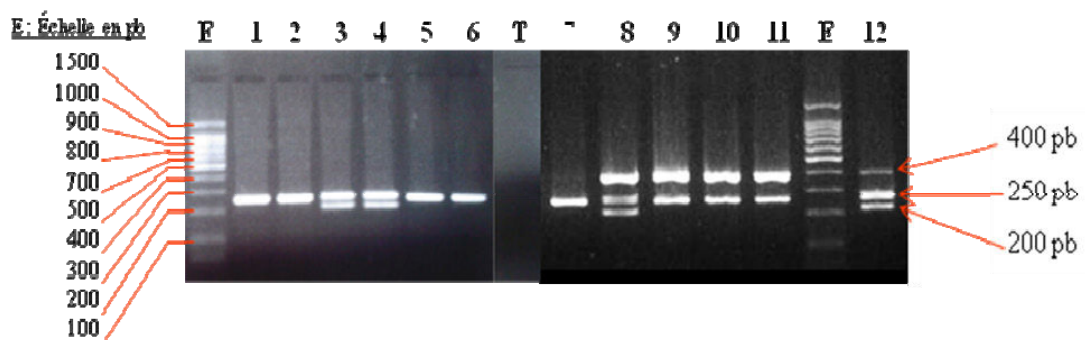


Figure 37. Electrophorèse des produits d'amplification. Les tailles des fragments permettent d'identifier les différents génotypes (voir Tableau 11).

Les résultats des croisements sont présentés dans le Tableau 12 pour les lignées constitutives et dans le tableau 13 pour les lignées inductibles. La fréquence attendue de chaque génotype est 25%. Pour la lignée inductible, les fréquences sont de 29,4%, 20,6%, 23,5% et 26,5%. La différence entre fréquence observée et fréquence théorique n'est statistiquement pas significative (Tableau 13).

En revanche, pour la lignée constitutive, nous avons observé que les fréquences des 4 génotypes sont de 31,0%, 10,3%, 41,4% et 17,2%. La différence entre fréquence observée et fréquence théorique est statistiquement significative. Il est possible que l'inactivation constitutive de HIF-1 α soit délétère dans cette lignée (Tableau 12).

		Femelle HIF ^{flox/wt} Cre ^{+/-} <i>Combinaisons alléliques</i>			
		Cre ⁻ /HIF ^{flox}	Cre ⁺ /HIF ^{flox}	Cre ⁻ /HIF ^{wt}	Cre ⁺ /HIF ^{wt}
Mâle Cre ^{-/-} HIF ^{flox/flox}	<i>Lignée constitutive</i>				
	Cre ⁻ /HIF ^{flox}	31,0%	10,3%	41,4%	17,2%

Tableau 12. Les différentes fréquences issues de croisements entre les lignées des souris transgéniques constitutives.

		Femelle HIF ^{flox/wt} Cre ^{+/-} <i>Combinaisons alléliques</i>			
		Cre ⁻ ER ^{T2} /HIF ^{flox}	Cre ⁺ ER ^{T2} /HIF ^{flox}	Cre ⁻ ER ^{T2} /HIF ^{wt}	Cre ⁺ ER ^{T2} /HIF ^{wt}
Mâle Cre ^{-/-} ER ^{T2} /HIF ^{flox/flox}	<i>Lignée inductible</i>				
	Cre ⁻ ER ^{T2} /HIF ^{flox}	29,4%	20,6%	23,5%	26,5%

Tableau 13. Les différentes fréquences issues de croisements entre les lignées des souris transgéniques inductibles.

1.2. La souris K14-Cre/HIF-1 α ^{flox/flox} développe des symptômes cutanés au fur et à mesure de son vieillissement

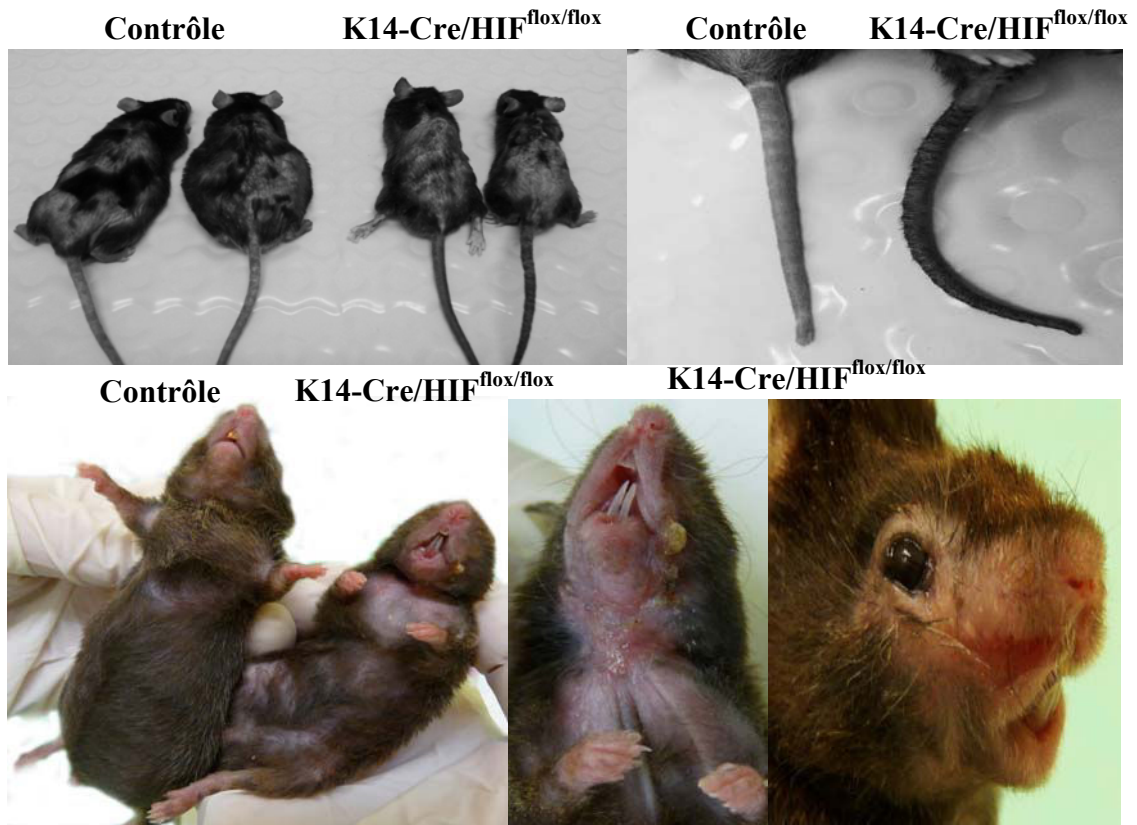
L'observation des souris K14-Cre/HIF-1 α ^{flox/flox} au cours des 3 premiers mois n'a pas révélé d'anomalies, en particulier au niveau de la peau. Nous avons néanmoins gardé les souris jusqu'à un laps de temps de 18 mois afin d'observer l'apparition éventuelle d'un phénotype cutané pathologique à long terme. A partir de 12 mois, des anomalies chez les souris K14-Cre/HIF-1 α ^{flox/flox} au niveau de la taille et de la peau sont apparues (Figure 38 A):

- 1- Les souris deviennent de plus en plus petites par rapport aux témoins,
- 2- Une kératose se développe de manière très nette au niveau de la queue,
- 3- Une inflammation apparaît au niveau du pourtour des yeux, de la bouche et du cou.

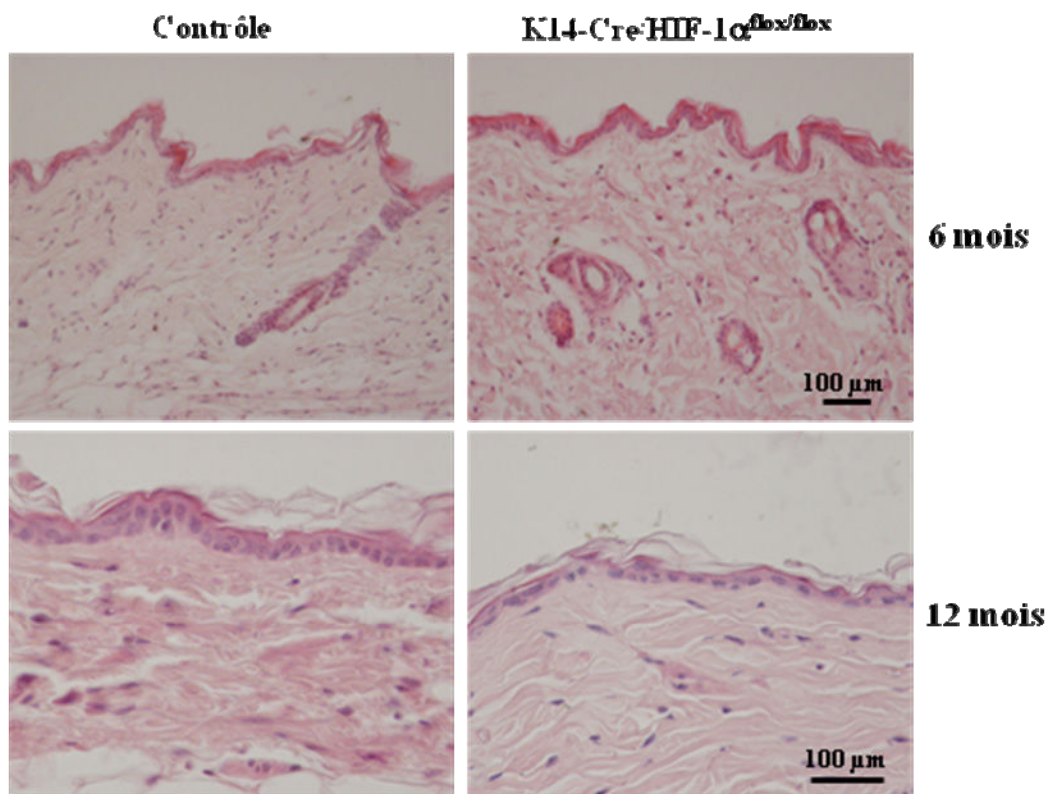
Du point de vue histologique, les coupes de la peau des souris K14-Cre/HIF-1 α ^{flox/flox} et celles des souris contrôles nous ont permis de confirmer ce que nous avons observé macroscopiquement. La peau est beaucoup plus fine chez les souris déficientes à 12 mois alors que l'histologie de la peau à 3 mois ne révèle aucune différence au niveau de l'épaisseur. L'épiderme est trois fois plus épais au niveau de la queue chez les souris déficientes en HIF-1 α en comparaison avec celles des souris contrôles (Figure 38 B et C).

De plus, la coloration hématoxyline-éosine (HE) sur des coupes au niveau de la bouche et du cou révèle un recrutement de cellules inflammatoires à proximité de la couche basale de l'épiderme (Figure 38 D). Un marquage de ces cellules sera indispensable afin de confirmer ces résultats.

A



B



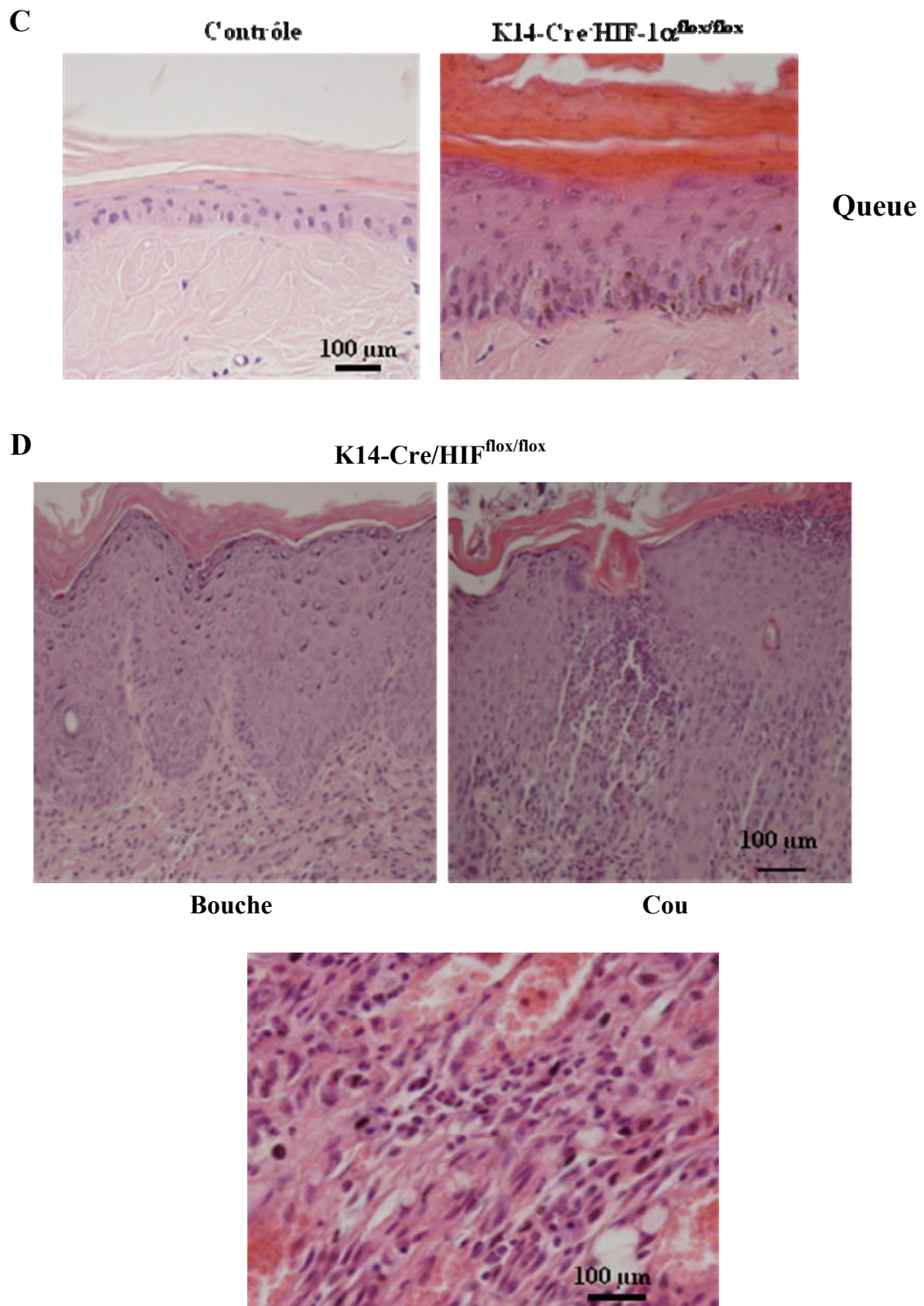


Figure 38. Caractérisation des souris K14-Cre/HIF-1 α ^{flox/flox}. A : Phénotype global des souris K14-Cre/HIF-1 α ^{flox/flox} et celles des contrôles. B : Coupes histologiques (coloration HE) au niveau de la peau (3 ou 12 mois). C : Coupes histologiques au niveau de la queue. D : Coloration au niveau de la bouche et du cou indiquant la présence de cellules inflammatoires.

Il est intéressant de noter que d'autres souris déficientes pour des molécules d'adhésion ont montré le même phénotype (inflammation et kératose) que notre modèle de souris. Cela nous permet de penser que HIF-1 α joue un rôle très important dans la jonction dermo-épidermique.

1.3. L'absence de l'expression de HIF-1 α au niveau de l'épiderme entraîne chez la souris une diminution de la laminine-322 ainsi que de l'intégrine β 1

La laminine-322 est une protéine de la matrice extracellulaire et un composant majeur de la membrane basale. Lors du processus de la cicatrisation, l'augmentation de l'expression de la laminine-322 est corrélée avec l'augmentation de l'expression de HIF-1 α (Fitsialos *et al.*, 2008). Nous avons voulu vérifier l'hypothèse d'une baisse de l'expression de cette laminine dans notre modèle de souris. L'étude en immunofluorescence de la chaîne γ 2 de la laminine montre une baisse très prononcée de cette dernière au niveau de la membrane basale (Figure 39). De manière intéressante, les intégrines α 3 β 1 et α 6 β 1, qui sont les récepteurs principaux de la laminine-322, sont aussi fortement abaissées.

A ce stade de l'étude, il nous est apparu surprenant qu'un tel déficit chez la souris ait un retentissement aussi faible sur l'architecture de la peau et la cohésion entre l'épiderme et le derme.

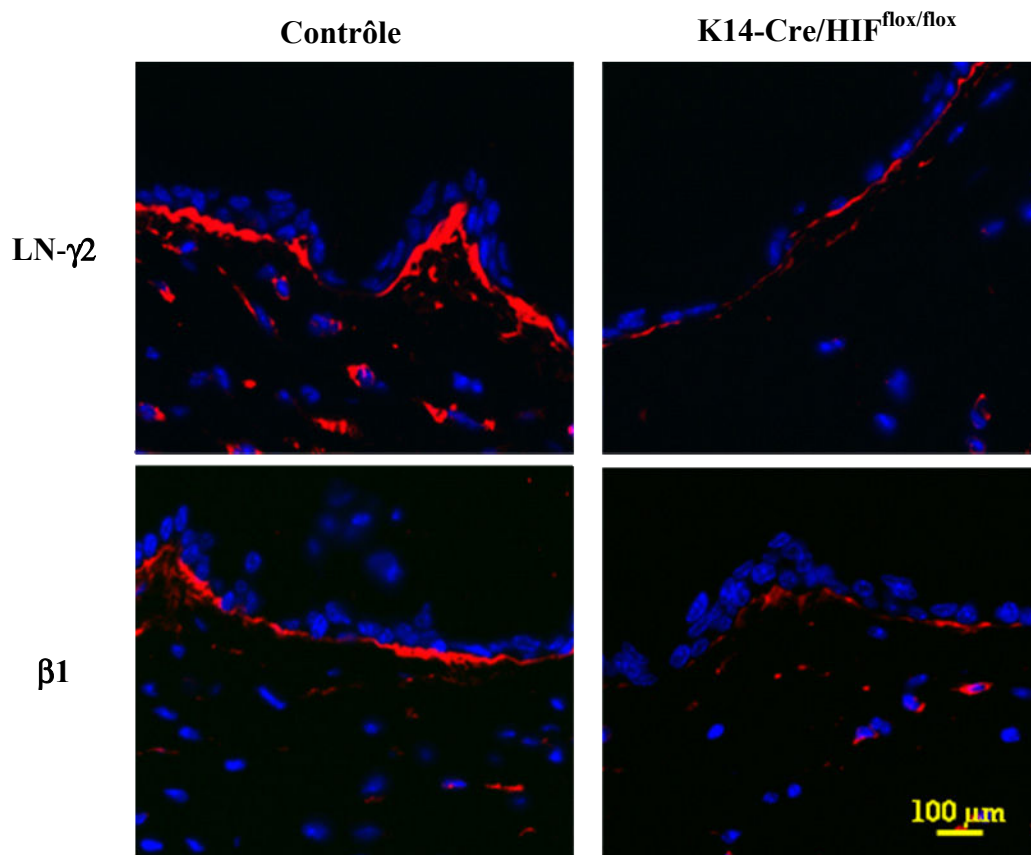
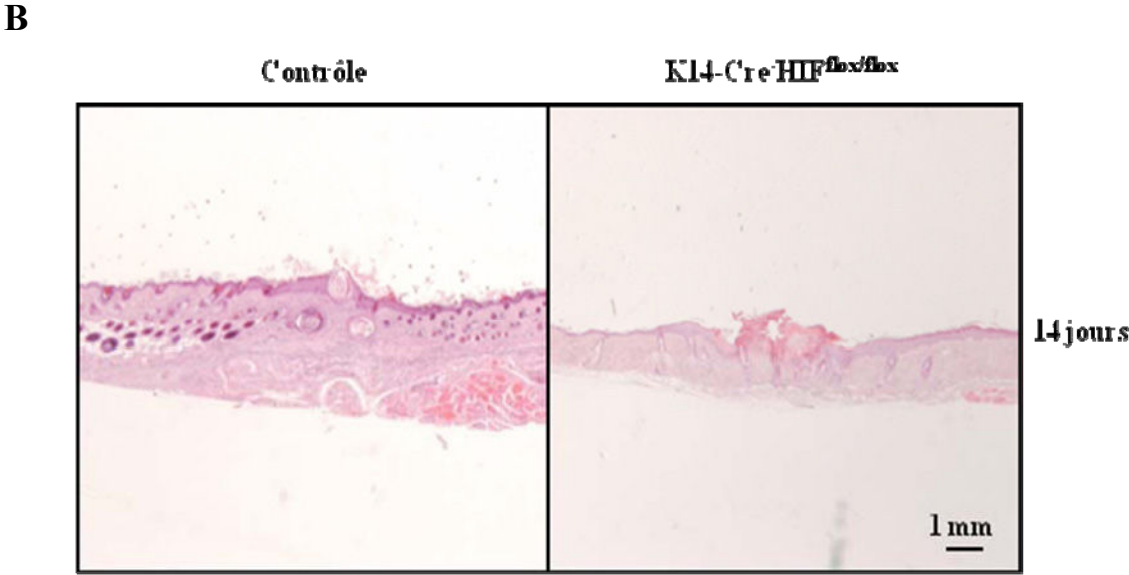
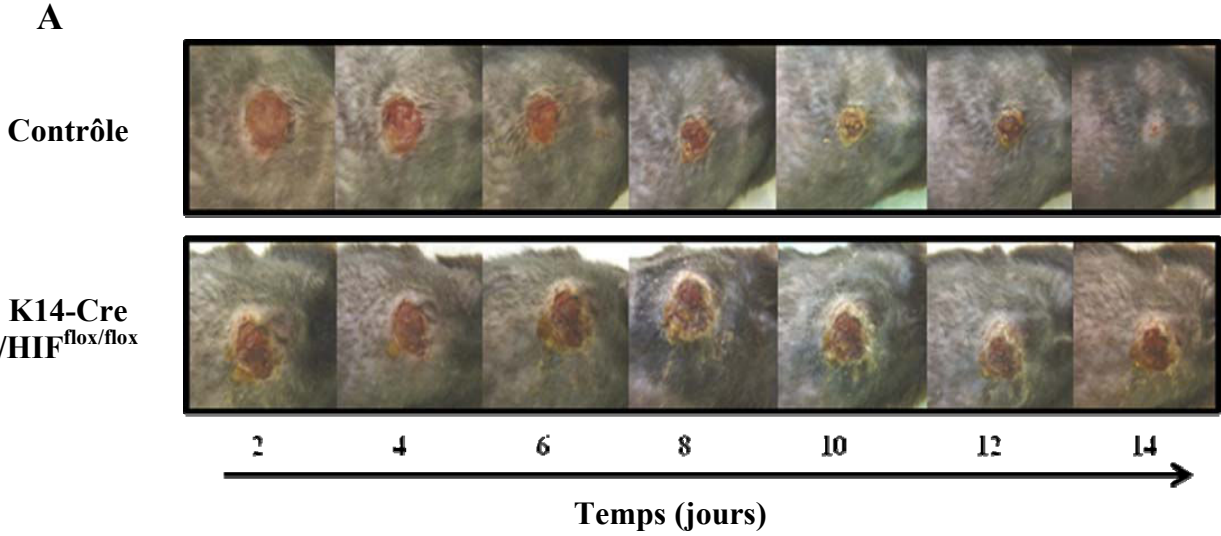


Figure 39. Immunofluorescence montrant l'expression de la chaîne $\gamma 2$ de la laminine-332 et de l'intégrine $\beta 1$ (fluorescence rouge) dans la peau des souris contrôles et celle des souris K14-Cre/HIF-1 $\alpha^{\text{flox/flox}}$.

1.4. L'inactivation de HIF-1 α au niveau de l'épiderme entraîne chez la souris un retard de la cicatrisation

Plusieurs études ont montré le rôle de la laminine-332 et des intégrines dans la cicatrisation *in vivo*. Nous avons alors décidé d'approfondir l'effet de la diminution cette molécule ainsi que celle de ces récepteurs sur la cicatrisation chez les souris contrôles et déficientes en HIF-1 α . Nos résultats indiquent un retard au niveau de la cicatrisation chez les souris déficientes en HIF-1 α par rapport aux souris contrôles. Au jour 14, les souris contrôles présentent une cicatrisation complète en comparaison avec celle des souris K14-Cre/HIF-1 $\alpha^{\text{flox/flox}}$ (Figure 40).



C

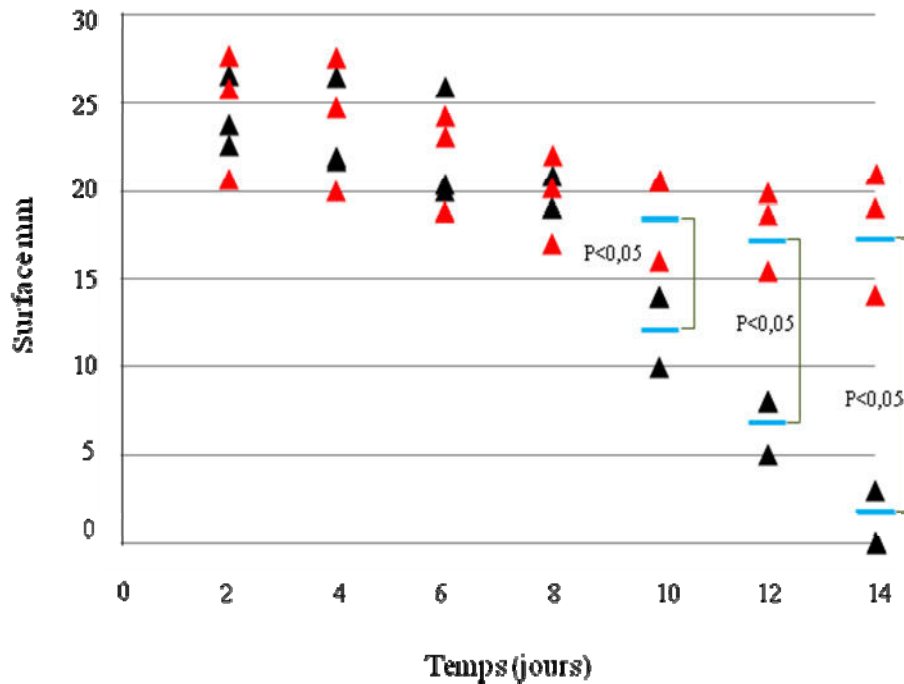


Figure 40. Test de cicatrisation chez les souris contrôles et les K14-Cre/HIF-1 α ^{flox/flox}. A : Etude macroscopique de la cicatrisation. Les souris ont subi un punch-biopsie de 3 mm et une photo a été prise tous les deux jours. B : Coloration HE à 14 jours de la zone de cicatrisation. C : Quantification de la surface de cicatrisation en fonction du temps.

Une souris K14-Cre/HIF-1 α ^{flox/flox} a été gardée jusqu'à 30 jours. De façon surprenante, cette souris ne cicatrise pas ou très mal. Nos résultats montrent que l'inhibition de HIF-1 α dans les kératinocytes provoque non seulement une diminution significative des molécules d'adhésion (laminine-332 et intégrines) dans ces cellules mais aussi comme conséquence un défaut de cicatrisation.

1.5. L'inactivation de HIF-1 α (induite par injection du tamoxifène) entraîne brusquement une mortalité chez les souris K14-CreER^{T2}/HIF-1 α ^{flox/flox}

Suite à l'observation que le phénotype des souris adultes déficientes pour HIF-1 α dans l'épiderme est relativement léger sans de graves effets observés comme ceux chez les autres souris knockdown des intégrines ou laminine-332, nous avons testé l'effet de la diminution rapide de l'expression de HIF-1 α après l'injection du tamoxifène dans les souris inducibles K14-CreER^{T2}/HIF-1 α ^{flox/flox}. De façon surprenante, toutes les souris injectées sont mortes

dans les 15 jours après traitement. Elles présentaient un amaigrissement très rapide, une akinésie et de multiples croûtes sur la peau. L'examen histologique a révélé de fausses dé-épidermisations avec formation de croûtes, contrastant avec l'absence d'effet sur les contrôles de type sauvage et les souris K14-CreER^{T2}/HIF-1 α ^{flox/flox} non traitées au tamoxifène (Figure 41). Sur les zones sans lésions cliniquement détectables, l'histo-pathologie a montré une désorganisation de l'épiderme avec des kératinocytes élargis et dystrophiques. Des structures similaires ont été observées dans l'épithélium buccal. Certaines souris K14-CreER^{T2}/HIF-1 α ^{flox/flox} ont été biopsiées avant le traitement avec le tamoxifène. Chez ces souris aucun changement aiguë n'a été retrouvé, en particulier la taille des kératinocytes. Fait intéressant, la perte aiguë de HIF-1 α dans l'épiderme n'a pas permis de déterminer un phénotype épidermolyse bulleuse, mais les changements histologiques sont plus en faveur d'un effet sur le cycle cellulaire.

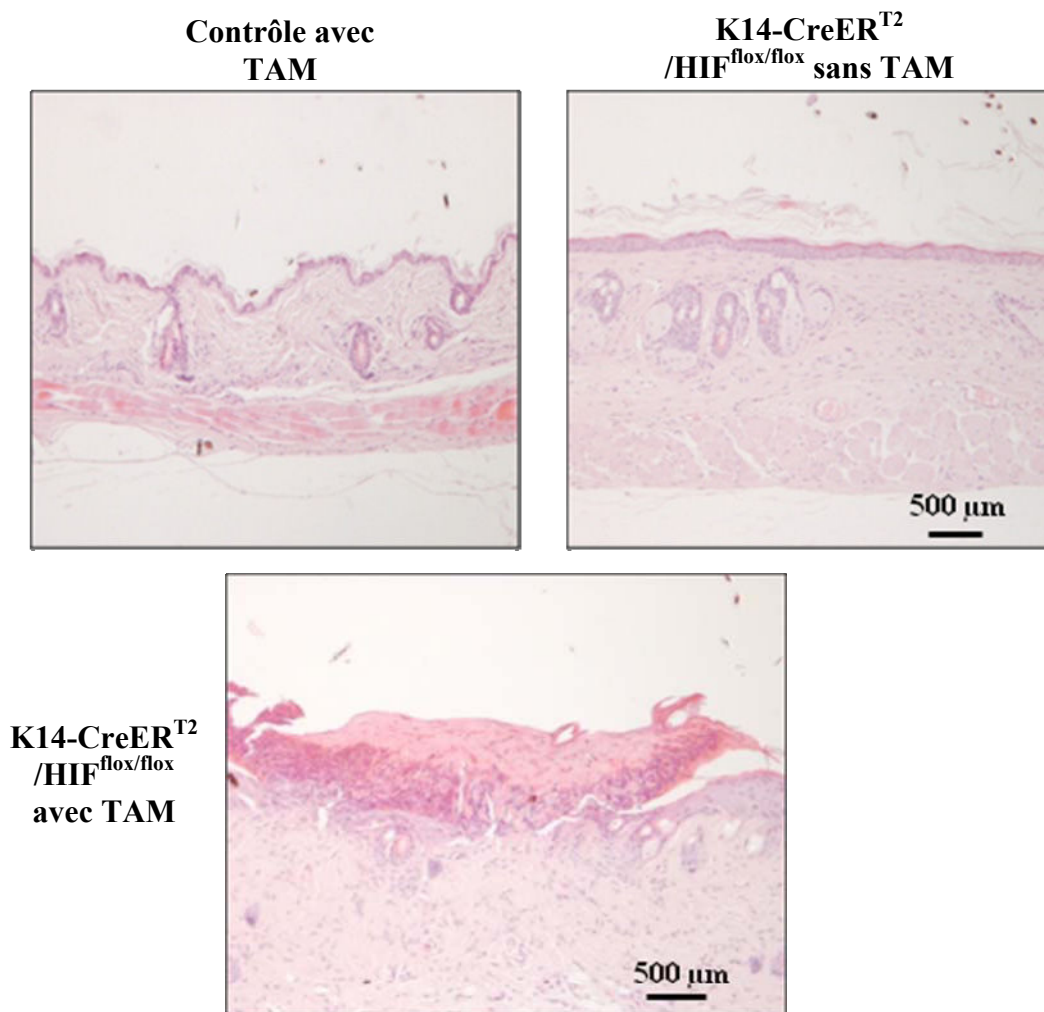


Figure 41 : Etude histologique (coloration HE) de la peau des souris normales et K14-CreERT2/HIF-1 α ^{flox/flox} après injection de tamoxifène (à 14 jours).

2. Etude du rôle de HIF-1 α , *in vitro*, dans les cellules humaines

2.1. L'inhibition de HIF-1 α dans les kératinocytes humains entraîne une diminution d'expression de la laminine-332 ainsi que des intégrines qui lui sont liées

Nous avons voulu déterminer si l'inhibition de HIF-1 α conduisait aussi à une baisse d'expression de la laminine-332 et des intégrines correspondantes dans les kératinocytes humains *in vitro*. Nous avons utilisé pour cela la technique des ARN interférents. Deux vecteurs lentiviraux précédemment construits dans le laboratoire ont été utilisés: l'un shRFP, l'autre shHIF-1 α (voir leur structure dans matériels et méthodes). L'efficacité de transduction des cellules, mesurée sur l'expression de la GFP (ou EGFP) en cytométrie, se situe entre 85 et 90%. En utilisant la technique du western blot, nous avons obtenu une inhibition de 90% de HIF-1 α avec le shHIF-1 α alors qu'il n'y a pas d'effet avec le shRNA contrôle (shRFP) (Figure 42).

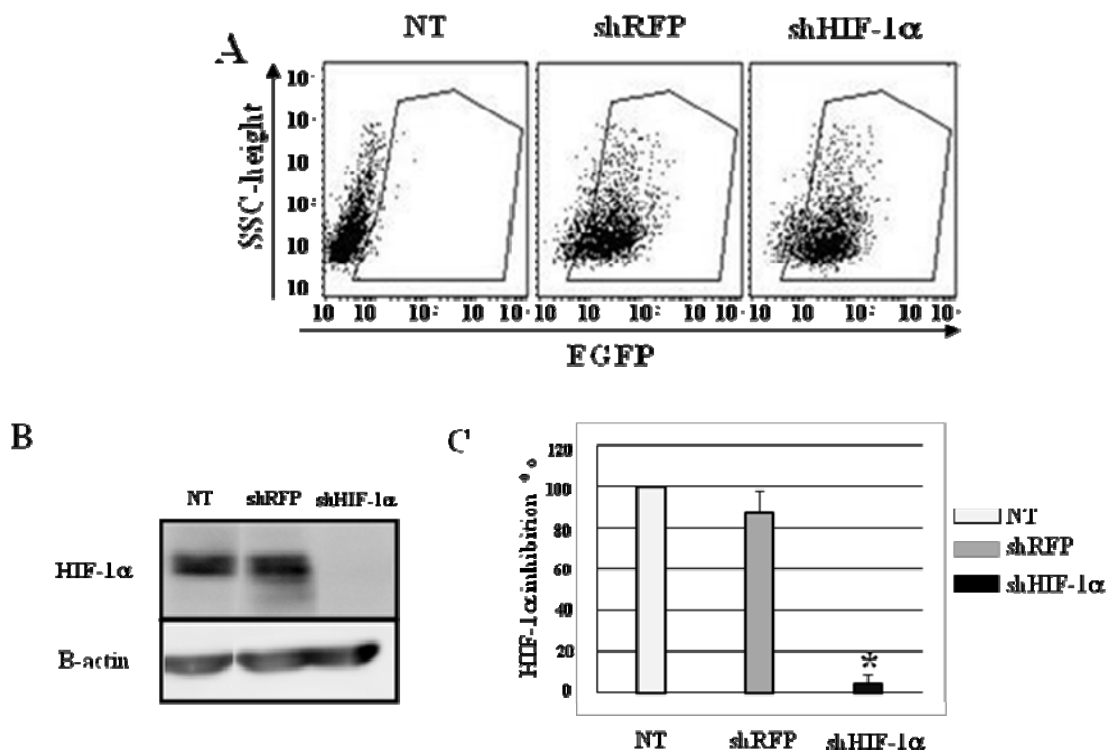
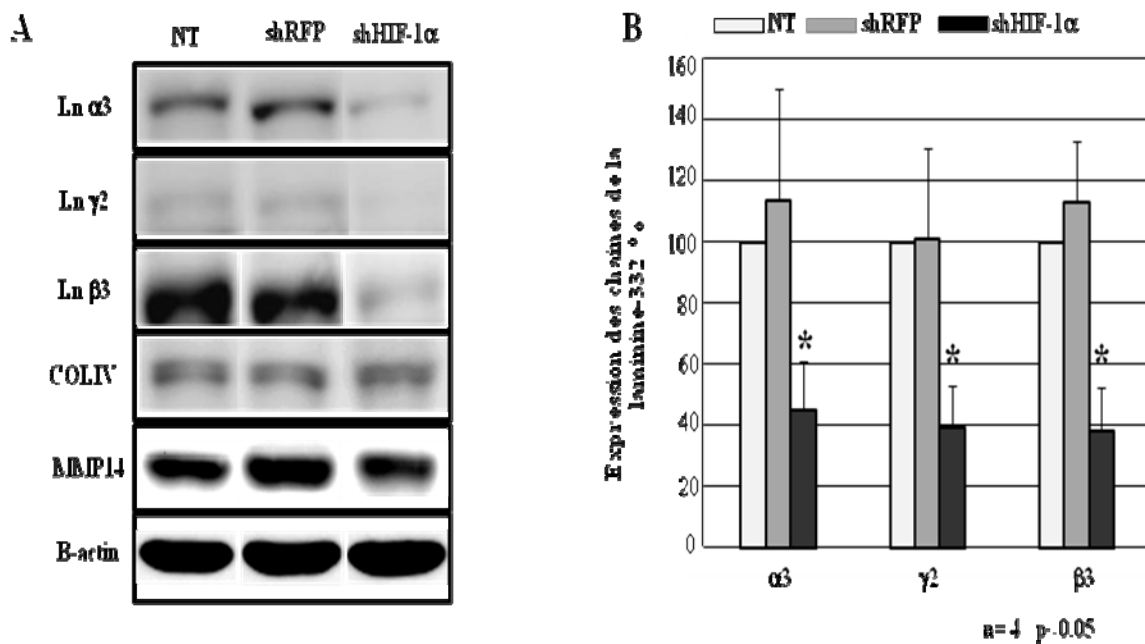


Figure 42. Inhibition de HIF-1 α dans les kératinocytes. A : Expression de la GFP indiquant l'efficacité de la transduction avec les deux vecteurs (shHIF-1 α et shRFP). B : Expression de HIF-1 α mesurée par Western blot dans les cellules non transduites (NT) et celles transduites avec shHIF-1 α ou shRFP. C : Quantification de l'expression de HIF-1 α dans les cellules NT, shHIF-1 α et shRFP montrant l'inhibition de cette protéine à 90 % (* p < 0,01 versus NT).

Nous avons alors étudié l'expression des 3 chaînes $\alpha 3$, $\gamma 2$ et $\beta 3$ de la laminine (toujours par Western blot) et les avons trouvés toutes les 3 diminuées de manière homogène (diminution de 60%). Il est à noter que les niveaux de collagène de type IV (COL IV, le plus abondant au niveau de la peau) et de MMP-14 ne sont pas modifiés (Figure 43A). Afin de confirmer ces résultats, une étude par immunofluorescence a été réalisée à l'aide d'anticorps spécifiques permettant de visualiser la laminine-332, la GFP (qui s'exprime en même temps que le shRNA) et l'actine (Figure 43C). Les résultats ont montré que les cellules kératinocytaires non transduites et celles transduites avec shRFP sont capables d'adhérer, de s'étaler, puis de migrer laissant derrière elles les traces de la laminine-332. En revanche, les kératinocytes déficients en HIF-1 α deviennent de plus en plus ronds avec un défaut d'adhésion parce qu'ils produisent très peu de la laminine-332.



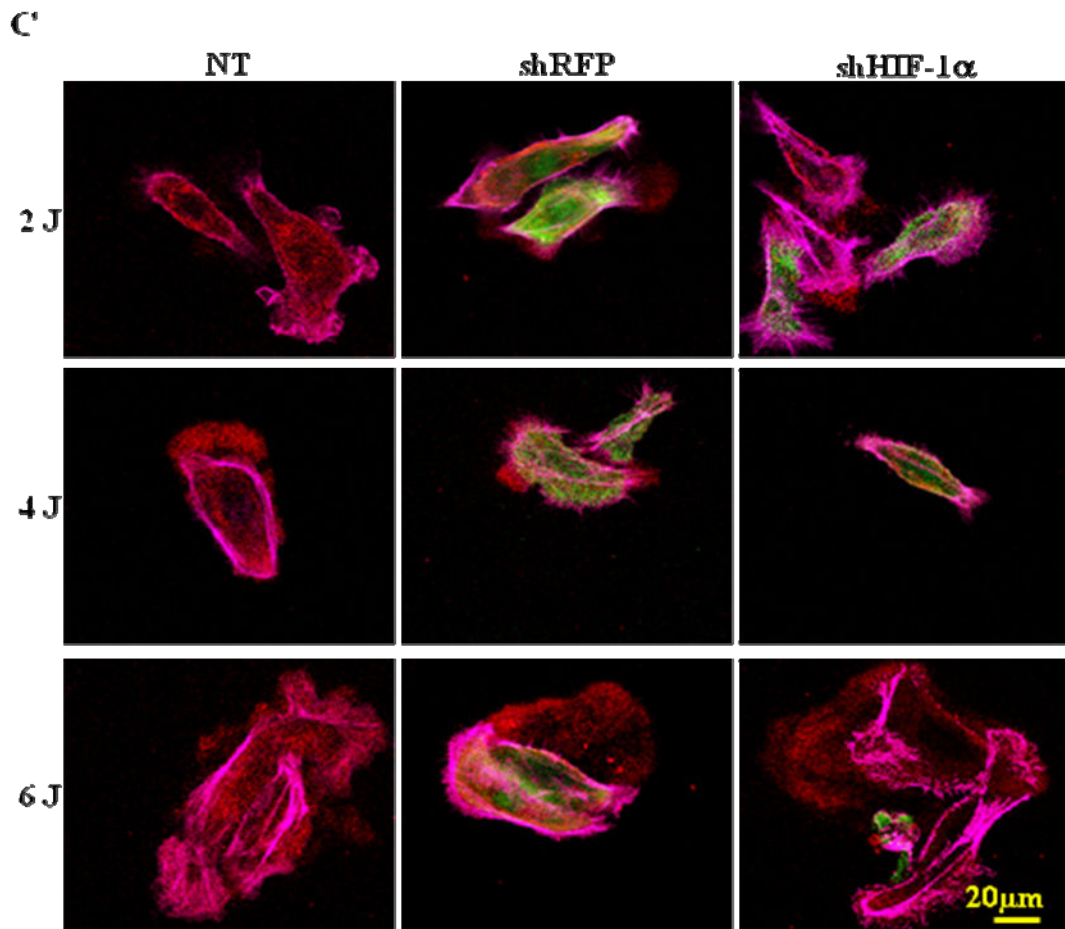
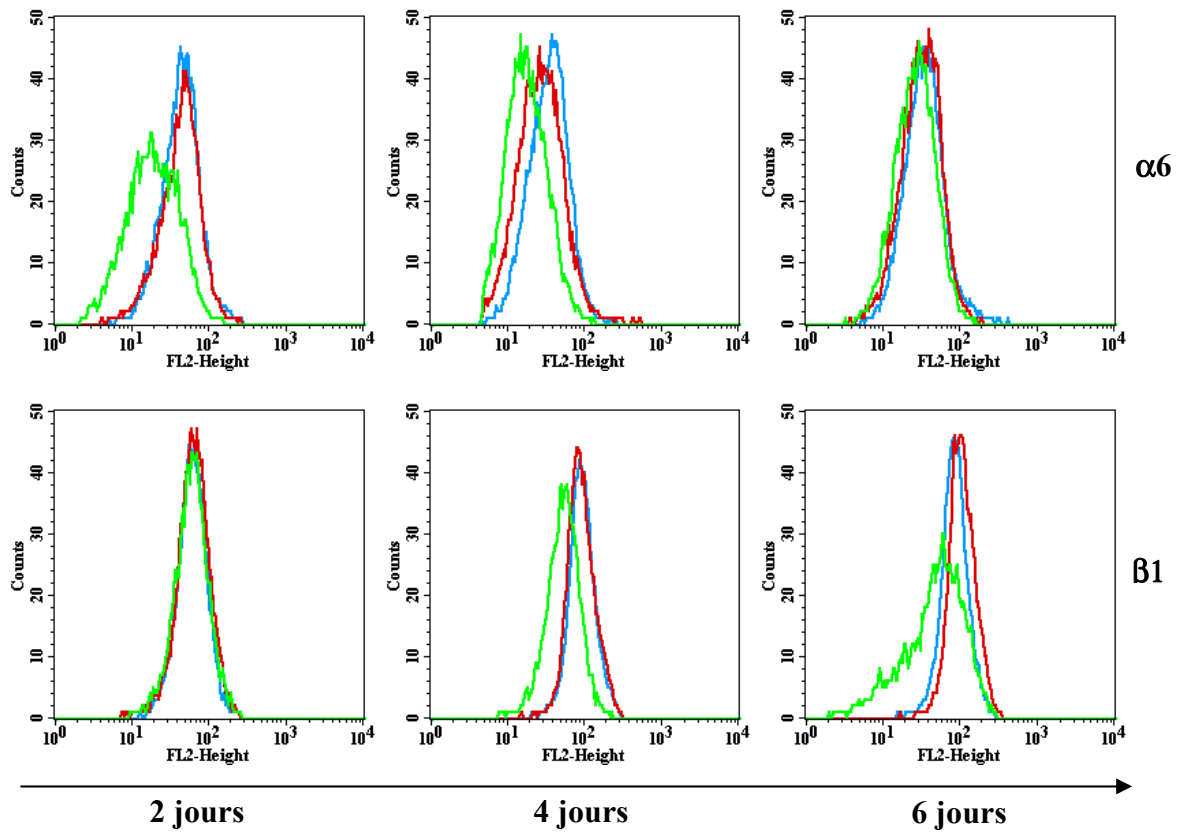


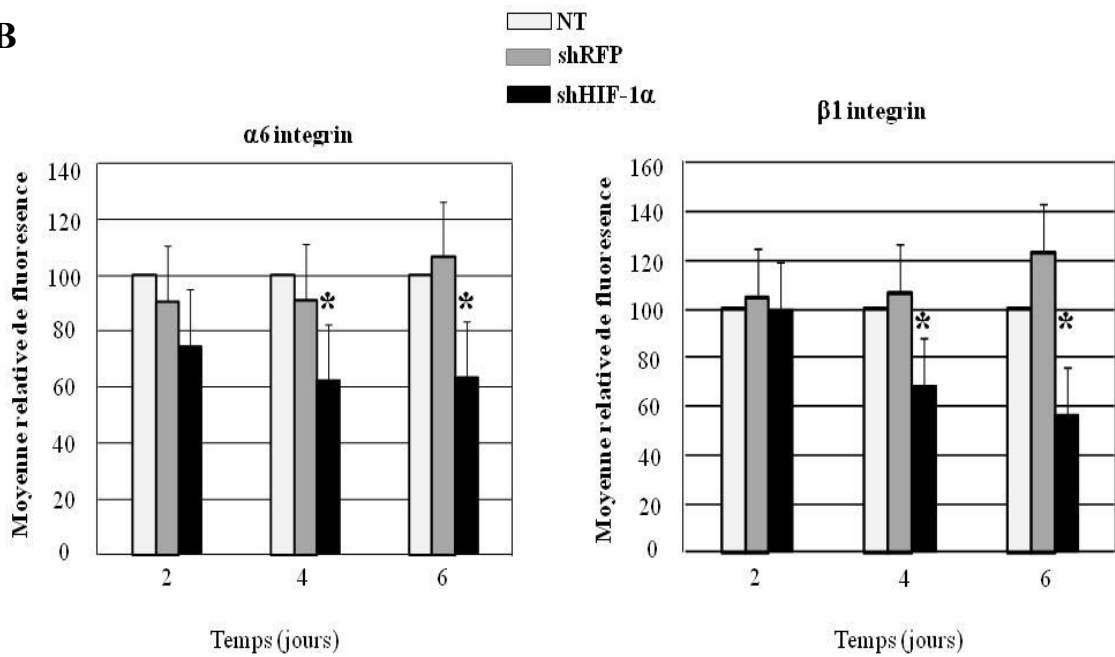
Figure 43. Diminution significative de l'expression de la laminine-332. A : Western blot montrant la diminution des chaînes $\alpha 3$, $\beta 3$ et $\gamma 2$ dans les kératinocytes transduits avec shHIF-1 α en comparaison avec les autres cellules NT ou celles transduites avec shRFP. Aucun changement au niveau du COL IV ou de MMP-14 n'a été noté. B : Quantification de l'expression des chaînes $\alpha 3$, $\beta 3$ et $\gamma 2$ de la laminine-332 révèle une diminution de 60 % suite à l'inhibition de HIF-1 α . C : Etude en immunofluorescence confirmant l'incapacité des kératinocytes transduits avec shHIF-1 α à adhérer et s'étaler avec une quantité très faibles de la laminine-332 de façon dépendante du temps. La laminine est en rouge, la GFP en vert et l'actine en violet.

Nous avons ensuite étudié le niveau d'expression des intégrines par cytométrie en flux à l'aide d'anticorps spécifiques. Les résultats indiquent que le niveau d'expression des chaînes $\alpha 6$ et $\beta 1$ des intégrines est significativement diminué. Une diminution de 20 et 40% respectivement a été mise en évidence (Figure 44).

A



B



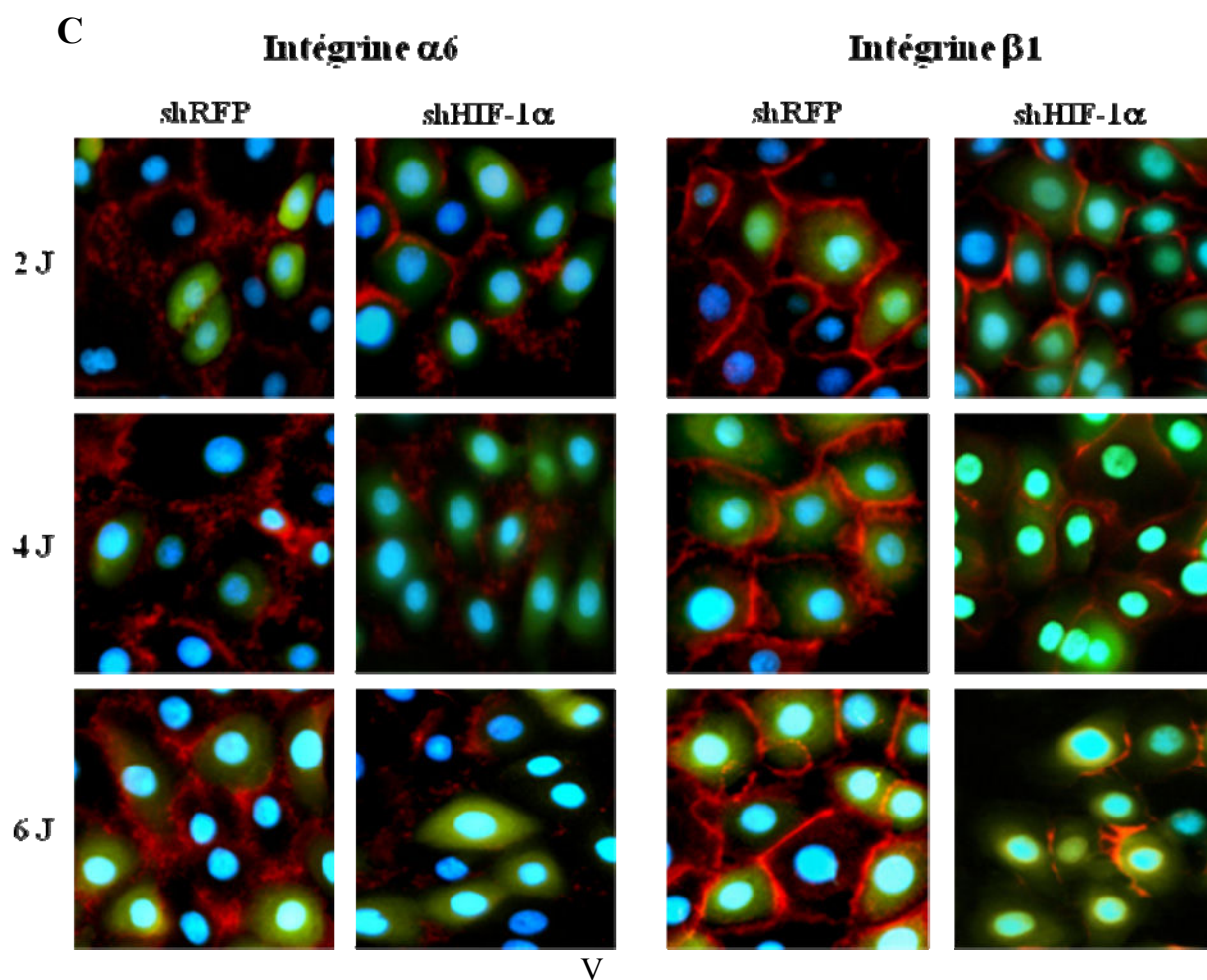


Figure 44. Diminution significative de l'expression des intégrines. A : Cytométrie en flux montrant la diminution des intégrines $\alpha 6$ et $\beta 1$ dans les kératinocytes transduits avec shHIF-1 α (ligne verte) en comparaison avec les autres cellules NT (ligne bleue) ou celles transduites avec shRFP (ligne rouge). B : Quantification de l'expression de $\alpha 6$ et $\beta 1$ qui montre leur diminution à partir du quatrième jour suite à l'inhibition de HIF-1 α . C : Etude en immunofluorescence révélant la diminution de l'expression des intégrines au cours du temps (2, 4 et 6j). Les intégrines sont en rouge, GFP en vert et les noyaux sont en bleu.

Afin de vérifier le rôle joué par les intégrines dans le défaut d'adhésion, nous avons traité des kératinocytes normaux avec des anticorps bloquants anti- $\alpha 4$ et anti- $\beta 1$ et compté à 4 jours le nombre de cellules adhérentes (en comparaison avec des cellules non traitées). Nous avons trouvé une diminution de 19 à 40% du nombre de cellules adhérentes, une diminution similaire à celle obtenue avec des kératinocytes déficients en HIF-1 α (Figure 45).

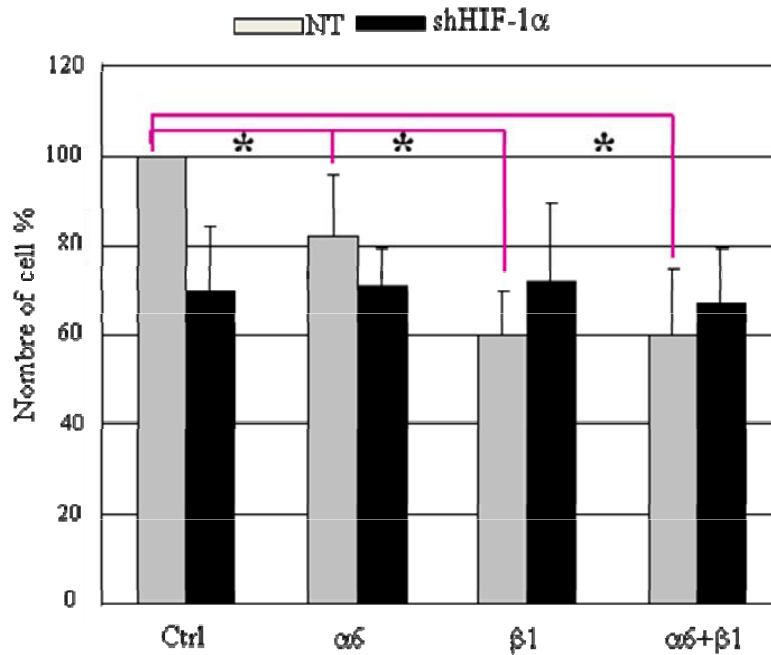


Figure 45 : Blocage des intégrines par des AC anti $\alpha 6$ et $\beta 1$ et mesure de l'adhésion des cellules. * $p < 0,05$.

2.2. L'inhibition de HIF-1 α dans les kératinocytes humains conduit à l'incapacité de former des épidermes reconstruits (ER)

Nous avons utilisé le modèle humain d'épiderme reconstruit pour étudier le rôle de HIF-1 α dans la formation et/ou le maintien de l'architecture cutanée. Cette technique permet d'étudier la capacité des kératinocytes à former un épiderme stratifié avec les différentes couches basale, épineuse, granuleuse et cornée. L'examen histologique des épidermes reconstruits avec des kératinocytes déficients montre un défaut de la reconstruction épidermique. En caractérisant l'expression de HIF-1 α et EGFP par immunohistochimie, nous avons constaté que les ER étaient majoritairement formés de kératinocytes normaux, n'exprimant pas la GFP (Figure 46).

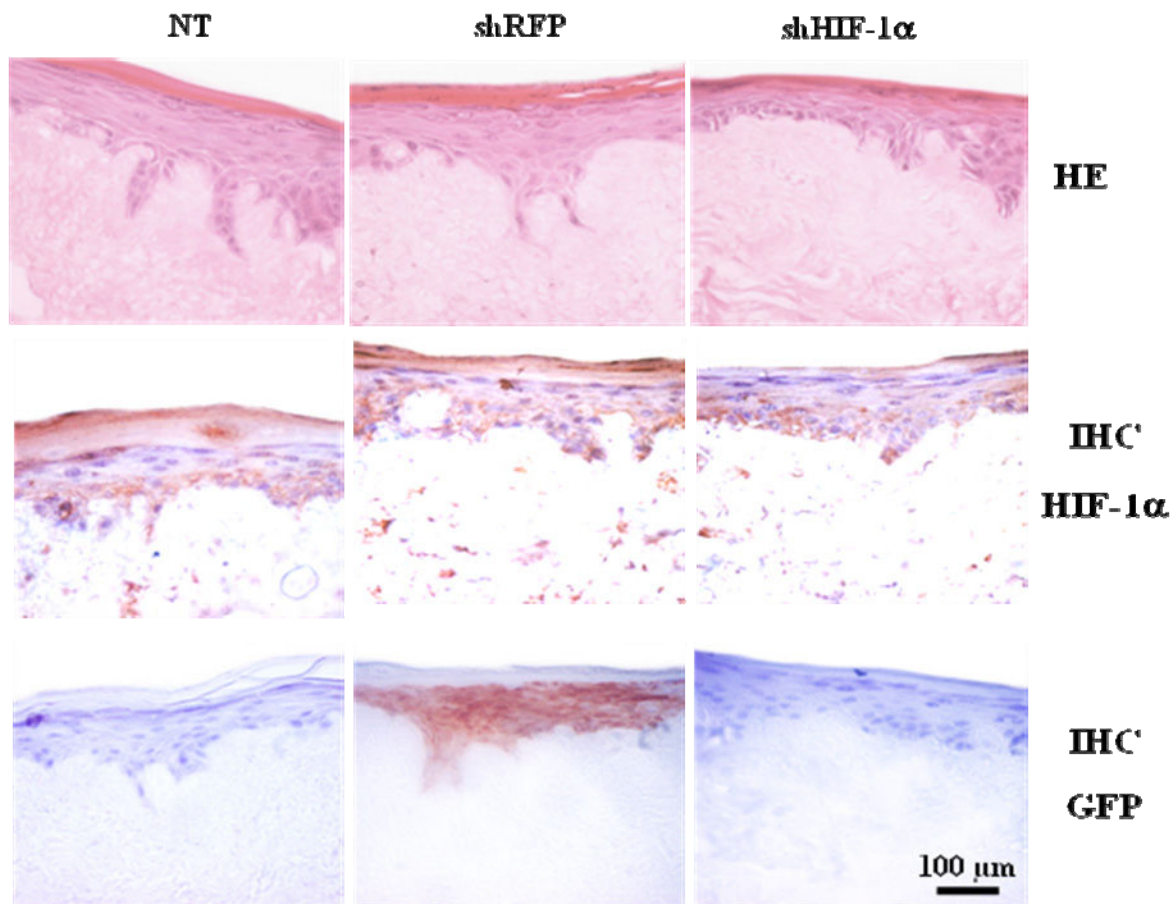


Figure 46. L'inactivation de HIF-1 α aboutit à une incapacité des kératinocytes à former un épiderme reconstruit. Pour l'expérience utilisant des kératinocytes « transduits avec shHIF-1 α », l'épiderme reconstruit contient des kératinocytes qui expriment HIF-1 α et pas la GFP, ce qui correspond à une présence des kératinocytes non transduits pour la reconstruction épidermique. HE : hématoxyline-Eosine.

Afin de confirmer ce résultat, nous avons utilisé aux dépôts différentes quantités de cellules pour la reconstruction épidermique. L'utilisation de 75 000 cellules déficientes n'aboutit à la reconstruction d'aucun épiderme. En revanche, 75 000 cellules normales utilisées au départ aboutissent à un pourcentage de reconstruction de 70%, alors que 150 000 cellules déficientes sont nécessaires pour obtenir un pourcentage similaire (Figure 47). Ceci démontre la nécessité d'un minimum de cellules normales, NT pour la reconstruction.

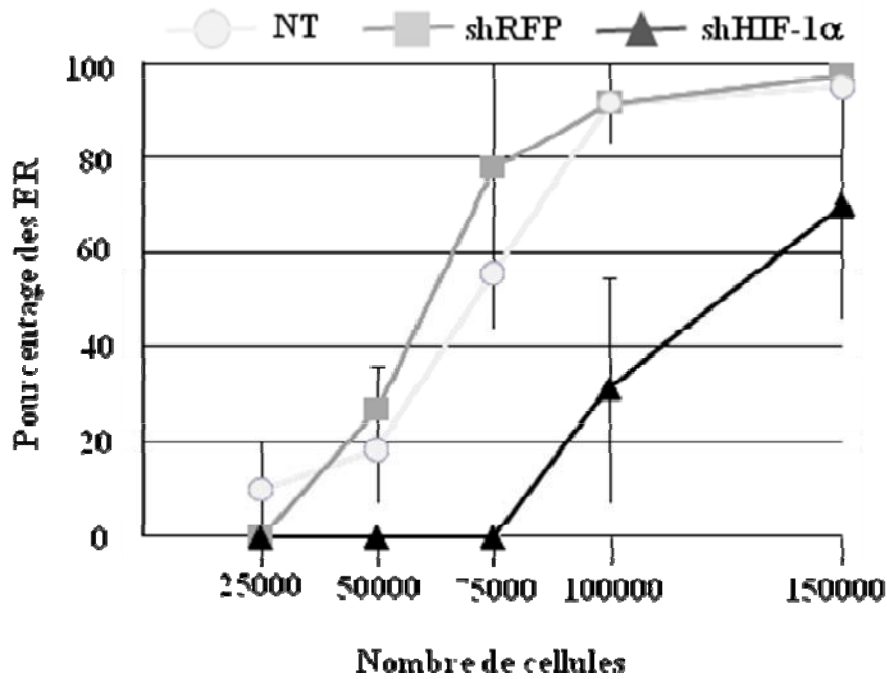


Figure 47. Formation d'ER en fonction du nombre de cellules de départ

Nous avons alors tenté de restaurer la reconstruction épidermique en ajoutant de la laminine-332 sur le derme mort. L'histologie révèle un ER avec une architecture normale utilisant les cellules NT ou les cellules transduites avec shRFP. Par ailleurs, les cellules transduites avec shHIF-1 α arrivent à adhérer sur les dermes mais ne forment pas un RE. L'immunohistologie de GFP montre bien la présence des cellules GFP positives, ce qui montre la présence des kératinocytes transduits avec shHIF-1 α (Figure 48). Nous pensons que ces cellules finissent par mourir parce qu'elles ne sont ni capables de migrer ni de proliférer.

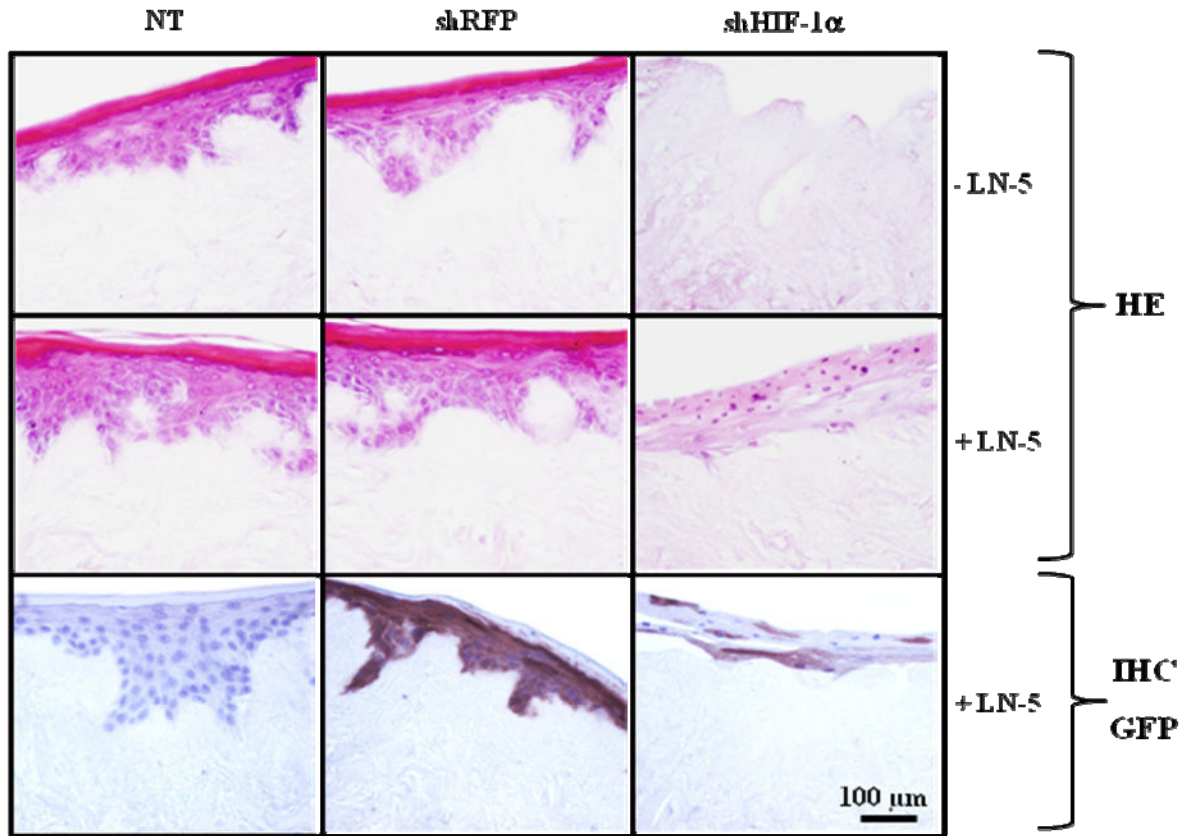


Figure 48. L'ajout de la laminine-332 ne restaure pas la formation des ER. Histologie des épidermes reconstruits en absence ou en présence de laminine-332. L'immunohistochimie (IHC) indique la présence de cellules GFP⁺ (pour shRFP et shHIF-1α), mais ne permet pas la reconstruction épidermique dans le cas de shHIF-1α.

Les souris K14-Cre/HIF-1 $\alpha^{\text{fllox/fllox}}$, comme il a été mentionné précédemment, ne montrent aucun phénotype au niveau de la peau avant 12 mois. Cette observation nous a permis de penser que les fibroblastes peuvent aider les kératinocytes déficients en HIF-1 α au niveau de la synthèse de la laminine-332 et d'autres molécules permettant leur adhésion. Pour cette raison, nous avons pensé que la reconstruction épidermique par les kératinocytes transduits avec shHIF-1 α pourrait être possible à condition de les co-cultiver avec les fibroblastes dermiques. Il convient d'ailleurs de noter que l'interaction entre les kératinocytes épidermiques et les fibroblastes dermiques conduit à un changement dans l'expression des gènes codant pour les composants de la membrane basale (Marionnet *et al.*, 2006).

Nos résultats montrent bien que la présence des fibroblastes aboutit à une reconstruction épidermique avec plus de couches par rapport à celle formée juste par des

kératinocytes normaux. En outre, les kératinocytes déficients en HIF-1 α sont présents dans ces épidermes mais ils sont toujours déplacés dans les couches suprabasales, ce qui est montré par l'immunohistologie utilisant les AC anti GFP (Figure 49).

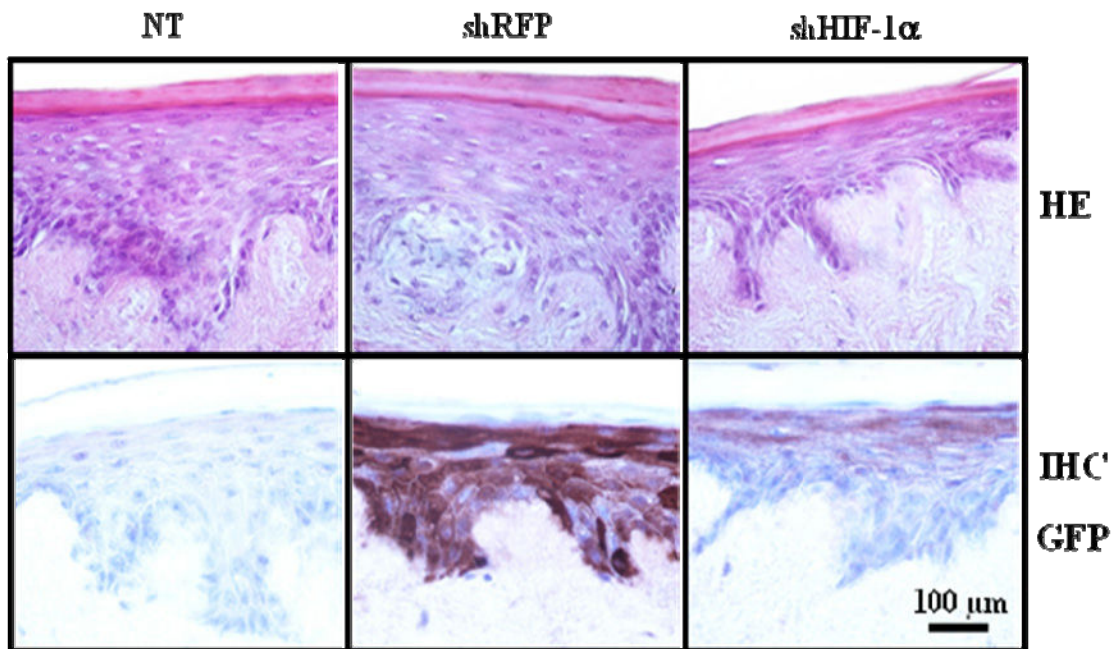


Figure 49. La présence des fibroblastes n'est pas suffisante pour aider les kératinocytes déficients en HIF-1 α à donner une reconstruction épidermique.

Après ces différents échecs, nous avons réalisé une cinétique (4, 6 et 8 jours) avec les épidermes reconstruits en utilisant les cellules transduites avec shHIF-1 α 24 h après transduction. Le but était de voir si l'inhibition de HIF-1 α induit la différenciation des kératinocytes ou seulement l'apoptose. Nos résultats indiquent que les cellules knockout en HIF-1 α migrent, de façon dépendante du temps, vers les couches supérieures de l'épiderme. De plus, la taille de ces cellules changent, deviennent plus grosses. Nous pensons que ces cellules subissent une apoptose: c'est pourquoi elles s'éliminent au fur à mesure par migration (Figure 50). Une façon de vérifier cette apoptose est de réaliser une immunohistochimie anti caspases et anti-GFP en même temps pour co-localiser les kératinocytes transduits avec shHIF-1 α .

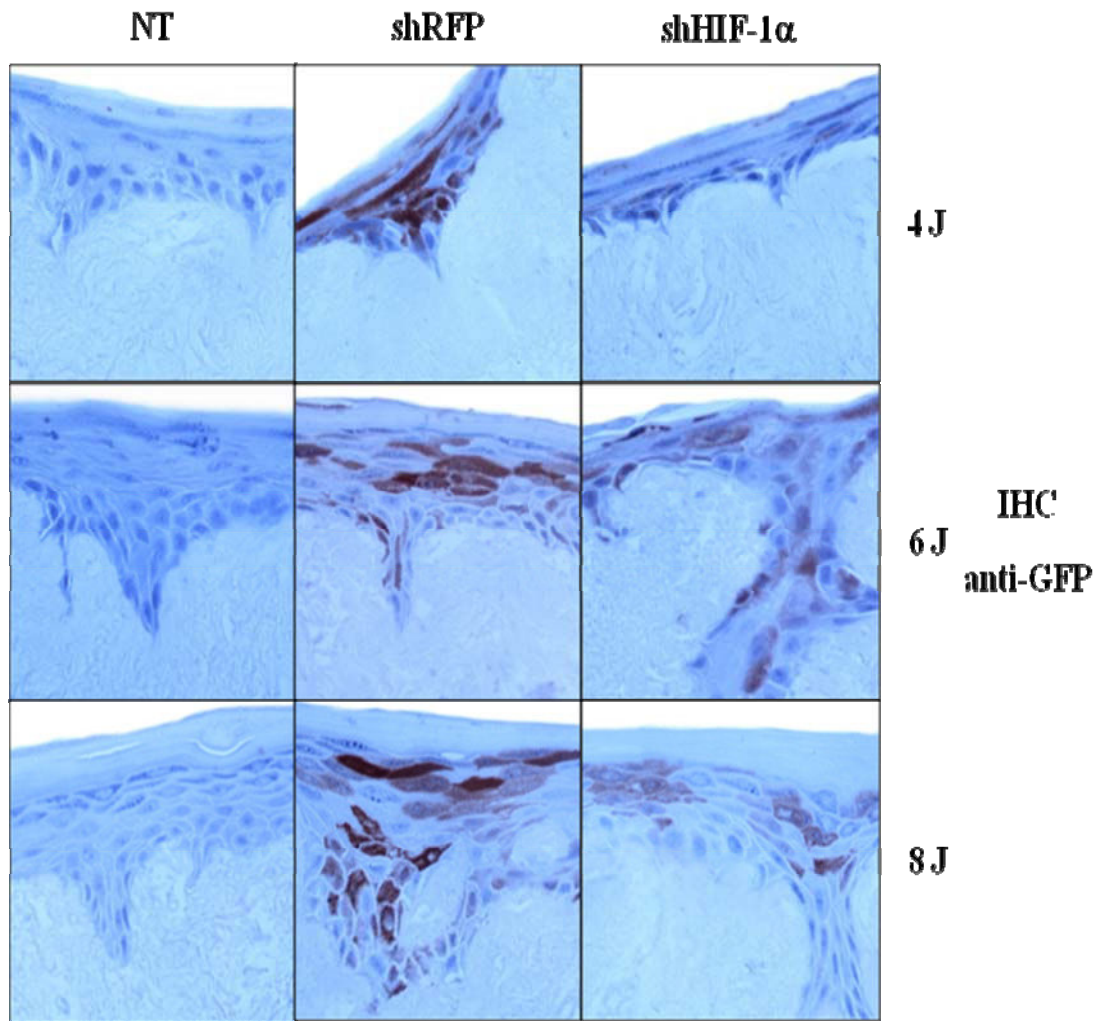
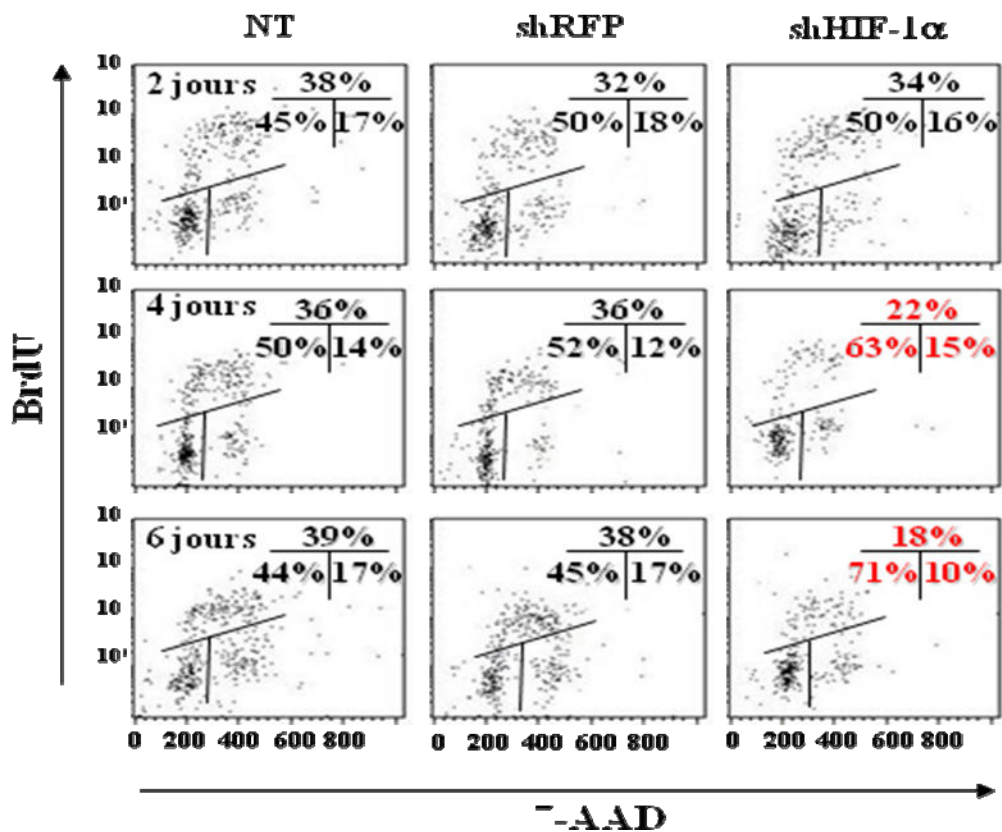


Figure 50. La réalisation des ER 24h après la transduction de shHIF-1 α ne permet pas une reconstruction épidermique.

2.3. L'inhibition de HIF-1 α aboutit à un arrêt du cycle cellulaire et à l'apoptose des kératinocytes

Nous avons voulu ensuite étudier la conséquence de l'inhibition de HIF-1 α sur le cycle cellulaire. Les résultats montrent clairement que le pourcentage de cellules en phase G0-G1 augmente avec le temps, en même temps qu'il existe une diminution du pourcentage de cellules en phase S (Figure 51). La quantification du nombre des kératinocytes knockout en HIF-1 α et qui sont en arrêt du cycle cellulaire indique une augmentation significative en comparaison avec les cellules contrôles.

A



B

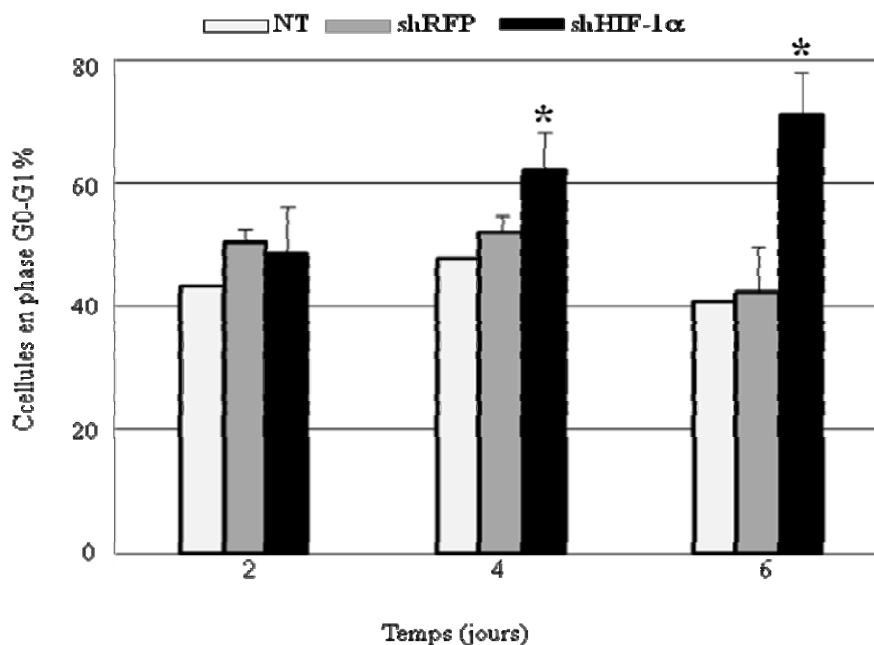


Figure 51. L'inhibition de HIF-1 α induit un arrêt du cycle cellulaire dans les kératinocytes. A : Cytométrie en flux utilisant le bromodéoxyuridine (BrdU) et le 7-Amino-actinomycine D (7-AAD). B : Quantification. * $p < 0,05$ versus NT.

L'étude de l'apoptose par marquage à l'iodure de propidium a montré une augmentation des cellules apoptotiques au 4^e jour (Figure 52 A). Ces cellules apoptotiques sont clairement mises en évidence au microscope (Figure 52 B).

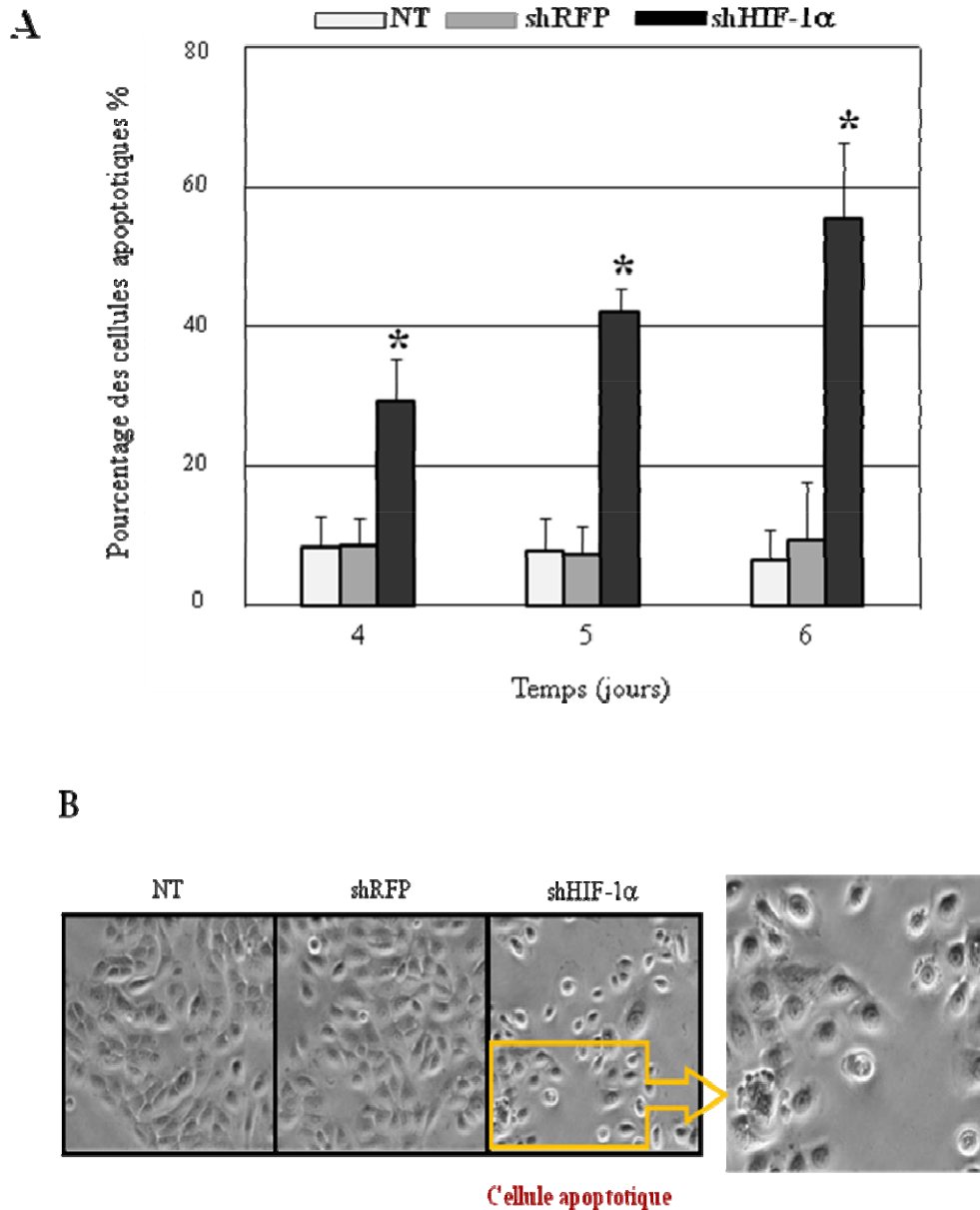


Figure 52. L'inhibition de HIF-1 α induit l'apoptose des cellules. A : Quantification des cellules apoptotiques par l'iodure de propidium. * $p < 0,01$ versus NT. B : image caractéristique des cellules apoptotiques en microscopie optique à contraste de phase.

Chapitre IV : Discussion et perspectives

HIF-1 est un facteur qui régule la transcription de plus de 200 gènes impliqués dans divers processus biologiques tels que l'adhésion, la migration, la survie cellulaire, la cicatrisation, l'angiogenèse et d'autres. Récemment, nous avons montré que HIF-1 α est impliqué dans la réparation de l'ADN dans les kératinocytes humaines suite à l'irradiation UVB (Rezvani *et al.*, 2010). Le microenvironnement modérément hypoxique de la peau (Bedogni *et al.*, 2005) favorise une augmentation de l'expression de HIF-1 α , ce qui suggère un rôle important de ce facteur dans la peau. Mes travaux de thèse ont été centrés sur le rôle de HIF-1 α dans la physiologie cutanée concernant la cicatrisation, *in vivo*, et l'adhésion des kératinocytes, *in vitro*, ou sur les épidermes reconstruits mais aussi son rôle dans la photoprotection.

1. Rôle de HIF-1 α dans la physiologie cutanée

1.1. Rôle de HIF-1 α dans la régulation des molécules d'adhésion

Dans un premier temps nous nous sommes intéressés à regarder l'effet de l'inactivation de HIF-1 α dans les kératinocytes. Cela nous a amené à choisir les épidermes reconstruits (ER) comme modèle proche de la physiologie de la peau. Nos résultats ont montré un défaut des kératinocytes qui n'expriment pas HIF-1 α à former un épiderme reconstruit. Ensuite, nous avons montré que le déficit de HIF-1 α entraîne une diminution significative des trois chaînes de la laminine-332 (α 3, β 3 et γ 2). Nos travaux confirment les précédentes données (Fitsialos *et al.*, 2008) qui ont montré que l'inactivation de HIF-1 α dans les kératinocytes aboutit à une diminution de la laminine-332 et que le gène codant pour la chaîne α 3 est un gène cible de HIF-1 α contenant des éléments de réponse (HRE) de ce facteur. De façon surprenante, l'ajout de la laminine-332 sur les dermes ne restaure pas la capacité des kératinocytes déficients en HIF-1 α à former des ER. En consultant les données bibliographiques, nous avons constaté que l'intégrine β 1 est un gène cible de HIF-1 α contenant des HRE (Keely *et al.*, 2009). Les intégrines, comme il a été déjà mentionné (4.3.2.3), sont des récepteurs indispensables à l'adhésion, la migration et la prolifération cellulaire (Giancotti et Ruoslahti, 1999 ; Berrier et Yamada, 2007). Les intégrines exprimées au sein des kératinocytes sont les α 6 β 1, α 6 β 4 et α 3 β 1 (Watt, 2002). Il est intéressant de noter aussi que ces intégrines sont les récepteurs directs de la laminine-332 (Barczyk et Sergio,

2010). Ces données, nous ont permis de penser que l'inhibition de HIF-1 α pouvait réguler aussi l'expression des intégrines. Nos résultats indiquent une diminution significative de l'expression des intégrines $\alpha 6$ et $\beta 1$ dans les kératinocytes déficients en HIF-1 α de manière dépendante du temps. L'utilisation des anticorps bloquants contre ces intégrines dans les kératinocytes exprimant ou non HIF-1 α a montré que les intégrines $\alpha 6$ et $\beta 1$ sont impliquées dans l'adhésion des kératinocytes. **Ceci nous a permis de conclure que HIF-1 α est primordial pour l'adhésion des kératinocytes en régulant l'expression de la laminine-332 et ses récepteurs (intégrines $\alpha 6$ et $\beta 1$).**

La suppression épidermiques des intégrines ou la modulation de leurs fonctions, *in vivo*, conduit à l'apparition de plusieurs phénotypes, tels que les **blessures ou les défauts dans la formation des follicules pileux** (Benitah *et al.*, 2005 ; Watt *et al.*, 2008). De plus, les intégrines sont impliquées dans plusieurs manifestations épidermiques telles que l'inflammation, l'hyperprolifération, les tumeurs et la formation de métastases (Guo et Giancotti, 2004 ; Brakebusch et Fassler, 2005 ; Janes et Watt, 2006 ; Wilhelmsen *et al.*, 2006 ; Hobbs et Watt, 2003 ; Raymond *et al.*, 2007). Des études ont montré que l'intégrine $\beta 1$ régule l'adhésion et la différenciation des cellules épidermiques, jouant un rôle essentiel dans la formation et la morphologies des follicule pileux (Brakebusch *et al.*, 2000 ; Raghavan *et al.*, 2000 ; Watt, 2002 ; Grose *et al.*, 2002). La surexpression de la forme mutée **Try188Ile de l'intégrine $\beta 1$** humaine dans les kératinocytes murins induit une augmentation de la sensibilité épidermique à développer des tumeurs malignes et une diminution de la différenciation tumorale (Ferreiro *et al.*, 2009).

Dans le psoriasis, il a été montré une **hyperprolifération** des cellules épidermiques accompagnée d'une expression élevée de l'intégrine $\alpha 2\beta 1$. Cette expression est présente non seulement dans la couche basale, mais aussi dans la couche suprabasale (Watt, 2002 ; Hertle *et al.*, 1992). Les souris transgéniques surexprimant l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ développent spontanément un phénotype inflammatoire de la peau ressemblant à celui du psoriasis avec une hyperplasie de l'épiderme et une perturbation de la différenciation, *in vivo* (Carroll *et al.*, 1995) (Figure 53, d'après Teige *et al.*, 2010).

Souris normale

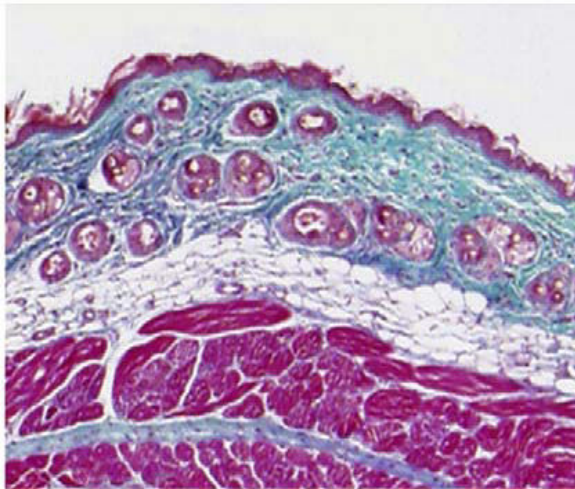
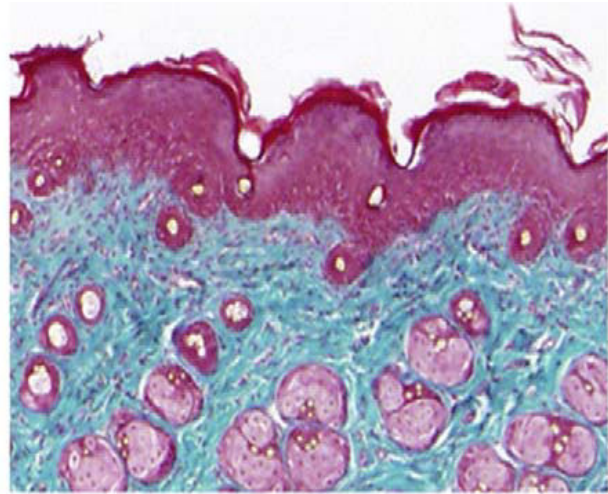
souris surexprimant $\alpha 2\beta 1$ 

Figure 53. Histologie de la peau chez les souris normales et celles surexprimant $\alpha 2\beta 1$ sous le promoteur involucrine, selon Teige *et al.*, 2010

Un des marqueurs des **cellules souches** interfolliculaires épidermiques humaines est l'intégrine $\beta 1$ (Jones et Watt, 1993 ; Jones *et al.*, 1995 ; Jensen *et al.* 1999). Les kératinocytes avec une expression élevée de $\beta 1$ affichent des propriétés typiques de celles des cellules souches, y compris leurs capacités à former des colonies, *in vitro*. Des résultats similaires ont été également obtenus avec des cellules adultes humaines de la paume de la main, de la plante des pieds et de la peau du sein qui expriment fortement $\beta 1$ (Wan *et al.*, 2003). La délétion de $\beta 1$ dans les kératinocytes aboutit à une diminution de la prolifération des cellules progénitrices de la peau et de l'épithélium des glandes mammaires (Taddei *et al.*, 2008). Les souris exprimant seulement 15% du niveau normal de l'intégrine $\beta 1$ développent un épiderme un peu épais et quelques rares bulles de petite taille (Piwko-Czuchra *et al.*, 2009). La plupart des follicules pileux sont mal formés. Les kératinocytes primaires isolés de la peau de ces jeunes souris adhèrent à des substrats de la matrice extracellulaire, mais ne sont pas capables de s'étaler, ni de proliférer, ni de survivre. Ces résultats suggèrent qu'une réduction de l'expression de $\beta 1$ permet toujours l'adhésion mais est insuffisante pour activer les voies de signalisation impliquées dans la réorganisation du cytosquelette, l'étalement cellulaire et la prolifération.

Récemment, une étude effectuée par Giangreco et son équipe a confirmé que $\beta 1$ est un marqueur des cellules souches en comparant son expression dans trois groupes de peau : une peau jeune (21 à 33 ans), une peau intermédiaire (51-59 ans) et une peau âgée (plus de 60

ans). Les auteurs ont montré une diminution significative de l'expression de $\beta 1$ avec l'âge, suggérant que le vieillissement de la peau humaine est associée à une expression réduite de marqueurs des cellules souches tels que l'intégrine $\beta 1$ (Figure 54, d'après Giangreco *et al.*, 2010).

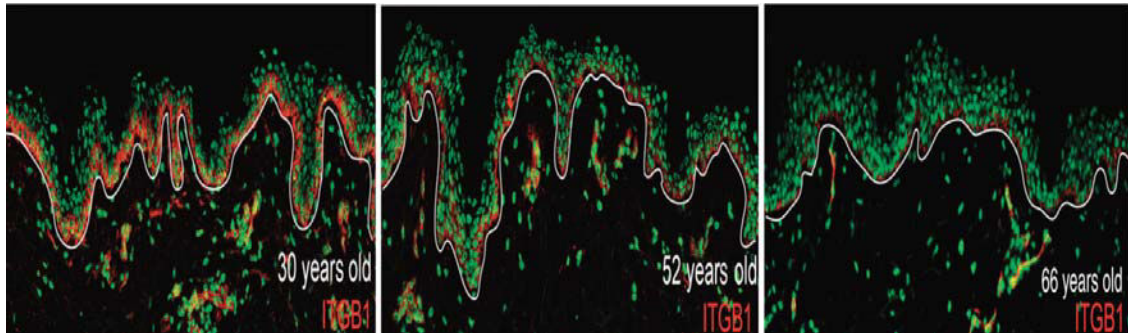


Figure 54. L'expression de l'intégrine $\beta 1$ (immunofluorescence rouge) diminue avec l'âge chez l'homme (d'après Giangreco *et al.*, 2010).

Ces données sont à comparer avec nos résultats chez les souris $K14-Cre/HIF-1\alpha^{flox/flox}$ âgées (de plus de 1 an) qui ont une peau plus fine et une diminution de l'expression de l'intégrine $\beta 1$. HIF-1 α pourrait alors avoir un rôle important au niveau des cellules souches épidermiques par l'intermédiaire de son action sur le couple laminine-332/intégrine $\alpha 2\beta 1$. Nos résultats montrent aussi que les kératinocytes déficients en HIF-1 α migrent de façon surprenante vers les couches suprabasales pour être incorporés finalement dans la couche cornée des épidermes reconstruits. La perte des kératinocytes déficients en HIF-1 α ressemble à celle décrite dans le vitiligo, où on retrouve une perte chronique et progressive des mélanocytes fonctionnels de l'épiderme ainsi que d'une diminution de la réserve des follicules, dont on ne connaît pas encore la cause (Huggins *et al.*, 2005 ; Taieb et Picardo, 2009). Ces résultats montrent l'importance de l'approfondissement du rôle de HIF-1 α dans la prolifération, la migration et la différenciation terminale des kératinocytes.

Les souris jeunes (jusqu'à 6 mois) $K14-Cre/HIF-1\alpha^{flox/flox}$ (« constitutives ») ont une peau normale sans aucun phénotype remarquable. Cela peut être expliqué par le fait que les souris se sont habituées à l'absence de HIF-1 α dès leur naissance. En revanche, les souris « inductibles » meurent rapidement (deux semaines) après l'injection de tamoxifène en montrant des micro-détachements au niveau de la peau. On ne connaît pas encore la raison pour laquelle ces souris ne peuvent survivre, mais on peut proposer l'hypothèse suivante :

l'inhibition de HIF-1 α induit une diminution de la laminine-332 et des intégrines $\alpha 6$ et $\beta 1$, ce qui aboutit à un détachement de l'épiderme au niveau de la jonction dermo-épidermique, provoquant une perte hydrique importante ainsi qu'une perte de poids. Connaissant le rôle de la laminine-332 et des intégrines dans la physiologie de la barrière cutanée, ainsi que le rôle des mutations dans le gène de la laminine-332 ou dans le gène de l'intégrine $\alpha 6$ qui conduisent à l'épidermolyse bulleuse jonctionnelle (Uitto et Richard, 2005 ; Georges-Labouesse *et al.*, 1996), un rôle de HIF-1 α dans cette dernière maladie peut être raisonnablement envisagé : il serait alors intéressant de rechercher des mutations de ce gène dans les cas atypiques ou non expliqués de la maladie.

1.2. Rôle de HIF-1 α dans la cicatrisation

Le rôle de HIF-1 α dans la cicatrisation a été démontré par plusieurs équipes (Fitsialos *et al.*, 2008 ; Elson *et al.*, 2000 ; Scheid *et al.*, 2002). De plus, l'environnement hypoxique au niveau de la plaie induit une expression élevée de HIF-1 α . Nos résultats montrent que l'absence de HIF-1 α chez les souris âgées K14-Cre/HIF-1 $\alpha^{\text{floX}/\text{floX}}$ aboutit à un retard de la cicatrisation chez ces souris par rapport aux souris contrôles. Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que l'inactivation de HIF-1 α perturbe la prolifération et la migration des cellules (fibroblastes et kératinocytes). En effet, l'hypoxie aiguë augmente la prolifération des fibroblastes dermiques humains, leur migration (Falanga *et al.*, 1993 ; Mogford *et al.*, 2002 ; Lerman *et al.*, 2003) et la migration des kératinocytes (O'Toole *et al.*, 1997 ; Xia *et al.*, 2001). L'inhibition de HIF-1 α induit une diminution de la laminine-332 qui à son tour provoque une diminution de la migration cellulaire, *in vitro*, (Fitsialos *et al.*, 2008). Nos résultats confirment ces données *in vitro* et *in vivo*, mais ils ne sont pas en accord avec d'autres résultats obtenus par O'Toole *et al.*, 1997 ; Esco *et al.*, 2001. Le premier groupe a montré que l'hypoxie induit une diminution de la laminine-332 ce qui favorise la migration des kératinocytes lors de la réépithélialisation. Le deuxième groupe a démontré que l'hypoxie chronique entraîne une apoptose des kératinocytes car ils déposent moins de laminine-332 fonctionnelle dans la matrice extracellulaire.

Le défaut au niveau de la cicatrisation était aussi signalé chez d'autres souris déficientes en intégrines telles que $\alpha 3 \beta 1$ (Margadant *et al.*, 2009). La stabilisation de HIF améliore la cicatrisation chez les souris diabétiques db/db en augmentant l'expression des gènes cibles de HIF qui sont importants dans la motilité, l'angiogenèse (Botusan *et al.*,

2008). L'ensemble de ces observations et de la fonction de HIF-1 α connue dans les différentes étapes de la cicatrisation fait de ce facteur une cible thérapeutique intéressante.

Dans ce contexte, il est indispensable de réaliser une étude complète du rôle de HIF-1 α dans la cicatrisation chez les jeunes souris K14-Cre/HIF^{flox/flox}, afin de mieux comprendre le rôle de ce facteur dans la physiologie de la peau jeune et vieille.

1.3. Rôle de HIF-1 α dans la régulation de l'homéostasie épidermique

En plus de son rôle dans la régulation des gènes régulés par l'hypoxie, HIF-1 α joue un rôle central dans la détermination du destin cellulaire. Nos résultats montrent que les kératinocytes déficients en HIF-1 α subissent un arrêt cellulaire en G0-G1 en comparaison avec les cellules contrôles. De plus, les kératinocytes déficients en HIF-1 α montrent une augmentation significative de l'apoptose. Nous supposons que la perte des intégrines ou la présence de celles-ci dans un état non lié pourrait induire une apoptose dans les kératinocytes (Desgrosellier et Cheresch, 2010).

Récemment, il a été constaté que HIF-1 α contrôle le cycle cellulaire des kératinocytes en régulant l'expression de p21 (Cho *et al.*, 2008). À des densités cellulaires fortes, les kératinocytes subissent un arrêt du cycle cellulaire en phase G1. En outre, l'inhibition de HIF-1 α va affranchir les kératinocytes de l'arrêt du cycle cellulaire. Compte tenu des informations actuellement disponibles (Ryan *et al.*, 1998 ; Carmeliet *et al.*, 1998 ; Sun *et al.*, 2003), HIF-1 α semble inhiber la croissance tumorale dans des conditions hypoxiques en inhibant la prolifération cellulaire. Par exemple, HIF-1 α est un antagoniste de c-Myc, ce qui provoque un arrêt du cycle cellulaire (Huang, 2008). En outre, HIF-1 α peut aussi interagir avec la β -caténine provoquant la dissociation du complexe β -caténine/TCF4 (transcription factor 4). Etant donné que le gène c-Myc est activé par le complexe β -caténine/TCF4, l'interaction entre HIF-1 α et β -caténine résulte en la diminution de l'expression de p21 provoquant l'arrêt du cycle cellulaire (Kaidi *et al.*, 2007) (Figure 55).

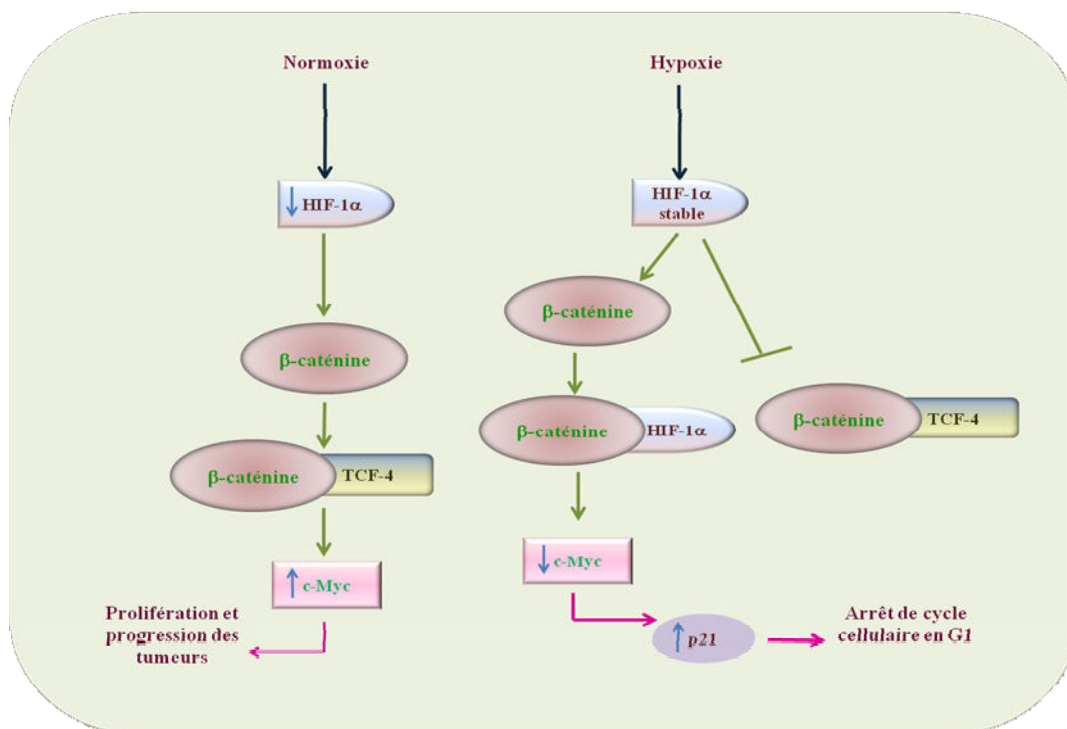


Figure 55. Schéma représentant le mécanisme par lequel HIF-1 α régule le cycle cellulaire.

Il est intéressant d'approfondir la participation de HIF-1 α dans la régulation des voies de signalisation participant au cycle cellulaire et à l'apoptose dans la physiologie cutanée.

2. Rôle de HIF-1 α dans la réponse aux UVB

Nous avons montré, ainsi que d'autres auteurs, que l'expression de HIF-1 α est modulée après l'exposition aux UVB et joue un rôle important dans la régulation des réponses cellulaires à ce type de stress génotoxique (Rezvani *et al*, 2007). Les résultats de Rezvani et collaborateurs indiquent que la production des ROS induite par les UVB a un effet biphasique sur l'expression de HIF-1 α . Les ROS cytoplasmiques produits rapidement après irradiation inhibent l'expression de HIF-1 α , par contre les ROS mitochondriaux produits plus tardivement entraînent sa surexpression. En outre, il a été montré que l'effet pro-apoptotique de HIF-1 α dans les cellules irradiées est accompagné par la modulation de p53 suggérant un lien entre la production des ROS UVB-induits, la variation de HIF-1 α et la réparation de l'ADN. Récemment, il a été montré que HIF-1 était activé par p38(MAPK) et était responsable de l'induction de Noxa (une protéine pro-apoptotique de la famille BH3-only) provoquant

l'apoptose par la voie intrinsèque suite aux UVB (Nys *et al.*, 2010). En accord avec ce rôle pro-apoptotique, HIF-1 α a été signalé comme régulant l'expression de Noxa directement par un HRE présent dans son promoteur (Kim *et al.*, 2004). Cependant, la manière dont p38(MAPK) peut réguler HIF-1 n'est pas encore clairement élucidé, bien que plusieurs hypothèses aient déjà été proposées. Par exemple, p38(MAPK) pourrait phosphoryler directement HIF-1 α afin de le stabiliser et/ou activer les gènes cibles (Kwon *et al.*, 2005 ; Rezvani *et al.*, 2007). Sinon, p38(MAPK) peut réguler HIF-1 α au niveau post-transcriptionnel, par la stabilisation de son ARNm, ou par l'activation de Siah2 (une ligase E3 qui cible PHD3 et l'amène à la dégradation par le protéasome) (Khurana *et al.*, 2006).

Le rôle de HIF-1 α dans la réponse aux UVB a été aussi étudié par Cho *et al.*, 2009, *in vitro* et *in vivo*. Dans cette étude, suite à l'irradiation UVB, l'expression de HIF-1 α diminue dans les kératinocytes, induisant une augmentation de la prolifération de ces cellules (en mesurant la phase S). En revanche, le traitement des kératinocytes avec le DMOG (ou d'autres substances qui vont stabiliser HIF-1 α avant l'irradiation) provoque un arrêt du cycle (G0-G1) après irradiation. Par contre, chez les souris nude, les auteurs ont montré que les UVB induisent une hyperplasie et que l'expression nucléaire de HIF-1 α est fortement diminuée (Cho *et al.*, 2009). Ces résultats suggèrent que la dérégulation de HIF-1 α suite à l'irradiation UVB est associée à une hyperplasie de la peau. Nos résultats préliminaires en utilisant les souris K14-Cre/HIF^{flox/flox} montrent une hyper-kératinisation et aussi une inflammation importante par rapport aux souris normales après irradiation UVB chronique (Figure 56).

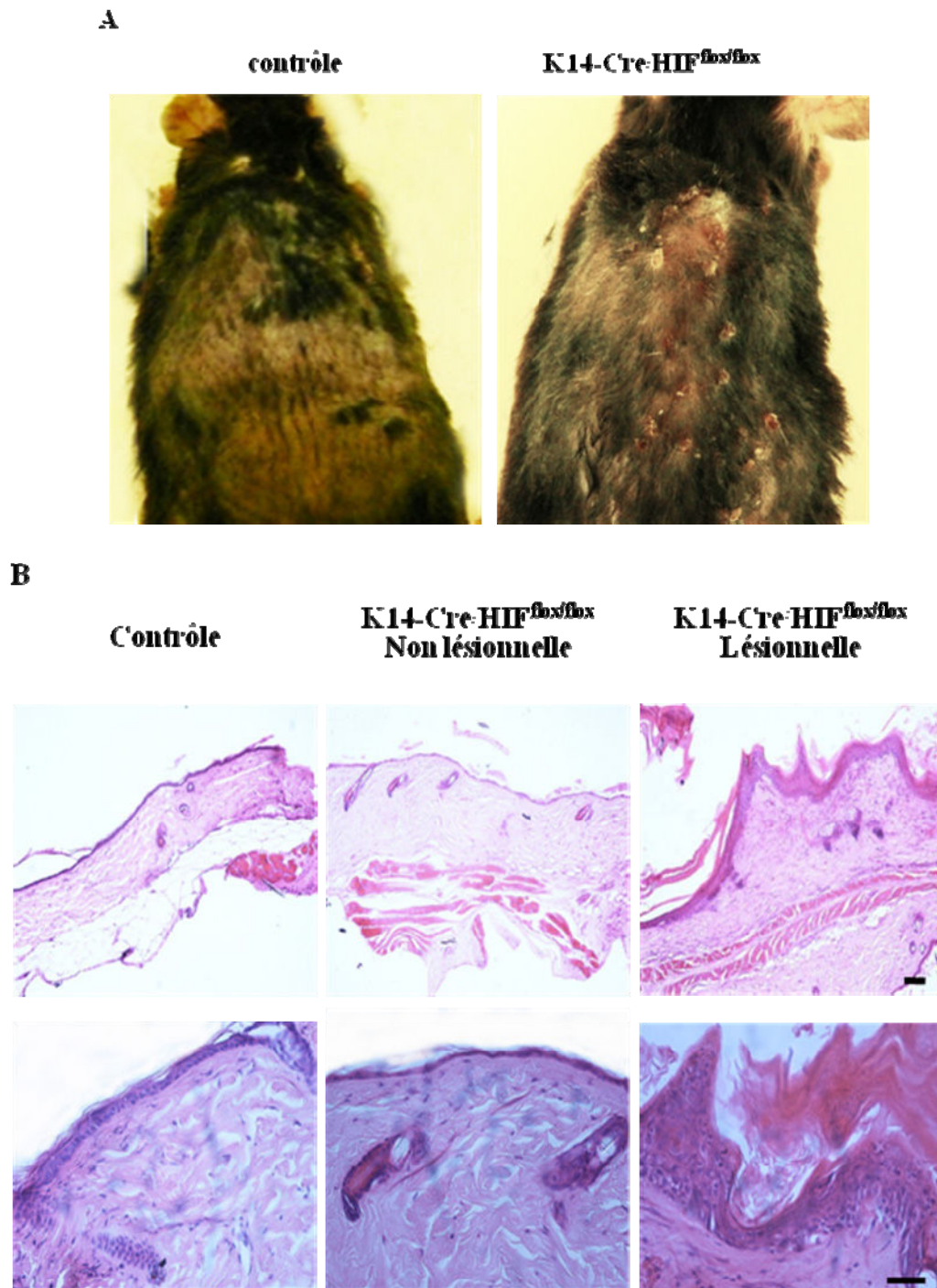


Figure 56. L'irradiation UVB induit une hyper-kératinisation chez les souris déficientes en HIF-1 α . A : Photo montrant les croûtes sur le dos d'une souris K14-Cre/HIF^{lox/lox} par rapport à une souris contrôle. B : coloration HE démontrant la hyper-kératinisation et l'inflammation chez la souris K14-Cre/HIF^{lox/lox}.

Nous nous sommes aussi intéressés à étudier le rôle de HIF-1 α dans la réparation de l'ADN. Nous avons montré que HIF-1 α régule l'expression de XPC et XPD. En effet, la

diminution de l'expression de HIF-1 α immédiatement suite à l'irradiation UVB induit une augmentation de l'expression de l'ARNm de XPC. Cette augmentation est expliquée par la compétition entre HIF-1 α et Sp1 pour se lier au promoteur de XPC. L'interaction entre HIF-1 α et Sp1 a été décrite dans une autre voie de réparation de l'ADN, la réparation des mésappariements (MMR). Le mécanisme par lequel l'hypoxie induit la suppression de MMR suggère une concurrence entre HIF-1 α et Myc pour la liaison avec Sp1, qui à son tour se lie directement au promoteur de MSH2 (Koshiji *et al.*, 2005). Sp1 se lie au promoteur MSH2 comme un interrupteur moléculaire en recrutant Myc en normoxie mais HIF-1 α en hypoxie, ce remplacement conduisant à la régulation négative de MSH2. Notre étude a montré que HIF-1 α et Sp1 peuvent se lier directement aux mêmes séquences qui se chevauchent (C-HRE3.3) sur le promoteur XPC, entraînant une surexpression de ce dernier.

Ces différents résultats regroupés montrent bien le rôle de HIF-1 α dans la réponse aux UVB. L'approfondissement de son rôle permet d'envisager HIF-1 α comme une cible thérapeutique dans la photocarcinogenèse cutanée et la protection contre les cancers de la peau UV-induits.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- A**becassis, J., Millon-Collard, R., Klein-Soyer, C., Nicora, F., Fricker, J. P., Beretz, A., Eber, M., Muller, D., and Cazenave, J. P. (1987). Adhesion of human breast cancer cell line MCF-7 to human vascular endothelial cells in culture. Enhancement by activated platelets. *International journal of cancer* *40*, 525-531.
- Aberdam, D., Galliano, M. F., Vailly, J., Pulkkinen, L., Bonifas, J., Christiano, A. M., Tryggvason, K., Uitto, J., Epstein, E. H., Jr., Ortonne, J. P., and et al. (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.
- Abrass, C. K., Berfield, A. K., Ryan, M. C., Carter, W. G., and Hansen, K. M. (2006). Abnormal development of glomerular endothelial and mesangial cells in mice with targeted disruption of the lama3 gene. *Kidney international* *70*, 1062-1071.
- Adam, S., Gohring, W., Wiedemann, H., Chu, M. L., Timpl, R., and Kostka, G. (1997). Binding of fibulin-1 to nidogen depends on its C-terminal globular domain and a specific array of calcium-binding epidermal growth factor-like (EG) modules. *Journal of molecular biology* *272*, 226-236.
- Adams, J. C., and Watt, F. M. (1989). Fibronectin inhibits the terminal differentiation of human keratinocytes. *Nature* *340*, 307-309.
- Adams, J. C., and Watt, F. M. (1991). Expression of beta 1, beta 3, beta 4, and beta 5 integrins by human epidermal keratinocytes and non-differentiating keratinocytes. *The Journal of cell biology* *115*, 829-841.
- Afaq, F., and Mukhtar, H. (2001). Effects of solar radiation on cutaneous detoxification pathways. *Journal of photochemistry and photobiology* *63*, 61-69.
- Afaq, F., and Mukhtar, H. (2002). Photochemoprevention by botanical antioxidants. *Skin pharmacology and applied skin physiology* *15*, 297-306.
- Ahokas, K., Lohi, J., Illman, S. A., Llano, E., Elomaa, O., Impola, U., Karjalainen-Lindsberg, M. L., and Saarialho-Kere, U. (2003). Matrix metalloproteinase-21 is expressed epithelially during development and in cancer and is up-regulated by transforming growth factor-beta1 in keratinocytes. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* *83*, 1887-1899.
- Aimes, R. T., and Quigley, J. P. (1995). Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. Inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific 3/4- and 1/4-length fragments. *The Journal of biological chemistry* *270*, 5872-5876.
- Ala-aho, R., and Kahari, V. M. (2005). Collagenases in cancer. *Biochimie* *87*, 273-286.

- Albina, J. E., Mastrofrancesco, B., Vessella, J. A., Louis, C. A., Henry, W. L., Jr., and Reichner, J. S. (2001). HIF-1 expression in healing wounds: HIF-1 α induction in primary inflammatory cells by TNF- α . *American journal of physiology* *281*, C1971-1977.
- Altieri, F., Grillo, C., Maceroni, M., and Chichiarelli, S. (2008). DNA damage and repair: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxidants & redox signaling* *10*, 891-937.
- Andac, Z., Sasaki, T., Mann, K., Brancaccio, A., Deutzmann, R., and Timpl, R. (1999). Analysis of heparin, alpha-dystroglycan and sulfatide binding to the G domain of the laminin alpha1 chain by site-directed mutagenesis. *Journal of molecular biology* *287*, 253-264.
- Anilkumar, N., Uekita, T., Couchman, J. R., Nagase, H., Seiki, M., and Itoh, Y. (2005). Palmitoylation at Cys574 is essential for MT1-MMP to promote cell migration. *Faseb J* *19*, 1326-1328.
- Aragane, Y., Kulms, D., Metze, D., Wilkes, G., Poppelmann, B., Luger, T. A., and Schwarz, T. (1998). Ultraviolet light induces apoptosis via direct activation of CD95 (Fas/APO-1) independently of its ligand CD95L. *The Journal of cell biology* *140*, 171-182.
- Arimoto-Ishida, E., Sakata, M., Sawada, K., Nakayama, M., Nishimoto, F., Mabuchi, S., Takeda, T., Yamamoto, T., Isobe, A., Okamoto, Y., *et al.* (2009). Up-regulation of alpha5-integrin by E-cadherin loss in hypoxia and its key role in the migration of extravillous trophoblast cells during early implantation. *Endocrinology* *150*, 4306-4315.
- Ashton, G. H., Sorelli, P., Mellerio, J. E., Keane, F. M., Eady, R. A., and McGrath, J. A. (2001). Alpha 6 beta 4 integrin abnormalities in junctional epidermolysis bullosa with pyloric atresia. *The British journal of dermatology* *144*, 408-414.
- Assefa, Z., Van Laethem, A., Garmyn, M., and Agostinis, P. (2005). Ultraviolet radiation-induced apoptosis in keratinocytes: on the role of cytosolic factors. *Biochimica et biophysica acta* *1755*, 90-106.
- Aumailley, M., Battaglia, C., Mayer, U., Reinhardt, D., Nischt, R., Timpl, R., and Fox, J. W. (1993). Nidogen mediates the formation of ternary complexes of basement membrane components. *Kidney international* *43*, 7-12.
- Aumailley, M., Bruckner-Tuderman, L., Carter, W. G., Deutzmann, R., Edgar, D., Ekblom, P., Engel, J., Engvall, E., Hohenester, E., Jones, J. C., *et al.* (2005). A simplified laminin nomenclature. *Matrix Biol* *24*, 326-332.
- Aumailley, M., Has, C., Tunggal, L., and Bruckner-Tuderman, L. (2006). Molecular basis of inherited skin-blistering disorders, and therapeutic implications. *Expert reviews in molecular medicine* *8*, 1-21.
- Aumailley, M., Pesch, M., Tunggal, L., Gaill, F., and Fassler, R. (2000). Altered synthesis of laminin 1 and absence of basement membrane component deposition in (beta)1 integrin-deficient embryoid bodies. *Journal of cell science* *113 Pt 2*, 259-268.

Aumailley, M., and Rousselle, P. (1999). Laminins of the dermo-epidermal junction. *Matrix Biol* 18, 19-28.

Aumailley, M., and Smyth, N. (1998). The role of laminins in basement membrane function.

Aumailley, M., and Timpl, R. (1986). Attachment of cells to basement membrane collagen type IV. *The Journal of cell biology* 103, 1569-1575.

Aumailley, M., Wiedemann, H., Mann, K., and Timpl, R. (1989). Binding of nidogen and the laminin-nidogen complex to basement membrane collagen type IV. *European journal of biochemistry / FEBS* 184, 241-248.

Avraamides, C. J., Garmy-Susini, B., and Varner, J. A. (2008). Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Cancer* 8, 604-617.

Babior, B. M., Kipnes, R. S., and Curnutte, J. T. (1973). Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *The Journal of clinical investigation* 52, 741-744.

Backstrom, J. R., Lim, G. P., Cullen, M. J., and Tokes, Z. A. (1996). Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) is synthesized in neurons of the human hippocampus and is capable of degrading the amyloid-beta peptide (1-40). *J Neurosci* 16, 7910-7919.

Backstrom, J. R., and Tokes, Z. A. (1995). The 84-kDa form of human matrix metalloproteinase-9 degrades substance P and gelatin. *Journal of neurochemistry* 64, 1312-1318.

Bader, B. L., Smyth, N., Nedbal, S., Miosge, N., Baranowsky, A., Mokkalapati, S., Murshed, M., and Nischt, R. (2005). Compound genetic ablation of nidogen 1 and 2 causes basement membrane defects and perinatal lethality in mice. *Molecular and cellular biology* 25, 6846-6856.

Bae, S. H., Jeong, J. W., Park, J. A., Kim, S. H., Bae, M. K., Choi, S. J., and Kim, K. W. (2004). Sumoylation increases HIF-1alpha stability and its transcriptional activity. *Biochemical and biophysical research communications* 324, 394-400.

Bagutti, C., Speight, P. M., and Watt, F. M. (1998). Comparison of integrin, cadherin, and catenin expression in squamous cell carcinomas of the oral cavity. *The Journal of pathology* 186, 8-16.

Baldeschi, C., Gache, Y., Rattenholl, A., Bouille, P., Danos, O., Ortonne, J. P., Bruckner-Tuderman, L., and Meneguzzi, G. (2003). Genetic correction of canine dystrophic epidermolysis bullosa mediated by retroviral vectors. *Human molecular genetics* 12, 1897-1905.

Bandyopadhyay, S., and Gronostajski, R. M. (1994). Identification of a conserved oxidation-sensitive cysteine residue in the NFI family of DNA-binding proteins. *The Journal of biological chemistry* 269, 29949-29955.

Barczyk, M., Carracedo, S., and Gullberg, D. Integrins. (2010). *Cell and tissue research* 339, 269-280.

Barker, D. F., Hostikka, S. L., Zhou, J., Chow, L. T., Oliphant, A. R., Gerken, S. C., Gregory, M. C., Skolnick, M. H., Atkin, C. L., and Tryggvason, K. (1990). Identification of mutations in the COL4A5 collagen gene in Alport syndrome. *Science (New York, NY)* 248, 1224-1227.

Barrientos, S., Stojadinovic, O., Golinko, M. S., Brem, H., and Tomic-Canic, M. (2008). Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen* 16, 585-601.

Battaglia, C., Mayer, U., Aumailley, M., and Timpl, R. (1992). Basement-membrane heparan sulfate proteoglycan binds to laminin by its heparan sulfate chains and to nidogen by sites in the protein core. *European journal of biochemistry / FEBS* 208, 359-366.

Beasley, N. J., Leek, R., Alam, M., Turley, H., Cox, G. J., Gatter, K., Millard, P., Fuggle, S., and Harris, A. L. (2002). Hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in head and neck cancer: relationship to tumor biology and treatment outcome in surgically resected patients. *Cancer research* 62, 2493-2497.

Bedogni, B., Warneke, J. A., Nickoloff, B. J., Giaccia, A. J., and Powell, M. B. (2008). Notch1 is an effector of Akt and hypoxia in melanoma development. *The Journal of clinical investigation* 118, 3660-3670.

Bedogni, B., Welford, S. M., Cassarino, D. S., Nickoloff, B. J., Giaccia, A. J., and Powell, M. B. (2005). The hypoxic microenvironment of the skin contributes to Akt-mediated melanocyte transformation. *Cancer cell* 8, 443-454.

Bell, E. L., Emerling, B. M., and Chandel, N. S. (2005). Mitochondrial regulation of oxygen sensing. *Mitochondrion* 5, 322-332.

Bender, K., Blattner, C., Knebel, A., Iordanov, M., Herrlich, P., and Rahmsdorf, H. J. (1997). UV-induced signal transduction. *Journal of photochemistry and photobiology* 37, 1-17.

Benitah, S. A., Frye, M., Glogauer, M., and Watt, F. M. (2005). Stem cell depletion through epidermal deletion of Rac1. *Science (New York, NY)* 309, 933-935.

Berg, J. T., Breen, E. C., Fu, Z., Mathieu-Costello, O., and West, J. B. (1998). Alveolar hypoxia increases gene expression of extracellular matrix proteins and platelet-derived growth factor-B in lung parenchyma. *American journal of respiratory and critical care medicine* 158, 1920-1928.

Bernardi, R., Guernah, I., Jin, D., Grisendi, S., Alimonti, A., Teruya-Feldstein, J., Cordon-Cardo, C., Simon, M. C., Rafii, S., and Pandolfi, P. P. (2006). PML inhibits HIF-1alpha translation and neoangiogenesis through repression of mTOR. *Nature* 442, 779-785.

Berndt, A., Hyckel, P., Konneker, A., Katenkamp, D., and Kosmehl, H. (1997). Oral squamous cell carcinoma invasion is associated with a laminin-5 matrix re-organization but independent of basement membrane and hemidesmosome formation. clues from an in vitro invasion model. *Invasion & metastasis* 17, 251-258.

- Bernhard, E. J., Gruber, S. B., and Muschel, R. J. (1994). Direct evidence linking expression of matrix metalloproteinase 9 (92-kDa gelatinase/collagenase) to the metastatic phenotype in transformed rat embryo cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *91*, 4293-4297.
- Berra, E., Richard, D. E., Gothie, E., and Pouyssegur, J. (2001). HIF-1-dependent transcriptional activity is required for oxygen-mediated HIF-1 α degradation. *FEBS letters* *491*, 85-90.
- Berrier, A. L., and Yamada, K. M. (2007). Cell-matrix adhesion. *Journal of cellular physiology* *213*, 565-573.
- Berta, M. A., Mazure, N., Hattab, M., Pouyssegur, J., and Brahimi-Horn, M. C. (2007). SUMOylation of hypoxia-inducible factor-1 α reduces its transcriptional activity. *Biochemical and biophysical research communications* *360*, 646-652.
- Bickers, D. R., and Athar, M. (2006). Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease. *The Journal of investigative dermatology* *126*, 2565-2575.
- Birkedal-Hansen, H., Moore, W. G., Bodden, M. K., Windsor, L. J., Birkedal-Hansen, B., DeCarlo, A., and Engler, J. A. (1993). Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* *4*, 197-250.
- Piwko-Czuchra, A., Koegel, H., Meyer, H., Bauer, M., Werner, S., Brakebusch, C., and Fassler, R. (2009). β 1 integrin-mediated adhesion signalling is essential for epidermal progenitor cell expansion. *PloS one* *4*, e5488.
- Bix, G., and Iozzo, R. V. (2005). Matrix revolutions: "tails" of basement-membrane components with angiostatic functions. *Trends in cell biology* *15*, 52-60.
- Bizik, J., Kankuri, E., Ristimaki, A., Taieb, A., Vapaatalo, H., Lubitz, W., and Vaheri, A. (2004). Cell-cell contacts trigger programmed necrosis and induce cyclooxygenase-2 expression. *Cell death and differentiation* *11*, 183-195.
- Bode, A. M., and Dong, Z. (2003). Mitogen-activated protein kinase activation in UV-induced signal transduction. *Sci STKE* *2003*, RE2.
- Bohr, V. A., Smith, C. A., Okumoto, D. S., and Hanawalt, P. C. (1985). DNA repair in an active gene: removal of pyrimidine dimers from the DHFR gene of CHO cells is much more efficient than in the genome overall. *Cell* *40*, 359-369.
- Boire, A., Covic, L., Agarwal, A., Jacques, S., Sherifi, S., and Kuliopulos, A. (2005). PAR1 is a matrix metalloprotease-1 receptor that promotes invasion and tumorigenesis of breast cancer cells. *Cell* *120*, 303-313.
- Boot-Handford, R. P., and Tuckwell, D. S. (2003). Fibrillar collagen: the key to vertebrate evolution? A tale of molecular incest. *Bioessays* *25*, 142-151.

Bose, K., Nischt, R., Page, A., Bader, B. L., Paulsson, M., and Smyth, N. (2006). Loss of nidogen-1 and -2 results in syndactyly and changes in limb development. *The Journal of biological chemistry* *281*, 39620-39629.

Botusan, I. R., Sunkari, V. G., Savu, O., Catrina, A. I., Grunler, J., Lindberg, S., Pereira, T., Yla-Herttuala, S., Poellinger, L., Brismar, K., and Catrina, S. B. (2008). Stabilization of HIF-1 α is critical to improve wound healing in diabetic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *105*, 19426-19431.

Boudreau, N. J., and Varner, J. A. (2004). The homeobox transcription factor Hox D3 promotes integrin $\alpha 5 \beta 1$ expression and function during angiogenesis. *The Journal of biological chemistry* *279*, 4862-4868.

Boulay, A., Masson, R., Chenard, M. P., El Fahime, M., Cassard, L., Bellocq, J. P., Sautes-Fridman, C., Basset, P., and Rio, M. C. (2001). High cancer cell death in syngeneic tumors developed in host mice deficient for the stromelysin-3 matrix metalloproteinase. *Cancer research* *61*, 2189-2193.

Boutin, A. T., Weidemann, A., Fu, Z., Mesropian, L., Gradin, K., Jamora, C., Wiesener, M., Eckardt, K. U., Koch, C. J., Ellies, L. G., *et al.* (2008). Epidermal sensing of oxygen is essential for systemic hypoxic response. *Cell* *133*, 223-234.

Bouvet, M., Ellis, L. M., Nishizaki, M., Fujiwara, T., Liu, W., Bucana, C. D., Fang, B., Lee, J. J., and Roth, J. A. (1998). Adenovirus-mediated wild-type p53 gene transfer down-regulates vascular endothelial growth factor expression and inhibits angiogenesis in human colon cancer. *Cancer research* *58*, 2288-2292.

Braga, V. M., Hajibagheri, N., and Watt, F. M. (1998). Calcium-induced intercellular adhesion of keratinocytes does not involve accumulation of beta 1 integrins at cell-cell contacts and does not involve changes in the levels or phosphorylation of catenins. *Cell adhesion and communication* *5*, 137-149.

Brahimi-Horn, C., Berra, E., and Pouyssegur, J. (2001). Hypoxia: the tumor's gateway to progression along the angiogenic pathway. *Trends in cell biology* *11*, S32-36.

Brahimi-Horn, C., Mazure, N., and Pouyssegur, J. (2005). Signalling via the hypoxia-inducible factor-1 α requires multiple posttranslational modifications. *Cellular signalling* *17*, 1-9.

Brakebusch, C., and Fassler, R. (2005). beta 1 integrin function in vivo: adhesion, migration and more. *Cancer metastasis reviews* *24*, 403-411.

Brakebusch, C., Grose, R., Quondamatteo, F., Ramirez, A., Jorcano, J. L., Pirro, A., Svensson, M., Herken, R., Sasaki, T., Timpl, R., *et al.* (2000). Skin and hair follicle integrity is crucially dependent on beta 1 integrin expression on keratinocytes. *The EMBO journal* *19*, 3990-4003.

Bregman, D. B., Halaban, R., van Gool, A. J., Henning, K. A., Friedberg, E. C., and Warren, S. L. (1996). UV-induced ubiquitination of RNA polymerase II: a novel modification

deficient in Cockayne syndrome cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *93*, 11586-11590.

Breuss, J. M., Gallo, J., DeLisser, H. M., Klimanskaya, I. V., Folkesson, H. G., Pittet, J. F., Nishimura, S. L., Aldape, K., Landers, D. V., Carpenter, W., and et al. (1995). Expression of the beta 6 integrin subunit in development, neoplasia and tissue repair suggests a role in epithelial remodeling. *Journal of cell science* *108 (Pt 6)*, 2241-2251.

Brew, K., Dinakarandian, D., and Nagase, H. (2000). Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochimica et biophysica acta* *1477*, 267-283.

Brodsky, B., and Persikov, A. V. (2005). Molecular structure of the collagen triple helix. *Advances in protein chemistry* *70*, 301-339.

Brooks, P. C., Clark, R. A., and Cheresh, D. A. (1994a). Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. *Science (New York, NY)* *264*, 569-571.

Brooks, P. C., Montgomery, A. M., Rosenfeld, M., Reisfeld, R. A., Hu, T., Klier, G., and Cheresh, D. A. (1994b). Integrin alpha v beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell* *79*, 1157-1164.

Brooks, P. C., Stromblad, S., Klemke, R., Visscher, D., Sarkar, F. H., and Cheresh, D. A. (1995). Antiintegrin alpha v beta 3 blocks human breast cancer growth and angiogenesis in human skin. *The Journal of clinical investigation* *96*, 1815-1822.

Brown, G. L., Curtsinger, L., 3rd, Brightwell, J. R., Ackerman, D. M., Tobin, G. R., Polk, H. C., Jr., George-Nascimento, C., Valenzuela, P., and Schultz, G. S. (1986). Enhancement of epidermal regeneration by biosynthetic epidermal growth factor. *The Journal of experimental medicine* *163*, 1319-1324.

Brown, G. L., Curtsinger, L. J., White, M., Mitchell, R. O., Pietsch, J., Nordquist, R., von Fraunhofer, A., and Schultz, G. S. (1988). Acceleration of tensile strength of incisions treated with EGF and TGF-beta. *Annals of surgery* *208*, 788-794.

Bruckner-Tuderman, L. (2009). Can type VII collagen injections cure dystrophic epidermolysis bullosa? *Mol Ther* *17*, 6-7.

Bruick, R. K., and McKnight, S. L. (2001). A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science (New York, NY)* *294*, 1337-1340.

Buisson, A. C., Zahm, J. M., Polette, M., Pierrot, D., Bellon, G., Puchelle, E., Birembaut, P., and Tournier, J. M. (1996). Gelatinase B is involved in the in vitro wound repair of human respiratory epithelium. *Journal of cellular physiology* *166*, 413-426.

Bunn, H. F., Gu, J., Huang, L. E., Park, J. W., and Zhu, H. (1998). Erythropoietin: a model system for studying oxygen-dependent gene regulation. *The Journal of experimental biology* *201*, 1197-1201.

Burgeson, R. E. (1993). Type VII collagen, anchoring fibrils, and epidermolysis bullosa. *The Journal of investigative dermatology* *101*, 252-255.

Busca, R., and Ballotti, R. (2000). Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation. *Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society* *13*, 60-69.

Busca, R., Berra, E., Gaggioli, C., Khaled, M., Bille, K., Marchetti, B., Thyss, R., Fitsialos, G., Larribere, L., Bertolotto, C., *et al.* (2005). Hypoxia-inducible factor 1{alpha} is a new target of microphthalmia-associated transcription factor (MITF) in melanoma cells. *The Journal of cell biology* *170*, 49-59.

Calaluce, R., Kunkel, M. W., Watts, G. S., Schmelz, M., Hao, J., Barrera, J., Gleason-Guzman, M., Isett, R., Fitchmun, M., Bowden, G. T., *et al.* (2001). Laminin-5-mediated gene expression in human prostate carcinoma cells. *Molecular carcinogenesis* *30*, 119-129.

Calvani, M., Rapisarda, A., Uranchimeg, B., Shoemaker, R. H., and Melillo, G. (2006). Hypoxic induction of an HIF-1alpha-dependent bFGF autocrine loop drives angiogenesis in human endothelial cells. *Blood* *107*, 2705-2712.

Carbia-Nagashima, A., Gerez, J., Perez-Castro, C., Paez-Pereda, M., Silberstein, S., Stalla, G. K., Holsboer, F., and Arzt, E. (2007). RSUME, a small RWD-containing protein, enhances SUMO conjugation and stabilizes HIF-1alpha during hypoxia. *Cell* *131*, 309-323.

Carmeliet, P., Dor, Y., Herbert, J. M., Fukumura, D., Brusselmans, K., Dewerchin, M., Neeman, M., Bono, F., Abramovitch, R., Maxwell, P., *et al.* (1998). Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature* *394*, 485-490.

Carrero, P., Okamoto, K., Coumailleau, P., O'Brien, S., Tanaka, H., and Poellinger, L. (2000). Redox-regulated recruitment of the transcriptional coactivators CREB-binding protein and SRC-1 to hypoxia-inducible factor 1alpha. *Molecular and cellular biology* *20*, 402-415.

Carroll, J. M., Romero, M. R., and Watt, F. M. (1995). Suprabasal integrin expression in the epidermis of transgenic mice results in developmental defects and a phenotype resembling psoriasis. *Cell* *83*, 957-968.

Carrozza, M. J., Utley, R. T., Workman, J. L., and Cote, J. (2003). The diverse functions of histone acetyltransferase complexes. *Trends Genet* *19*, 321-329.

Cha, D., O'Brien, P., O'Toole, E. A., Woodley, D. T., and Hudson, L. G. (1996). Enhanced modulation of keratinocyte motility by transforming growth factor-alpha (TGF-alpha) relative to epidermal growth factor (EGF). *The Journal of investigative dermatology* *106*, 590-597.

Champlaud, M. F., Lunstrum, G. P., Rousselle, P., Nishiyama, T., Keene, D. R., and Burgeson, R. E. (1996). Human amnion contains a novel laminin variant, laminin 7, which like laminin 6, covalently associates with laminin 5 to promote stable epithelial-stromal attachment. *The Journal of cell biology* *132*, 1189-1198.

Chan, D. A., Sutphin, P. D., Denko, N. C., and Giaccia, A. J. (2002). Role of prolyl hydroxylation in oncogenically stabilized hypoxia-inducible factor-1alpha. *The Journal of biological chemistry* *277*, 40112-40117.

Chang, C., and Werb, Z. (2001). The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends in cell biology* *11*, S37-43.

Chang, J. L., Chen, G., Lampe, J. W., and Ulrich, C. M. (2006a). DNA damage and repair measurements from cryopreserved lymphocytes without cell culture--a reproducible assay for intervention studies. *Environmental and molecular mutagenesis* *47*, 503-508.

Chang, L., and Karin, M. (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* *410*, 37-40.

Chang, Q., Qin, R., Huang, T., Gao, J., and Feng, Y. (2006b). Effect of antisense hypoxia-inducible factor 1alpha on progression, metastasis, and chemosensitivity of pancreatic cancer. *Pancreas* *32*, 297-305.

Charonis, A., Sideraki, V., Kaltezioti, V., Alberti, A., Vlahakos, D., Wu, K., and Tsilibary, E. (2005). Basement membrane peptides: functional considerations and biomedical applications in autoimmunity. *Current medicinal chemistry* *12*, 1495-1502.

Cheeseman, K. H. (1993). Tissue injury by free radicals. *Toxicology and industrial health* *9*, 39-51.

Chelberg, M. K., Tsilibary, E. C., Hauser, A. R., and McCarthy, J. B. (1989). Type IV collagen-mediated melanoma cell adhesion and migration: involvement of multiple, distinct domains of the collagen molecule. *Cancer research* *49*, 4796-4802.

Chen, C. P., Yang, Y. C., Su, T. H., Chen, C. Y., and Aplin, J. D. (2005). Hypoxia and transforming growth factor-beta 1 act independently to increase extracellular matrix production by placental fibroblasts. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* *90*, 1083-1090.

Chen, J., Diacovo, T. G., Grenache, D. G., Santoro, S. A., and Zutter, M. M. (2002). The alpha(2) integrin subunit-deficient mouse: a multifaceted phenotype including defects of branching morphogenesis and hemostasis. *The American journal of pathology* *161*, 337-344.

Chen, M., Marinkovich, M. P., Jones, J. C., O'Toole, E. A., Li, Y. Y., and Woodley, D. T. (1999). NC1 domain of type VII collagen binds to the beta3 chain of laminin 5 via a unique subdomain within the fibronectin-like repeats. *The Journal of investigative dermatology* *112*, 177-183.

Cheng, Y. F., and Kramer, R. H. (1989). Human microvascular endothelial cells express integrin-related complexes that mediate adhesion to the extracellular matrix. *Journal of cellular physiology* *139*, 275-286.

Cho, Y. S., Bae, J. M., Chun, Y. S., Chung, J. H., Jeon, Y. K., Kim, I. S., Kim, M. S., and Park, J. W. (2008). HIF-1alpha controls keratinocyte proliferation by up-regulating p21(WAF1/Cip1). *Biochimica et biophysica acta* *1783*, 323-333.

- Cho, Y. S., Kim, C. H., and Park, J. W. (2009). Involvement of HIF-1 α in UVB-induced epidermal hyperplasia. *Molecules and cells* 28, 537-543.
- Choma, D. P., Milano, V., Pumiglia, K. M., and DiPersio, C. M. (2007). Integrin α 3 β 1-dependent activation of FAK/Src regulates Rac1-mediated keratinocyte polarization on laminin-5. *The Journal of investigative dermatology* 127, 31-40.
- Choma, D. P., Pumiglia, K., and DiPersio, C. M. (2004). Integrin α 3 β 1 directs the stabilization of a polarized lamellipodium in epithelial cells through activation of Rac1. *Journal of cell science* 117, 3947-3959.
- Christiano, A. M., Greenspan, D. S., Lee, S., and Uitto, J. (1994). Cloning of human type VII collagen. Complete primary sequence of the α 1(VII) chain and identification of intragenic polymorphisms. *The Journal of biological chemistry* 269, 20256-20262.
- Christmann, M., Tomicic, M. T., Aasland, D., and Kaina, B. (2007). A role for UV-light-induced c-Fos: Stimulation of nucleotide excision repair and protection against sustained JNK activation and apoptosis. *Carcinogenesis* 28, 183-190.
- Chun, Y. S., Choi, E., Kim, T. Y., Kim, M. S., and Park, J. W. (2002). A dominant-negative isoform lacking exons 11 and 12 of the human hypoxia-inducible factor-1 α gene. *The Biochemical journal* 362, 71-79.
- Chun, Y. S., Choi, E., Yeo, E. J., Lee, J. H., Kim, M. S., and Park, J. W. (2001). A new HIF-1 α variant induced by zinc ion suppresses HIF-1-mediated hypoxic responses. *Journal of cell science* 114, 4051-4061.
- Chun, Y. S., Lee, K. H., Choi, E., Bae, S. Y., Yeo, E. J., Huang, L. E., Kim, M. S., and Park, J. W. (2003). Phorbol ester stimulates the nonhypoxic induction of a novel hypoxia-inducible factor 1 α isoform: implications for tumor promotion. *Cancer research* 63, 8700-8707.
- Chung, J., Yoon, S., Datta, K., Bachelder, R. E., and Mercurio, A. M. (2004). Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor transcription and protection from apoptosis are dependent on α 6 β 1 integrin in breast carcinoma cells. *Cancer research* 64, 4711-4716.
- Clark, R. A. *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair*, Second ed., Plenum Press, New York, 1996.
- Clydesdale, G. J., Dandie, G. W., and Muller, H. K. (2001). Ultraviolet light induced injury: immunological and inflammatory effects. *Immunology and cell biology* 79, 547-568.
- Cockman, M. E., Masson, N., Mole, D. R., Jaakkola, P., Chang, G. W., Clifford, S. C., Maher, E. R., Pugh, C. W., Ratcliffe, P. J., and Maxwell, P. H. (2000). Hypoxia inducible factor- α binding and ubiquitylation by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *The Journal of biological chemistry* 275, 25733-25741.
- Coin, F., Oksenysh, V., and Egly, J. M. (2007). Distinct roles for the XPB/p52 and XPD/p44 subcomplexes of TFIIH in damaged DNA opening during nucleotide excision repair. *Molecular cell* 26, 245-256.

Colognato, H., and Yurchenco, P. D. (2000). Form and function: the laminin family of heterotrimers. *Dev Dyn* 218, 213-234.

Cooper, K. D., Neises, G. R., and Katz, S. I. (1986). Antigen-presenting OKM5+ melanophages appear in human epidermis after ultraviolet radiation. *The Journal of investigative dermatology* 86, 363-370.

Corden, L. D., Mellerio, J. E., Gratian, M. J., Eady, R. A., Harper, J. I., Lacour, M., Magee, G., Lane, E. B., McGrath, J. A., and McLean, W. H. (1998). Homozygous nonsense mutation in helix 2 of K14 causes severe recessive epidermolysis bullosa simplex. *Human mutation* 11, 279-285.

Corre, S., and Galibert, M. D. (2006). [USF as a key regulatory element of gene expression]. *Med Sci (Paris)* 22, 62-67.

Corre, S., Primot, A., Sviderskaya, E., Bennett, D. C., Vaulont, S., Goding, C. R., and Galibert, M. D. (2004). UV-induced expression of key component of the tanning process, the POMC and MC1R genes, is dependent on the p-38-activated upstream stimulating factor-1 (USF-1). *The Journal of biological chemistry* 279, 51226-51233.

Cosgrove, D., Meehan, D. T., Grunkemeyer, J. A., Kornak, J. M., Sayers, R., Hunter, W. J., and Samuelson, G. C. (1996). Collagen COL4A3 knockout: a mouse model for autosomal Alport syndrome. *Genes & development* 10, 2981-2992.

Costell, M., Carmona, R., Gustafsson, E., Gonzalez-Iriarte, M., Fassler, R., and Munoz-Chapuli, R. (2002). Hyperplastic conotruncal endocardial cushions and transposition of great arteries in perlecan-null mice. *Circulation research* 91, 158-164.

Cummins, E. P., Seeballuck, F., Keely, S. J., Mangan, N. E., Callanan, J. J., Fallon, P. G., and Taylor, C. T. (2008). The hydroxylase inhibitor dimethylallylglycine is protective in a murine model of colitis. *Gastroenterology* 134, 156-165.

Dameron, K. M., Volpert, O. V., Tainsky, M. A., and Bouck, N. (1994). Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science (New York, NY)* 265, 1582-1584.

Das, B., Yeger, H., Tsuchida, R., Torkin, R., Gee, M. F., Thorner, P. S., Shibuya, M., Malkin, D., and Baruchel, S. (2005). A hypoxia-driven vascular endothelial growth factor/Flt1 autocrine loop interacts with hypoxia-inducible factor-1alpha through mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway in neuroblastoma. *Cancer research* 65, 7267-7275.

Daya-Grosjean, L., and Sarasin, A. (2005). The role of UV induced lesions in skin carcinogenesis: an overview of oncogene and tumor suppressor gene modifications in xeroderma pigmentosum skin tumors. *Mutation research* 571, 43-56.

de Gruijl, F. R. (2002). Photocarcinogenesis: UVA vs. UVB radiation. *Skin pharmacology and applied skin physiology* 15, 316-320.

- Decline, F., and Rousselle, P. (2001). Keratinocyte migration requires alpha2beta1 integrin-mediated interaction with the laminin 5 gamma2 chain. *Journal of cell science* *114*, 811-823.
- Decordier, I., De Bont, K., De Bock, K., Mateuca, R., Roelants, M., Ciardelli, R., Haumont, D., Knudsen, L. E., and Kirsch-Volders, M. (2007). Genetic susceptibility of newborn daughters to oxidative stress. *Toxicology letters* *172*, 68-84.
- Dedhar, S., Saulnier, R., Nagle, R., and Overall, C. M. (1993). Specific alterations in the expression of alpha 3 beta 1 and alpha 6 beta 4 integrins in highly invasive and metastatic variants of human prostate carcinoma cells selected by in vitro invasion through reconstituted basement membrane. *Clinical & experimental metastasis* *11*, 391-400.
- deHart, G. W., Healy, K. E., and Jones, J. C. (2003). The role of alpha3beta1 integrin in determining the supramolecular organization of laminin-5 in the extracellular matrix of keratinocytes. *Experimental cell research* *283*, 67-79.
- Denes, V., Witkovsky, P., Koch, M., Hunter, D. D., Pinzon-Duarte, G., and Brunken, W. J. (2007). Laminin deficits induce alterations in the development of dopaminergic neurons in the mouse retina. *Visual neuroscience* *24*, 549-562.
- Deng, S. J., Bickett, D. M., Mitchell, J. L., Lambert, M. H., Blackburn, R. K., Carter, H. L., 3rd, Neugebauer, J., Pahel, G., Weiner, M. P., and Moss, M. L. (2000). Substrate specificity of human collagenase 3 assessed using a phage-displayed peptide library. *The Journal of biological chemistry* *275*, 31422-31427.
- Denko, N. C., Fontana, L. A., Hudson, K. M., Sutphin, P. D., Raychaudhuri, S., Altman, R., and Giaccia, A. J. (2003). Investigating hypoxic tumor physiology through gene expression patterns. *Oncogene* *22*, 5907-5914.
- Dery, M. A., Michaud, M. D., and Richard, D. E. (2005). Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators. *The international journal of biochemistry & cell biology* *37*, 535-540.
- Desgrosellier, J. S., and Cheresh, D. A. (2010). Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* *10*, 9-22.
- Dikomey, E., Dahm-Daphi, J., Brammer, I., Martensen, R., and Kaina, B. (1998). Correlation between cellular radiosensitivity and non-repaired double-strand breaks studied in nine mammalian cell lines. *International journal of radiation biology* *73*, 269-278.
- DiPersio, C. M., Hodivala-Dilke, K. M., Jaenisch, R., Kreidberg, J. A., and Hynes, R. O. (1997). alpha3beta1 Integrin is required for normal development of the epidermal basement membrane. *The Journal of cell biology* *137*, 729-742.
- DiPersio, C. M., Shao, M., Di Costanzo, L., Kreidberg, J. A., and Hynes, R. O. (2000). Mouse keratinocytes immortalized with large T antigen acquire alpha3beta1 integrin-dependent secretion of MMP-9/gelatinase B. *Journal of cell science* *113* (Pt 16), 2909-2921.

Donawho, C. K., and Kripke, M. L. (1991). Evidence that the local effect of ultraviolet radiation on the growth of murine melanomas is immunologically mediated. *Cancer research* 51, 4176-4181.

Donawho, C. K., Muller, H. K., Bucana, C. D., and Kripke, M. L. (1996). Enhanced growth of murine melanoma in ultraviolet-irradiated skin is associated with local inhibition of immune effector mechanisms. *J Immunol* 157, 781-786.

Dong, L., Chen, Y., Lewis, M., Hsieh, J. C., Reing, J., Chaillet, J. R., Howell, C. Y., Melhem, M., Inoue, S., Kuszak, J. R., *et al.* (2002). Neurologic defects and selective disruption of basement membranes in mice lacking entactin-1/nidogen-1. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology 82, 1617-1630.

Dowling, J., Yu, Q. C., and Fuchs, E. (1996). Beta4 integrin is required for hemidesmosome formation, cell adhesion and cell survival. *The Journal of cell biology* 134, 559-572.

Downer, C. S., Watt, F. M., and Speight, P. M. (1993). Loss of alpha 6 and beta 4 integrin subunits coincides with loss of basement membrane components in oral squamous cell carcinomas. *The Journal of pathology* 171, 183-190.

Drapkin, R., Reardon, J. T., Ansari, A., Huang, J. C., Zawel, L., Ahn, K., Sancar, A., and Reinberg, D. (1994). Dual role of TFIIH in DNA excision repair and in transcription by RNA polymerase II. *Nature* 368, 769-772.

Dubois, B., Masure, S., Hurtenbach, U., Paemen, L., Heremans, H., van den Oord, J., Sciot, R., Meinhardt, T., Hammerling, G., Opdenakker, G., and Arnold, B. (1999). Resistance of young gelatinase B-deficient mice to experimental autoimmune encephalomyelitis and necrotizing tail lesions. *The Journal of clinical investigation* 104, 1507-1515.

Dumin, J. A., Dickeson, S. K., Stricker, T. P., Bhattacharyya-Pakrasi, M., Roby, J. D., Santoro, S. A., and Parks, W. C. (2001). Pro-collagenase-1 (matrix metalloproteinase-1) binds the alpha(2)beta(1) integrin upon release from keratinocytes migrating on type I collagen. *The Journal of biological chemistry* 276, 29368-29374.

Durbeej, M. (2010). Laminins. *Cell and tissue research* 339, 259-268.

Durmowicz, A. G., Parks, W. C., Hyde, D. M., Mecham, R. P., and Stenmark, K. R. (1994). Persistence, re-expression, and induction of pulmonary arterial fibronectin, tropoelastin, and type I procollagen mRNA expression in neonatal hypoxic pulmonary hypertension. *The American journal of pathology* 145, 1411-1420.

Egeblad, M., and Werb, Z. (2002). New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2, 161-174.

Eisen, J. A., and Hanawalt, P. C. (1999). A phylogenomic study of DNA repair genes, proteins, and processes. *Mutation research* 435, 171-213.

Elson, D. A., Thurston, G., Huang, L. E., Ginzinger, D. G., McDonald, D. M., Johnson, R. S., and Arbeit, J. M. (2001). Induction of hypervascularity without leakage or inflammation in transgenic mice overexpressing hypoxia-inducible factor-1alpha. *Genes & development* *15*, 2520-2532.

Emerling, B. M., Platanias, L. C., Black, E., Nebreda, A. R., Davis, R. J., and Chandel, N. S. (2005). Mitochondrial reactive oxygen species activation of p38 mitogen-activated protein kinase is required for hypoxia signaling. *Molecular and cellular biology* *25*, 4853-4862.

Esco, M. A., Wang, Z., McDermott, M. L., and Kurpakus-Wheaton, M. (2001). Potential role for laminin 5 in hypoxia-mediated apoptosis of human corneal epithelial cells. *Journal of cell science* *114*, 4033-4040.

Falanga, V., Martin, T. A., Takagi, H., Kirsner, R. S., Helfman, T., Pardes, J., and Ochoa, M. S. (1993). Low oxygen tension increases mRNA levels of alpha 1 (I) procollagen in human dermal fibroblasts. *Journal of cellular physiology* *157*, 408-412.

Ferreira, M., Fujiwara, H., Morita, K., and Watt, F. M. (2009). An activating beta1 integrin mutation increases the conversion of benign to malignant skin tumors. *Cancer research* *69*, 1334-1342.

Fine, J. D., Bauer, E. A., Briggaman, R. A., Carter, D. M., Eady, R. A., Esterly, N. B., Holbrook, K. A., Hurwitz, S., Johnson, L., Lin, A., *et al.* (1991). Revised clinical and laboratory criteria for subtypes of inherited epidermolysis bullosa. A consensus report by the Subcommittee on Diagnosis and Classification of the National Epidermolysis Bullosa Registry. *Journal of the American Academy of Dermatology* *24*, 119-135.

Fine, J. D., Eady, R. A., Bauer, E. A., Bauer, J. W., Bruckner-Tuderman, L., Heagerty, A., Hintner, H., Hovnanian, A., Jonkman, M. F., Leigh, I., *et al.* (2008). The classification of inherited epidermolysis bullosa (EB): Report of the Third International Consensus Meeting on Diagnosis and Classification of EB. *Journal of the American Academy of Dermatology* *58*, 931-950.

Fine, J. D., Johnson, L., and Wright, T. (1989). Epidermolysis bullosa simplex superficialis. A new variant of epidermolysis bullosa characterized by subcorneal skin cleavage mimicking peeling skin syndrome. *Archives of dermatology* *125*, 633-638.

Fine, J. D., McGrath, J., and Eady, R. A. (2000). Inherited epidermolysis bullosa comes into the new millenium: a revised classification system based on current knowledge of pathogenetic mechanisms and the clinical, laboratory, and epidemiologic findings of large, well-defined patient cohorts. *Journal of the American Academy of Dermatology* *43*, 135-137.

Fitsialos, G., Bourget, I., Augier, S., Ginouves, A., Rezzonico, R., Odorisio, T., Cianfarani, F., Virolle, T., Pouyssegur, J., Meneguzzi, G., *et al.* (2008). HIF1 transcription factor regulates laminin-332 expression and keratinocyte migration. *Journal of cell science* *121*, 2992-3001.

- Floeth, M., Fiedorowicz, J., Schacke, H., Hammami-Hausli, N., Owaribe, K., Trueb, R. M., and Bruckner-Tuderman, L. (1998). Novel homozygous and compound heterozygous COL17A1 mutations associated with junctional epidermolysis bullosa. *The Journal of investigative dermatology* *111*, 528-533.
- Flugel, D., Gorch, A., Michiels, C., and Kietzmann, T. (2007). Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates hypoxia-inducible factor 1 α and mediates its destabilization in a VHL-independent manner. *Molecular and cellular biology* *27*, 3253-3265.
- Folgueras, A. R., Pendas, A. M., Sanchez, L. M., and Lopez-Otin, C. (2004). Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies. *The International journal of developmental biology* *48*, 411-424.
- Forsythe, J. A., Jiang, B. H., Iyer, N. V., Agani, F., Leung, S. W., Koos, R. D., and Semenza, G. L. (1996). Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Molecular and cellular biology* *16*, 4604-4613.
- Fox, J. W., Mayer, U., Nischt, R., Aumailley, M., Reinhardt, D., Wiedemann, H., Mann, K., Timpl, R., Krieg, T., Engel, J., and et al. (1991). Recombinant nidogen consists of three globular domains and mediates binding of laminin to collagen type IV. *The EMBO journal* *10*, 3137-3146.
- Franzke, C. W., Has, C., Schulte, C., Huilaja, L., Tasanen, K., Aumailley, M., and Bruckner-Tuderman, L. (2006). C-terminal truncation impairs glycosylation of transmembrane collagen XVII and leads to intracellular accumulation. *The Journal of biological chemistry* *281*, 30260-30268.
- Freije, J. M., Diez-Itza, I., Balbin, M., Sanchez, L. M., Blasco, R., Tolivia, J., and Lopez-Otin, C. (1994). Molecular cloning and expression of collagenase-3, a novel human matrix metalloproteinase produced by breast carcinomas. *The Journal of biological chemistry* *269*, 16766-16773.
- Fridman, R., Toth, M., Pena, D., and Mobashery, S. (1995). Activation of progelatinase B (MMP-9) by gelatinase A (MMP-2). *Cancer research* *55*, 2548-2555.
- Friedberg, E. C. (2001). How nucleotide excision repair protects against cancer. *Nature reviews* *1*, 22-33.
- Friedlander, M., Brooks, P. C., Shaffer, R. W., Kincaid, C. M., Varner, J. A., and Chersesh, D. A. (1995). Definition of two angiogenic pathways by distinct α v integrins. *Science (New York, NY)* *270*, 1500-1502.
- Fritsch, A., Spassov, S., Elfert, S., Schlosser, A., Gache, Y., Meneguzzi, G., and Bruckner-Tuderman, L. (2009). Dominant-negative effects of COL7A1 mutations can be rescued by controlled overexpression of normal collagen VII. *The Journal of biological chemistry* *284*, 30248-30256.
- Fukumoto, S., Miner, J. H., Ida, H., Fukumoto, E., Yuasa, K., Miyazaki, H., Hoffman, M. P., and Yamada, Y. (2006). Laminin α 5 is required for dental epithelium growth and polarity

and the development of tooth bud and shape. *The Journal of biological chemistry* 281, 5008-5016.

Gache, Y., Baldeschi, C., Del Rio, M., Gagnoux-Palacios, L., Larcher, F., Lacour, J. P., and Meneguzzi, G. (2004). Construction of skin equivalents for gene therapy of recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Human gene therapy* 15, 921-933.

Galibert, M. D., Carreira, S., and Goding, C. R. (2001). The Usf-1 transcription factor is a novel target for the stress-responsive p38 kinase and mediates UV-induced Tyrosinase expression. *The EMBO journal* 20, 5022-5031.

Gandarillas, A., Goldsmith, L. A., Gschmeissner, S., Leigh, I. M., and Watt, F. M. (1999). Evidence that apoptosis and terminal differentiation of epidermal keratinocytes are distinct processes. *Experimental dermatology* 8, 71-79.

Gao, N., Ding, M., Zheng, J. Z., Zhang, Z., Leonard, S. S., Liu, K. J., Shi, X., and Jiang, B. H. (2002). Vanadate-induced expression of hypoxia-inducible factor 1 alpha and vascular endothelial growth factor through phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway and reactive oxygen species. *The Journal of biological chemistry* 277, 31963-31971.

Garbe, J. H., Gohring, W., Mann, K., Timpl, R., and Sasaki, T. (2002). Complete sequence, recombinant analysis and binding to laminins and sulphated ligands of the N-terminal domains of laminin alpha3B and alpha5 chains. *The Biochemical journal* 362, 213-221.

Garmy-Susini, B., Jin, H., Zhu, Y., Sung, R. J., Hwang, R., and Varner, J. (2005). Integrin alpha4beta1-VCAM-1-mediated adhesion between endothelial and mural cells is required for blood vessel maturation. *The Journal of clinical investigation* 115, 1542-1551.

Gearing, A. J., Beckett, P., Christodoulou, M., Churchill, M., Clements, J. M., Crimmin, M., Davidson, A. H., Drummond, A. H., Galloway, W. A., Gilbert, R., and et al. (1995). Matrix metalloproteinases and processing of pro-TNF-alpha. *Journal of leukocyte biology* 57, 774-777.

Gelse, K., Poschl, E., and Aigner, T. (2003). Collagens--structure, function, and biosynthesis. *Advanced drug delivery reviews* 55, 1531-1546.

Georges-Labouesse, E., Messaddeq, N., Yehia, G., Cadalbert, L., Dierich, A., and Le Meur, M. (1996). Absence of integrin alpha 6 leads to epidermolysis bullosa and neonatal death in mice. *Nature genetics* 13, 370-373.

Gerald, D., Berra, E., Frapart, Y. M., Chan, D. A., Giaccia, A. J., Mansuy, D., Pouyssegur, J., Yaniv, M., and Mehta-Grigoriou, F. (2004). JunD reduces tumor angiogenesis by protecting cells from oxidative stress. *Cell* 118, 781-794.

Giancotti, F. G. (2000). Complexity and specificity of integrin signalling. *Nature cell biology* 2, E13-14.

- Giancotti, F. G., and Ruoslahti, E. (1999). Integrin signaling. *Science (New York, NY)* 285, 1028-1032.
- Giangreco, A., Goldie, S. J., Failla, V., Saintigny, G., and Watt, F. M. (2010). Human skin aging is associated with reduced expression of the stem cell markers beta1 integrin and MCSP. *The Journal of investigative dermatology* 130, 604-608.
- Giannelli, G., and Antonaci, S. (2000). Biological and clinical relevance of Laminin-5 in cancer. *Clinical & experimental metastasis* 18, 439-443.
- Giannelli, G., Fransvea, E., Bergamini, C., Marinosci, F., and Antonaci, S. (2003). Laminin-5 chains are expressed differentially in metastatic and nonmetastatic hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 9, 3684-3691.
- Giannelli, G., Pozzi, A., Stetler-Stevenson, W. G., Gardner, H. A., and Quaranta, V. (1999). Expression of matrix metalloproteinase-2-cleaved laminin-5 in breast remodeling stimulated by sex steroids. *The American journal of pathology* 154, 1193-1201.
- Gill, S. E., and Parks, W. C. (2008). Metalloproteinases and their inhibitors: regulators of wound healing. *The international journal of biochemistry & cell biology* 40, 1334-1347.
- Gilles, C., Polette, M., Piette, J., Munaut, C., Thompson, E. W., Birembaut, P., and Foidart, J. M. (1996). High level of MT-MMP expression is associated with invasiveness of cervical cancer cells. *International journal of cancer* 65, 209-213.
- Giudice, G. J., Emery, D. J., and Diaz, L. A. (1992). Cloning and primary structural analysis of the bullous pemphigoid autoantigen BP180. *The Journal of investigative dermatology* 99, 243-250.
- Goldberg, M. A., Dunning, S. P., and Bunn, H. F. (1988). Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein. *Science (New York, NY)* 242, 1412-1415.
- Goldfinger, L. E., Hopkinson, S. B., deHart, G. W., Collawn, S., Couchman, J. R., and Jones, J. C. (1999). The alpha3 laminin subunit, alpha6beta4 and alpha3beta1 integrin coordinately regulate wound healing in cultured epithelial cells and in the skin. *Journal of cell science* 112 (Pt 16), 2615-2629.
- Gontier, E., Cario-Andre, M., Lepreux, S., Vergnes, P., Bizik, J., Surleve-Bazeille, J. E., and Taieb, A. (2002). Dermal nevus cells from congenital nevi cannot penetrate the dermis in skin reconstructs. *Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society* 15, 41-48.
- Gonzales, M., Haan, K., Baker, S. E., Fitchmun, M., Todorov, I., Weitzman, S., and Jones, J. C. (1999). A cell signal pathway involving laminin-5, alpha3beta1 integrin, and mitogen-activated protein kinase can regulate epithelial cell proliferation. *Molecular biology of the cell* 10, 259-270.

Gonzalez-Iriarte, M., Carmona, R., Perez-Pomares, J. M., Macias, D., Costell, M., and Munoz-Chapuli, R. (2003). Development of the coronary arteries in a murine model of transposition of great arteries. *Journal of molecular and cellular cardiology* 35, 795-802.

Goodhead, D. T. (1994). Initial events in the cellular effects of ionizing radiations: clustered damage in DNA. *International journal of radiation biology* 65, 7-17.

Gothie, E., Richard, D. E., Berra, E., Pages, G., and Pouyssegur, J. (2000). Identification of alternative spliced variants of human hypoxia-inducible factor-1alpha. *The Journal of biological chemistry* 275, 6922-6927.

Govindraj, P., West, L., Koob, T. J., Neame, P., Doege, K., and Hassell, J. R. (2002). Isolation and identification of the major heparan sulfate proteoglycans in the developing bovine rib growth plate. *The Journal of biological chemistry* 277, 19461-19469.

Grellner, W., Georg, T., and Wilske, J. (2000). Quantitative analysis of proinflammatory cytokines (IL-1beta, IL-6, TNF-alpha) in human skin wounds. *Forensic science international* 113, 251-264.

Grether-Beck, S., Olaizola-Horn, S., Schmitt, H., Grewe, M., Jahnke, A., Johnson, J. P., Briviba, K., Sies, H., and Krutmann, J. (1996). Activation of transcription factor AP-2 mediates UVA radiation- and singlet oxygen-induced expression of the human intercellular adhesion molecule 1 gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 14586-14591.

Grose, R., Hutter, C., Bloch, W., Thorey, I., Watt, F. M., Fassler, R., Brakebusch, C., and Werner, S. (2002). A crucial role of beta 1 integrins for keratinocyte migration in vitro and during cutaneous wound repair. *Development* 129, 2303-2315.

Gu, Y. Z., Moran, S. M., Hogenesch, J. B., Wartman, L., and Bradfield, C. A. (1998). Molecular characterization and chromosomal localization of a third alpha-class hypoxia inducible factor subunit, HIF3alpha. *Gene expression* 7, 205-213.

Guo, W., and Giancotti, F. G. (2004). Integrin signalling during tumour progression. *Nature reviews* 5, 816-826.

Guzy, R. D., and Schumacker, P. T. (2006). Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia. *Experimental physiology* 91, 807-819.

Haase, I., Hobbs, R. M., Romero, M. R., Broad, S., and Watt, F. M. (2001). A role for mitogen-activated protein kinase activation by integrins in the pathogenesis of psoriasis. *The Journal of clinical investigation* 108, 527-536.

Hakkinen, L., Hildebrand, H. C., Berndt, A., Kosmehl, H., and Larjava, H. (2000). Immunolocalization of tenascin-C, alpha9 integrin subunit, and alphavbeta6 integrin during wound healing in human oral mucosa. *J Histochem Cytochem* 48, 985-998.

- Hallmann, R., Horn, N., Selg, M., Wendler, O., Pausch, F., and Sorokin, L. M. (2005). Expression and function of laminins in the embryonic and mature vasculature. *Physiological reviews* 85, 979-1000.
- Hashizume, K. (2007). Analysis of uteroplacental-specific molecules and their functions during implantation and placentation in the bovine. *The Journal of reproduction and development* 53, 1-11.
- Hasty, K. A., Pourmotabbed, T. F., Goldberg, G. I., Thompson, J. P., Spinella, D. G., Stevens, R. M., and Mainardi, C. L. (1990). Human neutrophil collagenase. A distinct gene product with homology to other matrix metalloproteinases. *The Journal of biological chemistry* 265, 11421-11424.
- Heck, D. E., Gerecke, D. R., Vetrano, A. M., and Laskin, J. D. (2004). Solar ultraviolet radiation as a trigger of cell signal transduction. *Toxicology and applied pharmacology* 195, 288-297.
- Heldin, C. H., and Westermark, B. (1999). Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiological reviews* 79, 1283-1316.
- Herbst, T. J., McCarthy, J. B., Tsilibary, E. C., and Furcht, L. T. (1988). Differential effects of laminin, intact type IV collagen, and specific domains of type IV collagen on endothelial cell adhesion and migration. *The Journal of cell biology* 106, 1365-1373.
- Hertle, M. D., Kubler, M. D., Leigh, I. M., and Watt, F. M. (1992). Aberrant integrin expression during epidermal wound healing and in psoriatic epidermis. *The Journal of clinical investigation* 89, 1892-1901.
- Higgins, D. F., Kimura, K., Bernhardt, W. M., Shrimanker, N., Akai, Y., Hohenstein, B., Saito, Y., Johnson, R. S., Kretzler, M., Cohen, C. D., *et al.* (2007). Hypoxia promotes fibrogenesis in vivo via HIF-1 stimulation of epithelial-to-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investigation* 117, 3810-3820.
- Hildesheim, J., Awwad, R. T., and Fornace, A. J., Jr. (2004). p38 Mitogen-activated protein kinase inhibitor protects the epidermis against the acute damaging effects of ultraviolet irradiation by blocking apoptosis and inflammatory responses. *The Journal of investigative dermatology* 122, 497-502.
- Hobbs, R. M., and Watt, F. M. (2003). Regulation of interleukin-1alpha expression by integrins and epidermal growth factor receptor in keratinocytes from a mouse model of inflammatory skin disease. *The Journal of biological chemistry* 278, 19798-19807.
- Hockel, M., and Vaupel, P. (2001). Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *Journal of the National Cancer Institute* 93, 266-276.
- Hodivala-Dilke, K. M., DiPersio, C. M., Kreidberg, J. A., and Hynes, R. O. (1998). Novel roles for alpha3beta1 integrin as a regulator of cytoskeletal assembly and as a trans-dominant inhibitor of integrin receptor function in mouse keratinocytes. *The Journal of cell biology* 142, 1357-1369.

- Hoeijmakers, J. H. (2009). DNA damage, aging, and cancer. *The New England journal of medicine* *361*, 1475-1485.
- Hofbauer, K. H., Gess, B., Lohaus, C., Meyer, H. E., Katschinski, D., and Kurtz, A. (2003). Oxygen tension regulates the expression of a group of procollagen hydroxylases. *European journal of biochemistry / FEBS* *270*, 4515-4522.
- Hoffman, M. D., Fleming, M. G., and Pearson, R. W. (1995). Acantholytic epidermolysis bullosa. *Archives of dermatology* *131*, 586-589.
- Hofseth, L. J., Hussain, S. P., and Harris, C. C. (2004). p53: 25 years after its discovery. *Trends in pharmacological sciences* *25*, 177-181.
- Holick, M. F. (1981). The cutaneous photosynthesis of previtamin D3: a unique photoendocrine system. *The Journal of investigative dermatology* *77*, 51-58.
- Holler, E. (2005). Laminin isoform expression in breast tumors. *Breast Cancer Res* *7*, 166-167.
- Holmbeck, K., Bianco, P., Caterina, J., Yamada, S., Kromer, M., Kuznetsov, S. A., Mankani, M., Robey, P. G., Poole, A. R., Pidoux, I., *et al.* (1999). MT1-MMP-deficient mice develop dwarfism, osteopenia, arthritis, and connective tissue disease due to inadequate collagen turnover. *Cell* *99*, 81-92.
- Holtkotter, O., Nieswandt, B., Smyth, N., Muller, W., Hafner, M., Schulte, V., Krieg, T., and Eckes, B. (2002). Integrin alpha 2-deficient mice develop normally, are fertile, but display partially defective platelet interaction with collagen. *The Journal of biological chemistry* *277*, 10789-10794.
- Hopf, M., Gohring, W., Kohfeldt, E., Yamada, Y., and Timpl, R. (1999). Recombinant domain IV of perlecan binds to nidogens, laminin-nidogen complex, fibronectin, fibulin-2 and heparin. *European journal of biochemistry / FEBS* *259*, 917-925.
- Hopf, M., Gohring, W., Mann, K., and Timpl, R. (2001). Mapping of binding sites for nidogens, fibulin-2, fibronectin and heparin to different IG modules of perlecan. *Journal of molecular biology* *311*, 529-541.
- Hopkinson, S. B., Baker, S. E., and Jones, J. C. (1995). Molecular genetic studies of a human epidermal autoantigen (the 180-kD bullous pemphigoid antigen/BP180): identification of functionally important sequences within the BP180 molecule and evidence for an interaction between BP180 and alpha 6 integrin. *The Journal of cell biology* *130*, 117-125.
- Horino, Y., Takahashi, S., Miura, T., and Takahashi, Y. (2002). Prolonged hypoxia accelerates the posttranscriptional process of collagen synthesis in cultured fibroblasts. *Life sciences* *71*, 3031-3045.
- Hotary, K. B., Allen, E. D., Brooks, P. C., Datta, N. S., Long, M. W., and Weiss, S. J. (2003). Membrane type I matrix metalloproteinase usurps tumor growth control imposed by the three-dimensional extracellular matrix. *Cell* *114*, 33-45.

- Huang, J. C., Svoboda, D. L., Reardon, J. T., and Sancar, A. (1992). Human nucleotide excision nuclease removes thymine dimers from DNA by incising the 22nd phosphodiester bond 5' and the 6th phosphodiester bond 3' to the photodimer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *89*, 3664-3668.
- Huang, L. E., Arany, Z., Livingston, D. M., and Bunn, H. F. (1996a). Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit. *The Journal of biological chemistry* *271*, 32253-32259.
- Huang, L. E., Gu, J., Schau, M., and Bunn, H. F. (1998). Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *95*, 7987-7992.
- Huang, X., Griffiths, M., Wu, J., Farese, R. V., Jr., and Sheppard, D. (2000a). Normal development, wound healing, and adenovirus susceptibility in beta5-deficient mice. *Molecular and cellular biology* *20*, 755-759.
- Huang, X. Z., Wu, J. F., Cass, D., Erle, D. J., Corry, D., Young, S. G., Farese, R. V., Jr., and Sheppard, D. (1996b). Inactivation of the integrin beta 6 subunit gene reveals a role of epithelial integrins in regulating inflammation in the lung and skin. *The Journal of cell biology* *133*, 921-928.
- Huang, X. Z., Wu, J. F., Ferrando, R., Lee, J. H., Wang, Y. L., Farese, R. V., Jr., and Sheppard, D. (2000b). Fatal bilateral chylothorax in mice lacking the integrin alpha9beta1. *Molecular and cellular biology* *20*, 5208-5215.
- Hudson, B. G., Kalluri, R., Gunwar, S., Weber, M., Ballester, F., Hudson, J. K., Noelken, M. E., Sarras, M., Richardson, W. R., Saus, J., and et al. (1992). The pathogenesis of Alport syndrome involves type IV collagen molecules containing the alpha 3(IV) chain: evidence from anti-GBM nephritis after renal transplantation. *Kidney international* *42*, 179-187.
- Hudson, B. G., Reeders, S. T., and Tryggvason, K. (1993). Type IV collagen: structure, gene organization, and role in human diseases. Molecular basis of Goodpasture and Alport syndromes and diffuse leiomyomatosis. *The Journal of biological chemistry* *268*, 26033-26036.
- Hudson, B. G., Tryggvason, K., Sundaramoorthy, M., and Neilson, E. G. (2003). Alport's syndrome, Goodpasture's syndrome, and type IV collagen. *The New England journal of medicine* *348*, 2543-2556.
- Huggins, R. H., Schwartz, R. A., and Janniger, C. K. (2005). Vitiligo. *Acta dermatovenerologica Alpina, Panonica, et Adriatica* *14*, 137-142, 144-135.
- Hunt, T. K., Niinikoski, J., and Zederfeldt, B. (1972). Role of oxygen in repair processes. *Acta chirurgica Scandinavica* *138*, 109-110.
- Hussein, M. R. (2005). Ultraviolet radiation and skin cancer: molecular mechanisms. *Journal of cutaneous pathology* *32*, 191-205.

Huxley-Jones, J., Clarke, T. K., Beck, C., Toubaris, G., Robertson, D. L., and Boot-Handford, R. P. (2007). The evolution of the vertebrate metzincins; insights from *Ciona intestinalis* and *Danio rerio*. *BMC evolutionary biology* 7, 63.

Hynes, R. O. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110, 673-687.

Hynes, R. O. (2004). The emergence of integrins: a personal and historical perspective. *Matrix Biol* 23, 333-340.

Iinoue, M., Kratz, G., Haegerstrand, A., and Stahle-Backdahl, M. (1995). Collagenase expression is rapidly induced in wound-edge keratinocytes after acute injury in human skin, persists during healing, and stops at re-epithelialization. *The Journal of investigative dermatology* 104, 479-483.

Iozzo, R. V. (1998). Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annual review of biochemistry* 67, 609-652.

Iozzo, R. V. (2005). Basement membrane proteoglycans: from cellar to ceiling. *Nature reviews* 6, 646-656.

Iozzo, R. V., Cohen, I. R., Grassel, S., and Murdoch, A. D. (1994). The biology of perlecan: the multifaceted heparan sulphate proteoglycan of basement membranes and pericellular matrices. *The Biochemical journal* 302 (Pt 3), 625-639.

Iozzo, R. V., and Murdoch, A. D. (1996). Proteoglycans of the extracellular environment: clues from the gene and protein side offer novel perspectives in molecular diversity and function. *Faseb J* 10, 598-614.

Isaacs, J. S., Jung, Y. J., Mimnaugh, E. G., Martinez, A., Cuttitta, F., and Neckers, L. M. (2002). Hsp90 regulates a von Hippel Lindau-independent hypoxia-inducible factor-1 alpha-degradative pathway. *The Journal of biological chemistry* 277, 29936-29944.

Ito, A., Mukaiyama, A., Itoh, Y., Nagase, H., Thogersen, I. B., Enghild, J. J., Sasaguri, Y., and Mori, Y. (1996). Degradation of interleukin 1beta by matrix metalloproteinases. *The Journal of biological chemistry* 271, 14657-14660.

Itoh, T., Tanioka, M., Yoshida, H., Yoshioka, T., Nishimoto, H., and Itohara, S. (1998). Reduced angiogenesis and tumor progression in gelatinase A-deficient mice. *Cancer research* 58, 1048-1051.

Jackson, S. P., and Bartek, J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 461, 1071-1078.

Janes, S. M., and Watt, F. M. (2006). New roles for integrins in squamous-cell carcinoma. *Nat Rev Cancer* 6, 175-183.

- Jenner, T. J., Cunniffe, S. M., Stevens, D. L., and O'Neill, P. (1998). Induction of DNA-protein crosslinks in Chinese hamster V79-4 cells exposed to high- and low-linear energy transfer radiation. *Radiation research* *150*, 593-599.
- Jensen, U. B., Lowell, S., and Watt, F. M. (1999). The spatial relationship between stem cells and their progeny in the basal layer of human epidermis: a new view based on whole-mount labelling and lineage analysis. *Development* *126*, 2409-2418.
- Jeong, J. W., Bae, M. K., Ahn, M. Y., Kim, S. H., Sohn, T. K., Bae, M. H., Yoo, M. A., Song, E. J., Lee, K. J., and Kim, K. W. (2002). Regulation and destabilization of HIF-1 α by ARD1-mediated acetylation. *Cell* *111*, 709-720.
- Jiang, B. H., Jiang, G., Zheng, J. Z., Lu, Z., Hunter, T., and Vogt, P. K. (2001). Phosphatidylinositol 3-kinase signaling controls levels of hypoxia-inducible factor 1. *Cell Growth Differ* *12*, 363-369.
- Jiang, B. H., Rue, E., Wang, G. L., Roe, R., and Semenza, G. L. (1996). Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *The Journal of biological chemistry* *271*, 17771-17778.
- Jiang, X., Mulhaupt, H., Chan, E., Schaefer, L., Schaefer, R. M., and Couchman, J. R. (2004). Essential contribution of tumor-derived perlecan to epidermal tumor growth and angiogenesis. *J Histochem Cytochem* *52*, 1575-1590.
- Jin, H., and Varner, J. (2004). Integrins: roles in cancer development and as treatment targets. *British journal of cancer* *90*, 561-565.
- Johansson, N., Ala-aho, R., Uitto, V., Grenman, R., Fusenig, N. E., Lopez-Otin, C., and Kahari, V. M. (2000). Expression of collagenase-3 (MMP-13) and collagenase-1 (MMP-1) by transformed keratinocytes is dependent on the activity of p38 mitogen-activated protein kinase. *Journal of cell science* *113 Pt 2*, 227-235.
- Jones, J., Sugiyama, M., Watt, F. M., and Speight, P. M. (1993). Integrin expression in normal, hyperplastic, dysplastic, and malignant oral epithelium. *The Journal of pathology* *169*, 235-243.
- Jones, J., Watt, F. M., and Speight, P. M. (1997). Changes in the expression of alpha v integrins in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med* *26*, 63-68.
- Jones, J. C., Hopkinson, S. B., and Goldfinger, L. E. (1998). Structure and assembly of hemidesmosomes. *Bioessays* *20*, 488-494.
- Jones, P. H., Harper, S., and Watt, F. M. (1995). Stem cell patterning and fate in human epidermis. *Cell* *80*, 83-93.
- Jones, P. H., and Watt, F. M. (1993). Separation of human epidermal stem cells from transit amplifying cells on the basis of differences in integrin function and expression. *Cell* *73*, 713-724.

Jost, M., Huggett, T. M., Kari, C., Boise, L. H., and Rodeck, U. (2001). Epidermal growth factor receptor-dependent control of keratinocyte survival and Bcl-xL expression through a MEK-dependent pathway. *The Journal of biological chemistry* 276, 6320-6326.

Kadekaro, A. L., Kavanagh, R. J., Wakamatsu, K., Ito, S., Pipitone, M. A., and Abdel-Malek, Z. A. (2003). Cutaneous photobiology. The melanocyte vs. the sun: who will win the final round? *Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society* 16, 434-447.

Kadler, K. E., Baldock, C., Bella, J., and Boot-Handford, R. P. (2007). Collagens at a glance. *Journal of cell science* 120, 1955-1958.

Kaidi, A., Williams, A. C., and Paraskeva, C. (2007). Interaction between beta-catenin and HIF-1 promotes cellular adaptation to hypoxia. *Nature cell biology* 9, 210-217.

Kaido, T., Yebra, M., Cirulli, V., and Montgomery, A. M. (2004). Regulation of human beta-cell adhesion, motility, and insulin secretion by collagen IV and its receptor alpha1beta1. *The Journal of biological chemistry* 279, 53762-53769.

Kallio, P. J., Pongratz, I., Gradin, K., McGuire, J., and Poellinger, L. (1997). Activation of hypoxia-inducible factor 1alpha: posttranscriptional regulation and conformational change by recruitment of the Arnt transcription factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 5667-5672.

Kalluri, R., Shield, C. F., Todd, P., Hudson, B. G., and Neilson, E. G. (1997). Isoform switching of type IV collagen is developmentally arrested in X-linked Alport syndrome leading to increased susceptibility of renal basement membranes to endoproteolysis. *The Journal of clinical investigation* 99, 2470-2478.

Kamura, T., Sato, S., Iwai, K., Czyzyk-Krzeska, M., Conaway, R. C., and Conaway, J. W. (2000). Activation of HIF1alpha ubiquitination by a reconstituted von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 10430-10435.

Katayama, M., Sanzen, N., Funakoshi, A., and Sekiguchi, K. (2003). Laminin gamma2-chain fragment in the circulation: a prognostic indicator of epithelial tumor invasion. *Cancer research* 63, 222-229.

Katschinski, D. M., Le, L., Heinrich, D., Wagner, K. F., Hofer, T., Schindler, S. G., and Wenger, R. H. (2002). Heat induction of the unphosphorylated form of hypoxia-inducible factor-1alpha is dependent on heat shock protein-90 activity. *The Journal of biological chemistry* 277, 9262-9267.

Keely, S., Glover, L. E., MacManus, C. F., Campbell, E. L., Scully, M. M., Furuta, G. T., and Colgan, S. P. (2009). Selective induction of integrin beta1 by hypoxia-inducible factor: implications for wound healing. *Faseb J* 23, 1338-1346.

- Kemp, L. M., and Jeggo, P. A. (1986). Radiation-induced chromosome damage in X-ray-sensitive mutants (xrs) of the Chinese hamster ovary cell line. *Mutation research* 166, 255-263.
- Kerkela, E., Ala-aho, R., Lohi, J., Grenman, R., V, M. K., and Saarialho-Kere, U. (2001). Differential patterns of stromelysin-2 (MMP-10) and MT1-MMP (MMP-14) expression in epithelial skin cancers. *British journal of cancer* 84, 659-669.
- Khanna, S., Roy, S., Bagchi, D., Bagchi, M., and Sen, C. K. (2001). Upregulation of oxidant-induced VEGF expression in cultured keratinocytes by a grape seed proanthocyanidin extract. *Free radical biology & medicine* 31, 38-42.
- Khoshnoodi, J., Pedchenko, V., and Hudson, B. G. (2008). Mammalian collagen IV. *Microscopy research and technique* 71, 357-370.
- Khurana, A., Nakayama, K., Williams, S., Davis, R. J., Mustelin, T., and Ronai, Z. (2006). Regulation of the ring finger E3 ligase Siah2 by p38 MAPK. *The Journal of biological chemistry* 281, 35316-35326.
- Kietzmann, T., and Gorlach, A. (2005). Reactive oxygen species in the control of hypoxia-inducible factor-mediated gene expression. *Seminars in cell & developmental biology* 16, 474-486.
- Kietzmann, T., Jungermann, K., and Gorlach, A. (2003). Regulation of the hypoxia-dependent plasminogen activator inhibitor 1 expression by MAP kinases. *Thrombosis and haemostasis* 89, 666-673.
- Kietzmann, T., Roth, U., and Jungermann, K. (1999). Induction of the plasminogen activator inhibitor-1 gene expression by mild hypoxia via a hypoxia response element binding the hypoxia-inducible factor-1 in rat hepatocytes. *Blood* 94, 4177-4185.
- Kim, J. Y., Ahn, H. J., Ryu, J. H., Suk, K., and Park, J. H. (2004). BH3-only protein Noxa is a mediator of hypoxic cell death induced by hypoxia-inducible factor 1alpha. *The Journal of experimental medicine* 199, 113-124.
- Kim, M. S., Kwon, H. J., Lee, Y. M., Baek, J. H., Jang, J. E., Lee, S. W., Moon, E. J., Kim, H. S., Lee, S. K., Chung, H. Y., *et al.* (2001). Histone deacetylases induce angiogenesis by negative regulation of tumor suppressor genes. *Nature medicine* 7, 437-443.
- Kim, S., Bell, K., Mousa, S. A., and Varner, J. A. (2000). Regulation of angiogenesis in vivo by ligation of integrin alpha5beta1 with the central cell-binding domain of fibronectin. *The American journal of pathology* 156, 1345-1362.
- Kim, S. B., Kang, S. A., Park, J. S., Lee, J. S., and Hong, C. D. (1996). Effects of hypoxia on the extracellular matrix production of cultured rat mesangial cells. *Nephron* 72, 275-280.
- Kim, W. Y., Safran, M., Buckley, M. R., Ebert, B. L., Glickman, J., Bosenberg, M., Regan, M., and Kaelin, W. G., Jr. (2006). Failure to prolyl hydroxylate hypoxia-inducible factor alpha phenocopies VHL inactivation in vivo. *The EMBO journal* 25, 4650-4662.

- Kligys, K., Claiborne, J. N., DeBiase, P. J., Hopkinson, S. B., Wu, Y., Mizuno, K., and Jones, J. C. (2007). The slingshot family of phosphatases mediates Rac1 regulation of cofilin phosphorylation, laminin-332 organization, and motility behavior of keratinocytes. *The Journal of biological chemistry* 282, 32520-32528.
- Knight, C. G., Morton, L. F., Peachey, A. R., Tuckwell, D. S., Farndale, R. W., and Barnes, M. J. (2000). The collagen-binding A-domains of integrins alpha(1)beta(1) and alpha(2)beta(1) recognize the same specific amino acid sequence, GFOGER, in native (triple-helical) collagens. *The Journal of biological chemistry* 275, 35-40.
- Kohfeldt, E., Sasaki, T., Gohring, W., and Timpl, R. (1998). Nidogen-2: a new basement membrane protein with diverse binding properties. *Journal of molecular biology* 282, 99-109.
- Koike, T., Kimura, N., Miyazaki, K., Yabuta, T., Kumamoto, K., Takenoshita, S., Chen, J., Kobayashi, M., Hosokawa, M., Taniguchi, A., *et al.* (2004). Hypoxia induces adhesion molecules on cancer cells: A missing link between Warburg effect and induction of selectin-ligand carbohydrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 8132-8137.
- Kon, A., Pulkkinen, L., Hara, M., Tamai, K., Tagami, H., Hashimoto, I., and Uitto, J. (1998). Laminin 5 genes and Herlitz junctional epidermolysis bullosa: novel mutations and polymorphisms in the LAMB3 and LAMC2 genes. *Mutations in brief* no. 190. Online. *Human mutation* 12, 288.
- Kondo, S., Sauder, D. N., McKenzie, R. C., Fujisawa, H., Shivji, G. M., El-Ghorr, A., and Norval, M. (1995). The role of cis-urocanic acid in UVB-induced suppression of contact hypersensitivity. *Immunology letters* 48, 181-186.
- Koshiji, M., To, K. K., Hammer, S., Kumamoto, K., Harris, A. L., Modrich, P., and Huang, L. E. (2005). HIF-1alpha induces genetic instability by transcriptionally downregulating MutSalpha expression. *Molecular cell* 17, 793-803.
- Koshikawa, N., Giannelli, G., Cirulli, V., Miyazaki, K., and Quaranta, V. (2000). Role of cell surface metalloprotease MT1-MMP in epithelial cell migration over laminin-5. *The Journal of cell biology* 148, 615-624.
- Koshikawa, N., Minegishi, T., Sharabi, A., Quaranta, V., and Seiki, M. (2005). Membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) is a processing enzyme for human laminin gamma 2 chain. *The Journal of biological chemistry* 280, 88-93.
- Koster, J., Geerts, D., Favre, B., Borradori, L., and Sonnenberg, A. (2003). Analysis of the interactions between BP180, BP230, plectin and the integrin alpha6beta4 important for hemidesmosome assembly. *Journal of cell science* 116, 387-399.
- Kouzarides, T. (2000). Acetylation: a regulatory modification to rival phosphorylation? *The EMBO journal* 19, 1176-1179.
- Kozhukhar, A. V., Yasinska, I. M., and Sumbayev, V. V. (2006). Nitric oxide inhibits HIF-1alpha protein accumulation under hypoxic conditions: implication of 2-oxoglutarate and iron. *Biochimie* 88, 411-418.

Kozlova, N. I., Morozevich, G. E., Chubukina, A. N., and Berman, A. E. (2001). Integrin alphavbeta3 promotes anchorage-dependent apoptosis in human intestinal carcinoma cells. *Oncogene* 20, 4710-4717.

Kraemer, K. H., Lee, M. M., and Scotto, J. (1984). DNA repair protects against cutaneous and internal neoplasia: evidence from xeroderma pigmentosum. *Carcinogenesis* 5, 511-514.

Kraemer, K. H., Lee, M. M., and Scotto, J. (1987). Xeroderma pigmentosum. Cutaneous, ocular, and neurologic abnormalities in 830 published cases. *Archives of dermatology* 123, 241-250.

Kren, A., Baeriswyl, V., Lehembre, F., Wunderlin, C., Strittmatter, K., Antoniadis, H., Fassler, R., Cavallaro, U., and Christofori, G. (2007). Increased tumor cell dissemination and cellular senescence in the absence of beta1-integrin function. *The EMBO journal* 26, 2832-2842.

Krieg, M., Haas, R., Brauch, H., Acker, T., Flamme, I., and Plate, K. H. (2000). Up-regulation of hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha under normoxic conditions in renal carcinoma cells by von Hippel-Lindau tumor suppressor gene loss of function. *Oncogene* 19, 5435-5443.

Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V., El-Deiry, W. S., Golstein, P., Green, D. R., *et al.* (2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell death and differentiation* 16, 3-11.

Krutmann, J. (2000). Phototherapy for atopic dermatitis. *Clinical and experimental dermatology* 25, 552-558.

Kunz, C., Saito, Y., and Schar, P. (2009). DNA Repair in mammalian cells: Mismatched repair: variations on a theme. *Cell Mol Life Sci* 66, 1021-1038.

Kurimoto, I., and Streilein, J. W. (1992). Deleterious effects of cis-urocanic acid and UVB radiation on Langerhans cells and on induction of contact hypersensitivity are mediated by tumor necrosis factor-alpha. *The Journal of investigative dermatology* 99, 69S-70S.

Kuster, J. E., Guarnieri, M. H., Ault, J. G., Flaherty, L., and Swiatek, P. J. (1997). IAP insertion in the murine LamB3 gene results in junctional epidermolysis bullosa. *Mamm Genome* 8, 673-681.

Kwon, S. J., Song, J. J., and Lee, Y. J. (2005). Signal pathway of hypoxia-inducible factor-1alpha phosphorylation and its interaction with von Hippel-Lindau tumor suppressor protein during ischemia in MiaPaCa-2 pancreatic cancer cells. *Clin Cancer Res* 11, 7607-7613.

Laeq, S., and Faust, R. (2007). Modeling the cholesteatoma microenvironment: coculture of HaCaT keratinocytes with WS1 fibroblasts induces MMP-2 activation, invasive phenotype, and proteolysis of the extracellular matrix. *The Laryngoscope* 117, 313-318.

- Lambeth, J. D. (2004). NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol* 4, 181-189.
- Lando, D., Peet, D. J., Gorman, J. J., Whelan, D. A., Whitelaw, M. L., and Bruick, R. K. (2002). FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes & development* 16, 1466-1471.
- Langhoff, E., and Haseltine, W. A. (1992). Infection of accessory dendritic cells by human immunodeficiency virus type 1. *The Journal of investigative dermatology* 99, 89S-94S.
- Larjava, H., Haapasalmi, K., Salo, T., Wiebe, C., and Uitto, V. J. (1996). Keratinocyte integrins in wound healing and chronic inflammation of the human periodontium. *Oral diseases* 2, 77-86.
- Lee, J. W., Bae, S. H., Jeong, J. W., Kim, S. H., and Kim, K. W. (2004). Hypoxia-inducible factor (HIF-1)alpha: its protein stability and biological functions. *Experimental & molecular medicine* 36, 1-12.
- Lee, J. Y., Li, C., Chao, S. C., Pulkkinen, L., and Uitto, J. (2000). A de novo glycine substitution mutation in the collagenous domain of COL7A1 in dominant dystrophic epidermolysis bullosa. *Archives of dermatological research* 292, 159-163.
- Lee, S. H., Lee, Y. J., and Han, H. J. (2010). Effect of arachidonic acid on hypoxia-induced IL-6 production in mouse ES cells: Involvement of MAPKs, NF-kappaB, and HIF-1alpha. *Journal of cellular physiology* 222, 574-585.
- Lee, T. H., Seng, S., Li, H., Kennel, S. J., Avraham, H. K., and Avraham, S. (2006). Integrin regulation by vascular endothelial growth factor in human brain microvascular endothelial cells: role of alpha6beta1 integrin in angiogenesis. *The Journal of biological chemistry* 281, 40450-40460.
- Legrand, C., Gilles, C., Zahm, J. M., Polette, M., Buisson, A. C., Kaplan, H., Birembaut, P., and Tournier, J. M. (1999). Airway epithelial cell migration dynamics. MMP-9 role in cell-extracellular matrix remodeling. *The Journal of cell biology* 146, 517-529.
- Lehmann, A. R. (2003). DNA repair-deficient diseases, xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy. *Biochimie* 85, 1101-1111.
- Lehmann, A. R., Thompson, A. F., Harcourt, S. A., Stefanini, M., and Norris, P. G. (1993). Cockayne's syndrome: correlation of clinical features with cellular sensitivity of RNA synthesis to UV irradiation. *Journal of medical genetics* 30, 679-682.
- Lei, K., and Davis, R. J. (2003). JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 2432-2437.
- Leitinger, B., and Hohenester, E. (2007). Mammalian collagen receptors. *Matrix Biol* 26, 146-155.

- Leivo, T., Virtanen, I., and Oikarinen, A. (2001). Increased immunoreactivity for integrin beta 5 subunit in suprabasal cell layers in regenerating epidermis. *Archives of dermatological research* 293, 159-161.
- Lenander, C., Habermann, J. K., Ost, A., Nilsson, B., Schimmelpenning, H., Tryggvason, K., and Auer, G. (2001). Laminin-5 gamma 2 chain expression correlates with unfavorable prognosis in colon carcinomas. *Anal Cell Pathol* 22, 201-209.
- Lerman, O. Z., Galiano, R. D., Armour, M., Levine, J. P., and Gurtner, G. C. (2003). Cellular dysfunction in the diabetic fibroblast: impairment in migration, vascular endothelial growth factor production, and response to hypoxia. *The American journal of pathology* 162, 303-312.
- Levy, L., Broad, S., Diekmann, D., Evans, R. D., and Watt, F. M. (2000). beta1 integrins regulate keratinocyte adhesion and differentiation by distinct mechanisms. *Molecular biology of the cell* 11, 453-466.
- Li, J., Tzu, J., Chen, Y., Zhang, Y. P., Nguyen, N. T., Gao, J., Bradley, M., Keene, D. R., Oro, A. E., Miner, J. H., and Marinkovich, M. P. (2003). Laminin-10 is crucial for hair morphogenesis. *The EMBO journal* 22, 2400-2410.
- Li, W., Gibson, C. W., Abrams, W. R., Andrews, D. W., and DenBesten, P. K. (2001). Reduced hydrolysis of amelogenin may result in X-linked amelogenesis imperfecta. *Matrix Biol* 19, 755-760.
- Li, W., Li, Y., Guan, S., Fan, J., Cheng, C. F., Bright, A. M., Chinn, C., Chen, M., and Woodley, D. T. (2007). Extracellular heat shock protein-90alpha: linking hypoxia to skin cell motility and wound healing. *The EMBO journal* 26, 1221-1233.
- Li, Y., Fan, J., Chen, M., Li, W., and Woodley, D. T. (2006). Transforming growth factor-alpha: a major human serum factor that promotes human keratinocyte migration. *The Journal of investigative dermatology* 126, 2096-2105.
- Libby, R. T., Lavalley, C. R., Balkema, G. W., Brunken, W. J., and Hunter, D. D. (1999). Disruption of laminin beta2 chain production causes alterations in morphology and function in the CNS. *J Neurosci* 19, 9399-9411.
- Lieber, M. R. (1997). The FEN-1 family of structure-specific nucleases in eukaryotic DNA replication, recombination and repair. *Bioessays* 19, 233-240.
- Lim, G. P., Russell, M. J., Cullen, M. J., and Tokes, Z. A. (1997). Matrix metalloproteinases in dog brains exhibiting Alzheimer-like characteristics. *Journal of neurochemistry* 68, 1606-1611.
- Lining, X., Uchi, H., Hayashida, S., Tsuji, G., Kido, M., Nakahara, T., Takeuchi, S., Takahara, M., Moroi, Y., and Furue, M. (2009). Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha and hypoxia-inducible factor-2alpha with progression of keratinocytic neoplasms. *Journal of dermatological science* 56, 135-136.
- Litjens, S. H., de Pereda, J. M., and Sonnenberg, A. (2006). Current insights into the formation and breakdown of hemidesmosomes. *Trends in cell biology* 16, 376-383.

Liu, L. Z., Hu, X. W., Xia, C., He, J., Zhou, Q., Shi, X., Fang, J., and Jiang, B. H. (2006). Reactive oxygen species regulate epidermal growth factor-induced vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor-1alpha expression through activation of AKT and P70S6K1 in human ovarian cancer cells. *Free radical biology & medicine* 41, 1521-1533.

Liu, Z., Diaz, L. A., Haas, A. L., and Giudice, G. J. (1992). cDNA cloning of a novel human ubiquitin carrier protein. An antigenic domain specifically recognized by endemic pemphigus foliaceus autoantibodies is encoded in a secondary reading frame of this human epidermal transcript. *The Journal of biological chemistry* 267, 15829-15835.

Liu, Z., Shipley, J. M., Vu, T. H., Zhou, X., Diaz, L. A., Werb, Z., and Senior, R. M. (1998). Gelatinase B-deficient mice are resistant to experimental bullous pemphigoid. *The Journal of experimental medicine* 188, 475-482.

Loboda, A., Jozkowicz, A., and Dulak, J. (2010). HIF-1 and HIF-2 transcription factors--similar but not identical. *Molecules and cells* 29, 435-442.

Lohi, J., Wilson, C. L., Roby, J. D., and Parks, W. C. (2001). Epilysin, a novel human matrix metalloproteinase (MMP-28) expressed in testis and keratinocytes and in response to injury. *The Journal of biological chemistry* 276, 10134-10144.

Luo, D., Mari, B., Stoll, I., and Anglard, P. (2002). Alternative splicing and promoter usage generates an intracellular stromelysin 3 isoform directly translated as an active matrix metalloproteinase. *The Journal of biological chemistry* 277, 25527-25536.

Luthi, A. U., and Martin, S. J. (2007). The CASBAH: a searchable database of caspase substrates. *Cell death and differentiation* 14, 641-650.

Magner, W. J., Chang, A. C., Owens, J., Hong, M. J., Brooks, A., and Coligan, J. E. (2000). Aberrant development of thymocytes in mice lacking laminin-2. *Developmental immunology* 7, 179-193.

Mainiero, F., Murgia, C., Wary, K. K., Curatola, A. M., Pepe, A., Blumemberg, M., Westwick, J. K., Der, C. J., and Giancotti, F. G. (1997). The coupling of alpha6beta4 integrin to Ras-MAP kinase pathways mediated by Shc controls keratinocyte proliferation. *The EMBO journal* 16, 2365-2375.

Mainiero, F., Pepe, A., Wary, K. K., Spinardi, L., Mohammadi, M., Schlessinger, J., and Giancotti, F. G. (1995). Signal transduction by the alpha 6 beta 4 integrin: distinct beta 4 subunit sites mediate recruitment of Shc/Grb2 and association with the cytoskeleton of hemidesmosomes. *The EMBO journal* 14, 4470-4481.

Mainiero, F., Pepe, A., Yeon, M., Ren, Y., and Giancotti, F. G. (1996). The intracellular functions of alpha6beta4 integrin are regulated by EGF. *The Journal of cell biology* 134, 241-253.

- Makela, M., Larjava, H., Pirila, E., Maisi, P., Salo, T., Sorsa, T., and Uitto, V. J. (1999). Matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A) is related to migration of keratinocytes. *Experimental cell research* 251, 67-78.
- Manolescu, B., Oprea, E., Busu, C., and Cercasov, C. (2009). Natural compounds and the hypoxia-inducible factor (HIF) signalling pathway. *Biochimie* 91, 1347-1358.
- Marchenko, G. N., Marchenko, N. D., and Strongin, A. Y. (2003). The structure and regulation of the human and mouse matrix metalloproteinase-21 gene and protein. *The Biochemical journal* 372, 503-515.
- Marchenko, G. N., and Strongin, A. Y. (2001). MMP-28, a new human matrix metalloproteinase with an unusual cysteine-switch sequence is widely expressed in tumors. *Gene* 265, 87-93.
- Marchenko, N. D., Marchenko, G. N., Weinreb, R. N., Lindsey, J. D., Kyshtoobayeva, A., Crawford, H. C., and Strongin, A. Y. (2004). Beta-catenin regulates the gene of MMP-26, a novel metalloproteinase expressed both in carcinomas and normal epithelial cells. *The international journal of biochemistry & cell biology* 36, 942-956.
- Margadant, C., Frijns, E., Wilhelmsen, K., and Sonnenberg, A. (2008). Regulation of hemidesmosome disassembly by growth factor receptors. *Current opinion in cell biology* 20, 589-596.
- Margadant, C., Raymond, K., Kreft, M., Sachs, N., Janssen, H., and Sonnenberg, A. (2009). Integrin alpha3beta1 inhibits directional migration and wound re-epithelialization in the skin. *Journal of cell science* 122, 278-288.
- Marinkovich, M. P., Verrando, P., Keene, D. R., Meneguzzi, G., Lunstrum, G. P., Ortonne, J. P., and Burgeson, R. E. (1993). Basement membrane proteins kalinin and nicein are structurally and immunologically identical. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 69, 295-299.
- Marionnet, C., Pierrard, C., Vioux-Chagnoleau, C., Sok, J., Asselineau, D., and Bernerd, F. (2006). Interactions between fibroblasts and keratinocytes in morphogenesis of dermal epidermal junction in a model of reconstructed skin. *The Journal of investigative dermatology* 126, 971-979.
- Martin, P. (1997). Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science (New York, NY)* 276, 75-81.
- Masunaga, T., Shimizu, H., Takizawa, Y., Uitto, J., and Nishikawa, T. (2000). Combination of novel premature termination codon and glycine substitution mutations in COL7A1 leads to moderately severe recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *The Journal of investigative dermatology* 114, 204-205.
- Mathew, R., Khanna, R., Kumar, R., Mathur, M., Shukla, N. K., and Ralhan, R. (2002). Stromelysin-2 overexpression in human esophageal squamous cell carcinoma: potential clinical implications. *Cancer detection and prevention* 26, 222-228.

- Matsumoto, K., Sugiyama, M., and Ogura, R. (1991). Non-dimer DNA damage in Chinese hamster V-79 cells exposed to ultraviolet-B light. *Photochemistry and photobiology* *54*, 389-392.
- Maverakis, E., Miyamura, Y., Bowen, M. P., Correa, G., Ono, Y., and Goodarzi, H. (2010). Light, including ultraviolet. *Journal of autoimmunity* *34*, J247-257.
- Mavilio, F., Pellegrini, G., Ferrari, S., Di Nunzio, F., Di Iorio, E., Recchia, A., Maruggi, G., Ferrari, G., Provasi, E., Bonini, C., *et al.* (2006). Correction of junctional epidermolysis bullosa by transplantation of genetically modified epidermal stem cells. *Nature medicine* *12*, 1397-1402.
- Maxwell, P. H., Wiesener, M. S., Chang, G. W., Clifford, S. C., Vaux, E. C., Cockman, M. E., Wykoff, C. C., Pugh, C. W., Maher, E. R., and Ratcliffe, P. J. (1999). The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* *399*, 271-275.
- Mayer, U., Zimmermann, K., Mann, K., Reinhardt, D., Timpl, R., and Nischt, R. (1995). Binding properties and protease stability of recombinant human nidogen. *European journal of biochemistry / FEBS* *227*, 681-686.
- McCawley, L. J., and Matrisian, L. M. (2001). Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! *Current opinion in cell biology* *13*, 534-540.
- McGrath, J. A., Gatalica, B., Christiano, A. M., Li, K., Owaribe, K., McMillan, J. R., Eady, R. A., and Uitto, J. (1995). Mutations in the 180-kD bullous pemphigoid antigen (BPAG2), a hemidesmosomal transmembrane collagen (COL17A1), in generalized atrophic benign epidermolysis bullosa. *Nature genetics* *11*, 83-86.
- McLelland, J., and Chu, A. C. (1990). Multi-system Langerhans-cell histiocytosis in adults. *Clinical and experimental dermatology* *15*, 79-82.
- McNeill, L. A., Hewitson, K. S., Gleadle, J. M., Horsfall, L. E., Oldham, N. J., Maxwell, P. H., Pugh, C. W., Ratcliffe, P. J., and Schofield, C. J. (2002). The use of dioxygen by HIF prolyl hydroxylase (PHD1). *Bioorganic & medicinal chemistry letters* *12*, 1547-1550.
- McQuibban, G. A., Butler, G. S., Gong, J. H., Bendall, L., Power, C., Clark-Lewis, I., and Overall, C. M. (2001). Matrix metalloproteinase activity inactivates the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1. *The Journal of biological chemistry* *276*, 43503-43508.
- McQuibban, G. A., Gong, J. H., Tam, E. M., McCulloch, C. A., Clark-Lewis, I., and Overall, C. M. (2000). Inflammation dampened by gelatinase A cleavage of monocyte chemoattractant protein-3. *Science (New York, NY)* *289*, 1202-1206.
- Mellon, I., Spivak, G., and Hanawalt, P. C. (1987). Selective removal of transcription-blocking DNA damage from the transcribed strand of the mammalian DHFR gene. *Cell* *51*, 241-249.
- Melrose, J., Smith, S., and Whitelock, J. (2004). Perlecan immunolocalizes to perichondrial vessels and canals in human fetal cartilaginous primordia in early vascular and matrix

remodeling events associated with diarthrodial joint development. *J Histochem Cytochem* 52, 1405-1413.

Meneguzzi, G., Marinkovich, M. P., Aberdam, D., Pisani, A., Burgeson, R., and Ortonne, J. P. (1992). Kalinin is abnormally expressed in epithelial basement membranes of Herlitz's junctional epidermolysis bullosa patients. *Experimental dermatology* 1, 221-229.

Meng, X., Klement, J. F., Leperi, D. A., Birk, D. E., Sasaki, T., Timpl, R., Uitto, J., and Pulkkinen, L. (2003). Targeted inactivation of murine laminin gamma2-chain gene recapitulates human junctional epidermolysis bullosa. *The Journal of investigative dermatology* 121, 720-731.

Mercurio, A. M. (1995). Laminin receptors: achieving specificity through cooperation. *Trends in cell biology* 5, 419-423.

Mercurio, A. M., and Rabinovitz, I. (2001). Towards a mechanistic understanding of tumor invasion--lessons from the alpha6beta 4 integrin. *Seminars in cancer biology* 11, 129-141.

Mercurio, A. M., Rabinovitz, I., and Shaw, L. M. (2001). The alpha 6 beta 4 integrin and epithelial cell migration. *Current opinion in cell biology* 13, 541-545.

Metzen, E., and Ratcliffe, P. J. (2004). HIF hydroxylation and cellular oxygen sensing. *Biological chemistry* 385, 223-230.

Michel, G., Minet, E., Ernest, I., Roland, I., Durant, F., Remacle, J., and Michiels, C. (2000). A model for the complex between the hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) and its consensus DNA sequence. *Journal of biomolecular structure & dynamics* 18, 169-179.

Michiels, C., Minet, E., Mottet, D., and Raes, M. (2002). Regulation of gene expression by oxygen: NF-kappaB and HIF-1, two extremes. *Free radical biology & medicine* 33, 1231-1242.

Middleton, E., Jr., Kandaswami, C., and Theoharides, T. C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological reviews* 52, 673-751.

Miner, J. H. (2008). Laminins and their roles in mammals. *Microscopy research and technique* 71, 349-356.

Miner, J. H., Cunningham, J., and Sanes, J. R. (1998). Roles for laminin in embryogenesis: exencephaly, syndactyly, and placentopathy in mice lacking the laminin alpha5 chain. *The Journal of cell biology* 143, 1713-1723.

Miner, J. H., and Li, C. (2000). Defective glomerulogenesis in the absence of laminin alpha5 demonstrates a developmental role for the kidney glomerular basement membrane. *Developmental biology* 217, 278-289.

Miner, J. H., Patton, B. L., Lentz, S. I., Gilbert, D. J., Snider, W. D., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., and Sanes, J. R. (1997). The laminin alpha chains: expression, developmental transitions, and chromosomal locations of alpha1-5, identification of

heterotrimeric laminins 8-11, and cloning of a novel alpha3 isoform. *The Journal of cell biology* 137, 685-701.

Miner, J. H., and Yurchenco, P. D. (2004). Laminin functions in tissue morphogenesis. *Annual review of cell and developmental biology* 20, 255-284.

Minet, E., Michel, G., Mottet, D., Raes, M., and Michiels, C. (2001). Transduction pathways involved in Hypoxia-Inducible Factor-1 phosphorylation and activation. *Free radical biology & medicine* 31, 847-855.

Mizushima, H., Miyagi, Y., Kikkawa, Y., Yamanaka, N., Yasumitsu, H., Misugi, K., and Miyazaki, K. (1996). Differential expression of laminin-5/ladsin subunits in human tissues and cancer cell lines and their induction by tumor promoter and growth factors. *Journal of biochemistry* 120, 1196-1202.

Mogford, J. E., Tawil, N., Chen, A., Gies, D., Xia, Y., and Mustoe, T. A. (2002). Effect of age and hypoxia on TGFbeta1 receptor expression and signal transduction in human dermal fibroblasts: impact on cell migration. *Journal of cellular physiology* 190, 259-265.

Moggs, J. G., Yarema, K. J., Essigmann, J. M., and Wood, R. D. (1996). Analysis of incision sites produced by human cell extracts and purified proteins during nucleotide excision repair of a 1,3-intrastrand d(GpTpG)-cisplatin adduct. *The Journal of biological chemistry* 271, 7177-7186.

Mokkapati, S., Baranowsky, A., Mirancea, N., Smyth, N., Breitkreutz, D., and Nischt, R. (2008). Basement membranes in skin are differently affected by lack of nidogen 1 and 2. *The Journal of investigative dermatology* 128, 2259-2267.

Moodycliffe, A. M., Kimber, I., and Norval, M. (1994). Role of tumour necrosis factor-alpha in ultraviolet B light-induced dendritic cell migration and suppression of contact hypersensitivity. *Immunology* 81, 79-84.

Moog, U., de Die-Smulders, C. E., Scheffer, H., van der Vlies, P., Henquet, C. J., and Jonkman, M. F. (1999). Epidermolysis bullosa simplex with mottled pigmentation: clinical aspects and confirmation of the P24L mutation in the KRT5 gene in further patients. *American journal of medical genetics* 86, 376-379.

Mook, O. R., Frederiks, W. M., and Van Noorden, C. J. (2004). The role of gelatinases in colorectal cancer progression and metastasis. *Biochimica et biophysica acta* 1705, 69-89.

Moon, J. O., Welch, T. P., Gonzalez, F. J., and Copple, B. L. (2009). Reduced liver fibrosis in hypoxia-inducible factor-1alpha-deficient mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 296, G582-592.

Moriwaki, S., and Kraemer, K. H. (2001). Xeroderma pigmentosum--bridging a gap between clinic and laboratory. *Photodermatology, photoimmunology & photomedicine* 17, 47-54.

Morliere, P., Moysan, A., and Tirache, I. (1995). Action spectrum for UV-induced lipid peroxidation in cultured human skin fibroblasts. *Free radical biology & medicine* 19, 365-371.

- Mouly, R., Dufourmentel, C., Banzet, P., and Papadopoulos, O. (1980). [Xeroderma pigmentosum. Apropos of 12 surgical cases with malignant degeneration]. *Annales de chirurgie plastique* 25, 117-125.
- Mu, D., Hsu, D. S., and Sancar, A. (1996). Reaction mechanism of human DNA repair excision nuclease. *The Journal of biological chemistry* 271, 8285-8294.
- Muether, P. S., Dell, S., Kociok, N., Zahn, G., Stragies, R., Vossmeier, D., and Jousen, A. M. (2007). The role of integrin alpha5beta1 in the regulation of corneal neovascularization. *Experimental eye research* 85, 356-365.
- Munger, J. S., Huang, X., Kawakatsu, H., Griffiths, M. J., Dalton, S. L., Wu, J., Pittet, J. F., Kaminski, N., Garat, C., Matthay, M. A., *et al.* (1999). The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell* 96, 319-328.
- Murgia, C., Blaikie, P., Kim, N., Dans, M., Petrie, H. T., and Giancotti, F. G. (1998). Cell cycle and adhesion defects in mice carrying a targeted deletion of the integrin beta4 cytoplasmic domain. *The EMBO journal* 17, 3940-3951.
- Murphy, G., Segain, J. P., O'Shea, M., Cockett, M., Ioannou, C., Lefebvre, O., Chambon, P., and Basset, P. (1993). The 28-kDa N-terminal domain of mouse stromelysin-3 has the general properties of a weak metalloproteinase. *The Journal of biological chemistry* 268, 15435-15441.
- Murray, J. C., Stingl, G., Kleinman, H. K., Martin, G. R., and Katz, S. I. (1979). Epidermal cells adhere preferentially to type IV (basement membrane) collagen. *The Journal of cell biology* 80, 197-202.
- Murshed, M., Smyth, N., Miosge, N., Karolat, J., Krieg, T., Paulsson, M., and Nischt, R. (2000). The absence of nidogen 1 does not affect murine basement membrane formation. *Molecular and cellular biology* 20, 7007-7012.
- Muthusamy, V., and Piva, T. J. (2010). The UV response of the skin: a review of the MAPK, NFkappaB and TNFalpha signal transduction pathways. *Archives of dermatological research* 302, 5-17.
- Myers, J. C., Dion, A. S., Abraham, V., and Amenta, P. S. (1996). Type XV collagen exhibits a widespread distribution in human tissues but a distinct localization in basement membrane zones. *Cell and tissue research* 286, 493-505.
- Myers, J. C., Li, D., Bageris, A., Abraham, V., Dion, A. S., and Amenta, P. S. (1997). Biochemical and immunohistochemical characterization of human type XIX defines a novel class of basement membrane zone collagens. *The American journal of pathology* 151, 1729-1740.
- Myllyharju, J., and Kivirikko, K. I. (2001). Collagens and collagen-related diseases. *Annals of medicine* 33, 7-21.

Mylyharju, J., and Kivirikko, K. I. (2004). Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. *Trends Genet* 20, 33-43.

Nakanishi, K., Hiroi, S., Tominaga, S., Aida, S., Kasamatsu, H., Matsuyama, S., Matsuyama, T., and Kawai, T. (2005). Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha protein predicts survival in patients with transitional cell carcinoma of the upper urinary tract. *Clin Cancer Res* 11, 2583-2590.

Nakano, A., Pfindner, E., Hashimoto, I., and Uitto, J. (2000). Herlitz junctional epidermolysis bullosa: novel and recurrent mutations in the LAMB3 gene and the population carrier frequency. *The Journal of investigative dermatology* 115, 493-498.

Namiki, A., Brogi, E., Kearney, M., Kim, E. A., Wu, T., Couffignal, T., Varticovski, L., and Isner, J. M. (1995). Hypoxia induces vascular endothelial growth factor in cultured human endothelial cells. *The Journal of biological chemistry* 270, 31189-31195.

Nawrocki, B., Polette, M., Marchand, V., Monteau, M., Gillery, P., Tournier, J. M., and Birembaut, P. (1997). Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human bronchopulmonary carcinomas: quantitative and morphological analyses. *International journal of cancer* 72, 556-564.

Nguyen, B. P., Gil, S. G., and Carter, W. G. (2000a). Deposition of laminin 5 by keratinocytes regulates integrin adhesion and signaling. *The Journal of biological chemistry* 275, 31896-31907.

Nguyen, B. P., Ren, X. D., Schwartz, M. A., and Carter, W. G. (2001). Ligation of integrin alpha 3beta 1 by laminin 5 at the wound edge activates Rho-dependent adhesion of leading keratinocytes on collagen. *The Journal of biological chemistry* 276, 43860-43870.

Nguyen, B. P., Ryan, M. C., Gil, S. G., and Carter, W. G. (2000b). Deposition of laminin 5 in epidermal wounds regulates integrin signaling and adhesion. *Current opinion in cell biology* 12, 554-562.

Nguyen, N. M., Miner, J. H., Pierce, R. A., and Senior, R. M. (2002). Laminin alpha 5 is required for lobar septation and visceral pleural basement membrane formation in the developing mouse lung. *Developmental biology* 246, 231-244.

Nguyen, N. M., Pulkkinen, L., Schlueter, J. A., Meneguzzi, G., Uitto, J., and Senior, R. M. (2006). Lung development in laminin gamma2 deficiency: abnormal tracheal hemidesmosomes with normal branching morphogenesis and epithelial differentiation. *Respiratory research* 7, 28.

Nguyen, Q., Willenbrock, F., Cockett, M. I., O'Shea, M., Docherty, A. J., and Murphy, G. (1994). Different domain interactions are involved in the binding of tissue inhibitors of metalloproteinases to stromelysin-1 and gelatinase A. *Biochemistry* 33, 2089-2095.

Niinikoski, J., Grislis, G., and Hunt, T. K. (1972). Respiratory gas tensions and collagen in infected wounds. *Annals of surgery* 175, 588-593.

- Nikolopoulos, S. N., Blaikie, P., Yoshioka, T., Guo, W., and Giancotti, F. G. (2004). Integrin beta4 signaling promotes tumor angiogenesis. *Cancer cell* 6, 471-483.
- Nikolopoulos, S. N., Blaikie, P., Yoshioka, T., Guo, W., Puri, C., Tacchetti, C., and Giancotti, F. G. (2005). Targeted deletion of the integrin beta4 signaling domain suppresses laminin-5-dependent nuclear entry of mitogen-activated protein kinases and NF-kappaB, causing defects in epidermal growth and migration. *Molecular and cellular biology* 25, 6090-6102.
- Nishigori, C., Yarosh, D. B., Donawho, C., and Kripke, M. L. (1996). The immune system in ultraviolet carcinogenesis. *The journal of investigative dermatology Symposium proceedings / the Society for Investigative Dermatology, Inc* 1, 143-146.
- Nishimura, S. L., Sheppard, D., and Pytela, R. (1994). Integrin alpha v beta 8. Interaction with vitronectin and functional divergence of the beta 8 cytoplasmic domain. *The Journal of biological chemistry* 269, 28708-28715.
- Nishiuchi, R., Takagi, J., Hayashi, M., Ido, H., Yagi, Y., Sanzen, N., Tsuji, T., Yamada, M., and Sekiguchi, K. (2006). Ligand-binding specificities of laminin-binding integrins: a comprehensive survey of laminin-integrin interactions using recombinant alpha3beta1, alpha6beta1, alpha7beta1 and alpha6beta4 integrins. *Matrix Biol* 25, 189-197.
- Noakes, P. G., Gautam, M., Mudd, J., Sanes, J. R., and Merlie, J. P. (1995a). Aberrant differentiation of neuromuscular junctions in mice lacking s-laminin/laminin beta 2. *Nature* 374, 258-262.
- Noakes, P. G., Miner, J. H., Gautam, M., Cunningham, J. M., Sanes, J. R., and Merlie, J. P. (1995b). The renal glomerulus of mice lacking s-laminin/laminin beta 2: nephrosis despite molecular compensation by laminin beta 1. *Nature genetics* 10, 400-406.
- Nordemar, S., Kronenwett, U., Auer, G., Hogmo, A., Lindholm, J., Edstrom, S., Tryggvasson, K., Linder, S., and Munck-Wikland, E. (2001). Laminin-5 as a predictor of invasiveness in cancer in situ lesions of the larynx. *Anticancer research* 21, 509-512.
- Nordstrom, B., Einhorn, N., Silfversward, C., Sjovall, K., Tryggvason, K., and Auer, G. (2002). Laminin-5 gamma 2 chain as an invasivity marker for uni- and multifocal lesions in the lower anogenital tract. *Int J Gynecol Cancer* 12, 105-109.
- Norman, J. T., Clark, I. M., and Garcia, P. L. (2000). Hypoxia promotes fibrogenesis in human renal fibroblasts. *Kidney international* 58, 2351-2366.
- Norval, M., Gibbs, N. K., and Gilmour, J. (1995). The role of urocanic acid in UV-induced immunosuppression: recent advances (1992-1994). *Photochemistry and photobiology* 62, 209-217.
- Nouspikel, T. (2009). DNA repair in mammalian cells : Nucleotide excision repair: variations on versatility. *Cell Mol Life Sci* 66, 994-1009.
- Nugent, M. A., Nugent, H. M., Iozzo, R. V., Sanchack, K., and Edelman, E. R. (2000). Perlecan is required to inhibit thrombosis after deep vascular injury and contributes to

endothelial cell-mediated inhibition of intimal hyperplasia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 6722-6727.

Nys, K., Van Laethem, A., Michiels, C., Rubio, N., Piette, J. G., Garmyn, M., and Agostinis, P. A p38(MAPK)/HIF-1 Pathway Initiated by UVB Irradiation Is Required to Induce Noxa and Apoptosis of Human Keratinocytes. *The Journal of investigative dermatology*.

OConnor, K. L., Nguyen, B. K., and Mercurio, A. M. (2000). RhoA function in lamellae formation and migration is regulated by the alpha6beta4 integrin and cAMP metabolism. *The Journal of cell biology* 148, 253-258.

O'Toole, E. A. (2001). Extracellular matrix and keratinocyte migration. *Clinical and experimental dermatology* 26, 525-530.

O'Toole, E. A., Marinkovich, M. P., Peavey, C. L., Amieva, M. R., Furthmayr, H., Mustoe, T. A., and Woodley, D. T. (1997). Hypoxia increases human keratinocyte motility on connective tissue. *The Journal of clinical investigation* 100, 2881-2891.

Oda, K., Matsuoka, Y., Funahashi, A., and Kitano, H. (2005). A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling. *Molecular systems biology* 1, 2005 0010.

Ohh, M., Park, C. W., Ivan, M., Hoffman, M. A., Kim, T. Y., Huang, L. E., Pavletich, N., Chau, V., and Kaelin, W. G. (2000). Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the beta-domain of the von Hippel-Lindau protein. *Nature cell biology* 2, 423-427.

Ohuchi, E., Imai, K., Fujii, Y., Sato, H., Seiki, M., and Okada, Y. (1997). Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules. *The Journal of biological chemistry* 272, 2446-2451.

Olsson, A. K., Dimberg, A., Kreuger, J., and Claesson-Welsh, L. (2006). VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 359-371.

Ono, Y., Nakanishi, Y., Ino, Y., Niki, T., Yamada, T., Yoshimura, K., Saikawa, M., Nakajima, T., and Hirohashi, S. (1999). Clinicopathologic significance of laminin-5 gamma2 chain expression in squamous cell carcinoma of the tongue: immunohistochemical analysis of 67 lesions. *Cancer* 85, 2315-2321.

Orian-Rousseau, V., Aberdam, D., Rousselle, P., Messent, A., Gavrilovic, J., Meneguzzi, G., Kedinger, M., and Simon-Assmann, P. (1998). Human colonic cancer cells synthesize and adhere to laminin-5. Their adhesion to laminin-5 involves multiple receptors among which is integrin alpha2beta1. *Journal of cell science* 111 (Pt 14), 1993-2004.

Ortega, N., and Werb, Z. (2002). New functional roles for non-collagenous domains of basement membrane collagens. *Journal of cell science* 115, 4201-4214.

Ostadal, B., Kolar, F., Pelouch, V., and Widimsky, J. (1995). Ontogenetic differences in cardiopulmonary adaptation to chronic hypoxia. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* 44, 45-51.

Owen, C. A., Hu, Z., Lopez-Otin, C., and Shapiro, S. D. (2004). Membrane-bound matrix metalloproteinase-8 on activated polymorphonuclear cells is a potent, tissue inhibitor of metalloproteinase-resistant collagenase and serpinase. *J Immunol* *172*, 7791-7803.

Owens, D. M., and Watt, F. M. (2001). Influence of beta1 integrins on epidermal squamous cell carcinoma formation in a transgenic mouse model: alpha3beta1, but not alpha2beta1, suppresses malignant conversion. *Cancer research* *61*, 5248-5254.

Oyoshi, M. K., Murphy, G. F., and Geha, R. S. (2009). Filaggrin-deficient mice exhibit TH17-dominated skin inflammation and permissiveness to epicutaneous sensitization with protein antigen. *The Journal of allergy and clinical immunology* *124*, 485-493, 493 e481.

Palmer, E. L., Ruegg, C., Ferrando, R., Pytela, R., and Sheppard, D. (1993). Sequence and tissue distribution of the integrin alpha 9 subunit, a novel partner of beta 1 that is widely distributed in epithelia and muscle. *The Journal of cell biology* *123*, 1289-1297.

Papakonstantinou, E., Aletras, A. J., Roth, M., Tamm, M., and Karakiulakis, G. (2003). Hypoxia modulates the effects of transforming growth factor-beta isoforms on matrix-formation by primary human lung fibroblasts. *Cytokine* *24*, 25-35.

Pardo, B., Gomez-Gonzalez, B., and Aguilera, A. (2009). DNA repair in mammalian cells: DNA double-strand break repair: how to fix a broken relationship. *Cell Mol Life Sci* *66*, 1039-1056.

Parikka, M., Kainulainen, T., Tasanen, K., Bruckner-Tuderman, L., and Salo, T. (2001). Altered expression of collagen XVII in ameloblastomas and basal cell carcinomas. *J Oral Pathol Med* *30*, 589-595.

Parks, D., Bolinger, R., and Mann, K. (1997). Redox state regulates binding of p53 to sequence-specific DNA, but not to non-specific or mismatched DNA. *Nucleic acids research* *25*, 1289-1295.

Parks, W. C., Wilson, C. L., and Lopez-Boado, Y. S. (2004). Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nature reviews* *4*, 617-629.

Patterson, M. L., Atkinson, S. J., Knauper, V., and Murphy, G. (2001). Specific collagenolysis by gelatinase A, MMP-2, is determined by the hemopexin domain and not the fibronectin-like domain. *FEBS letters* *503*, 158-162.

Pattison, D. I., and Davies, M. J. (2006). Actions of ultraviolet light on cellular structures. *Exs*, 131-157.

Patton, B. L., Cunningham, J. M., Thyboll, J., Kortessmaa, J., Westerblad, H., Edstrom, L., Tryggvason, K., and Sanes, J. R. (2001). Properly formed but improperly localized synaptic specializations in the absence of laminin alpha4. *Nature neuroscience* *4*, 597-604.

Pedchenko, V., Zent, R., and Hudson, B. G. (2004). Alpha(v)beta3 and alpha(v)beta5 integrins bind both the proximal RGD site and non-RGD motifs within noncollagenous (NC1)

domain of the alpha3 chain of type IV collagen: implication for the mechanism of endothelial cell adhesion. *The Journal of biological chemistry* 279, 2772-2780.

Pei, D. (1999). Leukolysin/MMP25/MT6-MMP: a novel matrix metalloproteinase specifically expressed in the leukocyte lineage. *Cell research* 9, 291-303.

Pei, D., Majmudar, G., and Weiss, S. J. (1994). Hydrolytic inactivation of a breast carcinoma cell-derived serpin by human stromelysin-3. *The Journal of biological chemistry* 269, 25849-25855.

Perez, S., Sargent, O., Morel, P., Chevanne, M., Dubos, M. P., Cillard, P., and Cillard, J. (1995). [Kinetics of lipid peroxidation induced by UV beta rays in human keratinocyte and fibroblast cultures]. *Comptes rendus des seances de la Societe de biologie et de ses filiales* 189, 453-465.

Perkins, G. R., Marshall, C. J., and Collins, M. K. (1996). The role of MAP kinase kinase in interleukin-3 stimulation of proliferation. *Blood* 87, 3669-3675.

Perry, J. J., Cotner-Gohara, E., Ellenberger, T., and Tainer, J. A. (2010). Structural dynamics in DNA damage signaling and repair. *Current opinion in structural biology*.

Petit Frere, C., Clingen, P. H., Arlett, C. F., and Green, M. H. (1996). Inhibition of RNA and DNA synthesis in UV-irradiated normal human fibroblasts is correlated with pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproduct formation. *Mutation research* 354, 87-94.

Pfander, D., Cramer, T., Schipani, E., and Johnson, R. S. (2003). HIF-1alpha controls extracellular matrix synthesis by epiphyseal chondrocytes. *Journal of cell science* 116, 1819-1826.

Pfendner, E., Rouan, F., and Uitto, J. (2005). Progress in epidermolysis bullosa: the phenotypic spectrum of plectin mutations. *Experimental dermatology* 14, 241-249.

Pilcher, B. K., Dumin, J., Schwartz, M. J., Mast, B. A., Schultz, G. S., Parks, W. C., and Welgus, H. G. (1999). Keratinocyte collagenase-1 expression requires an epidermal growth factor receptor autocrine mechanism. *The Journal of biological chemistry* 274, 10372-10381.

Pillers, D. A., Kempton, J. B., Duncan, N. M., Pang, J., Dwinnell, S. J., and Trune, D. R. (2002). Hearing loss in the laminin-deficient dy mouse model of congenital muscular dystrophy. *Molecular genetics and metabolism* 76, 217-224.

Piwko-Czuchra, A., Koegel, H., Meyer, H., Bauer, M., Werner, S., Brakebusch, C., and Fassler, R. (2009). Beta1 integrin-mediated adhesion signalling is essential for epidermal progenitor cell expansion. *PloS one* 4, e5488.

Pognonec, P., Kato, H., and Roeder, R. G. (1992). The helix-loop-helix/leucine repeat transcription factor USF can be functionally regulated in a redox-dependent manner. *The Journal of biological chemistry* 267, 24563-24567.

Polette, M., and Birembaut, P. (1998). Membrane-type metalloproteinases in tumor invasion. *The international journal of biochemistry & cell biology* 30, 1195-1202.

Polette, M., Gilles, C., Marchand, V., Seiki, M., Tournier, J. M., and Birembaut, P. (1997). Induction of membrane-type matrix metalloproteinase 1 (MT1-MMP) expression in human fibroblasts by breast adenocarcinoma cells. *Clinical & experimental metastasis* 15, 157-163.

Ponce, M. L., Nomizu, M., and Kleinman, H. K. (2001). An angiogenic laminin site and its antagonist bind through the alpha(v)beta3 and alpha5beta1 integrins. *Faseb J* 15, 1389-1397.

Pouyssegur, J., Dayan, F., and Mazure, N. M. (2006). Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature* 441, 437-443.

Powers, C. J., McLeskey, S. W., and Wellstein, A. (2000). Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocrine-related cancer* 7, 165-197.

Prunieras, M. (1979). Epidermal cell cultures as models for living epidermis. *The Journal of investigative dermatology* 73, 135-137.

Pugh, C. W., O'Rourke, J. F., Nagao, M., Gleadle, J. M., and Ratcliffe, P. J. (1997). Activation of hypoxia-inducible factor-1; definition of regulatory domains within the alpha subunit. *The Journal of biological chemistry* 272, 11205-11214.

Pulkkinen, L., Christiano, A. M., Gerecke, D., Wagman, D. W., Burgeson, R. E., Pittelkow, M. R., and Uitto, J. (1994). A homozygous nonsense mutation in the beta 3 chain gene of laminin 5 (LAMB3) in Herlitz junctional epidermolysis bullosa. *Genomics* 24, 357-360.

Pulkkinen, L., and Uitto, J. (1998). Hemidesmosomal variants of epidermolysis bullosa. Mutations in the alpha6beta4 integrin and the 180-kD bullous pemphigoid antigen/type XVII collagen genes. *Experimental dermatology* 7, 46-64.

Pulkkinen, L., and Uitto, J. (1999). Mutation analysis and molecular genetics of epidermolysis bullosa. *Matrix Biol* 18, 29-42.

Pyke, C., Salo, S., Ralfkiaer, E., Romer, J., Dano, K., and Tryggvason, K. (1995). Laminin-5 is a marker of invading cancer cells in some human carcinomas and is coexpressed with the receptor for urokinase plasminogen activator in budding cancer cells in colon adenocarcinomas. *Cancer research* 55, 4132-4139.

Raghavan, S., Bauer, C., Mundschau, G., Li, Q., and Fuchs, E. (2000). Conditional ablation of beta1 integrin in skin. Severe defects in epidermal proliferation, basement membrane formation, and hair follicle invagination. *The Journal of cell biology* 150, 1149-1160.

Rapp, A., and Greulich, K. O. (2004). After double-strand break induction by UV-A, homologous recombination and nonhomologous end joining cooperate at the same DSB if both systems are available. *Journal of cell science* 117, 4935-4945.

Ravanat, J. L., Douki, T., and Cadet, J. (2001). Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. *Journal of photochemistry and photobiology* 63, 88-102.

- Ravanti, L., and Kahari, V. M. (2000). Matrix metalloproteinases in wound repair (review). *International journal of molecular medicine* 6, 391-407.
- Raymond, K., Kreft, M., Song, J. Y., Janssen, H., and Sonnenberg, A. (2007). Dual Role of alpha6beta4 integrin in epidermal tumor growth: tumor-suppressive versus tumor-promoting function. *Molecular biology of the cell* 18, 4210-4221.
- Rebustini, I. T., Patel, V. N., Stewart, J. S., Layvey, A., Georges-Labouesse, E., Miner, J. H., and Hoffman, M. P. (2007). Laminin alpha5 is necessary for submandibular gland epithelial morphogenesis and influences FGFR expression through beta1 integrin signaling. *Developmental biology* 308, 15-29.
- Remy, L., and Trespeuch, C. (2005). [Matrilysin-1 and cancer pathology]. *Med Sci (Paris)* 21, 498-502.
- Rezvani, H. R., Dedieu, S., North, S., Belloc, F., Rossignol, R., Letellier, T., de Verneuil, H., Taieb, A., and Mazurier, F. (2007). Hypoxia-inducible factor-1alpha, a key factor in the keratinocyte response to UVB exposure. *The Journal of biological chemistry* 282, 16413-16422.
- Rezvani, H. R., Mahfouf, W., Ali, N., Chemin, C., Ged, C., Kim, A. L., de Verneuil, H., Taieb, A., Bickers, D. R., and Mazurier, F. (2010). Hypoxia-inducible factor-1alpha regulates the expression of nucleotide excision repair proteins in keratinocytes. *Nucleic acids research* 38, 797-809.
- Richard, D. E., Berra, E., Gothie, E., Roux, D., and Pouyssegur, J. (1999). p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. *The Journal of biological chemistry* 274, 32631-32637.
- Rio, M. C. (2005). From a unique cell to metastasis is a long way to go: clues to stromelysin-3 participation. *Biochimie* 87, 299-306.
- Robbins, J. H., Brumback, R. A., Mendiones, M., Barrett, S. F., Carl, J. R., Cho, S., Denckla, M. B., Ganges, M. B., Gerber, L. H., Guthrie, R. A., and et al. (1991). Neurological disease in xeroderma pigmentosum. Documentation of a late onset type of the juvenile onset form. *Brain* 114 (Pt 3), 1335-1361.
- Robbins, J. H., Brumback, R. A., and Moshell, A. N. (1993). Clinically asymptomatic xeroderma pigmentosum neurological disease in an adult: evidence for a neurodegeneration in later life caused by defective DNA repair. *European neurology* 33, 188-190.
- Robertson, A. B., Klungland, A., Rognes, T., and Leiros, I. (2009). DNA repair in mammalian cells: Base excision repair: the long and short of it. *Cell Mol Life Sci* 66, 981-993.
- Robinson, A., Keely, S., Karhausen, J., Gerich, M. E., Furuta, G. T., and Colgan, S. P. (2008). Mucosal protection by hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase inhibition. *Gastroenterology* 134, 145-155.

- Rohwer, N., Welzel, M., Daskalow, K., Pfander, D., Wiedenmann, B., Detjen, K., and Cramer, T. (2008). Hypoxia-inducible factor 1alpha mediates anoikis resistance via suppression of alpha5 integrin. *Cancer research* 68, 10113-10120.
- Romero, M. R., Carroll, J. M., and Watt, F. M. (1999). Analysis of cultured keratinocytes from a transgenic mouse model of psoriasis: effects of suprabasal integrin expression on keratinocyte adhesion, proliferation and terminal differentiation. *Experimental dermatology* 8, 53-67.
- Rosette, C., and Karin, M. (1996). Ultraviolet light and osmotic stress: activation of the JNK cascade through multiple growth factor and cytokine receptors. *Science (New York, NY)* 274, 1194-1197.
- Rossignol, F., Vache, C., and Clottes, E. (2002). Natural antisense transcripts of hypoxia-inducible factor 1alpha are detected in different normal and tumour human tissues. *Gene* 299, 135-140.
- Roth, J. M., Akalu, A., Zelmanovich, A., Policarpio, D., Ng, B., MacDonald, S., Formenti, S., Liebes, L., and Brooks, P. C. (2005). Recombinant alpha2(IV)NC1 domain inhibits tumor cell-extracellular matrix interactions, induces cellular senescence, and inhibits tumor growth in vivo. *The American journal of pathology* 166, 901-911.
- Rouan, F., Pulkkinen, L., Meneguzzi, G., Laforgia, S., Hyde, P., Kim, D. U., Richard, G., and Uitto, J. (2000). Epidermolysis bullosa: novel and de novo premature termination codon and deletion mutations in the plectin gene predict late-onset muscular dystrophy. *The Journal of investigative dermatology* 114, 381-387.
- Rubin, K., Hook, M., Obrink, B., and Timpl, R. (1981). Substrate adhesion of rat hepatocytes: mechanism of attachment to collagen substrates. *Cell* 24, 463-470.
- Ryan, H. E., Lo, J., and Johnson, R. S. (1998). HIF-1 alpha is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *The EMBO journal* 17, 3005-3015.
- Ryan, M. C., Christiano, A. M., Engvall, E., Wewer, U. M., Miner, J. H., Sanes, J. R., and Burgeson, R. E. (1996). The functions of laminins: lessons from in vivo studies. *Matrix Biol* 15, 369-381.
- Ryan, M. C., Lee, K., Miyashita, Y., and Carter, W. G. (1999). Targeted disruption of the LAMA3 gene in mice reveals abnormalities in survival and late stage differentiation of epithelial cells. *The Journal of cell biology* 145, 1309-1323.
- Ryu, M. H., Park, H. M., Chung, J., Lee, C. H., and Park, H. R. (2010). Hypoxia-inducible factor-1alpha mediates oral squamous cell carcinoma invasion via upregulation of alpha5 integrin and fibronectin. *Biochemical and biophysical research communications* 393, 11-15.
- Ryu, O. H., Fincham, A. G., Hu, C. C., Zhang, C., Qian, Q., Bartlett, J. D., and Simmer, J. P. (1999). Characterization of recombinant pig enamelysin activity and cleavage of recombinant pig and mouse amelogenins. *Journal of dental research* 78, 743-750.

Ryynanen, M., Knowlton, R. G., Parente, M. G., Chung, L. C., Chu, M. L., and Uitto, J. (1991). Human type VII collagen: genetic linkage of the gene (COL7A1) on chromosome 3 to dominant dystrophic epidermolysis bullosa. *American journal of human genetics* 49, 797-803.

Saarela, J., Rehn, M., Oikarinen, A., Autio-Harmainen, H., and Pihlajaniemi, T. (1998). The short and long forms of type XVIII collagen show clear tissue specificities in their expression and location in basement membrane zones in humans. *The American journal of pathology* 153, 611-626.

Saarialho-Kere, U., Kerkela, E., Jahkola, T., Suomela, S., Keski-Oja, J., and Lohi, J. (2002). Epilysin (MMP-28) expression is associated with cell proliferation during epithelial repair. *The Journal of investigative dermatology* 119, 14-21.

Saarialho-Kere, U. K., Crouch, E. C., and Parks, W. C. (1995). Matrix metalloproteinase matrilysin is constitutively expressed in adult human exocrine epithelium. *The Journal of investigative dermatology* 105, 190-196.

Sabeh, F., Ota, I., Holmbeck, K., Birkedal-Hansen, H., Soloway, P., Balbin, M., Lopez-Otin, C., Shapiro, S., Inada, M., Krane, S., *et al.* (2004). Tumor cell traffic through the extracellular matrix is controlled by the membrane-anchored collagenase MT1-MMP. *The Journal of cell biology* 167, 769-781.

Sadowski, T., Dietrich, S., Koschinsky, F., Ludwig, A., Proksch, E., Titz, B., and Sedlacek, R. (2005). Matrix metalloproteinase 19 processes the laminin 5 gamma 2 chain and induces epithelial cell migration. *Cell Mol Life Sci* 62, 870-880.

Sadowski, T., Dietrich, S., Koschinsky, F., and Sedlacek, R. (2003). Matrix metalloproteinase 19 regulates insulin-like growth factor-mediated proliferation, migration, and adhesion in human keratinocytes through proteolysis of insulin-like growth factor binding protein-3. *Molecular biology of the cell* 14, 4569-4580.

Safran, M., and Kaelin, W. G., Jr. (2003). HIF hydroxylation and the mammalian oxygen-sensing pathway. *The Journal of clinical investigation* 111, 779-783.

Salceda, S., and Caro, J. (1997). Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *The Journal of biological chemistry* 272, 22642-22647.

Salmivirta, K., Talts, J. F., Olsson, M., Sasaki, T., Timpl, R., and Ekblom, P. (2002). Binding of mouse nidogen-2 to basement membrane components and cells and its expression in embryonic and adult tissues suggest complementary functions of the two nidogens. *Experimental cell research* 279, 188-201.

Salo, T., Makela, M., Kylmaniemi, M., Autio-Harmainen, H., and Larjava, H. (1994). Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 during early human wound healing. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 70, 176-182.

- Sang, N., Stiehl, D. P., Bohensky, J., Leshchinsky, I., Srinivas, V., and Caro, J. (2003). MAPK signaling up-regulates the activity of hypoxia-inducible factors by its effects on p300. *The Journal of biological chemistry* 278, 14013-14019.
- Santoro, M. M., and Gaudino, G. (2005). Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing. *Experimental cell research* 304, 274-286.
- Santoro, S. A. (1986). Identification of a 160,000 dalton platelet membrane protein that mediates the initial divalent cation-dependent adhesion of platelets to collagen. *Cell* 46, 913-920.
- Sasaki, T. (1992). The effects of basic fibroblast growth factor and doxorubicin on cultured human skin fibroblasts: relevance to wound healing. *The Journal of dermatology* 19, 664-666.
- Sasaki, T., Forsberg, E., Bloch, W., Addicks, K., Fassler, R., and Timpl, R. (1998). Deficiency of beta 1 integrins in teratoma interferes with basement membrane assembly and laminin-1 expression. *Experimental cell research* 238, 70-81.
- Sasaki, T., and Timpl, R. (2001). Domain IVa of laminin alpha5 chain is cell-adhesive and binds beta1 and alphaVbeta3 integrins through Arg-Gly-Asp. *FEBS letters* 509, 181-185.
- Sato, H., Takino, T., Okada, Y., Cao, J., Shinagawa, A., Yamamoto, E., and Seiki, M. (1994). A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature* 370, 61-65.
- Savoia, P., Trusolino, L., Pepino, E., Cremona, O., and Marchisio, P. C. (1993). Expression and topography of integrins and basement membrane proteins in epidermal carcinomas: basal but not squamous cell carcinomas display loss of alpha 6 beta 4 and BM-600/nicein. *The Journal of investigative dermatology* 101, 352-358.
- Scharer, O. D. (2008). XPG: its products and biological roles. *Advances in experimental medicine and biology* 637, 83-92.
- Scheele, S., Nystrom, A., Durbeej, M., Talts, J. F., Ekblom, M., and Ekblom, P. (2007). Laminin isoforms in development and disease. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 85, 825-836.
- Scheid, A., Wenger, R. H., Schaffer, L., Camenisch, I., Distler, O., Ferenc, A., Cristina, H., Ryan, H. E., Johnson, R. S., Wagner, K. F., *et al.* (2002). Physiologically low oxygen concentrations in fetal skin regulate hypoxia-inducible factor 1 and transforming growth factor-beta3. *Faseb J* 16, 411-413.
- Schmid, T., Zhou, J., and Brune, B. (2004). HIF-1 and p53: communication of transcription factors under hypoxia. *Journal of cellular and molecular medicine* 8, 423-431.
- Schnapp, L. M., Hatch, N., Ramos, D. M., Klimanskaya, I. V., Sheppard, D., and Pytela, R. (1995). The human integrin alpha 8 beta 1 functions as a receptor for tenascin, fibronectin, and vitronectin. *The Journal of biological chemistry* 270, 23196-23202.

Schofield, C. J., and Zhang, Z. (1999). Structural and mechanistic studies on 2-oxoglutarate-dependent oxygenases and related enzymes. *Current opinion in structural biology* 9, 722-731.

Schreck, R., Albermann, K., and Baeuerle, P. A. (1992). Nuclear factor kappa B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review). *Free radical research communications* 17, 221-237.

Schumann, H., Baetge, J., Tasanen, K., Wojnarowska, F., Schacke, H., Zillikens, D., and Bruckner-Tuderman, L. (2000). The shed ectodomain of collagen XVII/BP180 is targeted by autoantibodies in different blistering skin diseases. *The American journal of pathology* 156, 685-695.

Schumann, H., Hammami-Hauasli, N., Pulkkinen, L., Mauviel, A., Kuster, W., Luthi, U., Owaribe, K., Uitto, J., and Bruckner-Tuderman, L. (1997). Three novel homozygous point mutations and a new polymorphism in the COL17A1 gene: relation to biological and clinical phenotypes of junctional epidermolysis bullosa. *American journal of human genetics* 60, 1344-1353.

Schwarz, T. (2005). Mechanisms of UV-induced immunosuppression. *The Keio journal of medicine* 54, 165-171.

Schymeinsky, J., Nedbal, S., Miosge, N., Poschl, E., Rao, C., Beier, D. R., Skarnes, W. C., Timpl, R., and Bader, B. L. (2002). Gene structure and functional analysis of the mouse nidogen-2 gene: nidogen-2 is not essential for basement membrane formation in mice. *Molecular and cellular biology* 22, 6820-6830.

Sedlacek, R., Mauch, S., Kolb, B., Schatzlein, C., Eibel, H., Peter, H. H., Schmitt, J., and Krawinkel, U. (1998). Matrix metalloproteinase MMP-19 (RASI-1) is expressed on the surface of activated peripheral blood mononuclear cells and is detected as an autoantigen in rheumatoid arthritis. *Immunobiology* 198, 408-423.

Sehgal, B. U., DeBiase, P. J., Matzno, S., Chew, T. L., Claiborne, J. N., Hopkinson, S. B., Russell, A., Marinkovich, M. P., and Jones, J. C. (2006). Integrin beta4 regulates migratory behavior of keratinocytes by determining laminin-332 organization. *The Journal of biological chemistry* 281, 35487-35498.

Sekine-Aizawa, Y., Hama, E., Watanabe, K., Tsubuki, S., Kanai-Azuma, M., Kanai, Y., Arai, H., Aizawa, H., Iwata, N., and Saido, T. C. (2001). Matrix metalloproteinase (MMP) system in brain: identification and characterization of brain-specific MMP highly expressed in cerebellum. *The European journal of neuroscience* 13, 935-948.

Selby, C. P., and Sancar, A. (1997). Human transcription-repair coupling factor CSB/ERCC6 is a DNA-stimulated ATPase but is not a helicase and does not disrupt the ternary transcription complex of stalled RNA polymerase II. *The Journal of biological chemistry* 272, 1885-1890.

Semenza, G. L. (1999). Perspectives on oxygen sensing. *Cell* 98, 281-284.

Semenza, G. L. (2000). HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol* 88, 1474-1480.

- Semenza, G. L. (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nature reviews* 3, 721-732.
- Semenza, G. L. (2004). Intratumoral hypoxia, radiation resistance, and HIF-1. *Cancer cell* 5, 405-406.
- Semenza, G. L., Neufeldt, M. K., Chi, S. M., and Antonarakis, S. E. (1991). Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 5680-5684.
- Semenza, G. L., and Wang, G. L. (1992). A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Molecular and cellular biology* 12, 5447-5454.
- Sen, C. K., Khanna, S., Venojarvi, M., Trikha, P., Ellison, E. C., Hunt, T. K., and Roy, S. (2002). Copper-induced vascular endothelial growth factor expression and wound healing. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282, H1821-1827.
- Senger, D. R., Claffey, K. P., Benes, J. E., Perruzzi, C. A., Sergiou, A. P., and Detmar, M. (1997). Angiogenesis promoted by vascular endothelial growth factor: regulation through alpha1beta1 and alpha2beta1 integrins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 13612-13617.
- Setty, S., Kim, Y., Fields, G. B., Clegg, D. O., Wayner, E. A., and Tsilibary, E. C. (1998). Interactions of type IV collagen and its domains with human mesangial cells. *The Journal of biological chemistry* 273, 12244-12249.
- Shapiro, S. D., Kobayashi, D. K., and Ley, T. J. (1993). Cloning and characterization of a unique elastolytic metalloproteinase produced by human alveolar macrophages. *The Journal of biological chemistry* 268, 23824-23829.
- Shimada, K., Nakamura, M., Ishida, E., Kishi, M., and Konishi, N. (2003). Roles of p38- and c-jun NH2-terminal kinase-mediated pathways in 2-methoxyestradiol-induced p53 induction and apoptosis. *Carcinogenesis* 24, 1067-1075.
- Shimizu, H., Takizawa, Y., Pulkkinen, L., Murata, S., Kawai, M., Hachisuka, H., Udono, M., Uitto, J., and Nishikawa, T. (1999). Epidermolysis bullosa simplex associated with muscular dystrophy: phenotype-genotype correlations and review of the literature. *Journal of the American Academy of Dermatology* 41, 950-956.
- Shinto, E., Tsuda, H., Ueno, H., Hashiguchi, Y., Hase, K., Tamai, S., Mochizuki, H., Inazawa, J., and Matsubara, O. (2005). Prognostic implication of laminin-5 gamma 2 chain expression in the invasive front of colorectal cancers, disclosed by area-specific four-point tissue microarrays. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 85, 257-266.
- Shibley, J. M., Wesselschmidt, R. L., Kobayashi, D. K., Ley, T. J., and Shapiro, S. D. (1996). Metalloelastase is required for macrophage-mediated proteolysis and matrix invasion in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 3942-3946.

- Shiraha, H., Glading, A., Gupta, K., and Wells, A. (1999). IP-10 inhibits epidermal growth factor-induced motility by decreasing epidermal growth factor receptor-mediated calpain activity. *The Journal of cell biology* *146*, 243-254.
- Shivji, M. K., Podust, V. N., Hubscher, U., and Wood, R. D. (1995). Nucleotide excision repair DNA synthesis by DNA polymerase epsilon in the presence of PCNA, RFC, and RPA. *Biochemistry* *34*, 5011-5017.
- Shreedhar, V., Giese, T., Sung, V. W., and Ullrich, S. E. (1998). A cytokine cascade including prostaglandin E2, IL-4, and IL-10 is responsible for UV-induced systemic immune suppression. *J Immunol* *160*, 3783-3789.
- Shyu, K. G., Hsu, F. L., Wang, M. J., Wang, B. W., and Lin, S. (2007). Hypoxia-inducible factor 1alpha regulates lung adenocarcinoma cell invasion. *Experimental cell research* *313*, 1181-1191.
- Simon, M. M., Aragane, Y., Schwarz, A., Luger, T. A., and Schwarz, T. (1994). UVB light induces nuclear factor kappa B (NF kappa B) activity independently from chromosomal DNA damage in cell-free cytosolic extracts. *The Journal of investigative dermatology* *102*, 422-427.
- Singer, A. J., and Clark, R. A. (1999). Cutaneous wound healing. *The New England journal of medicine* *341*, 738-746.
- Skyldberg, B., Salo, S., Eriksson, E., Aspenblad, U., Moberger, B., Tryggvason, K., and Auer, G. (1999). Laminin-5 as a marker of invasiveness in cervical lesions. *Journal of the National Cancer Institute* *91*, 1882-1887.
- Smyth, N., Vatansever, H. S., Murray, P., Meyer, M., Frie, C., Paulsson, M., and Edgar, D. (1999). Absence of basement membranes after targeting the LAMC1 gene results in embryonic lethality due to failure of endoderm differentiation. *The Journal of cell biology* *144*, 151-160.
- Sogabe, Y., Abe, M., Yokoyama, Y., and Ishikawa, O. (2006). Basic fibroblast growth factor stimulates human keratinocyte motility by Rac activation. *Wound Repair Regen* *14*, 457-462.
- Sopata, I., and Danciewicz, A. M. (1974). Presence of a gelatin-specific proteinase and its latent form in human leucocytes. *Biochimica et biophysica acta* *370*, 510-523.
- Sounni, N. E., Devy, L., Hajitou, A., Frankenne, F., Munaut, C., Gilles, C., Deroanne, C., Thompson, E. W., Foidart, J. M., and Noel, A. (2002). MT1-MMP expression promotes tumor growth and angiogenesis through an up-regulation of vascular endothelial growth factor expression. *Faseb J* *16*, 555-564.
- Spangenberg, C., Lausch, E. U., Trost, T. M., Prawitt, D., May, A., Keppler, R., Fees, S. A., Reutzel, D., Bell, C., Schmitt, S., *et al.* (2006). ERBB2-mediated transcriptional up-regulation of the alpha5beta1 integrin fibronectin receptor promotes tumor cell survival under adverse conditions. *Cancer research* *66*, 3715-3725.

Staatz, W. D., Walsh, J. J., Pexton, T., and Santoro, S. A. (1990). The alpha 2 beta 1 integrin cell surface collagen receptor binds to the alpha 1 (I)-CB3 peptide of collagen. *The Journal of biological chemistry* 265, 4778-4781.

Stefanini, M., Lagomarsini, P., Giliani, S., Nardo, T., Botta, E., Peserico, A., Kleijer, W. J., Lehmann, A. R., and Sarasin, A. (1993a). Genetic heterogeneity of the excision repair defect associated with trichothiodystrophy. *Carcinogenesis* 14, 1101-1105.

Stefanini, M., Vermeulen, W., Weeda, G., Giliani, S., Nardo, T., Mezzina, M., Sarasin, A., Harper, J. I., Arlett, C. F., Hoeijmakers, J. H., and et al. (1993b). A new nucleotide-excision-repair gene associated with the disorder trichothiodystrophy. *American journal of human genetics* 53, 817-821.

Stepp, M. A., Zhu, L., Sheppard, D., and Cranfill, R. L. (1995). Localized distribution of alpha 9 integrin in the cornea and changes in expression during corneal epithelial cell differentiation. *J Histochem Cytochem* 43, 353-362.

Sternlicht, M. D., Bissell, M. J., and Werb, Z. (2000). The matrix metalloproteinase stromelysin-1 acts as a natural mammary tumor promoter. *Oncogene* 19, 1102-1113.

Sternlicht, M. D., and Werb, Z. (2001). How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annual review of cell and developmental biology* 17, 463-516.

Stetler-Stevenson, W. G. (1994). Progelatinase A activation during tumor cell invasion. *Invasion & metastasis* 14, 259-268.

Stiehl, D. P., Wirthner, R., Koditz, J., Spielmann, P., Camenisch, G., and Wenger, R. H. (2006). Increased prolyl 4-hydroxylase domain proteins compensate for decreased oxygen levels. Evidence for an autoregulatory oxygen-sensing system. *The Journal of biological chemistry* 281, 23482-23491.

Streilein, J. W., Taylor, J. R., Vincek, V., Kurimoto, I., Shimizu, T., Tie, C., and Golomb, C. (1994). Immune surveillance and sunlight-induced skin cancer. *Immunology today* 15, 174-179.

Stromblad, S., Becker, J. C., Yebra, M., Brooks, P. C., and Cheresch, D. A. (1996). Suppression of p53 activity and p21WAF1/CIP1 expression by vascular cell integrin alphaVbeta3 during angiogenesis. *The Journal of clinical investigation* 98, 426-433.

Stupack, D. G., Puente, X. S., Boutsabouloy, S., Storgard, C. M., and Cheresch, D. A. (2001). Apoptosis of adherent cells by recruitment of caspase-8 to unligated integrins. *The Journal of cell biology* 155, 459-470.

Sumbayev, V. V., Budde, A., Zhou, J., and Brune, B. (2003). HIF-1 alpha protein as a target for S-nitrosation. *FEBS letters* 535, 106-112.

Sumbayev, V. V., and Yasinska, I. M. (2006). Peroxynitrite as an alternative donor of oxygen in HIF-1alpha proline hydroxylation under low oxygen availability. *Free radical research* 40, 631-635.

Sun, X., Kanwar, J. R., Leung, E., Vale, M., and Krissansen, G. W. (2003). Regression of solid tumors by engineered overexpression of von Hippel-Lindau tumor suppressor protein and antisense hypoxia-inducible factor-1alpha. *Gene therapy* *10*, 2081-2089.

Sunada, Y., Bernier, S. M., Kozak, C. A., Yamada, Y., and Campbell, K. P. (1994). Deficiency of merosin in dystrophic dy mice and genetic linkage of laminin M chain gene to dy locus. *The Journal of biological chemistry* *269*, 13729-13732.

SundarRaj, N., Fite, D., Ledbetter, S., Chakravarti, S., and Hassell, J. R. (1995). Perlecan is a component of cartilage matrix and promotes chondrocyte attachment. *Journal of cell science* *108 (Pt 7)*, 2663-2672.

Sutherland, B. M., Bennett, P. V., Schenk, H., Sidorkina, O., Laval, J., Trunk, J., Monteleone, D., and Sutherland, J. (2001). Clustered DNA damages induced by high and low LET radiation, including heavy ions. *Phys Med* *17 Suppl 1*, 202-204.

Suzuma, K., Takagi, H., Otani, A., and Honda, Y. (1998). Hypoxia and vascular endothelial growth factor stimulate angiogenic integrin expression in bovine retinal microvascular endothelial cells. *Investigative ophthalmology & visual science* *39*, 1028-1035.

Taddei, I., Deugnier, M. A., Faraldo, M. M., Petit, V., Bouvard, D., Medina, D., Fassler, R., Thiery, J. P., and Glukhova, M. A. (2008). Beta1 integrin deletion from the basal compartment of the mammary epithelium affects stem cells. *Nature cell biology* *10*, 716-722.

Taieb, A., and Picardo, M. (2009). Clinical practice. Vitiligo. *The New England journal of medicine* *360*, 160-169.

Tajima, R., Kawaguchi, N., Horino, Y., Takahashi, Y., Toriyama, K., Inou, K., Torii, S., and Kitagawa, Y. (2001). Hypoxic enhancement of type IV collagen secretion accelerates adipose conversion of 3T3-L1 fibroblasts. *Biochimica et biophysica acta* *1540*, 179-187.

Takada, Y., Ye, X., and Simon, S. (2007). The integrins. *Genome biology* *8*, 215.

Takizawa, Y., Hiraoka, Y., Takahashi, H., Ishiko, A., Yasuraoka, I., Hashimoto, I., Aiso, S., Nishikawa, T., and Shimizu, H. (2000a). Compound heterozygosity for a point mutation and a deletion located at splice acceptor sites in the LAMB3 gene leads to generalized atrophic benign epidermolysis bullosa. *The Journal of investigative dermatology* *115*, 312-316.

Takizawa, Y., Pulkkinen, L., Chao, S. C., Nakajima, H., Nakano, Y., Shimizu, H., and Uitto, J. (2000b). Mutation report: complete paternal uniparental isodisomy of chromosome 1: a novel mechanism for Herlitz junctional epidermolysis bullosa. *The Journal of investigative dermatology* *115*, 307-311.

Takizawa, Y., Shimizu, H., Nishikawa, T., Hatta, N., Pulkkinen, L., and Uitto, J. (1997). Novel ITGB4 mutations in a patient with junctional epidermolysis bullosa-pyloric atresia syndrome and altered basement membrane zone immunofluorescence for the alpha6beta4 integrin. *The Journal of investigative dermatology* *108*, 943-946.

Talks, K. L., Turley, H., Gatter, K. C., Maxwell, P. H., Pugh, C. W., Ratcliffe, P. J., and Harris, A. L. (2000). The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *The American journal of pathology* 157, 411-421.

Talts, J. F., and Timpl, R. (1999). Mutation of a basic sequence in the laminin alpha2LG3 module leads to a lack of proteolytic processing and has different effects on beta1 integrin-mediated cell adhesion and alpha-dystroglycan binding. *FEBS letters* 458, 319-323.

Tam, E. M., Moore, T. R., Butler, G. S., and Overall, C. M. (2004). Characterization of the distinct collagen binding, helicase and cleavage mechanisms of matrix metalloproteinase 2 and 14 (gelatinase A and MT1-MMP): the differential roles of the MMP hemopexin c domains and the MMP-2 fibronectin type II modules in collagen triple helicase activities. *The Journal of biological chemistry* 279, 43336-43344.

Tam, E. M., Wu, Y. I., Butler, G. S., Stack, M. S., and Overall, C. M. (2002). Collagen binding properties of the membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) hemopexin C domain. The ectodomain of the 44-kDa autocatalytic product of MT1-MMP inhibits cell invasion by disrupting native type I collagen cleavage. *The Journal of biological chemistry* 277, 39005-39014.

Tamai, K., Ishida-Yamamoto, A., Matsuo, S., Iizuka, H., Hashimoto, I., Christiano, A. M., Uitto, J., and McGrath, J. A. (1997). Compound heterozygosity for a nonsense mutation and a splice site mutation in the type VII collagen gene (COL7A1) in recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 76, 209-217.

Tamai, K., Murai, T., Mayama, M., Kon, A., Nomura, K., Sawamura, D., Hanada, K., Hashimoto, I., Shimizu, H., Masunaga, T., *et al.* (1999). Recurrent COL7A1 mutations in Japanese patients with dystrophic epidermolysis bullosa: positional effects of premature termination codon mutations on clinical severity. Japanese Collaborative Study Group on Epidermolysis Bullosa. *The Journal of investigative dermatology* 112, 991-993.

Tamamori, M., Ito, H., Hiroe, M., Marumo, F., and Hata, R. I. (1997). Stimulation of collagen synthesis in rat cardiac fibroblasts by exposure to hypoxic culture conditions and suppression of the effect by natriuretic peptides. *Cell biology international* 21, 175-180.

Tanaka, K., Kawai, K., Kumahara, Y., Ikenaga, M., and Okada, Y. (1981). Genetic complementation groups in cockayne syndrome. *Somatic cell genetics* 7, 445-455.

Tandara, A. A., and Mustoe, T. A. (2004). Oxygen in wound healing--more than a nutrient. *World journal of surgery* 28, 294-300.

Tang, N., Wang, L., Esko, J., Giordano, F. J., Huang, Y., Gerber, H. P., Ferrara, N., and Johnson, R. S. (2004). Loss of HIF-1alpha in endothelial cells disrupts a hypoxia-driven VEGF autocrine loop necessary for tumorigenesis. *Cancer cell* 6, 485-495.

Tani, T., Lumme, A., Linnala, A., Kivilaakso, E., Kiviluoto, T., Burgeson, R. E., Kangas, L., Leivo, I., and Virtanen, I. (1997). Pancreatic carcinomas deposit laminin-5, preferably adhere

to laminin-5, and migrate on the newly deposited basement membrane. *The American journal of pathology* *151*, 1289-1302.

Tanimoto, K., Makino, Y., Pereira, T., and Poellinger, L. (2000). Mechanism of regulation of the hypoxia-inducible factor-1 alpha by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *The EMBO journal* *19*, 4298-4309.

Tapanadechopone, P., Tumova, S., Jiang, X., and Couchman, J. R. (2001). Epidermal transformation leads to increased perlecan synthesis with heparin-binding-growth-factor affinity. *The Biochemical journal* *355*, 517-527.

Tasanen, K., Floeth, M., Schumann, H., and Bruckner-Tuderman, L. (2000). Hemizyosity for a glycine substitution in collagen XVII: unfolding and degradation of the ectodomain. *The Journal of investigative dermatology* *115*, 207-212.

Tasanen, K., Tunggal, L., Chometon, G., Bruckner-Tuderman, L., and Aumailley, M. (2004). Keratinocytes from patients lacking collagen XVII display a migratory phenotype. *The American journal of pathology* *164*, 2027-2038.

Teige, I., Backlund, A., Svensson, L., Kvist, P. H., Petersen, T. K., and Kemp, K. (2010). Induced keratinocyte hyper-proliferation in alpha2beta1 integrin transgenic mice results in systemic immune cell activation. *International immunopharmacology* *10*, 107-114.

Theodoropoulos, V. E., Lazaris, A., Sofras, F., Gerzelis, I., Tsoukala, V., Ghikonti, I., Manikas, K., and Kastriotis, I. (2004). Hypoxia-inducible factor 1 alpha expression correlates with angiogenesis and unfavorable prognosis in bladder cancer. *European urology* *46*, 200-208.

Thrash-Bingham, C. A., and Tartof, K. D. (1999). aHIF: a natural antisense transcript overexpressed in human renal cancer and during hypoxia. *Journal of the National Cancer Institute* *91*, 143-151.

Thyboll, J., Kortessmaa, J., Cao, R., Soininen, R., Wang, L., Iivanainen, A., Sorokin, L., Risling, M., Cao, Y., and Tryggvason, K. (2002). Deletion of the laminin alpha4 chain leads to impaired microvessel maturation. *Molecular and cellular biology* *22*, 1194-1202.

Timpl, R., Tisi, D., Talts, J. F., Andac, Z., Sasaki, T., and Hohenester, E. (2000). Structure and function of laminin LG modules. *Matrix Biol* *19*, 309-317.

Tomono, Y., Naito, I., Ando, K., Yonezawa, T., Sado, Y., Hirakawa, S., Arata, J., Okigaki, T., and Ninomiya, Y. (2002). Epitope-defined monoclonal antibodies against multiplexin collagens demonstrate that type XV and XVIII collagens are expressed in specialized basement membranes. *Cell structure and function* *27*, 9-20.

Tornaletti, S., and Pfeifer, G. P. (1996). UV damage and repair mechanisms in mammalian cells. *Bioessays* *18*, 221-228.

Tournier, C., Hess, P., Yang, D. D., Xu, J., Turner, T. K., Nimnual, A., Bar-Sagi, D., Jones, S. N., Flavell, R. A., and Davis, R. J. (2000). Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science (New York, NY)* *288*, 870-874.

Trautinger, F. (2001). Mechanisms of photodamage of the skin and its functional consequences for skin ageing. *Clinical and experimental dermatology* 26, 573-577.

Treins, C., Giorgetti-Peraldi, S., Murdaca, J., Semenza, G. L., and Van Obberghen, E. (2002). Insulin stimulates hypoxia-inducible factor 1 through a phosphatidylinositol 3-kinase/target of rapamycin-dependent signaling pathway. *The Journal of biological chemistry* 277, 27975-27981.

Triantafyllou, A., Liakos, P., Tsakalof, A., Chachami, G., Paraskeva, E., Molyvdas, P. A., Georgatsou, E., Simos, G., and Bonanou, S. (2007). The flavonoid quercetin induces hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) and inhibits cell proliferation by depleting intracellular iron. *Free radical research* 41, 342-356.

Turpeenniemi-Hujanen, T. (2005). Gelatinases (MMP-2 and -9) and their natural inhibitors as prognostic indicators in solid cancers. *Biochimie* 87, 287-297.

Tzu, J., and Marinkovich, M. P. (2008). Bridging structure with function: structural, regulatory, and developmental role of laminins. *The international journal of biochemistry & cell biology* 40, 199-214.

Uchida, T., Rossignol, F., Matthay, M. A., Mounier, R., Couette, S., Clottes, E., and Clerici, C. (2004). Prolonged hypoxia differentially regulates hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha expression in lung epithelial cells: implication of natural antisense HIF-1alpha. *The Journal of biological chemistry* 279, 14871-14878.

Uitto, J. (2008). Epidermolysis bullosa: prospects for cell-based therapies. *The Journal of investigative dermatology* 128, 2140-2142.

Uitto, J., and Pulkkinen, L. (1996). Molecular complexity of the cutaneous basement membrane zone. *Molecular biology reports* 23, 35-46.

Uitto, J., and Richard, G. (2005). Progress in epidermolysis bullosa: from eponyms to molecular genetic classification. *Clinics in dermatology* 23, 33-40.

Umeda, N., Kachi, S., Akiyama, H., Zahn, G., Vossmeier, D., Stragies, R., and Campochiaro, P. A. (2006). Suppression and regression of choroidal neovascularization by systemic administration of an alpha5beta1 integrin antagonist. *Molecular pharmacology* 69, 1820-1828.

Underwood, P. A., Bennett, F. A., Kirkpatrick, A., Bean, P. A., and Moss, B. A. (1995). Evidence for the location of a binding sequence for the alpha 2 beta 1 integrin of endothelial cells, in the beta 1 subunit of laminin. *The Biochemical journal* 309 (Pt 3), 765-771.

Utani, A., Nomizu, M., Sugiyama, S., Miyamoto, S., Roller, P. P., and Yamada, Y. (1995). A specific sequence of the laminin alpha 2 chain critical for the initiation of heterotrimer assembly. *The Journal of biological chemistry* 270, 3292-3298.

- Vaalamo, M., Weckroth, M., Puolakkainen, P., Kere, J., Saarinen, P., Lauharanta, J., and Saarialho-Kere, U. K. (1996). Patterns of matrix metalloproteinase and TIMP-1 expression in chronic and normally healing human cutaneous wounds. *The British journal of dermatology* *135*, 52-59.
- Vaillant, J. M., Flageul, G., Aubiniere, E., Couly, G., and Oger, P. (1979). [A further look at the treatment of xeroderma pigmentosum]. *Annales de chirurgie plastique* *24*, 257-263.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., and Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology* *39*, 44-84.
- van der Leun, J. C. (2004). The ozone layer. *Photodermatology, photoimmunology & photomedicine* *20*, 159-162.
- van der Neut, R., Krimpenfort, P., Calafat, J., Niessen, C. M., and Sonnenberg, A. (1996). Epithelial detachment due to absence of hemidesmosomes in integrin beta 4 null mice. *Nature genetics* *13*, 366-369.
- van Hoffen, A., Kalle, W. H., de Jong-Versteeg, A., Lehmann, A. R., van Zeeland, A. A., and Mullenders, L. H. (1999). Cells from XP-D and XP-D-CS patients exhibit equally inefficient repair of UV-induced damage in transcribed genes but different capacity to recover UV-inhibited transcription. *Nucleic acids research* *27*, 2898-2904.
- Vandenberg, P., Kern, A., Ries, A., Luckenbill-Edds, L., Mann, K., and Kuhn, K. (1991). Characterization of a type IV collagen major cell binding site with affinity to the alpha 1 beta 1 and the alpha 2 beta 1 integrins. *The Journal of cell biology* *113*, 1475-1483.
- Varghese, M. C., Balin, A. K., Carter, D. M., and Caldwell, D. (1986). Local environment of chronic wounds under synthetic dressings. *Archives of dermatology* *122*, 52-57.
- Vasudevan, A., Ho, M. S., Weiergraber, M., Nischt, R., Schneider, T., Lie, A., Smyth, N., and Kohling, R. Basement membrane protein nidogen-1 shapes hippocampal synaptic plasticity and excitability. *Hippocampus* *20*, 608-620.
- Veit, G., Zimina, E. P., Franzke, C. W., Kutsch, S., Siebolds, U., Gordon, M. K., Bruckner-Tuderman, L., and Koch, M. (2007). Shedding of collagen XXIII is mediated by furin and depends on the plasma membrane microenvironment. *The Journal of biological chemistry* *282*, 27424-27435.
- Velasco, G., Cal, S., Merlos-Suarez, A., Ferrando, A. A., Alvarez, S., Nakano, A., Arribas, J., and Lopez-Otin, C. (2000). Human MT6-matrix metalloproteinase: identification, progelatinase A activation, and expression in brain tumors. *Cancer research* *60*, 877-882.
- Venstrom, K., and Reichardt, L. (1995). Beta 8 integrins mediate interactions of chick sensory neurons with laminin-1, collagen IV, and fibronectin. *Molecular biology of the cell* *6*, 419-431.

Vermeer, B. J., and Hurks, M. (1994). The clinical relevance of immunosuppression by UV irradiation. *Journal of photochemistry and photobiology* 24, 149-154.

Vermeer, M., and Streilein, J. W. (1990). Ultraviolet B light-induced alterations in epidermal Langerhans cells are mediated in part by tumor necrosis factor-alpha. *Photodermatology, photoimmunology & photomedicine* 7, 258-265.

Vink, A. A., Strickland, F. M., Bucana, C., Cox, P. A., Roza, L., Yarosh, D. B., and Kripke, M. L. (1996). Localization of DNA damage and its role in altered antigen-presenting cell function in ultraviolet-irradiated mice. *The Journal of experimental medicine* 183, 1491-1500.

Visse, R., and Nagase, H. (2003). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circulation research* 92, 827-839.

Vlahakis, N. E., Young, B. A., Atakilit, A., Hawkrige, A. E., Issaka, R. B., Boudreau, N., and Sheppard, D. (2007). Integrin alpha9beta1 directly binds to vascular endothelial growth factor (VEGF)-A and contributes to VEGF-A-induced angiogenesis. *The Journal of biological chemistry* 282, 15187-15196.

Vo, N., and Goodman, R. H. (2001). CREB-binding protein and p300 in transcriptional regulation. *The Journal of biological chemistry* 276, 13505-13508.

Wallquist, W., Plantman, S., Thams, S., Thyboll, J., Kortessmaa, J., Lannergren, J., Domogatskaya, A., Ogren, S. O., Risling, M., Hammarberg, H., *et al.* (2005). Impeded interaction between Schwann cells and axons in the absence of laminin alpha4. *J Neurosci* 25, 3692-3700.

Walmsley, S. R., McGovern, N. N., Whyte, M. K., and Chilvers, E. R. (2008). The HIF/VHL pathway: from oxygen sensing to innate immunity. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 38, 251-255.

Walton, H. L., Corjay, M. H., Mohamed, S. N., Mousa, S. A., Santomena, L. D., and Reilly, T. M. (2000). Hypoxia induces differential expression of the integrin receptors alpha(vbeta3) and alpha(vbeta5) in cultured human endothelial cells. *Journal of cellular biochemistry* 78, 674-680.

Wan, H., Stone, M. G., Simpson, C., Reynolds, L. E., Marshall, J. F., Hart, I. R., Hodivala-Dilke, K. M., and Eady, R. A. (2003). Desmosomal proteins, including desmoglein 3, serve as novel negative markers for epidermal stem cell-containing population of keratinocytes. *Journal of cell science* 116, 4239-4248.

Wang, J., Hoshijima, M., Lam, J., Zhou, Z., Jokiel, A., Dalton, N. D., Hultenby, K., Ruiz-Lozano, P., Ross, J., Jr., Tryggvason, K., and Chien, K. R. (2006). Cardiomyopathy associated with microcirculation dysfunction in laminin alpha4 chain-deficient mice. *The Journal of biological chemistry* 281, 213-220.

Wang, X., Xing, D., Liu, L., and Chen, W. R. (2009). BimL directly neutralizes Bcl-xL to promote Bax activation during UV-induced apoptosis. *FEBS letters* 583, 1873-1879.

- Wang, Z., Buratowski, S., Svejstrup, J. Q., Feaver, W. J., Wu, X., Kornberg, R. D., Donahue, T. F., and Friedberg, E. C. (1995). The yeast TFB1 and SSL1 genes, which encode subunits of transcription factor IIIH, are required for nucleotide excision repair and RNA polymerase II transcription. *Molecular and cellular biology* *15*, 2288-2293.
- Watt, F. M. (2002). Role of integrins in regulating epidermal adhesion, growth and differentiation. *The EMBO journal* *21*, 3919-3926.
- Watt, F. M., Frye, M., and Benitah, S. A. (2008). MYC in mammalian epidermis: how can an oncogene stimulate differentiation? *Nat Rev Cancer* *8*, 234-242.
- Watt F.M. and Hertle, M. D. (1994). Keratinocyte integrins. In Leigh, I. M., Lane, E. B. and Watt, F. M. (eds), *The Keratinocyte Handbook*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 153–164
- Watt, F. M., Kubler, M. D., Hotchin, N. A., Nicholson, L. J., and Adams, J. C. (1993). Regulation of keratinocyte terminal differentiation by integrin-extracellular matrix interactions. *Journal of cell science* *106 (Pt 1)*, 175-182.
- Weeda, G., Eveno, E., Donker, I., Vermeulen, W., Chevallier-Lagente, O., Taieb, A., Stary, A., Hoeijmakers, J. H., Mezzina, M., and Sarasin, A. (1997). A mutation in the XPB/ERCC3 DNA repair transcription gene, associated with trichothiodystrophy. *American journal of human genetics* *60*, 320-329.
- Welsh, S. J., Koh, M. Y., and Powis, G. (2006). The hypoxic inducible stress response as a target for cancer drug discovery. *Seminars in oncology* *33*, 486-497.
- Wilhelmsen, K., Litjens, S. H., and Sonnenberg, A. (2006). Multiple functions of the integrin alpha6beta4 in epidermal homeostasis and tumorigenesis. *Molecular and cellular biology* *26*, 2877-2886.
- Willem, M., Miosge, N., Halfter, W., Smyth, N., Jannetti, I., Burghart, E., Timpl, R., and Mayer, U. (2002). Specific ablation of the nidogen-binding site in the laminin gamma1 chain interferes with kidney and lung development. *Development (Cambridge, England)* *129*, 2711-2722.
- Wilson, C. L., and Matrisian, L. M. (1996). Matrilysin: an epithelial matrix metalloproteinase with potentially novel functions. *The international journal of biochemistry & cell biology* *28*, 123-136.
- Woo, M. S., Park, J. S., Choi, I. Y., Kim, W. K., and Kim, H. S. (2008). Inhibition of MMP-3 or -9 suppresses lipopolysaccharide-induced expression of proinflammatory cytokines and iNOS in microglia. *Journal of neurochemistry* *106*, 770-780.
- Woodley, D. T., Fan, J., Cheng, C. F., Li, Y., Chen, M., Bu, G., and Li, W. (2009). Participation of the lipoprotein receptor LRP1 in hypoxia-HSP90alpha autocrine signaling to promote keratinocyte migration. *Journal of cell science* *122*, 1495-1498.

Wu, E., Mari, B. P., Wang, F., Anderson, I. C., Sunday, M. E., and Shipp, M. A. (2001). Stromelysin-3 suppresses tumor cell apoptosis in a murine model. *Journal of cellular biochemistry* 82, 549-555.

Wu, X., Bishopric, N. H., Discher, D. J., Murphy, B. J., and Webster, K. A. (1996). Physical and functional sensitivity of zinc finger transcription factors to redox change. *Molecular and cellular biology* 16, 1035-1046.

Wunderlich, L., Paragh, G., Wikonkal, N. M., Banhegyi, G., Karpati, S., and Mandl, J. (2008). UVB induces a biphasic response of HIF-1alpha in cultured human keratinocytes. *Experimental dermatology* 17, 335-342.

Xia, Y. P., Zhao, Y., Tyrone, J. W., Chen, A., and Mustoe, T. A. (2001). Differential activation of migration by hypoxia in keratinocytes isolated from donors of increasing age: implication for chronic wounds in the elderly. *The Journal of investigative dermatology* 116, 50-56.

Xu, H., Wu, X. R., Wewer, U. M., and Engvall, E. (1994). Murine muscular dystrophy caused by a mutation in the laminin alpha 2 (Lama2) gene. *Nature genetics* 8, 297-302.

Yamashita, K., Azumano, I., Mai, M., and Okada, Y. (1998). Expression and tissue localization of matrix metalloproteinase 7 (matrilysin) in human gastric carcinomas. Implications for vessel invasion and metastasis. *International journal of cancer* 79, 187-194.

Yanez-Mo, M., Alfranca, A., Cabanas, C., Marazuela, M., Tejedor, R., Ursa, M. A., Ashman, L. K., de Landazuri, M. O., and Sanchez-Madrid, F. (1998). Regulation of endothelial cell motility by complexes of tetraspan molecules CD81/TAPA-1 and CD151/PETA-3 with alpha3 beta1 integrin localized at endothelial lateral junctions. *The Journal of cell biology* 141, 791-804.

Yang, M., Murray, M. T., and Kurkinen, M. (1997). A novel matrix metalloproteinase gene (XMMP) encoding vitronectin-like motifs is transiently expressed in *Xenopus laevis* early embryo development. *The Journal of biological chemistry* 272, 13527-13533.

Yasinska, I. M., and Sumbayev, V. V. (2003). S-nitrosation of Cys-800 of HIF-1alpha protein activates its interaction with p300 and stimulates its transcriptional activity. *FEBS letters* 549, 105-109.

Yoon, S. O., Shin, S., and Mercurio, A. M. (2005). Hypoxia stimulates carcinoma invasion by stabilizing microtubules and promoting the Rab11 trafficking of the alpha6beta4 integrin. *Cancer research* 65, 2761-2769.

Yoshida, D., Kim, K., Noha, M., and Teramoto, A. (2006). Hypoxia inducible factor 1-alpha regulates of platelet derived growth factor-B in human glioblastoma cells. *Journal of neuro-oncology* 76, 13-21.

Yoshikawa, T., Rae, V., Bruins-Slot, W., Van den Berg, J. W., Taylor, J. R., and Streilein, J. W. (1990). Susceptibility to effects of UVB radiation on induction of contact hypersensitivity as a risk factor for skin cancer in humans. *The Journal of investigative dermatology* 95, 530-536.

Yu, A. E., Hewitt, R. E., Connor, E. W., and Stetler-Stevenson, W. G. (1997). Matrix metalloproteinases. Novel targets for directed cancer therapy. *Drugs & aging* 11, 229-244.

Yurchenco, P. D., Smirnov, S., and Matus, T. (2002). Analysis of basement membrane self-assembly and cellular interactions with native and recombinant glycoproteins. *Methods in cell biology* 69, 111-144.

Zambruno, G., Marchisio, P. C., Marconi, A., Vaschieri, C., Melchiori, A., Giannetti, A., and De Luca, M. (1995). Transforming growth factor-beta 1 modulates beta 1 and beta 5 integrin receptors and induces the de novo expression of the alpha v beta 6 heterodimer in normal human keratinocytes: implications for wound healing. *The Journal of cell biology* 129, 853-865.

Zhao, Y. G., Xiao, A. Z., Newcomer, R. G., Park, H. I., Kang, T., Chung, L. W., Swanson, M. G., Zhau, H. E., Kurhanewicz, J., and Sang, Q. X. (2003). Activation of pro-gelatinase B by endometase/matrilysin-2 promotes invasion of human prostate cancer cells. *The Journal of biological chemistry* 278, 15056-15064.

Zhao, Y. G., Xiao, A. Z., Park, H. I., Newcomer, R. G., Yan, M., Man, Y. G., Heffelfinger, S. C., and Sang, Q. X. (2004). Endometase/matrilysin-2 in human breast ductal carcinoma in situ and its inhibition by tissue inhibitors of metalloproteinases-2 and -4: a putative role in the initiation of breast cancer invasion. *Cancer research* 64, 590-598.

Zheng, X., Linke, S., Dias, J. M., Zheng, X., Gradin, K., Wallis, T. P., Hamilton, B. R., Gustafsson, M., Ruas, J. L., Wilkins, S., *et al.* (2008). Interaction with factor inhibiting HIF-1 defines an additional mode of cross-coupling between the Notch and hypoxia signaling pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 3368-3373.

Zhong, H., De Marzo, A. M., Laughner, E., Lim, M., Hilton, D. A., Zagzag, D., Buechler, P., Isaacs, W. B., Semenza, G. L., and Simons, J. W. (1999). Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases. *Cancer research* 59, 5830-5835.

Zhou, Q., Liu, L. Z., Fu, B., Hu, X., Shi, X., Fang, J., and Jiang, B. H. (2007). Reactive oxygen species regulate insulin-induced VEGF and HIF-1alpha expression through the activation of p70S6K1 in human prostate cancer cells. *Carcinogenesis* 28, 28-37.

Zundel, W., Schindler, C., Haas-Kogan, D., Koong, A., Kaper, F., Chen, E., Gottschalk, A. R., Ryan, H. E., Johnson, R. S., Jefferson, A. B., *et al.* (2000). Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression. *Genes & development* 14, 391-396.

Zutter, M. M., Santoro, S. A., Staats, W. D., and Tsung, Y. L. (1995). Re-expression of the alpha 2 beta 1 integrin abrogates the malignant phenotype of breast carcinoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 7411-7415.

Communications orals

1. **Ali N**, Rezvani HR, Varon C, Pain C, Taieb A, De Verneuil H, Mazurier F. HIF-1alpha knockdown keratinocytes cannot reconstruct a viable epidermis. **39th ESDR annual meeting** in Budapest (Hungary), 2009.
2. **Ali N**, Rezvani HR, Varon C, Pain C, Taieb A, De Verneuil H, Mazurier F. HIF-1alpha knockdown keratinocytes cannot reconstruct a viable epidermis. **Journée annuelle de l'IFR 66**, Bordeaux, France, 2008.
3. **Ali N**, Rezvani HR, Varon C, Pain C, Taieb A, De Verneuil H, Mazurier F. HIF-1alpha knockdown keratinocytes cannot reconstruct a viable epidermis. **Journée annuelle de l'IFR 66**, Bordeaux, France, 2009.
4. Rezvani HR, Mazurier F, Kim A.L., **Ali N**, Daly M, de Verneuil H, Taïeb A, Bickers D.R. XPC silencing in normal human keratinocytes induces AKT activation and triggers metabolic alterations that drive the formation of squamous cell carcinomas. **71th SID annual meeting** in Atlanta (Georgia, USA), 2010.
5. Rezvani HR, Mazurier F, Kim A.L., **Ali N**, Daly M, de Verneuil H, Taïeb A, Bickers D.R. XPC silencing in normal human keratinocytes induces AKT activation and triggers metabolic alterations that drive the formation of squamous cell carcinomas. **40th ESDR annual meeting** in Helsinki (Finland), 2010.

Communications poster

1. Rezvani HR, Mahfouf W, **Ali N**, Chemin C, Ged C, Kim AL, de Verneuil H, Taïeb A, Bickers DR, Mazurier F. Hypoxia inducible factor-1 α regulates expression of nucleotide excision repair proteins in keratinocytes. **39th ESDR annual meeting** in Budapest (Hungary), 2009.
2. **Ali N**, Rezvani HR, Varon C, Pain C, Taieb A, De Verneuil H, Mazurier F. HIF-1alpha knockdown keratinocytes cannot reconstruct a viable epidermis. **71th SID annual meeting** in Atlanta (Georgia, USA), 2010.
3. Rezvani HR, Mahfouf W, **Ali N**, Chemin C, Ged C, Kim AL, de Verneuil H, Taïeb A, Bickers DR, Mazurier F. Hypoxia inducible factor-1 α regulates expression of nucleotide excision repair proteins in keratinocytes. Oxyegen in Health and Disease, Smolenice Castle, Slovakia, 2010

Publications

1. Rezvani HR, Mahfouf W, **Ali N**, Chemin C, Ged C, Kim AL, de Verneuil H, Taïeb A, Bickers DR, Mazurier F. Hypoxia inducible factor-1a regulates expression of nucleotide excision repair proteins in keratinocytes. *Nucleic Acid Research* **2010**; 38 (3):797-809.
2. **Ali N**^{1,*}, Rezvani HR^{1,*}, Dubus P², Varon C³, Ged C¹, Pain C¹, Cario-André M^{1,4}, Seneschal J^{1,4}, Taïeb A^{1,4}, de Verneuil H¹, Mazurier F^{1,†}: “Loss of epidermal hypoxia-inducible factor-1alpha hastens skin aging (and wound healing) in human and mouse”. **En cours.**
3. Rezvani HR, Rossignol R, **Ali N**, de Verneuil H, Mazurier F, Kim AL, Taïeb A. XPC silencing-induced NADP oxidase activation leads to Warburg effect. **En préparation.**
4. Rezvani HR, **Ali N**, Taieb A, De Verneuil H, Mazurier F. HIF-1alpha: a key factor in skin physiology. **En préparation.**
5. Rezvani HR^{1,2,3*}, Kim AL¹, Rossignol R⁴, **Ali N**^{2,3}, Daly M¹, Mahfouf W^{2,3}, Bellance N⁴, Taïeb A^{2,3,5}, de Verneuil H^{2,3}, Mazurier F^{2,3†}, Bickers DR^{1*†} XPC silencing in normal human keratinocytes triggers metabolic alterations that drive the formation of squamous cell carcinomas. **Accepté en JCI**

Liste des abréviations

6-4PP	6-4 pyrimidine-pyrimidone photoproduits	CBC	carcinome basocellulaire ou en anglais BCC (Basal Cell Carcinoma)
8-oxo-dG	8-oxo-2' désoxyguanosine	CBP	CREB Binding Protein
AP	activator protein	CDB	cassures double brin
ARD-1	ARrest Defective-1 protein	COFS	syndrome cérébro-oculo-facial
ARNT	Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator	COL IV	collagène de type IV
ASK	apoptosis-signaling kinase 1	CPD	cyclobutane-pyrimidine
Asn803	asparagine 803	CS	syndrome de Cockayne
ATM	Ataxia-telangiectasia-mutated	CSA et CSB	Cockayne Syndrome A et B
ATR	Ataxia-telangiectasia-RAD3-related	CSB	cassures simple brin
BER	réparation par excision de base	CSC	carcinome spinocellulaire ou en anglais SCC (Squamous Cell Carcinoma)
bHLH	base helix-loop-helix	CSP	mutations homozygotes de type codon stop prématuré
BP	pemphigoïde bulleuse	DDSH	Dyssegmental dysplasi Silverman-Handmaker
BP180	collagène de type XVII	DFO	déféroxamine
CAD	domaine C-TAD correspond à la région C-terminale	DMOG	dimethyloxalyglycine
Caspases	cysteinylyl aspartate-directed proteases	DNA-PK	phosphatidylinositol 3-kinase-like kinases
CB3	cyanogen bromide-derived		

DSBR	réparation des cassures	FIH-1	factor inhibiting HIF-1
double brin		FN	Fibronectine
EB	Epidermolyse Bulleuse	FSP	fibroblast-specific protein-1
EBD	Epidermolyse Bulleuse	GGR	réparation Globale du
Dystrophique		Génome	
EBJH	Epidermolyse Bulleuse	H2O2	peroxyde d'hydrogène
Jonctionnelle de type Herlitz		HB-EGF	heparin-binding-EGF-like
EDNRB	endothelin receptor type B	growth factor	
EGF	Epidermal Growth Factor	HD	hémidesmosomes
EGFR	Epidermal growth factor	HE	hematoxyline-éosine
receptor		Hémopexine	hemopexin-like domain
EHS	Engelbreth-Holm-Swarm	hHR23B	human homologue of
EPO	érythropoïétine rénale	RAD23,	
ER	épidermes reconstruits ou en	HIF-1	Hypoxia-Inducible Factor-1
anglais RE (reconstructed epidermis)		HNF-4	Hepatocyte Nuclear Factor
ERCC1	Excision Repair Cross-	4	
Complementing 1 protein		HPSG	heparan protéoglycanes
ERK	Extracellular signal-	sulfate	
regulated kinases		HPTF	HIF-1 α proteasome
ES	embryonic stem cell	targeting factor	
FACIT	collagènes associés aux	HRE	Hypoxia ResponseElement
fibres ou (fibril-associated collagens with		Hsp90	shock protein-90alpha
interrupted triple helices)		HUVEC	human umbilical vein
FAK	Focal Adhesion kinase	endothelial cells	
FGF	Fibroblast growth factor		
FH	fumarate hydratase		

ICAM Molecule	Intercellular Adhesion	MAPK kinase	Mitogen-activated protein kinase
IHC	Immunohistochimie	MC1R	melanocortin 1 receptor
IL	Interleukine	MCP-3	Monocyte Chemoattractant Protein-3
IMF	Immunofluorescence	MDEM	Dulbecco's Modified Eagles's Medium
INF γ	Interferon-gamma	MDM2	Murine Double Minute 2
JNK	c-Jun N-terminal kinases	MEC	matrice extracellulaire
K5 et K14	Kératine 5 ou 14	MEK	methyl ethyl ketone
l'ARN Pol II	RNA polymerase II	MITF	Microphthalmia Associated Transcription Factor
LE	laminin epidermal-growthfactor-like	MMP	Métalloprotéinases
LF	Laminin Four	MMR	Réparation des mésappariements
LG	domaines globulaires C-terminal	MSP	Macrophage stimulating protein
LMDS	locally multiply damages sites	MT-MMP	Métalloprotéinases de type transmembranaire
LN	domaine N-terminal	mTOR	mammalian target of rapamycin.
Ln	laminine	NAD	domaine N-TAD correspond à la région N-terminale
Ln-332	laminine-332 ($\alpha 3\beta 3\gamma 2$)	NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase
LoxL2	lysyl oxydase-like 2	NC	régions non collagéniques
LRP1	LDL-receptor-related1		
Lysine 532	Lys532		
L β	laminin h-knob		

NER	Réparation par excision de nucléotides	PDGF	Platelet-derived growth factor
NF- κB	nuclear factor-kappa B	PEST	séquence riche en proline, acide glutamique, sérine ou thréonine qui se trouve dans plusieurs protéines
NF-1	nuclear factor-1	PHD	prolyl-4-hydroxylase
NLS Sequence	Nuclear Localisation	PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
NO•	monoxyde d'azote	PLOD	procollagène lysyl-hydroxylase
NSCLC : non-small lung cancer		pol δ/ε	ADN polymérase δ ou ε,
O ₂ ^{-•}	anion superoxide	PTEN	phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10
ODC	Ornithine Décarboxylase	pVHL	protéine von Hippel Lindau
ODD	Oxygen-Dependent Domain	Rac1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
OH•	radical libre hydroxyle	RASI	Rheumatoid arthritis Synovial Inflammation
ONOO-	nitroperoxyde	RECK	Reversion inducing Cysteine riche protein with Kasal motifs
OSCC carcinoma	oral squamous cell carcinoma	Ref-1	Redox Factor-1
P4H	prolyl-4-hydroxylase	RGD	trois acides aminés, arginine-glycine-aspartique
PAF	Platelet-activating factor	ROS	Reactive Oxygen Species
PAI-1 inhibitor-1	plasminogen activator inhibitor-1	RPA	Replication Protein A
PAR-1 Receptor-1	Protease Activated Receptor-1	RSUME	RWD-containing sumoylation enhancer
PAS	Per, Arnt, Sim motif		
PCNA Antigen	Proliferating Cell Nuclear Antigen		

RTX	radiation thérapie	TIF2	transcription intermediary factor 2
SBC	sunburns cell	TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloproteinase
SCF	stromal cell factor	TNF- α	Tumor Necrosis Factor- α
SDF-1 Factor-1	Stromal Cell-Derived	TPE	Triplex-PGK-EGFP-DeltaU3
SDH	succinate dehydrogenase	TSC	tuberous sclerosis
SH	groupement thiol	TSP-2	Thrombospondine-2
Snail repressor	zinc-finger transcriptional	TTD	Trichothiodystrophie
Sp1	Smad proteins and transcription factor	UCA	cis- and trans-urocanic acid
SRC-1 Coactivator-1	Steroid Receptor	USF	Upstream Stimulatory Factor
SUMO modifier	small ubiquitin-related	UV-DDB	DDB1-DDB2-containing E3-ubiquitin ligase complex
SVF	sérum de veau fœtal	VEGF	Vascular endothelial growth factor
TAD	domaines de transactivation	XP	Xeroderma Pigmentosum
TAM	tamoxifène	α -DG	l' α -dystroglycane
TCF4	transcription factor 4	α -MSH	α -melanocyte specific hormone
TCR Transcription	Réparation Couplée à la		
TFIIH	transcription factor II H		
TGF- β Factor Beta	Transforming Growth		

Loss of epidermal hypoxia-inducible factor-1alpha accelerates epidermal aging and affects reepithelization in human and mouse

Nsrein Ali^{1,*}, Hamid Reza Rezvani^{1,*}, Pierre Dubus², Christine Varon³, Cécile Ged¹, Catherine Pain¹, Muriel Cario-André^{1,4}, Julien Seneschal^{1,4}, Alain Taïeb^{1,4}, Hubert de Verneuil¹, Frédéric Mazurier^{1,§}

¹ INSERM U876, Bordeaux, F-33076 France; Université Victor Segalen Bordeaux 2, Bordeaux, F-33076 France;

² Université Victor Segalen Bordeaux 2, EA 2406 Histologie et Pathologie Moléculaire, Bordeaux, F-33076 France;

³ INSERM U853, Bordeaux, F-33076 France; Université Victor Segalen Bordeaux 2, Bordeaux, F-33076 France;

⁴ CHU de Bordeaux, Département de Dermatologie & Dermatologie Pédiatrique, Centre de référence des maladies rares de la peau, Hôpital St André, Bordeaux, F-33000, France.

* Both authors contributed equally to the work

§ Corresponding author : INSERM U876, Bordeaux, 146 rue Léo Saignat, F-33076, France

email address: mazurier@u-bordeaux2.fr Phone: +33-557-571-373 Fax: +33-557-571-374

Abstract

In mouse and human skin, HIF-1 α is constitutively expressed in the epidermis, mainly in the basal layer. Critical systemic effects have been demonstrated: regulation of kidney erythropoietin production in the mouse with constitutive HIF-1 α epidermal deletion and hypervascularity following epidermal HIF-1 α overexpression. However, its local role in the keratinocyte physiology has not been clearly defined. To address the function of HIF-1 α specifically in the epidermis, we used the mouse model of HIF-1 α knockout targeted to keratinocytes (K14-Cre/HIF-1 $\alpha^{\text{lox/lox}}$). These mice presented a delayed skin phenotype characterized by skin atrophy and pruritic inflammation, partly mediated via basement membrane disturbances involving laminin-332 (Ln-332) and integrins. We further investigated the relevance of mouse findings in human skin using reconstructed epidermis and showed that upon HIF-1 α knockdown (HIF-1 α^{KD}) human keratinocytes cannot reconstruct a viable epidermis. A diminution of keratinocyte growth potential, following HIF-1 α silencing, was associated with a decreased expression of Ln-322 and α 6 and β 1 integrins. Finally, the blunt knockdown of HIF-1 α in the epidermis, cause by tamoxifen treatment of K14-Cre-ER^{T2}/HIF-1 $\alpha^{\text{lox/lox}}$ mice, induces lethality with massive epidermal changes in aged mice. Overall, these results indicate a role of HIF-1 α in skin homeostasis especially during skin aging.

Introduction

The skin is a barrier, which, among other functions, prevents the invasion of pathogens, limits chemical and physical aggressions, and regulates the loss of water and electrolytes (1). It is a complex organ composed of the epidermis and its appendages (sweat glands, hair follicles), which are separated from the dermis by a basement membrane consisting primarily of laminins and collagens (2). The epidermis is a highly dynamic stratified epithelium made principally from keratinocytes. New differentiating keratinocytes continuously emerge from the proliferative basal layer of the epidermis to replenish upper layers, progressively differentiating into the external cornified and desquamating dead envelope. Skin is a naturally mild hypoxic (low oxygen) milieu (3-6). Under acute injury, the microenvironment of a skin wound becomes even more hypoxic following vascular disruption and high oxygen consumption by the cells located at the edge of the wound and in the granulation tissue (6, 7). Repair of wounded epidermis requires both keratinocyte migration and deposition of Ln-332 (8). Hypoxia promotes *in vitro* keratinocyte motility (9). The hypoxic situation induces the synthesis and secretion of growth factors that could either be mediated by a hypoxia-inducible factor (HIF)-dependent pathway or by a reactive oxygen species (ROS)-dependent pathway that does not involve HIF (10).

The HIF family (HIF-1, -2 and -3) is related to the basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factor family. These factors are composed of two subunits, HIF- α , a tightly regulated one, and the constitutively expressed HIF-1 β (also called ARNT) (11-14). The activity of HIF-1 was originally described as dependent on the oxygen level, whereas now it is well-admitted that many factors such as growth factors, cytokines, hormones and ROS drive HIF-1 expression (12, 15). Under atmospheric oxygen pressure (called normoxia), prolyl-hydroxylases (PHD) enable the hydroxylation of two specific proline (P402 and P563 in human) present in the oxygen-dependent

degradation domain (ODDD) of HIF-1 α . The hydroxylation of HIF-1 α is a prerequisite for the association of this protein with the von Hippel-Lindau (VHL) E3-ligase, which consequently leads to HIF-1 α ubiquitination and targets the protein to the proteasome for degradation (16-18). Reduced PHD activity due to the limited level of oxygen (hypoxia) results in the stabilization and the accumulation of HIF-1 α (19-23). HIF-1 regulates the expression of almost 200 genes involved in many biological processes, including glycolysis, angiogenesis, apoptosis, adhesion, migration, invasion and metastasis (24, 25).

Several data suggest that the expression of HIF-1 α by skin cells control the response of the organism to oxygen, and can play a major role in skin homeostasis (26-28). Epidermis and adnexae constitutionally express HIF-1 α (3, 29, 30). By targeting its deletion to keratinocytes, it has been recently evidenced that skin is a primary coordinator of the systemic hypoxic response (31). This study has shown that modulation of cutaneous blood flow potentiates renal and hepatic erythropoietin (EPO) synthesis in a HIF-1 α dependent manner. Moreover, HIF-1 α overexpression in keratinocytes expands skin dermal vasculature, suggesting a control of blood vessel growth regulation by cutaneous cells (32, 33). HIF-1 α has been demonstrated to drive the expression of laminin-332 (Ln-332) (34), an extracellular glycoprotein composed of three chains (α 3, β 3, γ 2) secreted by keratinocytes. The main role of Ln-332 is the maintenance of epithelial-mesenchymal cohesion in tissues exposed to external forces, including skin, stratified squamous mucosa, amnion and cornea (35). Ln-332 is involved in the attachment of the basal epidermal keratinocytes to the basement membrane through its interaction with heterodimeric cell surface receptors α 6 β 1, α 6 β 4 and α 3 β 1 integrins, which mediate adhesion of extracellular matrix (ECM) to the cell cytoskeleton (36). Ln-332 has an important role in keratinocyte adhesion and migration

(37). Indeed, loss of Ln-332 causes the most severe epidermolysis bullosa (EB) phenotype, EB lethalis Herlitz (38, 39).

To address a more physiological role of HIF-1 α in the skin, we first used a murine model of HIF-1 α knockout targeted to keratinocytes (K14-Cre/HIF-1 $\alpha^{\text{flox/flox}}$). These mice presented a delayed skin phenotype, partly mediated through basement membrane disturbances involving Ln-332 and integrins, suggesting an important role of HIF-1 α in skin homeostasis during skin aging. Using human reconstructed epidermis model, we investigated further the relevance of mouse findings and showed that HIF-1 α knockdown (HIF-1 α^{KD}) human keratinocytes cannot reconstruct a viable epidermis. The adhesion deficiency of HIF-1 α^{KD} cells was not only associated with decreased expression of Ln-322 but also with $\alpha 6$ and $\beta 1$ integrin downregulation. Finally, we used a tamoxifen-inducible K14-Cre-ER^{T2}/HIF-1 $\alpha^{\text{flox/flox}}$ mouse model inducing a blunt knockdown of HIF-1 α in the epidermis, which leads to a lethal skin-driven phenotype with massive epidermal changes in aged mice.

Results

Abnormal skin phenotype of the K14-Cre/HIF-1^{flox/flox} aging mouse

HIF-1 α -null embryos die before delivery, displaying many tissues abnormalities including neural development and vascular defaults (40). To address *in vivo* the role of HIF-1 α in adult skin physiology, we generated mice in which HIF-1 α deficiency was restricted to keratinocytes by crossing homozygous mice for floxed HIF-1 α allele (HIF-1^{flox/flox}) (41) with mice expressing Cre recombinase under the control of the keratinocyte-specific K14 promoter (K14-Cre) (42). As previously reported by Boutin *et al.* (31), no apparent abnormal death rate was observed in the neonatal period of HIF-1 α -deficient mice. However, the ratio of K14-Cre/HIF-1^{flox/flox} mice was only 10.3% versus the 25% expected. During the first months of life K14-Cre/HIF-1^{flox/flox} mice developed normally (data not shown). However, after 6 months, K14-Cre/HIF-1^{flox/flox} mice started to be different from wild type mice in terms of skin phenotype, weight and behavior. Indeed, K14-Cre/HIF-1^{flox/flox} mice exhibit hair growth, hyperpigmentation and hyperkeratotic epidermis of the tail (Figure 1A). In some mice, stratum corneum sloughing of the whole tail was also noticed (data not shown). Pathology demonstrated a thickened epidermis, the presence of pigment in basal layers, increased cell mass in granular layer and a hyper and parakeratotic horny layer (Figure 1, B and C). At 12 months, features of epidermal lichenification and inflammation became obvious with erosions and crusts around the eye, the mouth and the ventral part of the neck (Figure 1, D-F). The K14-Cre/HIF-1^{flox/flox} mice also showed weight loss and cervical lymphadenopathies, possibly due to intractable pruritus. Morphological examination evidenced epidermal thickening with massive dermal inflammation made of plasma cells and eosinophils (Figure 1G). Cervical reactive inflammatory lymphadenopathy showed an infiltrate made up

predominantly of plasma cells (data not shown). In non-inflammatory skin, epidermal and dermal atrophy developing in K14-Cre/HIF-1^{flox/flox} mice between 6 and 12 months suggests an accelerated skin aging (Figure 1, H-K).

Guided by studies showing a similar phenotype in integrin deficient mice (43) and other models implying a key role of HIF-1 in the regulation of major components of the extracellular matrix such as Ln-332 (34) and its receptor, the β 1-integrin (44), we examined the expression of these two molecules in the skin of K14-Cre/HIF-1^{flox/flox} mice. As shown by immunofluorescence (Figure 1, L-O), the expression of the γ 2 chain (a subunit of Ln-332), and of the β 1 integrin, were dramatically decreased in the epidermal basement membrane zone as compared to its normal counterpart.

HIF-1 α regulates Ln-332 and integrin expression in human keratinocytes

Ln-332 plays an important role in the adhesion and migration of keratinocytes. Based on the role of HIF-1 α in the regulation of this adhesion molecule and its receptors *in vitro* (34, 44) and *in vivo* (data presented above), we examined more comprehensively the expression of the Ln-332 chains in human keratinocytes after inactivation of HIF-1 α *in vitro*. We used the shRNA strategy to knock down the HIF-1 α gene. Efficient gene silencing (> 98% inhibition) was obtained with the shHIF-1 α vector in transduced cells whereas transduction with the control shRNA (shCTL) did not disturb HIF-1 α expression (Figure 2A). HIF-1 α extinction led to a strong and equivalent decrease of all the three Ln-332 chains ($63 \pm 20\%$, $62 \pm 11\%$ and $66 \pm 16\%$ for the α 3, β 3 and γ 2 chains, respectively) (Figure 2, B and C). No change was observed in the level of other adhesion molecules such as collagen IV (COL IV) or enzymes involved in ECM remodeling such as

MMP-14 in the same cells (Figure 2B). To confirm these results, laminin expression was examined by immunofluorescence at different time points after transduction of keratinocytes with the shHIF-1 α vector (Figure 2D). To identify the transduced keratinocytes GFP was detected. Phenotypically, cells transduced with the shHIF-1 α vector became rounded and did not spread on plastic support with time, concomitantly to the decrease in Ln-332 subunits expression (Figure 2C). In addition, no Ln-332 deposit was noted around the HIF-1 α deficient cells in oppose to the control and untransduced cells (Figure 2D, dashed line).

Since Ln-332-deficient keratinocytes from patients with epidermolysis bullosa (γ 2-deficient) show only partial decrease in adhesion and migration (45, 46), we questioned whether the strong effect of HIF-1 α deficiency is related to the dysregulated expression of other adhesion molecules such as are α 6 β 4 and α 3 β 1 integrins - the major receptors of Ln-332. In accordance with our previous data obtained in mouse skin, flow cytometric analysis confirmed a significant decrease of the α 6 and β 1 integrin at day-4 and -6 after HIF-1 α inhibition (Figure 3, A-D).

HIF-1 α downregulation impairs the formation of a reconstructed epidermis

To explore the role of HIF-1 α in the physiologic environment, we used the reconstructed epidermis (RE) model. First, we examined whether HIF-1 α ^{KD} keratinocytes were able to generate a fully stratified epidermis. Keratinocytes transduced with the shHIF-1 α vector generated epidermis with lower frequency, as compared to non-transduced or shCTL-transduced keratinocytes. To determine the stability of HIF-1 α inactivation and the origin of cells in epidermal reconstructs, expression of HIF-1 α and GFP were then assessed by immunohistochemistry (IHC). The rare epidermis obtained from HIF-1 α ^{KD} keratinocytes were

essentially formed by GFP-negative cells expressing HIF-1 α , implying a phenotype of normal keratinocytes (Figure 4A). To confirm these results, we used various seeding densities to reconstruct epidermis (Figure 4B). Whereas 150,000 shHIF-1 α -transduced cells were necessary to obtain 70% of RE, only 75,000 non-transduced (NT) or shCTL-transduced cells were sufficient to obtain 60-80% of RE, reflecting the minimal need of non-transduced cells for the reconstruction.

Considering the data demonstrating a decrease in extracellular matrix (ECM) adhesion molecules, we examined the possibility to rescue the adhesion defect of HIF-1 α ^{KD} keratinocytes by adding exogenous Ln-322 on dead dermis (Figure 4C). IHC examination revealed that some GFP positive HIF-1 α ^{KD} keratinocytes were present but the morphology of the resulting epidermis was poorly differentiated. Since young K14-Cre/HIF-1 α ^{fllox/fllox} mice develop normal epidermis, we wondered whether fibroblasts might be crucial for epidermal formation. Thus, we tested *in vitro* whether addition of fibroblasts within the reconstructed epidermis enables HIF-1 α ^{KD} keratinocyte seeding and growth (Figure 4D). Fibroblasts helped epidermis formation but the presence of GFP in the upper epidermal layers indicated a transient rescue and a progressive elimination of HIF-1 α ^{KD} keratinocytes.

HIF-1 α downregulation triggers cell cycle arrest and keratinocyte apoptosis

Because of the marked failure in epidermal reconstruction with HIF-1 α ^{KD} keratinocytes, we tested whether HIF-1 α deletion affects growth potentials of keratinocytes, too. Keratinocytes were seeded on mitomycin C-treated 3T3 fibroblasts (feeder layer) in one day post-transduction (one day) to prevent adhesion troubles. The number of colonies formed by HIF-1 α ^{KD} keratinocytes

was dramatically decreased as compared to CTL cells (Figure 5A, B). Moreover, the distribution of the different types of colonies, according to their size and morphology, formed by HIF-1 α ^{KD} cells and CTL cells was significantly affected. Indeed, 72% of colonies formed by HIF-1 α ^{KD} cells consist of small colonies (< 1 mm) (Figure 5C). HIF-1 α ^{KD} prevented cells to form large colonies (> 2 mm) (Figure 5C), which suggests an effect of HIF-1 α downregulation on cell cycle progression. Analysis of cell cycle progression in HIF-1 α ^{KD} keratinocytes indicated that the percentage of cells in phase G0/G1 increased with time, concomitantly with a decrease in the percentage of cells in S phase (Figure 5, D and E). Increased apoptosis, measured by flow cytometry, was also observed (Figure 5F) and typical apoptotic cells were clearly seen under the microscope (data not shown). Altogether, these results suggest that downregulation of HIF-1 α triggers a significant decrease in growth potential of keratinocytes.

Aged K14-Cre/HIF-1^{flox/flox} mice have a delayed wound healing

Because of the striking repression of Ln-332 and integrins noted in the K14-Cre/HIF-1^{flox/flox} mice and the dramatic failure in epidermis reconstruction using HIF-1^{KD} keratinocytes, we were puzzled to observe no bullae, severe erosions on pads or spontaneous wound healing defects in the affected mice, except for the mild cephalic erosive lesions interpreted as consecutive to scratching. We thus performed a wound healing assay using standardized biopsies on the back of the mice. As compared to control wild type mice, there was a significant impairment of wound healing in K14-Cre/HIF-1^{flox/flox} mice (Figure 6, A and B). Histologically, inflammation was not increased but there was a delayed migration of keratinocytes from the margins of the wound (Figure 6C).

Tamoxifen induces epithelial changes and lethality in aged K14-Cre-ER^{T2}/HIF-1^{flox/flox} mice

Following the finding that the phenotype in adult mice deleted for HIF-1 α in epidermis was mild in comparison with the observed effects in epidermal reconstructs, we tested the effect of a rapid decrease in HIF-1 α protein synthesis following tamoxifen injection in the conditional knockout K14-Cre-ER^{T2}/HIF-1^{flox/flox} mouse model. Interestingly, almost all mice tested died within 14 days with similar clinical features including akinesia and poor feeding, and multiple spotted crusts on skin. Histology revealed pits of deepidermization with crusting on top, as compared with no effect on wild type controls and untreated K14-Cre-ER^{T2}/HIF-1^{flox/flox} mice (Figure 7A). On areas without clinically detectable lesions, a disorganization of the epidermis with enlarged and dystrophic keratinocytes (Figure 7B, top right) was observed. Similar features were noted in oral epithelium (Figure 7B, bottom right). There was no acute change in epidermis and in the of keratinocytes when K14-Cre-ER^{T2}/HIF-1^{flox/flox} mice were biopsied before tamoxifen challenge. Interestingly, the acute loss of HIF-1 α in epidermis did not determine an epidermolysis bullosa phenotype, but histologic changes are more in favor of an effect on cell cycle.

Discussion

Besides known as the main transcription factor involving in oxygen sensing, HIF-1 α has recently been suggested to participate in epidermal physiology. HIF-1 α has been shown to modulate adhesion/migration of skin cells such as human fibroblasts (47) or keratinocytes *in vitro* (34). Upregulation of HIF-1 α has been observed during wound healing in mice, suggesting involvement of HIF-1 α in tissue repair (48, 49). Strong HIF-1 α expression has also been demonstrated in hyperproliferative psoriatic keratinocytes (30). Consistent with this notion, our present data in mice and human reconstructed epidermis models clearly point out HIF-1 α as a critical determinant of skin homeostasis.

We found that expression of Ln-322 and its receptors (i.e. α 6 and β 1 integrins) is decreased following silencing of HIF-1 α in human keratinocytes and is associated with a significant deficiency in cell proliferation. Consistently, Fitsialos *et al.* showed a preeminent role of HIF-1 α in keratinocyte adhesion and migration through regulation of Ln-332 expression. They found hypoxia-response elements (HRE) in the Ln-332 promoter and proposed a direct regulation of Ln-332 transcription by HIF-1 α (34). Furthermore, Keely *et al.* showed HRE in the integrin β 1 promoter and that HIF-1 α directly regulates its transcription (44). Our results showed that HIF-1 α ^{KD} cells are not capable to reconstitute an epidermis even in the presence of supplemental exogenous laminin, indicating that deficiency in Ln-332 is not the only limiting factor in epidermal development by HIF-1 α ^{KD} cells. In accordance with that, it has been reported that laminin-deficient cells could successfully reconstruct an epidermis (45, 46). Our data, further, indicate that HIF-1 α downregulation leads to decreased expression of α 6 and β 1 integrins, diminished keratinocytes colony-forming efficiency, and arrested cell cycle progression in G0/G1

phase, which together could contribute to failure in reconstructing of epidermis. However, the central position of HIF-1 α in the cell physiology (cell survival, apoptosis, cell motility, cytoskeletal structure, cell adhesion and energy metabolism, ...) (13, 14) may render difficult the identification of the exact mechanism by which this factor intervenes in epidermal development.

Our *in vivo* data in the K14-Cre/HIF-1 α ^{flox/flox} mice indicated that the loss of HIF-1 α in epidermis is harmful with aging. Consistently, Boutin *et al.* has reported no obvious defects on skin physiology of young K14-Cre/HIF-1 α ^{flox/flox} mice (31). Conversely, they demonstrated an important extracutaneous effect of HIF-1 α depletion in epidermis in young mice. Indeed, loss of HIF-1 α in epidermis resulted in diminished renal and hepatic secretion of erythropoietin through modulation of NO production (31). It is well acknowledged in humans that skin barrier maturation is important immediately after birth and the premature babies can be oxygenated through the skin (50). The role of HIF-1 α could thus, be crucial in the context of neonatal adaptation to atmospheric conditions to increase the maturation of the epidermal barrier and adaptation of neonatal dermal vascularisation via its angiogenic effectors (i.e. VEGF). We have previously demonstrated a role of HIF-1 α in keratinocyte response to UVB (51) and in the regulation of the DNA repair mechanisms in keratinocytes (52). Some of the regulated genes (i.e. XPD) are involved in the transcription machinery and epidermal differentiation, as noted in trichothiodystrophy which manifests at birth with a collodion membrane engaining the skin (53). Thus, it is intriguing that mice epidermally deleted for HIF-1 α do not manifest a clear neonatal skin phenotype, in our experience and in others (31). This suggests alternative or compensation mechanisms in the prenatal and neonatal developing epidermis.

Our most striking finding was the acute skin failure provoked by acquired epidermal deletion of HIF-1 α in one-year-old mice, in which the main identified features possibly leading to death

were multiple skin microerosions and histologically apparent epidermal dystrophy. This acute change contrasts with the stigma of skin aging noted in the epidermal constitutively deleted HIF-1 α mouse: dermo-epidermal atrophy, areas of marked pruritic inflammation, which affects behavior and probably induces weight loss. The effect of constitutive epidermal HIF-1 α deletion on the expression of basal lamina proteins especially Ln-332, α 6- and β 1-integrins may affect the whole epidermal physiology with more propensities to develop atrophy and inflammation. Similar late inflammatory phenotypes have been reported in other mouse models targeting the epidermal barrier including K14-Cre/Integrin α 3^{flox/flox} (43), the Filaggrin (Flg) (54) and the Retinoic X Receptor (RXR) deficient mice (55). Clearly, structural anomalies in the basement membrane (demonstrated in our model) or in the differentiated stratae (granular layer for the Flg^{-/-} mouse) would lead to epidermal inflammation via different pathways.

Following cutaneous injury, a well-defined cascade of events called wound healing is activated, which results in sealing the epidermal fault. Our data showed that loss of HIF-1 α in keratinocytes resulted in significant delay in wound healing in aged mice. In agreement with our results, Loh *et al.* demonstrated a significantly impaired wound healing concomitant to reduced SDF-1 α level and decreased HIF-1 α in aged mice (56). Re-epithelization through proliferation and migration of wound edge keratinocytes as well as neovascularisation play a pivotal role in wound healing process (57). Thus, the dramatic impairment of wound repair in our mouse model may be due to the diminished synthesis of basement membrane proteins such as β 1 integrin or/and to reduced adaptation to neovascularisation. Our histological assessment was more in favor of reduced re-epithelization, which can be linked to the major effect of HIF-1 α epidermal deletion on Ln-332 and integrin expression. Consistent with this, β 1 integrin deficiency targeted to keratinocytes have impaired re-epithelization (58). HIF-1 α could also affect wound healing process through

regulation or interaction with other factors including extracellular heat shock protein-90a expression (47), Notch Ligand Delta 1 (59), or p21 (26), which have been shown to modulate wound healing.

In conclusion, our study demonstrates that HIF-1 α is an important factor in epidermal homeostasis, especially in aged skin and wound healing. Other functions might come to light after more in-depth investigations across different age groups using this model. Most interestingly, the type of inflammation noted might correspond to a new epidermal determinant of atopic dermatitis, which is now detected in aging human individuals (60). The precise causes of death in the inducible epidermal deletion model needs also to be investigated further because it suggests some systemic effects driven by skin as already noted in the case of oxygen sensing and kidney erythropoietin (31).

Methods

Animals and experimental protocol

Breeding: the K14-Cre and K14-Cre-ER^{T2} mouse strains were kindly provided by Dr. D. Metzger (42). The HIF-1^{flox/flox} mouse strain was kindly obtained from Dr. R.S. Johnson (31). Crossing the different strains generated the K14-Cre/HIF-1^{flox/flox} and K14-Cre-ERT2/HIF-1^{flox/flox} mice. In order to induce HIF ablation, 1 mg of 4-hydroxy-tamoxifen (OHT) was injected intraperitoneally into 1 to 1.5 year-old K14-Cre-ER^{T2}/HIF-1^{flox/flox} mice for 5 consecutive days as previously described (42).

Wound healing assay: general anesthesia was performed with 3% isoflurane. The hair of the back was shaved with an electric shaver and the skin was rinsed with alcohol. Wound was performed using an 8-mm biopsy punch. The animals were then caged individually and received buprenorphine in accordance with the ethical committee of the University Bordeaux 2.

Source of human keratinocytes

Keratinocytes were isolated from normal human skin in patients undergoing plastic surgery as previously described (51). Briefly, fresh skin fragments were immediately cut into 5 x 5-mm pieces and treated with trypsin for 3 h at 37°C or overnight at 4°C to separate epidermis from dermis. Keratinocytes were seeded at a concentration of 10⁵ cells per cm² in MCDB153 medium, supplemented with hydrocortisone (0.5 µg/ml), epidermal growth factor (10 ng/ml), insulin (5 µg/ml), and bovine pituitary extract (70 µg/ml) (all from Sigma, Saint Quentin, France). The medium was changed three times a week. When the cultures reached 70–80% confluence, the

cells were detached with 10% trypsin and then resuspended in MCDB153 medium or were used to reconstruct epidermis.

Lentiviral vector constructs and transduction procedure

The lentiviral vector TEEHshHIF1 (noted here shHIF-1 α) used for transduction was constructed as follows. The 21-sense and antisense oligonucleotides were designed in the 3'-coding region of the human HIF-1 α (GATGTTAGCTCCCTATATCCC) gene (51). The DNA fragments were cloned downstream the polymerase III H1 promoter. The fragment containing the H1 promoter and the shRNA sequences was then introduced into the 3' U3 long terminal repeat (LTR) region of the pTRIP Δ U3-EF1 α -EGFP-MCS Δ U3 kindly provided by P. Charneau (Institut Pasteur, Paris, France). This vector contains the enhanced green fluorescent protein (EGFP) gene under the control of the EF1 α promoter. A shRNA directed against the dsRed fluorescent protein (TEEshRFP or shRFP), not expressed in mammalian cells, was used as control (noted thereafter shCTL). A total of 5×10^5 cells were plated in T25-flasks and incubated for 24 h in complete medium. Before infection, medium was removed and cells were infected with viral supernatants for 24 h at 37°C. After 1 to 5 days, the cells were trypsinized and used for coculture or epidermal reconstruction. Before reconstruction, the percentage of EGFP-positive cells was analyzed by flow cytometry on a FACSCalibur (Becton Dickinson, San Diego, CA).

Preparation of epidermal reconstructs

Epidermal reconstructs were prepared according to a modified Prunieras technique, as already described (61). In brief, normal skin samples were cut into 1 x 1 cm-pieces and then kept at 37°C

for 15 days. Then, dermis was separated from epidermis (treated with alcohol) and stored at -80°C. Normal human keratinocytes were seeded at 2×10^5 cells per cm^2 on the thawed dead dermis. Twenty-four hours later, the dermis was immersed in culture medium for 72 h to allow cell proliferation. Then, it was placed at the air/liquid interface for 7 days to allow differentiation.

To reconstruct the epidermis with both fibroblasts and keratinocytes, normal human fibroblasts were first seeded at 2×10^5 cells per cm^2 on the thawed dead dermis. Twenty-four hours later, the dermis was immersed in culture medium for 72 h to allow cell proliferation. Three days later, the medium was removed and keratinocytes were added as already mentioned. To study the effect of exogenous laminin, dead dermis were coated with 1 mg/ml of human Ln-332 (Immundiagnostik AG, Bensheim, Germany) at 4°C over night. The normal human keratinocytes were then seeded on this coated dead dermis.

Colony-forming assay

Cells were seeded at a density of 50 cells/ cm^2 on mitomycin C-treated 3T3 fibroblasts in complete Green's media, which included cholera toxin (8.5 ng/ml), hydrocortisone (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), epidermal growth factor (10 ng/ml), insulin (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), triiodo-L-thyronine (2×10^{-7} M) and 10% fetal serum. After 10 days of culture, the dish was fixed in 4% formaldehyde for 10 min, washed in PBS, and then stained with trypan blue for 1 h. The clones were counted under an inverted microscope. Values are expressed as the ratio of the number colonies on the number of inoculated cells. Three classes of colonies were distinguished according to diameter: > 2 mm, 1-2 mm, and < 1 mm (maximum 10 cells per colony). Large, intermediate, and small colonies presumably corresponded to high, intermediate, and very low growth potentials, respectively.

Histological and immunohistochemical studies

Reconstructs were fixed in 4% formaldehyde, embedded in paraffin, cut in 3 mm sections and stained with hematoxylin-eosin to assess the general morphology of the epidermis. The monoclonal antibodies against HIF-1 α (NB100-131, Novus Biologicas, Interchim, Montluçon, France), laminin γ 2 (clone D4B5, Millipore, Molsheim, France) and GFP (B-2 sc-9996 Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) were used for specific purposes.

Immunofluorescence microscopy

Subconfluent cells were fixed with 3% paraformaldehyde prepared in CB (cytoskeletal buffer; pH 6.1; 10 mM Mes, 150 mM NaCl, 5 mM EGTA, 5 mM MgCl₂ and 5 mM glucose) for 10 min at room temperature (25°C) and permeabilized with 0.1% (v/v) Triton X-100 for 1 min. After 3 washes in CB, cells were incubated in blocking solution [1% BSA/2% FBS in TBS (Tris-buffered saline; 20 mM Tris, 150 mM NaCl, 2 mM EGTA and 2 mM MgCl₂, pH 7.5)] for 10 min. Cells were then incubated with the primary antibodies (anti-laminin γ 2 (clone D4B5, Millipore, Molsheim, France), anti-actin (Sigma, France), or anti-GFP (B-2 sc-9996 Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) diluted in blocking solution for 30 min, then with rhodamine-phalloidin, Hoescht 33342 and the fluorescently labeled secondary antibody for 30 min. Between each step, cells were washed three times with TBS. The coverslips were washed in water and mounted on to microscope slides using FMM (fluoromount mounting medium, Clinisciences, Montrouge, France). Immunofluorescence was detected using a fluorescence microscope (Eclipse TE2000, Nikon, Champigny sur Marne, France) and a DXM 1200 camera (Nikon) (Lucia 5.0 acquisition software, Nikon) or by confocal imaging using an LSM510 Meta

(Zeiss Systèmes SA, Nanterre, France) inverted laser-scanning fluorescence microscope with acquisition software (LSM 510 acquisition software, Zeiss) and an x63 (numerical aperture, 1.4) oil immersion objective. Triple channel imaging using Hoescht 33342, Alexa Fluor® 488-labelled secondary antibodies and rhodamine-phalloidin was obtained using selective laser excitation at 350 nm, 488 nm and 543 nm, respectively. The images were processed using Adobe® Photoshop 7.

α6 and β1 integrin expression analysis

At different time (2, 4 and 6 days), cells were fixed with 4% formaldehyde for 10 min at room temperature and then permeabilized in 0.5% Triton-X-100 for 10 min at room temperature. After washing with PBS, keratinocytes were incubated overnight at 4°C with a 1:200 dilution of either the anti-α6 integrin (MAB1378, Millipore, Molsheim, France) or anti-β1 integrin (MAB1959, Millipore, Molsheim, France) antibodies. After washing with PBS, cells were incubated with Alexa-Fluor 532-coupled secondary antibody (1:200) for 1 h at room temperature. The integrin expression (α6 and β1) was then monitored by flow cytometry to quantify the change in geometric mean fluorescence over time.

Cell cycle and apoptosis analysis

Cell cycle analysis was performed using APC-linked anti-BrdU and 7-AAD according to the manufacturer's protocols (BD Biosciences). For apoptosis analysis, cells were incubated with 2.5 mg/ml propidium iodide (PI, Sigma) and immediately analyzed by flow cytometry.

Western blotting Procedure

Equal amounts of total protein were resolved by SDS-PAGE and electrophoretically transferred to phenylmethylsulfonyl fluoride membranes. Membranes were then incubated overnight at 4°C with a 1:1000 dilution of the anti-HIF-1 α (BD Transduction Laboratories, Le Pont de Claix, France), anti-collagen IV (ab6586) or anti MMP14 (ab51074) (Abcam, Paris, France). After additional incubation with a 1:10,000 dilution of an anti-immunoglobulin horseradish peroxidase-linked antibody (Vector Laboratories, Biovalley S.A, Marne la Vallée, France) for 1 h, blots were developed using the chemiluminescence ECL reagent (Amersham Biosciences, Saclay, France).

Statistics

A Student's paired t-test was used for comparison of differences between indicated groups.

* $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Acknowledgements

We would like to thank P. Charneau (Institut Pasteur, Paris, France) for providing the lentivector pTRIPΔU3-EF1α-EGFP-MCS, D. Metzger and P. Chambon (IGBMC, Strasbourg, France) for the K14-Cre and K14-Cre-ER^{T2} mouse strains and R.S. Johnson (UC San Diego, La Jolla, CA, USA) for the HIF-1α^{flox/flox} mouse strain. We acknowledge P. Costet for technical assistance. Nsrein Ali was granted by the Ministry of higher studies in Syria.

References

1. Proksch, E., Brandner, J.M., and Jensen, J.M. 2008. The skin: an indispensable barrier. *Exp Dermatol* 17:1063-1072.
2. Burgeson, R.E., and Christiano, A.M. 1997. The dermal-epidermal junction. *Curr Opin Cell Biol* 9:651-658.
3. Bedogni, B., Welford, S.M., Cassarino, D.S., Nickoloff, B.J., Giaccia, A.J., and Powell, M.B. 2005. The hypoxic microenvironment of the skin contributes to Akt-mediated melanocyte transformation. *Cancer Cell* 8:443-454.
4. Evans, N.T., and Naylor, P.F. 1967. The oxygen tension gradient across human epidermis. *Respir Physiol* 3:38-42.
5. Stewart, F.A., Denekamp, J., and Randhawa, V.S. 1982. Skin sensitization by misonidazole: a demonstration of uniform mild hypoxia. *Br J Cancer* 45:869-877.
6. Varghese, M.C., Balin, A.K., Carter, D.M., and Caldwell, D. 1986. Local environment of chronic wounds under synthetic dressings. *Arch Dermatol* 122:52-57.
7. Ninikoski, J., Heughan, C., and Hunt, T.K. 1972. Oxygen tensions in human wounds. *J Surg Res* 12:77-82.
8. Frank, S., and Kampfer, H. 2003. Excisional wound healing. An experimental approach. *Methods Mol Med* 78:3-15.
9. O'Toole, E.A., Marinkovich, M.P., Hoeffler, W.K., Furthmayr, H., and Woodley, D.T. 1997. Laminin-5 inhibits human keratinocyte migration. *Exp Cell Res* 233:330-339.
10. Sen, C.K., Khanna, S., Babior, B.M., Hunt, T.K., Ellison, E.C., and Roy, S. 2002. Oxidant-induced vascular endothelial growth factor expression in human keratinocytes and cutaneous wound healing. *J Biol Chem* 277:33284-33290.
11. Maxwell, P.H. 2004. HIF-1's relationship to oxygen: simple yet sophisticated. *Cell Cycle* 3:156-159.
12. Metzen, E., and Ratcliffe, P.J. 2004. HIF hydroxylation and cellular oxygen sensing. *Biol Chem* 385:223-230.
13. Semenza, G.L. 2004. O₂-regulated gene expression: transcriptional control of cardiorespiratory physiology by HIF-1. *J Appl Physiol* 96:1173-1177; discussion 1170-1172.

14. Wenger, R.H. 2002. Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *Faseb J* 16:1151-1162.
15. Kietzmann, T., and Gorlach, A. 2005. Reactive oxygen species in the control of hypoxia-inducible factor-mediated gene expression. *Semin Cell Dev Biol* 16:474-486.
16. Berra, E., Ginouves, A., and Pouyssegur, J. 2006. The hypoxia-inducible-factor hydroxylases bring fresh air into hypoxia signalling. *EMBO Rep* 7:41-45.
17. Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., Kim, W., Valiando, J., Ohh, M., Salic, A., Asara, J.M., Lane, W.S., and Kaelin, W.G., Jr. 2001. HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science* 292:464-468.
18. Maxwell, P.H., Pugh, C.W., and Ratcliffe, P.J. 2001. The pVHL-hIF-1 system. A key mediator of oxygen homeostasis. *Adv Exp Med Biol* 502:365-376.
19. Huang, L.E., Gu, J., Schau, M., and Bunn, H.F. 1998. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:7987-7992.
20. Kallio, P.J., Wilson, W.J., O'Brien, S., Makino, Y., and Poellinger, L. 1999. Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1 α by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem* 274:6519-6525.
21. Salceda, S., and Caro, J. 1997. Hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem* 272:22642-22647.
22. Semenza, G.L., and Wang, G.L. 1992. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 12:5447-5454.
23. Wang, G.L., Jiang, B.H., Rue, E.A., and Semenza, G.L. 1995. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:5510-5514.
24. Pouyssegur, J., Dayan, F., and Mazure, N.M. 2006. Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature* 441:437-443.
25. Semenza, G.L. 2003. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3:721-732.

26. Cho, Y.S., Bae, J.M., Chun, Y.S., Chung, J.H., Jeon, Y.K., Kim, I.S., Kim, M.S., and Park, J.W. 2008. HIF-1alpha controls keratinocyte proliferation by up-regulating p21(WAF1/Cip1). *Biochim Biophys Acta* 1783:323-333.
27. Liu, L., Marti, G.P., Wei, X., Zhang, X., Zhang, H., Liu, Y.V., Nastai, M., Semenza, G.L., and Harmon, J.W. 2008. Age-dependent impairment of HIF-1alpha expression in diabetic mice: Correction with electroporation-facilitated gene therapy increases wound healing, angiogenesis, and circulating angiogenic cells. *J Cell Physiol* 217:319-327.
28. Michaylira, C.Z., and Nakagawa, H. 2006. Hypoxic microenvironment as a cradle for melanoma development and progression. *Cancer Biol Ther* 5:476-479.
29. Distler, O., Distler, J.H., Scheid, A., Acker, T., Hirth, A., Rethage, J., Michel, B.A., Gay, R.E., Muller-Ladner, U., Matucci-Cerinic, M., et al. 2004. Uncontrolled expression of vascular endothelial growth factor and its receptors leads to insufficient skin angiogenesis in patients with systemic sclerosis. *Circ Res* 95:109-116.
30. Rosenberger, C., Solovan, C., Rosenberger, A.D., Jinping, L., Treudler, R., Frei, U., Eckardt, K.U., and Brown, L.F. 2007. Upregulation of hypoxia-inducible factors in normal and psoriatic skin. *J Invest Dermatol* 127:2445-2452.
31. Boutin, A.T., Weidemann, A., Fu, Z., Mesropian, L., Gradin, K., Jamora, C., Wiesener, M., Eckardt, K.U., Koch, C.J., Ellies, L.G., et al. 2008. Epidermal sensing of oxygen is essential for systemic hypoxic response. *Cell* 133:223-234.
32. Elson, D.A., Thurston, G., Huang, L.E., Ginzinger, D.G., McDonald, D.M., Johnson, R.S., and Arbeit, J.M. 2001. Induction of hypervascularity without leakage or inflammation in transgenic mice overexpressing hypoxia-inducible factor-1alpha. *Genes Dev* 15:2520-2532.
33. Kim, K.S., Rajagopal, V., Gonsalves, C., Johnson, C., and Kalra, V.K. 2006. A novel role of hypoxia-inducible factor in cobalt chloride- and hypoxia-mediated expression of IL-8 chemokine in human endothelial cells. *J Immunol* 177:7211-7224.
34. Fitsialos, G., Bourget, I., Augier, S., Ginouves, A., Rezzonico, R., Odorisio, T., Cianfarani, F., Virolle, T., Pouyssegur, J., Meneguzzi, G., et al. 2008. HIF1 transcription factor regulates laminin-332 expression and keratinocyte migration. *J Cell Sci* 121:2992-3001.

35. Ryan, M.C., Christiano, A.M., Engvall, E., Wewer, U.M., Miner, J.H., Sanes, J.R., and Burgeson, R.E. 1996. The functions of laminins: lessons from in vivo studies. *Matrix Biol* 15:369-381.
36. Watt, F.M. 2002. Role of integrins in regulating epidermal adhesion, growth and differentiation. *Embo J* 21:3919-3926.
37. Rousselle, P., Lunstrum, G.P., Keene, D.R., and Burgeson, R.E. 1991. Kalinin: an epithelium-specific basement membrane adhesion molecule that is a component of anchoring filaments. *J Cell Biol* 114:567-576.
38. Fine, J.D., Eady, R.A., Bauer, E.A., Bauer, J.W., Bruckner-Tuderman, L., Heagerty, A., Hintner, H., Hovnanian, A., Jonkman, M.F., Leigh, I., et al. 2008. The classification of inherited epidermolysis bullosa (EB): Report of the Third International Consensus Meeting on Diagnosis and Classification of EB. *J Am Acad Dermatol* 58:931-950.
39. Nakano, A., Chao, S.C., Pulkkinen, L., Murrell, D., Bruckner-Tuderman, L., Pfendner, E., and Uitto, J. 2002. Laminin 5 mutations in junctional epidermolysis bullosa: molecular basis of Herlitz vs. non-Herlitz phenotypes. *Hum Genet* 110:41-51.
40. Ryan, H.E., Lo, J., and Johnson, R.S. 1998. HIF-1 alpha is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *Embo J* 17:3005-3015.
41. Cramer, T., Yamanishi, Y., Clausen, B.E., Forster, I., Pawlinski, R., Mackman, N., Haase, V.H., Jaenisch, R., Corr, M., Nizet, V., et al. 2003. HIF-1alpha is essential for myeloid cell-mediated inflammation. *Cell* 112:645-657.
42. Indra, A.K., Warot, X., Brocard, J., Bornert, J.M., Xiao, J.H., Chambon, P., and Metzger, D. 1999. Temporally-controlled site-specific mutagenesis in the basal layer of the epidermis: comparison of the recombinase activity of the tamoxifen-inducible Cre-ER(T) and Cre-ER(T2) recombinases. *Nucleic Acids Res* 27:4324-4327.
43. Margadant, C., Raymond, K., Kreft, M., Sachs, N., Janssen, H., and Sonnenberg, A. 2009. Integrin alpha3beta1 inhibits directional migration and wound re-epithelialization in the skin. *J Cell Sci* 122:278-288.
44. Keely, S., Glover, L.E., MacManus, C.F., Campbell, E.L., Scully, M.M., Furuta, G.T., and Colgan, S.P. 2009. Selective induction of integrin beta1 by hypoxia-inducible factor: implications for wound healing. *Faseb J* 23:1338-1346.

45. Gagnoux-Palacios, L., Vailly, J., Durand-Clement, M., Wagner, E., Ortonne, J.P., and Meneguzzi, G. 1996. Functional Re-expression of laminin-5 in laminin-gamma2-deficient human keratinocytes modifies cell morphology, motility, and adhesion. *J Biol Chem* 271:18437-18444.
46. Vailly, J., Gagnoux-Palacios, L., Dell'Ambra, E., Romero, C., Pinola, M., Zambruno, G., De Luca, M., Ortonne, J.P., and Meneguzzi, G. 1998. Corrective gene transfer of keratinocytes from patients with junctional epidermolysis bullosa restores assembly of hemidesmosomes in reconstructed epithelia. *Gene Ther* 5:1322-1332.
47. Li, W., Li, Y., Guan, S., Fan, J., Cheng, C.F., Bright, A.M., Chinn, C., Chen, M., and Woodley, D.T. 2007. Extracellular heat shock protein-90alpha: linking hypoxia to skin cell motility and wound healing. *Embo J* 26:1221-1233.
48. Biswas, S., Roy, S., Banerjee, J., Hussain, S.R., Khanna, S., Meenakshisundaram, G., Kuppusamy, P., Friedman, A., and Sen, C.K. 2010. Hypoxia inducible microRNA 210 attenuates keratinocyte proliferation and impairs closure in a murine model of ischemic wounds. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:6976-6981.
49. Elson, D.A., Ryan, H.E., Snow, J.W., Johnson, R., and Arbeit, J.M. 2000. Coordinate up-regulation of hypoxia inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-1 target genes during multi-stage epidermal carcinogenesis and wound healing. *Cancer Res* 60:6189-6195.
50. Fluhr, J.W., Darlenski, R., Taieb, A., Hachem, J.P., Baudouin, C., Msika, P., De Belilovsky, C., and Berardesca, E. 2010. Functional skin adaptation in infancy - almost complete but not fully competent. *Exp Dermatol* 19:483-492.
51. Rezvani, H.R., Dedieu, S., North, S., Belloc, F., Rossignol, R., Letellier, T., de Verneuil, H., Taieb, A., and Mazurier, F. 2007. Hypoxia-inducible factor-1alpha, a key factor in the keratinocyte response to UVB exposure. *J Biol Chem* 282:16413-16422.
52. Rezvani, H.R., Mahfouf, W., Ali, N., Chemin, C., Ged, C., Kim, A.L., de Verneuil, H., Taieb, A., Bickers, D.R., and Mazurier, F. 2010. Hypoxia-inducible factor-1alpha regulates the expression of nucleotide excision repair proteins in keratinocytes. *Nucleic Acids Res* 38:797-809.
53. Morice-Picard, F., Cario-Andre, M., Rezvani, H., Lacombe, D., Sarasin, A., and Taieb, A. 2009. New clinico-genetic classification of trichothiodystrophy. *Am J Med Genet A* 149A:2020-2030.

54. Oyoshi, M.K., Murphy, G.F., and Geha, R.S. 2009. Filaggrin-deficient mice exhibit TH17-dominated skin inflammation and permissiveness to epicutaneous sensitization with protein antigen. *J Allergy Clin Immunol* 124:485-493, 493 e481.
55. Li, M., Chiba, H., Warot, X., Messaddeq, N., Gerard, C., Chambon, P., and Metzger, D. 2001. RXR-alpha ablation in skin keratinocytes results in alopecia and epidermal alterations. *Development* 128:675-688.
56. Loh, S.A., Chang, E.I., Galvez, M.G., Thangarajah, H., El-ftesi, S., Vial, I.N., Lin, D.A., and Gurtner, G.C. 2009. SDF-1 alpha expression during wound healing in the aged is HIF dependent. *Plast Reconstr Surg* 123:65S-75S.
57. Martin, P. 1997. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science* 276:75-81.
58. Grose, R., Hutter, C., Bloch, W., Thorey, I., Watt, F.M., Fassler, R., Brakebusch, C., and Werner, S. 2002. A crucial role of beta 1 integrins for keratinocyte migration in vitro and during cutaneous wound repair. *Development* 129:2303-2315.
59. Estrach, S., Legg, J., and Watt, F.M. 2007. Syntenin mediates Delta1-induced cohesiveness of epidermal stem cells in culture. *J Cell Sci* 120:2944-2952.
60. Tanei, R. 2009. Atopic dermatitis in the elderly. *Inflamm Allergy Drug Targets* 8:398-404.
61. Cario-Andre, M., Briganti, S., Picardo, M., Nikaido, O., Gall, Y., Ginestar, J., and Taieb, A. 2002. Epidermal reconstructs: a new tool to study topical and systemic photoprotective molecules. *J Photochem Photobiol B* 68:79-87.

Figure legends

Figure 1. Macroscopic and histological skin changes in aging K14-CRE/HIF-1 $\alpha^{\text{flox/flox}}$ mouse. (A) At 12 months, the K14-CRE/HIF-1 $\alpha^{\text{flox/flox}}$ mouse exhibits hair growth, hyperpigmentation and a hyperkeratotic epidermis in the tail. (B and C) Differences are observed in pathology sections: thickened epidermis, pigment in basal layers (indicated by arrows), increased cells in granular layer, and hyperparakeratotic horny layer. At 12 months other features of epidermal lichenification and inflammation (D) become obvious around the eye (E), the mouth and the ventral aspect of the neck, with erosions and crusts (F). (G) Lichenified epidermis with massive dermal inflammation. (H-K) At six months of age, changes are not detectable in skin thickness, but at 12 months epidermal thinning and dermal atrophy are noticeable. (L-O) Reduced expression of Ln-332 $\gamma 2$ chain and $\beta 1$ integrin observed by immunofluorescence. Skin biopsies were obtained on the back at age 12 months and stained for immunofluorescence as indicated in Methods.

Figure 2. HIF-1 α knockdown alters Ln-332 expression in human keratinocytes in culture. (A) Efficient extinction of HIF-1 α by RNA interference mediated by lentiviral vectors. Western blot analysis in normal non-transduced keratinocytes (NT) and 4 days after transduction of the same cells with the control vector shCTL or the shHIF-1 α vector. Equal loading protein was confirmed by β -actin quantification. (B) Western blot analysis and (C) quantification of Ln-332 $\alpha 3$, $\beta 3$ and $\gamma 2$ chains expression indicates a dramatic decrease in the expression of the Ln-332 subunits after HIF-1 α^{KD} . (C) The protein bands corresponding to Ln-332 $\alpha 3$, $\beta 3$ and $\gamma 2$ chains were quantified. Data are presented as the mean \pm S.D. of 3 independent experiments. *, $p < 0.05$. (D) Detection of Ln-332 $\gamma 2$ chain (red staining), GFP (green), and actin (purple) expression by immunofluorescence in keratinocytes at different times after

transduction confirms that adhesion and migration are disturbed in HIF-1 α ^{KD} keratinocytes in a time-dependant manner. Dashed line depicts laminin γ 2 deposit around the cells. Arrows indicate GFP-positive cells.

Figure 3. HIF-1 α knockdown affects α 6 and β 1 integrins expression in human keratinocytes. (A and B) Flow cytometry analysis of cultured keratinocytes, 2, 4 and 6 days after transduction, shows a drop of α 6 and β 1 integrins expression. (C and D) Relative mean of fluorescence is measured as depicted in A and B and the values compared to the NT value. (E and F) Detection of α 6 and β 1 integrins (red staining), and GFP (green) by immunofluorescence in cells at different times after transduction confirms the progressive lost of integrins expression in HIF-1 α ^{KD} keratinocytes. Blue: DAPI (nuclei). Data are the mean \pm S.D. of three independent experiments. * $p < 0.05$.

Figure 4. HIF-1 α knockdown prevents the reconstruction of a fully stratified epidermis. (A) Hematoxylin-eosin (HE) staining indicates that all groups [i.e. non-transduced (NT), shCTL and shHIF-1 α -transduced cells] form a normal reconstructed epidermis. In contrast, immunohistochemical analysis using anti-HIF-1 α and anti-GFP antibodies expression for the same epidermis shows absence of transduced cells in the epidermis reconstructed with the shHIF-1 α -transduced cells. (B) Relative number of epidermal reconstructs formed in relation with the number of inoculated cells. In the case of HIF-1 α ^{KD}, epidermal reconstruction is only possible because of the presence of non-transduced keratinocytes. Data are the mean \pm S.D. of four independent experiments. * $p < 0.05$. (C) Effect of dead dermis coating by exogenous Ln-332. shHIF-1 α -transduced GFP-positive cells can be detected indicating that some HIF-1 α ^{KD} keratinocytes can adhere to the modified substrate (bottom right), but the architecture of

the resulting reconstruct is poorly organized with an absence of normal differentiation (nucleated cells in upper epidermis). (D) Introduction of fibroblasts in reconstructs helps the growth of HIF-1 α ^{KD} cells in reconstructs which are better differentiated compared to the same group of cells in C, but the location of GFP cells is mostly in differentiated layers (bottom right, arrows), suggesting a progressive elimination of HIF-1 α ^{KD} keratinocytes.

Figure 5. Knockdown of HIF-1 α results in diminished growth potential of keratinocytes, cell cycle arrest in G0/G1 phase, and apoptotic cell death. (A-C) Colony-forming efficiency and distribution of colony types were assessed following transduced and untransduced keratinocyte cultures onto mitomycin C-treated 3T3 fibroblasts as a feeder layer. Note the significant decrease in colony forming efficiency and in formation of big colonies (> 2 mm) by HIF-1 α ^{KD} cells compared with CTL cells. (D) Flow cytometry analysis of cell cycle progression indicates increased percentage of cells in G0-G1 phase with time, concomitantly, with a decrease in the percentage of cells in S phase. (E) Graphic representation of the distribution of cells in the G1, S, and G2 phases. (F) Study of apoptosis using propidium iodide demonstrating a progressive increase in the percentage of apoptotic cells in shHIF-1 α transduced cells in a time dependent-manner. Data for E and F are the mean \pm S.D. of three independent experiments. * $p < 0.05$.

Figure 6. Wound healing is delayed in K14-Cre/HIF-1 α ^{flx/flx} aged mice. (A) The time course of wound healing in two representative wild type and HIF-1 α deficient mice shows dramatic impairment of skin regeneration in the absence of HIF-1 α expression in keratinocytes. (B) Wound surface measurements over time indicate significant difference in kinetics of wound

healing after 14 days. (C) Histology of scar at sacrifice (14 days) evidences delay in re-epithelialization without marked increase in skin inflammation.

Figure 7. Chronic HIF-1 α deletion by tamoxifen injection in aged K14-Cre-ER^{T2}/HIF-1 α ^{flox/flox} mice provokes epidermis change and animal death. One-year old mice were intraperitoneally injected with 1 mg of 4-hydroxy-tamoxifen. (A) Histology reveals pits of deepidermization with crusting on top (right), as compared with wild type and untreated K14-Cre-ER^{T2}/HIF-1 α ^{flox/flox} control mice. (B) On areas without clinically detectable lesions, note a disorganization of the epidermis with enlarged and dystrophic keratinocytes (top right). Similar features were noted in oral epithelium (bottom right). (C) In some K14-Cre-ER^{T2}/HIF-1 α ^{flox/flox} mice, before (left) and after (right) tamoxifen injection, the size of keratinocytes is not changed.

Figure 2

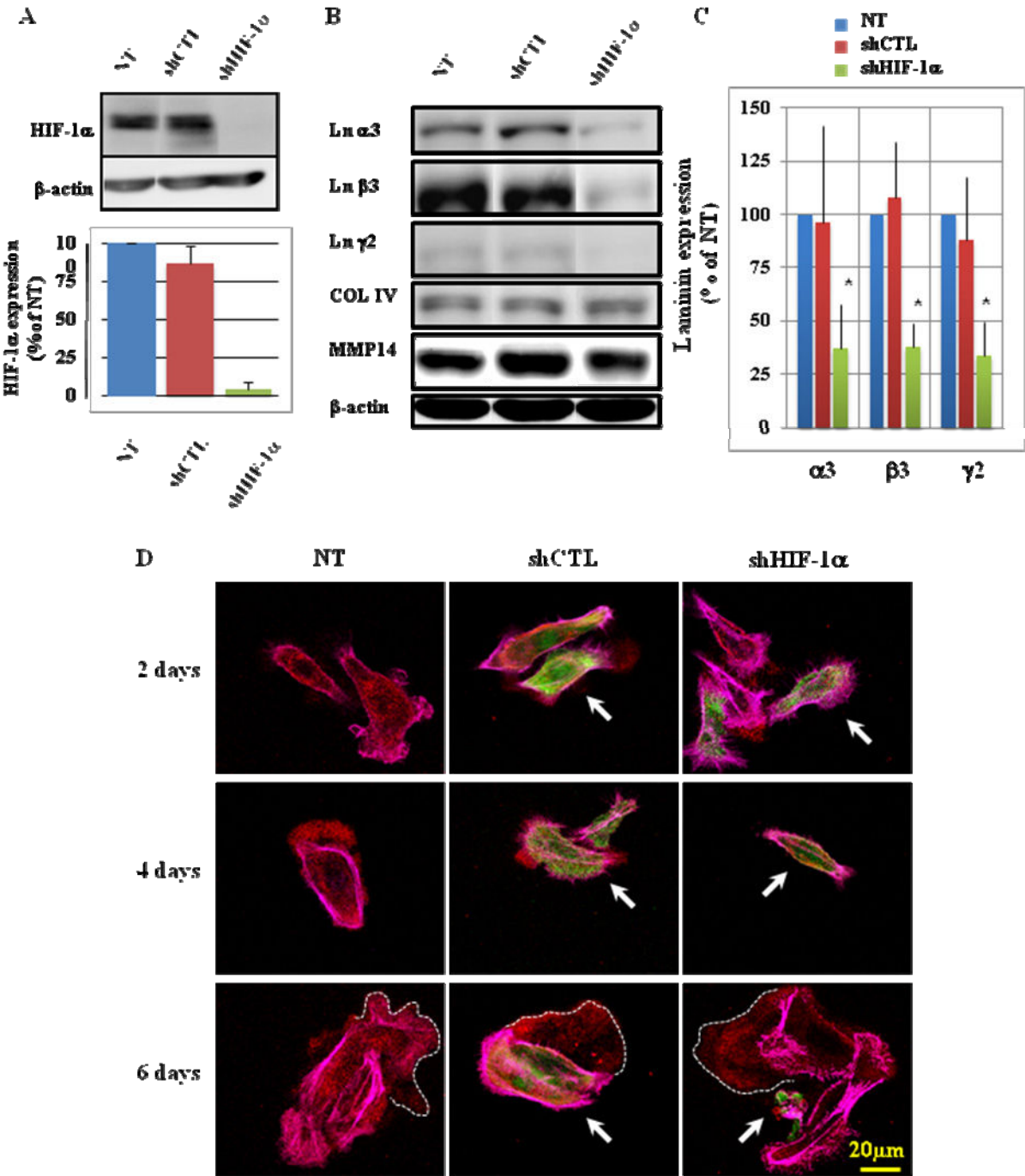


Figure 3

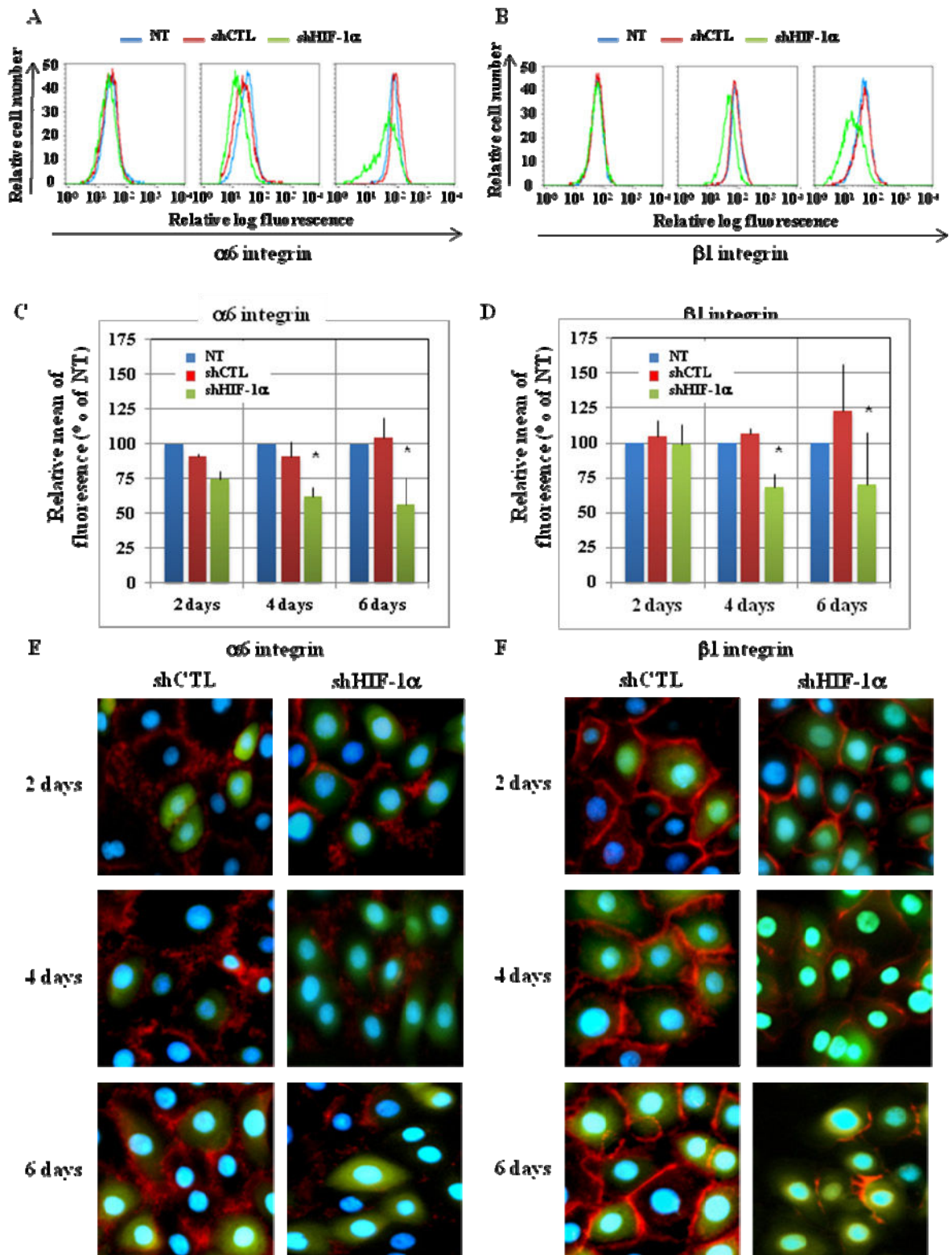


Figure 4

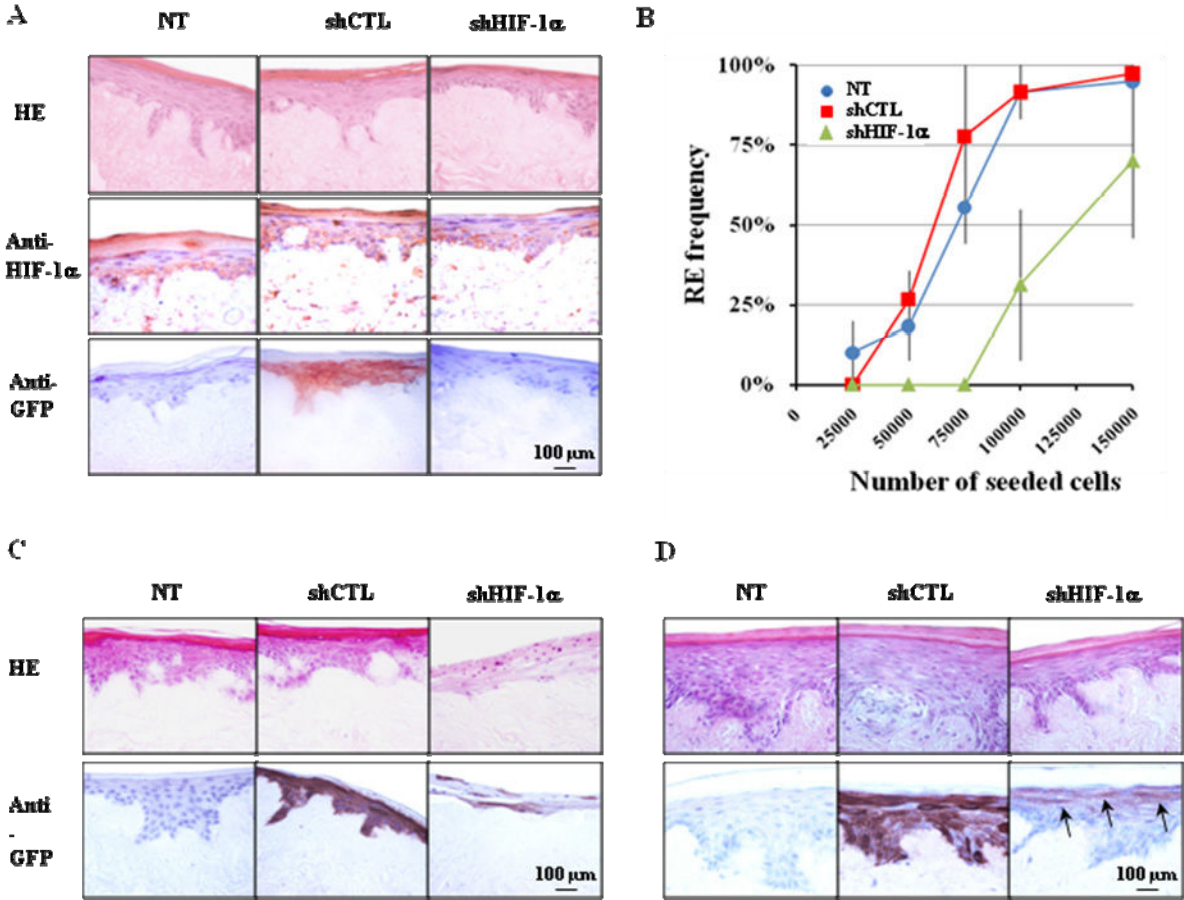


Figure 5

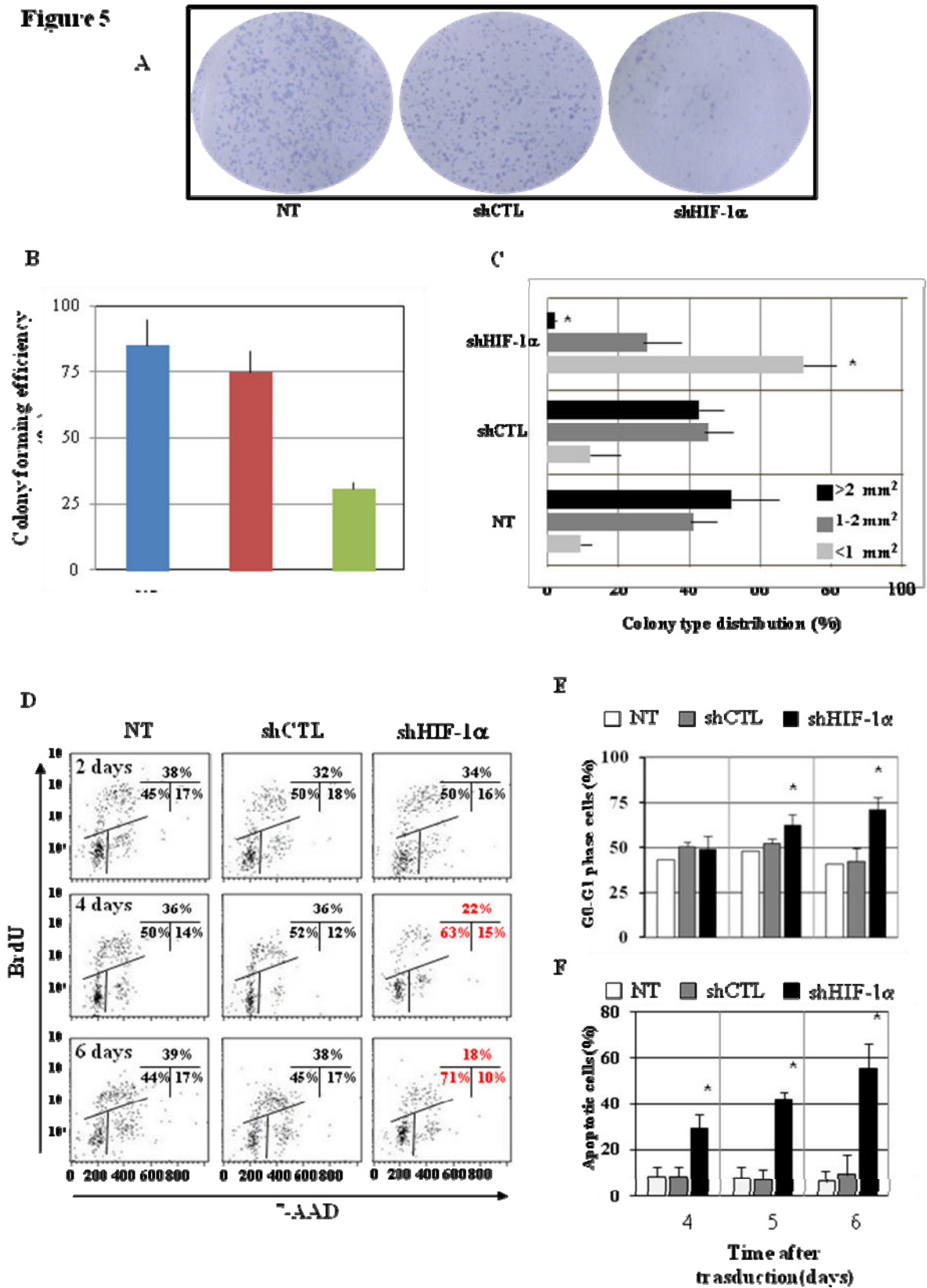


Figure 6

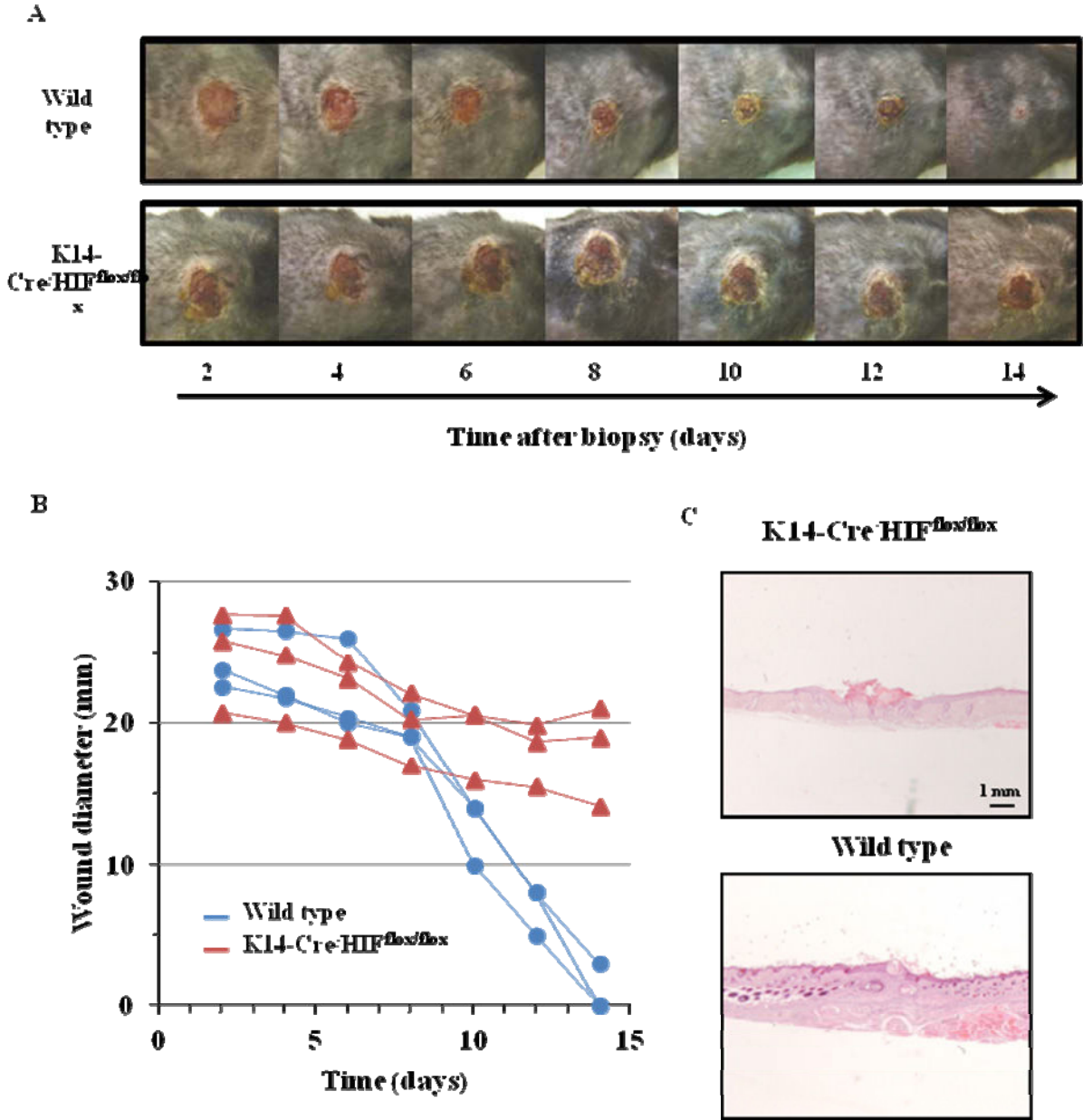
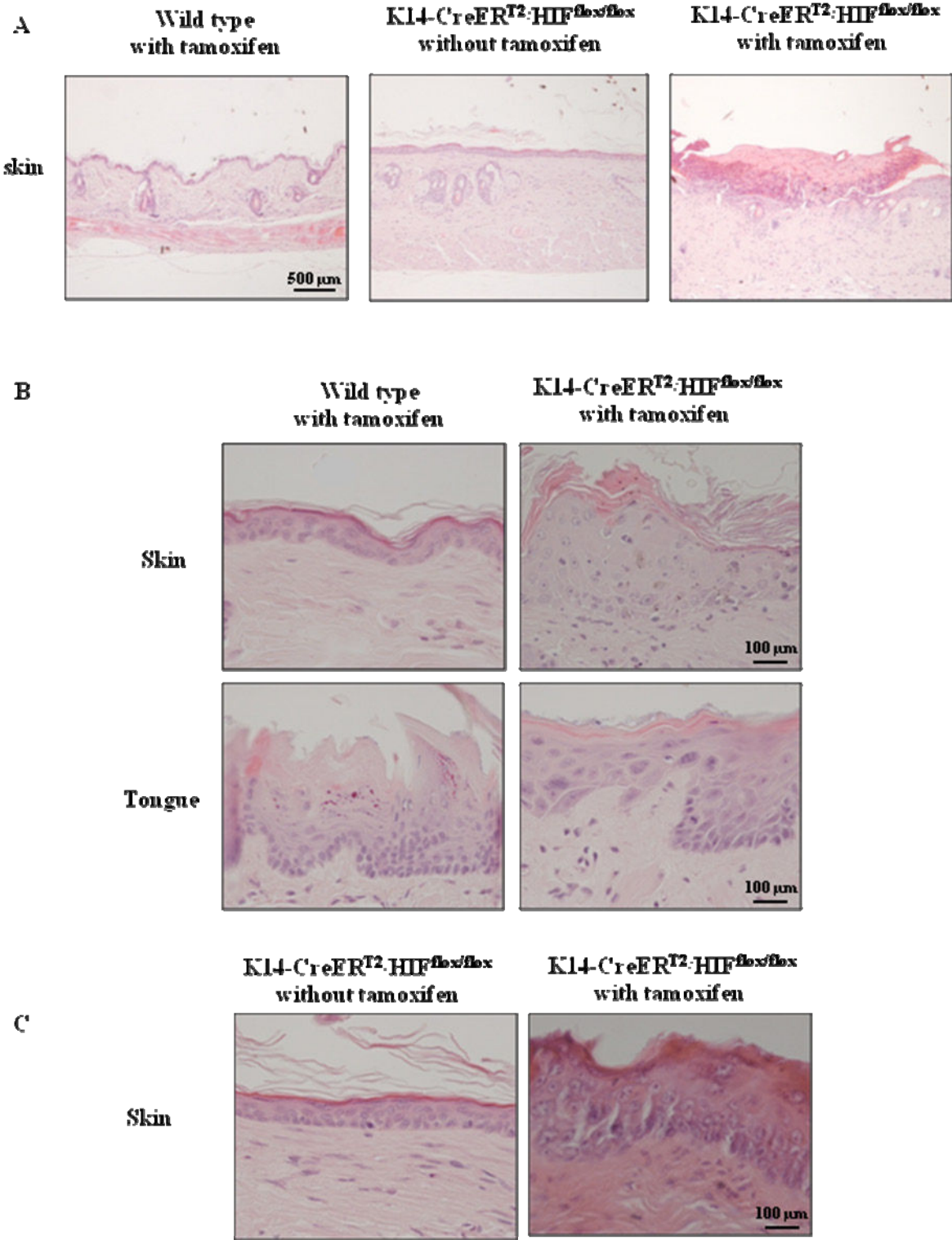


Figure 7



XPC silencing in normal human keratinocytes triggers metabolic alterations that drive the formation of squamous cell carcinomas

Hamid Reza Rezvani^{1,2,3*}, Arianna L. Kim¹, Rodrigue Rossignol⁴, Nsrein Ali^{2,3}, Meaghan Daly¹, Walid Mahfouf^{2,3}, Nadège Bellance⁴, Alain Taïeb^{2,3,5}, Hubert de Verneuil^{2,3}, Frédéric Mazurier^{2,3†}, David R. Bickers^{1*†}

¹Department of Dermatology, College of Physicians and Surgeons, Columbia University, New York, NY 10032, US;

²INSERM U876, Bordeaux, F-33000 France;

³University Victor Segalen Bordeaux 2, Bordeaux, F-33000 France;

⁴INSERM U688, Bordeaux, F-33000 France ;

⁵CHU de Bordeaux, Department of Dermatology & Pediatric Dermatology, National Reference Center for Rare Skin Disorders, Hôpital St André, Bordeaux, F-33000, France.

*** Corresponding Authors**

1) Department of Dermatology, College of Physicians and Surgeons, Columbia University, New York, NY 10032, US

Email address: drb25@columbia.edu

Phone: 212- 305-5565

Fax: 212-851-4540

2) INSERM U876, Bordeaux, F-33000 France

Email address: hamidreza.rezvani@u-bordeaux2.fr

Phone: +33-557-571-373

Fax: +33-556-983-348

† These authors have equally contributed to this work.

Running Title

XPC silencing triggers neoplastic transformation

Summary

We took advantage of the intrinsic genomic instability arising in the nucleotide excision repair disease xeroderma pigmentosum C (XPC) to understand the inter-relationships between genomic instability and metabolic alterations in the neoplastic transformation. We show that knockdown of XPC in normal human keratinocytes (XPC^{KDNHK}) reduces mitochondrial oxidative phosphorylation and increases glycolysis. The critical step is DNA-dependent protein kinase-mediated activation of AKT and NADPH oxidase-1 (NOX1) with a concomitant increase in reactive oxygen species (ROS) production, associated with specific deletions in mitochondrial DNA (mtDNA). The XPC^{KDNHK} containing mtDNA deletions are capable of forming squamous cell carcinomas (SCCs) when implanted into immunodeficient mice. Impairment of AKT or NOX activation in XPC^{KDNHK} cells blocks the formation of ROS, mtDNA deletions, and neoplastic transformation.

Introduction

Early studies of the metabolic changes that accompany the development of cancer led Otto Warburg to propose that a respiratory deficiency might drive neoplastic transformation (1), prompting many investigators to analyze the metabolism of tumor cells. These analyses revealed that a large number of cancer cell lines have a higher rate of glycolysis, an increased rate of glucose transport, increased pentose phosphate pathway (PPP) activity, decreased numbers of mitochondria, and a reduction in mitochondrial oxidative phosphorylation (OXPHOS) proteins and activities (2-4). These alterations in cancer cell energy metabolism could be related to somatic mutations in mitochondrial DNA (mtDNA); oxidative stress as a result of increased ROS level; adaptation to tissue hypoxia (4-7); the activation of oncogenes and/or inactivation of tumor suppressors (TP53, HIF-1 α , c-MYC); as well as deregulation of PI3K/AKT, which influence the glycolytic flux through regulation of different factors (8).

However, the etiologic relationship between genomic mutations, the Warburg effect, and increased ROS levels in tumor induction remains unclear (3, 5, 9). Furthermore, there is no clear mechanism(s) linking genomic mutations and modified cellular bioenergetics. To understand the relationships between these factors, we speculated that cells with heightened predisposition to malignant transformation, or cells with the capacity to accumulate mutations, could be helpful in elucidating this mechanism. To this end, xeroderma pigmentosum (XP) cells are a useful tool since they manifest varying defects in nucleotide excision repair (NER) rendering them more susceptible to neoplastic transformation and cancer induction (10).

NER is the major pathway for repairing numerous types of DNA damage including helix-distorting lesions produced mostly by ultraviolet (UV) radiation and bulky lesions created by carcinogenic chemicals (11). The pivotal role of NER is demonstrated in three dermatological diseases that manifest skin photosensitivity—namely, XP, Cockayne syndrome, and trichothiodystrophy (11). Patients with XP exhibit extreme sensitivity to solar UV light and have a disproportionately high incidence of skin cancers (11, 12). XP patients are also shown to have a high incidence of developing several types of internal malignancies before the age of 20 (13). There are multiple subtypes of XP that have been defined on the basis of complementation groups (XPA-XPG). Among XP patients, XPC patients have proficient transcription-coupled repair and defective global genome repair. Therefore, in these patients, the cells accumulate mutations in non-transcribed parts of the genome, leading to neoplastic transformation (11). Notably, XPC knock-out mice have heightened predisposition to many

types of UV-induced and spontaneous cancers (14, 15), indicating that XPC plays a role in the removal of non-UV-related mutations as well. Moreover, lymphocytes from XPC^{-/-} mice accumulate spontaneous lesions in the hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HPRT) gene (16). Interestingly, the most frequent mutations observed in older mice (i.e., > one-year old) are G to T transversions, which also result from oxidative processes (16), suggesting a causative role for ROS. Here, we used XPC-deficient cells as a model system for assessing how the accumulation of DNA damage alters cellular energy metabolism in the context of cancer induction.

Results

XPC downregulation results in mitochondrial bioenergetics deficiency

To determine whether DNA repair deficiency has an effect on cell bioenergetics, endogenous XPC protein expression was first inhibited using lentivirus-mediated expression of short hairpin RNA (shRNA) against XPC (**Figure S1**). To rule out “off target“ effects of shXPC, all experiments were performed with two distinct shRNAs against XPC (**Figure S1**). Both shXPCs stably inhibited more than 92% of XPC expression in keratinocytes (**Figure S1**). Since both shRNA had similar effects, hereafter only the results of shXPC1 have been shown.

Measurement of glucose consumption and lactate production in shCtrl- and shXPC-transduced keratinocytes on different days post-transduction revealed that XPC^{KDNHK} exhibited lactic acidosis at 20 and 30 d post-transduction (**Figure 1A**), suggesting a deficiency in the mitochondrial metabolism of pyruvate through the Krebs cycle and OXPHOS system. Consumption of glucose and the production of lactate were higher in XPC keratinocytes taken from XPC patients (XPC-KC) than in control keratinocytes over time (**Figure 1A**). ATP levels were similar in shCtrl- and shXPC-transduced keratinocytes on different days post-transduction (**Figure 1B**), although a non-significant decrease in ATP production occurred 5d after shXPC transduction. To assess whether XPC^{KDNHK} and XPC-KC are more dependent on glycolysis for ATP generation, the ATP level was measured in the presence of iodoacetate, an inhibitor of glycolysis. ATP levels were decreased to a greater extent in the iodoacetate-treated XPC^{KDNHK} as compared to control cells on days 20 and 30 after transduction (**Figure 1B**). Similarly, XPC-KC produced less mitochondrial ATP compared with control keratinocytes (**Figure 1B**).

The mitochondrial OXPHOS pathway includes the respiratory chain which consists of about 85 individual subunits segregated into five main complexes (I to V). Among the mitochondrial protein subunits, 13 polypeptides are encoded by mtDNA (17). To determine whether OXPHOS subunits are affected by XPC downregulation, we assessed the levels of two mtDNA-encoded proteins: NADH dehydrogenase subunit 1 (ND1 from complex I) and cytochrome *c* oxidase subunit III (COX3, from complex IV). The levels of ND1 and COX3 decreased from around 20 d after XPC silencing (**Figure 1C**). Complex IV activity also diminished following XPC downregulation (**Figure 1D**). Both COX1 and COX3 mRNA expression decreased, correlating with the reduced activity of complex IV around 20 d after XPC downregulation (**Figure 1E**). XPC^{KDNHK} also showed decreased expression of ND1 and

ND5 mRNA compared to shCtrl-transduced cells at approximately 20 d post-transduction (**Figure 1E**).

The above results indicate that XPC^{KDNHK} generate most of their ATP through glycolysis. To further examine this hypothesis, we measured the mRNA and protein levels of four enzymes that are involved in the regulation of the glycolytic flux. The hexokinase (HK) isoenzymes catalyze the first step of glucose metabolism following glucose uptake into cells. Among the four HK subtypes, HK-2 is the most highly expressed in tumors (18) and the XPC^{KDNHK} displayed increased expression of HK-2 mRNA (**Figure 1F**) and protein (**Figure 1C**). The bifunctional enzyme 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (PFKFB) catalyzes the phosphorylation of fructose-6-phosphate to fructose-2,6-bisphosphate. The PFKFB3 isozyme has the highest kinase/phosphatase activity ratio of all the PFKFB isoforms and is overexpressed in many types of neoplastic cells (19). Our data showed that XPC^{KDNHK} manifest elevated PFKFB3 as compared to control cells (**Figure 1C, F**). The enhanced rate of glycolysis in tumors is usually accompanied not only by a marked increase in HK activity, but also by an upregulation of glucose transporter proteins (GLUTs) that facilitate its cellular uptake (3). Therefore, we quantified GLUT-1 mRNA and protein levels and showed that they were increased after XPC silencing (**Figure 1C, F**). Cancer cells are known to have increased PPP activity which is the only known pathway for the direct synthesis of ribose from glucose and the main pathway for NADPH synthesis. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), the first enzyme of this pathway is known to be upregulated in cancer cells (20), and it was increased in XPC^{KDNHK} (**Figure 1C, F**). Consistently, XPC-KC also showed a reduction in the expression of mitochondrial OXPHOS subunits and increased expression of HK-2, PFKFB-3, GLUT-1, and G6PD (**Figure 1C-F**).

Mitochondrial morphology is critically linked to bioenergetics and changes in mitochondrial energy state cause structural alterations of the mitochondrial network (21). To determine whether XPC downregulation alters mitochondrial network morphology, cells were stained with a MitoTracker probe. Normal keratinocytes demonstrated an interconnected network located mostly around the nucleus, while XPC^{KDNHK} and XPC-KC exhibited a larger tubular mitochondrial network more dispersed throughout the cytoplasm (**Figure 1G, H**). Moreover, XPC^{KDNHK} were substantially larger than control cells (**Figure 1G, Figure S2**).

Taken together, our results demonstrate that XPC silencing in normal human keratinocytes leads to altered metabolism, which resembles the metabolic signature of most cancer cells.

XPC downregulation elevates intracellular ROS levels and results in mtDNA oxidation through the activation of NADPH oxidase

The mitochondrial respiratory chain is the major source of ROS generation in cells, and altered OXPHOS activity is associated with variations in ROS levels (7, 9). To evaluate ROS following XPC knockdown, we measured the cytoplasmic and mitochondrial steady-state levels of ROS using CM-H₂DCF-DA and MitoSOX probes, respectively (**Figure 2A, Figure S3**). A significant increase in cytoplasmic ROS level occurred in XPC^{KDNHK} over time as compared to control cells. In contrast, the mitochondrial ROS showed a moderate but significant ($P < 0.01$, $n=3$) decrease 5 d after XPC downregulation, followed by a gradual increase that peaked 30 d post-transduction. Consistently, cytoplasmic and mitochondrial ROS levels were higher in XPC-KC than normal keratinocytes (**Figure 2A**).

Since ROS can cause oxidative DNA damage, we determined the level of genomic and mitochondrial DNA oxidation using an antibody directed against 7,8-dihydro-8-oxoguanine (8-oxodG) (**Figure 2B**). 8-oxodG increased in the nuclear genome and mtDNA after XPC silencing in a time-dependent manner that was accompanied by increased cytoplasmic and mitochondrial ROS levels (**Figure 2B**), indicating that XPC silencing results in increased oxidative stress in both the nuclear and mitochondrial compartments.

Since increased oxidative stress is associated with mtDNA deletions and subsequent mitochondrial dysfunction (22, 23), we next assessed whether ROS generated in XPC^{KDNHK} led to mtDNA deletions and OXPHOS deficiency. To this end, we initially looked for two characteristic mtDNA deletions: 1) the 3895 bp deletion, which is known to occur more frequently in sun-exposed skin and is present in nonmelanoma skin cancer (24), and 2) the 4977 bp deletion, which is known to be involved in neurodegenerative diseases, and the processes of aging and photoaging (22, 23). As shown in **Figure 2C**, XPC^{KDNHK} accumulated both types of mtDNA deletions in a time-dependent manner.

We further investigated the role of ROS in mtDNA deletions using XPC^{KDNHK} overexpressing the antioxidant enzymes, catalase, CuZnSOD, or MnSOD, as well as treating these cells with diphenylene iodonium (DPI, 2.5 μ M), which is an inhibitor of cytoplasmic NADPH oxidase (**Figure S1, Figure S3**). Overexpression of catalase, CuZnSOD and MnSOD significantly decreased steady-state levels of endogenous ROS, but had no effect on XPC downregulation-induced enhancement of ROS generation. In contrast, DPI treatment eliminated the effects of XPC silencing on cytoplasmic and mitochondrial ROS alterations

over time (**Figure 2A, Figure S3**), suggesting that cytoplasmic NADPH oxidase is crucial for the metabolic alterations observed in XPC^{KDNHK}. NADPH oxidase consists of six hetero-subunits that, when activated, associate to form an active enzyme complex generating O₂⁻ from oxygen using NADPH as an electron donor (25). The catalytic subunit of this complex, NOX, has seven homologous members, of which NOX1 and NOX2 are expressed in keratinocytes (26, 27). NOX proteins are involved in host defense, post-translational processing of proteins, cellular signaling, regulation of gene expression, and cellular differentiation (25). We further characterized the role of NADPH oxidase in ROS production in XPC^{KDNHK} by overexpressing or downregulating NOX1 and NOX2 (**Figure S1**). Our results indicated that NOX2 has little or no involvement in ROS generation in XPC^{KDNHK} (data not shown). In contrast, NOX1 downregulation completely blocked both cytoplasmic and mitochondrial ROS generation in XPC^{KDNHK} (**Figure 2A, Figure S3**). The ROS level was higher in the XPC^{KDNHK} that overexpressed NOX1 than in normal cells overexpressing NOX1 (**Figure 2A, Figure S3**). These results suggest that ROS generation associated with XPC downregulation might be dependent on NADPH oxidase activation. To assess this, NADPH oxidase activity was measured. Results indicated that XPC silencing resulted in increased NADPH oxidase activity and that NOX1 downregulation or DPI treatment of XPC^{KDNHK} completely abrogated the modification in NADPH oxidase activity (**Figure 2D**). Overexpression of NOX1 enhanced NADPH oxidase activity in XPC^{KDNHK}, indicating a synergistic effect between XPC deficiency and NOX1 overexpression (**Figure 2D**). Our data further indicated that downregulation of NOX1 blocked the oxidative effects of XPC silencing on genomic and mitochondrial DNA (**Figure 2B**) and inhibited mtDNA deletions (**Figure 2C**). In contrast, NOX1 overexpression in XPC^{KDNHK} increased the nuclear and mitochondrial level of 8-oxodG (**Figure 2B**) and the degree of the two mtDNA deletions (**Figure 2C**). Interestingly, NOX1 overexpression alone had no effect on DNA oxidation (**Figure 2B**) and mtDNA deletions (data not shown).

We next determined whether variations in glycolysis and mitochondrial metabolism following XPC downregulation are dependent on upregulation of NADPH oxidase. We found that downregulation of NOX1 in XPC^{KDNHK} restored glucose consumption and lactate production (**Figure 2E**); mitochondrial ATP production (**Figure 2E**); expression levels of ND1, ND5, COX I, and COX III; and expression levels of HK-2, PFKFB-3, GLUT-1, and G6PD to normal (**Figure S4 A-C**). In contrast, NOX1 overexpression in XPC^{KDNHK} increased the rate of metabolic alterations (**Figure 2E, Figure S4 A-C**). Taken together, our results

demonstrate that NADPH oxidase activation plays an essential role in the XPC-silencing induced metabolism remodeling.

XPC deficiency increases the proliferative capacity of normal keratinocytes

To examine the effects of altered metabolism on the proliferative capacity of XPC^{KDNHK}, we performed serial cell counts on different days following XPC downregulation. An initial period of growth retardation was followed by increased proliferation of XPC^{KDNHK} as compared to control cells (**Figure 3A**). Cell cycle analysis indicated cells in S phase increased within five days of XPC downregulation. The number of S-phase cells then declined over the next few days and a second persistent increase occurred 15 d post-transduction (**Figure 3B, C**). Measurement of DNA synthesis time demonstrated a prolongation of S-phase in XPC^{KDNHK} 5 d after transduction, that was followed by a gradual decrease that peaked around day 30 (**Figure 3D**). Western blotting revealed that XPC knockdown resulted in immediate ATR-mediated Chk1 phosphorylation, which then declined over time (**Figure 3E**). XPC downregulation also resulted in an initial reduction of cyclin B1, D2, and E protein expression five days after transduction. Thereafter the levels of these cell cycle proteins increased over time (**Figure 3E**). Concomitantly, the expression of inhibitors of cell cycle progression, namely p16, p21^{WAF1}, and p-Cdc2, initially increased shortly after XPC downregulation, and then declined in a time-dependent manner (**Figure 3E**). Taken together, these results indicate that XPC^{KDNHK} acquire increased proliferative capacity shortly after ATR-mediated cell cycle delay.

To assess the chronic effect of the XPC downregulation on keratinocyte proliferation and differentiation, XPC^{KDNHK} were seeded either 5 d or 15 d post-transduction on dead dermis. Epidermis reconstructed with XPC^{KDNHK} at 5 d post-transduction showed a significant reduction in thickness and also in the number of Ki67-positive cells, compared to control cells (**Figure 4A**). In contrast, epidermal thickness, the number of Ki67-positive cells, and levels of basal cell layer markers (keratin 14, α 6 and β 1 integrin) were significantly higher in epidermis reconstructed with XPC^{KDNHK} 15 d post-transduction, compared to control constructs (**Figure 4A**). It is important to emphasize that the epidermis reconstructed with XPC-KC manifested the same characteristics as the epidermis reconstructed with XPC^{KDNHK} 15 d post-transduction, i.e. higher proliferation, increased levels of keratin 14, α 6 and β 1 integrin, and limited expression of keratin 10 to the upper epidermis (**Figure 4A**). Furthermore, both epidermis reconstructed with XPC^{KDNHK} at 15 d post-transduction and

XPC-KC manifested large and frequent extension of rete pegs (**Figure 4A, B**) compared to control epidermis. Altogether, these results show that knockdown of XPC results in epithelial hyperplasia.

NOX1 downregulation inhibits neoplastic transformation of XPC^{KDNHK} cells

To determine whether XPC^{KDNHK} have tumorigenic potency, cells were injected subcutaneously into immunosuppressed NOD/SCID mice 15 days after transduction. Around 17 weeks after xenografting, well-differentiated squamous cell carcinomas (SCCs) developed in 11 of the 18 injected mice (six of nine mice xenografted with shXPC1-transduced keratinocytes and five of 11 mice xenografted with shXPC2-transduced keratinocytes) and grew over time (**Figure 5A-C**). XPC-KC, when injected subcutaneously into NOD/SCID mice, also developed differentiated SCCs around 13 weeks after xenografting (**Figure 5A-B**).

To investigate the role of NADPH oxidase activity on tumorigenic potency of XPC^{KDNHK}, the double knockdown cells (XPC^{KDNHK}/NOX1^{KDNHK}) and XPC^{KDNHK} overexpressing NOX1 were injected into mice. While XPC^{KDNHK}/NOX1^{KDNHK} failed to form tumors (two of nine injected mice, **Figure 5A**), the XPC^{KDNHK} cells overexpressing NOX1 formed tumors (eight of nine injected mice, **Figure 5A-C**) with larger size (1.6 fold) compared to the tumors formed by XPC^{KDNHK} cells alone (**Figure 5B**), suggesting that ROS level may be an essential factor for tumor initiation.

To further investigate the role of ROS in XPC-silencing induced tumorigenic transformation of keratinocytes, we looked at the p53 status in tumors developed by xenografted XPC^{KDNHK}. Results showed that the majority of tumors (seven of 11) had G to T transversion mutations in p53 (unpublished data), suggesting that XPC silencing initially causes ROS generation, which then leads to mutations in oncogenes and tumor suppressors.

AKT downregulation inhibits NOX1 activation and neoplastic transformation of XPC^{KDNHK} cells

To define the signaling pathways resulting in tumorigenic transformation of XPC^{KDNHK}, we assessed the activation profile of 10 “cancer” pathways (AKT, Wnt, p53, TGF β , pRb-E2F, Nf κ B, Myc, hypoxia, MAPK/ERK, and MAPK/JNK) using cancer reporter arrays. Among them, Wnt- β -catenin, AKT/PKB, and p53 were upregulated in XPC^{KDNHK} (**Figure 6A**). Interestingly, Knockdown of AKT1—using lentivirus-mediated expression of shRNA directed against AKT1 (Supplementary **Figure S1**)—in XPC^{KDNHK} repressed Wnt activation

(**Figure 6A**). This is consistent with the previous data indicating that AKT could positively regulate Wnt- β -catenin signaling through GSK-3 β phosphorylation (28). We also found an increase in phosphorylation of GSK-3 β in XPC^{KDNHK}; this increase was blocked in the absence of AKT (**Figure S5A**), suggesting that AKT activation is the principal event following XPC downregulation.

AKT is shown to regulate multiple steps in glycolysis via posttranscriptional mechanisms that include localization of the glucose transporter to the cell surface, maintenance of hexokinase function in the absence of extrinsic factors, and phosphorylation of some proteins that influence glycolytic flux (29, 30). Therefore, we next examined whether variations in bioenergetics following XPC downregulation are dependent on AKT upregulation. We found that downregulation of AKT1 in XPC^{KDNHK} restored glucose consumption and lactate production; mitochondrial ATP production (**Figure 6B-C**); expression levels of ND1, ND5, COX I, and COX III; and expression levels of HK-2, PFKFB-3, GLUT-1, and G6PD to normal (**Figure S5B-E**). That downregulation also blocked XPC knockdown-induced NADPH oxidase activation; cytoplasmic and mitochondrial ROS generation (**Figure 6D**); genomic and mitochondrial DNA oxidation (**Figure 6E**); and mtDNA deletions (**Figure 2C**). AKT1 downregulation also blocked the changes in mitochondrial network morphology (**Figure S5E**) and in cell size (**Figure S2**). As AKT downregulation had no effect on early decreased mRNA expression of all examined genes (i.e. COX1, COX3, etc), their biphasic change observed in XPC^{KDNHK} could be related to stalled cell cycle and the selection of cell subsets with overactivation of AKT.

The above results prompted us to examine whether AKT1 downregulation blocks tumorigenic transformation of XPC^{KDNHK}. We initially reconstructed epidermis with the AKT1^{KDNHK} and double (XPC+AKT1)-knockdown cells (XPC^{KDNHK}/AKT1^{KDNHK}) (**Figure S6**). The epidermis reconstructed with XPC^{KDNHK}/AKT1^{KDNHK} 5 d post-transduction showed the same characteristic as XPC^{KDNHK}, i.e. a significant reduction in the epidermal thickness and in the number of Ki67-positive cells compared to control cells (see **Figure S6**, and compare with **Figure 4A**). The thickness of epidermis, number of Ki67 positive cells, and levels of basal cell layer markers in epidermis reconstructed with XPC^{KDNHK}/AKT1^{KDNHK} 15 d post-transduction resembled control epidermis (see **Figure S6**, and compare with **Figure 4A**). Interestingly, we did not observe any hyperplasia, especially large extension of rete pegs found in epidermis reconstructed with XPC^{KDNHK} or XPC-KC. To assess the tumorigenic potency *in vivo*, the XPC^{KDNHK}/AKT1^{KDNHK} cells were subcutaneously injected into

immunodeficient mice at 15 d post-transduction. These mice were followed for up to six months, during which only one of the 9 injected mice developed well-differentiated SCCs (**Figure 5A**).

Concerning the relation between AKT and NOX, our data indicated that AKT downregulation in XPC^{KDNHK} blocked both increased NADPH oxidase activity and increased cytoplasmic and mitochondrial ROS levels observed in XPC^{KDNHK} (**Figure 6D**), suggesting that AKT activation is upstream of NOX1 activation. We further found that NOX downregulation had no effect on AKT activity at 5 d after transduction but abrogated XPC silencing-induced AKT activation over the following days (**Figure 6F, S7A**). Interestingly, an absence of AKT activation in the double (XPC+NOX)-knockdown cells (XPC^{KDNHK}/NOX^{KDNHK}) after day 5th inhibited XPC silencing-induced metabolic alteration (**Figure S4**) and resulted in increased apoptosis (**Figure S7B**). These results suggest a crosstalk between NADPH oxidase activation and AKT activity during tumoral transformation of XPC^{KDNHK}.

DNA-PKcs activation results in AKT activation in XPC^{KDNHK}

We then asked the mechanism by which AKT is activated in XPC^{KDNHK} cells. Since a considerable decrease in cell numbers (not just a plateau) was apparent with cell proliferation curves (see **Figure 3A**), it is reasonable to speculate that the majority of cells harboring stalled cell cycle progression undergo apoptosis and only subsets of cells with some modification will be selected. A marked increase in the percentage of apoptotic cells 5 d post-transduction that was followed by a rapid decrease in the following days confirmed this concept (**Figure 7A**). Furthermore, western blotting revealed that knockdown of XPC resulted in an imbalance between proapoptotic (Bax and Bad) and antiapoptotic (Bcl-xL and Bcl-2) proteins in favor of the former five days after transduction, leading to induction of apoptosis (**Figure 7B**). Decreased Bax and Bad levels and increased Bcl-2 and Bcl-xL levels could account for the reduction in apoptotic cell death in XPC^{KDNHK} (**Figure 7B**).

To determine the mechanism whereby some cells escape the stalled cell cycle-induced apoptosis, we assessed the expression profile of 84 genes with established roles in DNA damage signaling using DNA damage PCR arrays. This revealed a 2.8±0.7 fold-increase in DNA-dependent protein kinase catalytic subunit (DNA-PKcs) mRNA and a 2.2±0.6 fold in Ku70/XRCC6 mRNA — the main component of the nonhomologous endjoining (NHEJ)

repair pathway— in XPC^{KDNHK}, compared to control cells. NHEJ, as well as homologous recombination (HR), are important for repairing double stranded breaks (DSBs) that are induced by ionizing radiation, collapsed replication forks, or oxidative damage. HR is an error-free pathway, whereas NHEJ is error-prone which can provoke genomic changes (31, 32). The results of PCR arrays were then validated with quantitative real-time RT-PCR (qRT-PCR) (**Figure 7C**). Western blotting revealed that the expression levels of DNA-PKcs and Ku70/XRCC6 as well as those of XRCC4 and DNA-ligase IV (other components of NHEJ repair) were also increased in XPC^{KDNHK} and XPC-KC (**Figure 7B**). Both cell types further displayed a marked increase in DNA-PK kinase activity compared to control cells over time (**Figure 7D**). We then performed *in vitro* NHEJ assay to measure efficiency and fidelity of NHEJ in cell extracts obtained from XPC^{KDNHK}, XPC-KC, and control cells. The conversion of monomeric linear plasmid into multimer products, an indicator of end-joining efficiency, increased significantly when cell extracts from XPC^{KDNHK} and XPC-KC were used (**Figure 7E, F**). Repair fidelity was then assessed by comparing the percentage of end-joined products that could be cut again with the same restriction enzyme initially used to generate the linear DNA substrate. Interestingly, extracts from XPC^{KDNHK} and XPC-KC showed a substantial reduction in correct end-joining compared with that of control cells (**Figure 7E, F**).

To evaluate the effect of NHEJ repair activation on cell survival, XPC^{KDNHK} were treated with two DNA-PKcs inhibitors: 1) NU7026, which at low concentrations inhibits DNA-PKcs but not PI-3 kinase, ATM, or ATR; and 2) wortmannin, which inhibits all PI-3 and PI-3-like kinases, including DNA-PKcs. Treatment of XPC^{KDNHK} with both inhibitors resulted in a major increase in apoptotic cell death (**Figure 7A**), indicating that DNA-PK activity in XPC^{KDNHK} is essential to bypass stalled cell cycle progression.

It has been shown that DNA-PK can phosphorylate AKT on Ser473 resulting subsequently in the activation of AKT signaling pathway (33, 34). Our results showed that XPC silencing-induced phosphorylation of AKT on Ser473 (**Figure S7A**) and that inhibition of DNA-PK upon treatment with NU7026 blocked the AKT activation (**Figure 6A**). In contrast, Knockdown of AKT1 in XPC^{KDNHK} had no effect on the expression and activity of DNA-PK (**Figure 7B, C, D**). Overall, these results indicate that XPC downregulation results in AKT activation through DNA-PK activation.

Discussion

Cancer cells are now known to utilize complex mechanisms to remodelized their bioenergetics. The factors contributing to the shift from classic OXPHOS to glycolysis in tumor cells include mitochondrial dysfunction, redox stress, oncogene activation, loss of tumor suppressor genes, and environmental hypoxia adaptation. We exploited the intrinsic genomic instability of XPC to investigate the relationship between the accumulation of genomic mutations, bioenergetic remodeling, and ROS in driving tumorigenesis.

Effects of XPC silencing on NHEJ and AKT activation

Structural DNA damage evokes the recruitment of DNA damage signaling proteins including DNA-PK, ATM, or ATR to the sites of damaged bases. They amplify and convey the signal from the damaged DNA to DNA-repair, cell cycle, and apoptotic cell death machineries (31, 35). The ultimate fate of cells with damaged DNA depends on the type and extent of damage. It has been postulated that arrested replication due to damaged bases on the non-transcribed portion of the genome (in contrast to the transcribed part) does not result in apoptotic cell death. Instead, cells escape replicative arrest utilizing DNA damage tolerance mechanisms that include error-free and error-prone DNA repair systems (36). We and others have shown that UV radiation-induced apoptosis is decreased in XPC^{-/-} cells compared to XPC^{+/+} wild-type cells (37-39). Our results show that the XPC^{KDNHK} overcome the early stalled cell cycle and replicate their DNA efficiently albeit with greater infidelity in the days following overactivation of DNA-PK and the NHEJ pathway (**Figure 7**). The high incidence of spontaneous cancers in XPC^{-/-} mice (14, 15), and the increased risk of developing internal cancers in XPC patients (13) support this concept.

Increased formation of double strand breaks (DSBs) as detected by γ H₂AX (**Figure 7B**) could be the signal that activates DNA-PK in XPC^{KDNHK}. DSBs, in turn, could result from stalled DNA replication observed 5 days after XPC downregulation (**Figure 3**) as well as from subsequent enhanced ROS-induced oxidative DNA damage (**Figure 2B**). The decrease in 8-oxodG level and γ H₂AX following downregulation of NOX1 or AKT1 in XPC^{KDNHK} (see **Figure 2B, 6E, 7B and S7A**) support this notion.

AKT activation has been revealed to be sufficient to induce the Warburg effect in either nontransformed cells or cancer cells (40, 41). Our results indicate that XPC silencing-induced DNA-PK activation triggers phosphorylation and subsequently activation of the AKT pathway, which in turn results in a characteristic increase in aerobic glycolysis and finally tumorigenic transformation. Interestingly, AKT inhibition blocks both events. AKT signaling

is also an essential mediator of epidermal morphogenesis and contributes to epidermal homeostasis by modulating keratinocyte proliferation and apoptosis. Transgenic mice with overexpressed AKT targeted to the epidermal basal cell layer develop spontaneous epithelial tumors in multiple organs with age and are also susceptible to skin carcinogenesis (42).

Effects XPC silencing-induced NADPH oxidase activation on bioenergetics

One of the mechanisms explaining the Warburg effect is the occurrence of a deficiency in mitochondrial respiration during cell growth due to somatic mutations in mtDNA or increased oxidative stress (4, 5, 7). mtDNA mutations are known to correlate with the 8-OxodG content of mtDNA (43). Increased ROS in response to environmental insults (i.e., UV irradiation) or oxidative stress can cause mtDNA deletions *in vitro* and *in vivo* (23, 44). It is likely that NOX activation-induced increased cytoplasmic ROS leads to enhanced oxidation of nuclear and mitochondrial DNA, followed by the induction of mtDNA deletions and alterations in mitochondrial bioenergetics. Interestingly, inhibition of NOX1 activation (by AKT1 or NOX1 downregulation or through treatment with DPI) inhibits the Warburg effect in XPC^{KDNHK}, indicating that NOX activation-induced ROS generation is the cause of the Warburg effect in XPC^{KDNHK}.

According to our data supporting that oxidative damage contributes to the tumorigenicity of XPC^{KDNHK}, it is known that XPC-deficient cells are more sensitive to oxidative stress (45, 46). Spontaneous mutation frequencies in the HPRT gene are 30-fold higher in the spleen of XPC^{-/-} mice as compared to normal mice and the majority of these mutations result from oxidative damage (16). Also, the frequency of spontaneous lung tumors and hepatocellular adenomas is enhanced in XPC^{-/-} mice (47). Consistent with the contribution of NOX1-induced ROS in tumorigenicity, it has been shown that NOX overexpression enhances the tumorigenicity of NIH3T3 cells implanted in athymic nude mice (48).

A model outlining cellular responses to XPC downregulation

The connection between XPC downregulation, ROS, mtDNA deletion, and tumorigenic transformation is depicted in the following scheme (**Figure 8**). Accumulation of unrepaired damaged DNA bases in XPC^{KDNHK} triggers apoptotic death. However, in some cells the unrepaired bases are recognized by other repair systems such as NHEJ repair, thereby enhancing infidelity of damage repair. DNA-PK activation subsequently promotes AKT activation that in turn mediates induction of NADPH oxidase. Cytoplasmic ROS generation will consequently increase, leading to enhanced oxidation of nuclear and mitochondrial DNA, followed by the induction of mtDNA deletions in an amplification loop of DNA

damage ↔ ROS. This amplification loop might reduce the chance that cells with unrepaired DNA escape senescence and death through bypass repair systems. This could diminish the risk of cancer. Consistent with this assertion, it is known that mtDNA mutations result in premature aging (49) or sensitize cells to mitochondrial-dependent apoptosis (50). Meanwhile, increased ROS can result in mutations of oncogenes and/or tumor suppressor genes, leading to the deregulation of cell cycle progression and proliferation, the escape of some cells from apoptosis, and, finally, formation of cancer cells.

G to T transversion mutations in p53 in the majority of tumors developed by xenografted XPC^{KDNHK} lend further credence to the proposed model. Consistent with our results, it has been reported that the predisposition to UV-induced skin cancer in XPC^{-/-} mice is enhanced if these animals are heterozygous additionally for Apex (51), a gene coding the apurinic/aprimidinic endonuclease which is a key enzyme in the process of base excision repair, required for the repair of spontaneous base damage that arises as a result of oxidative damage to DNA. Interestingly, the kinetics of cancer induction in XPC^{-/-} mice that are heterozygous additionally for both p53 and Apex is indistinguishable from that in XPC^{-/-} mice heterozygous for just p53 (51), suggesting that the enhanced predisposition to skin cancer in XPC^{-/-} Apex^{+/-} animals could result from oxidative stress-induced loss of p53 activity.

In conclusion, we demonstrate a mechanism whereby XPC silencing-induced ROS generation, through NOX1 activation, leads to neoplastic transformation of normal keratinocytes. Beyond skin cancer, since the activation of the NOX family has been shown in many cancer cells (5), blocking of NOX activation could offer a unique target for the prevention and treatment of cancers driven by the generation of ROS.

Acknowledgements

We thank Yucui Zhu, M.D. and Catherine Pain for technical assistance, and Aqeel Ahmed, M.D. and Mireia Castillo Martin, M.D., Department of Pathology, Columbia University, for histological evaluation of the tumors. This work was supported by the French National Plan “maladies rares” and the GENESKIN European coordination action LSHM-CT-2005-512117 to AT, a grant from “Enfants de la lune” to HV and AT, the NIH Grants, R01 CA-097249-01 to DRB and K01-AR048582-04 and R03 CA125855-01 to ALK.

Methods

Source and culture of cells

Normal human keratinocytes were isolated from normal human skin in patients undergoing plastic surgery as previously described (38, 52). Briefly, fresh skin fragments were cut into 5mm x 5mm pieces and treated with trypsin-EDTA overnight at 4°C, which allows for separation of the epidermis from the dermis. Keratinocytes were seeded at a concentration of 10^5 cells per cm^2 in KGM medium, which included hydrocortisone, epidermal growth factor, insulin and bovine pituitary extract (all from Lonza, Walkersville, MD). The medium was changed three times a week. When the cultures reached 70%-80% confluence, the cells were detached with 10% trypsin-EDTA and then resuspended in KGM medium.

Three unrelated patients clinically classified as classical XP with no associated neurologic or extracutaneous findings were included in the study. Western blot analyses of XPC protein expression performed on total cellular extracts using anti-XPC and anti- β -actin antibodies showed that neither the full length nor the truncated XPC protein was detectable in the keratinocytes from the three XPC patients (**Supplementary Figure S10**). XPC keratinocytes were isolated from punch biopsies obtained after informed consent from non-exposed body sites and seeded on mitomycin C-treated feeder cells originating from the mouse fibroblast J2-3T3 cell line in complete Green’s media as already described (38). Epidermises were reconstructed following seeding of keratinocytes on dead dermis as previously described (38, 52).

Lentiviral vectors constructs and keratinocyte transduction

The different lentiviral vectors were constructed by inserting catalase, CuZnSOD, MnSOD(52), and NOX1 cDNAs into the multiple cloning site (MCS) of the TPW vector downstream of the human phosphoglycerate kinase (hPGK) promoter (**Supplementary**

Figure S1A). TPW was also used as the backbone for the construction of the TEEHshXPCW, TEEHshNOX1W, and TEEHshRFPW by replacement of the hPGK promoter by the EF-1 α promoter and inserting a cassette containing the H1 promoter followed by shRNA sequences targeting either the XPC, AKT1, NOX1, or NOX2 mRNA or by a scramble sequence (targeting the red fluorescent protein mRNA)(**Supplemental Figure. S1B**). Lentiviral particles were produced by transient transfection of 293T cells using a calcium phosphate transfection technique as previously described (52). Determination of the titer of each viral supernatant was performed by assessing enhanced-green fluorescent protein (EGFP) expression by flow cytometry and by enzyme-linked immunosorbent assays of p24. For transduction, keratinocytes (5×10^5 cells per T25 flasks) were incubated for 24 h in complete medium. Prior to infection, the medium was removed, and the cells were incubated with viral supernatants for 24 h at 37°C in the presence of 8 μ g/ml of protamine sulfate. After five days, the percentage of EGFP-positive cells was determined by cytofluorimetry (52).

Western blotting procedure

Western blotting was performed as previously described (52). Briefly, equal amounts of total protein were resolved by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and electrophoretically transferred to PVDF membranes. The membranes were then incubated overnight at 4°C with a 1:1000 dilution of the anti-XPC (GeneTex, San Antonio, TX), anti-ND1, anti-COX3, anti-cyclin D2, anti-cyclin B1, anti-p-Cdc2 p34, anti-p16, anti-p21, anti-MnSOD, anti-CuZnSOD, anti-AKT1, anti-G6PD, anti-Ku70, XRCC4, DNA ligase IV (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA), anti-DNA-PKcs (Thermo scientific, Fremont, CA), anti-ATM, anti-ATR, anti-phospho-ATR, anti-phospho-ATM, anti-phospho-ChK1, anti-phospho-ChK2, anti-phospho-AKT, anti-phospho-GSK3 β , anti-HK2 (Cell Signaling, Danvers, MA), anti-PFKFB-3 (Abnova, TEBU, Le Perray en Yvelines, France), and anti-catalase (Rockland) antibodies. After additional incubation with a 1:10,000 dilution of an anti-immunoglobulin horseradish peroxidase-linked antibody (Vector Laboratories, Burlingame, CA) for 1 h, blots were developed using the chemiluminescence ECL reagent (Amersham, Piscataway, NJ).

Cell proliferation and apoptosis analysis

Serial cultures of keratinocytes were performed in 24-well plates by seeding 8×10^3 cells in triplicate, refeeding the cells every second day, and subculturing every five-six days. The trypan blue exclusion test was used to obtain cell counts at different days after seeding.

For apoptosis analysis by flow cytometry, keratinocytes were incubated with 5 $\mu\text{mol/L}$ FITC-VAD-FMK (Promega, Charbonnières, France) for 30 min at 37°C in the dark and then with 2.5 $\mu\text{g/ml}$ propidium iodide (PI, Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) as already described (53, 54).

Cell cycle analysis and S phase length calculation

Cell cycle analysis was performed using APC-linked anti-BrdU and 7-AAD according to the manufacturer's protocols (BD Biosciences, San Diego, CA). Briefly, after 2 h BrdU pulse labeling, the cells were trypsinized and fixed in cytofix/cytoperm buffer on ice for 20 min. The cells were then incubated with APC-linked anti-BrdU antibody over night and then resuspended in 20 μl of 7-AAD solution for flow cytometric analysis.

The length of the S-phase was assessed using the BrdU pulse labeling method. Briefly, immediately after 2 h pulse BrdU labeling and at 2-h intervals thereafter, the cells were trypsinized, fixed, and stained with APC-conjugated anti-BrdU and 7-AAD. Changes in the 7-AAD intensity of S-phase cells (relative movement [RM]) during the time relative to the 7-AAD positions of G_1 and G_2 were calculated according to Begg *et al* (55) with the following formulas: $\text{RM}(t) = [F_L(t) - F_{G_1}(t)]/[F_{G_2/M}(t) - F_{G_1}(t)]$, where F_L is the mean red fluorescence (7-AAD) of BrdU-positive cells and F^{G_1} and $F^{G_2/M}$ are the mean 7-AAD fluorescence values for G_1 and G_2/M cells at time (t), respectively. The S-phase duration was calculated as follows: $T_s = [0.5/(\text{RM} - 0.5)] \times t$, where t is the post-labeling time. This procedure was repeated at different days after transduction.

Measurement of glucose consumption and lactate production

Glucose consumption and lactate production was measured using colorimetric assay kits according to the manufacturer (both from BioVision, Mountain View, CA).

Measurement of endogenous and mitochondrial ATP production

The amount of intracellular ATP was measured by a luciferin/luciferase-based assay. In brief, the cells were trypsinized, rinsed with PBS, and lysed with 0.2 ml of cell lysis reagent. ATP

concentrations in the cell lysates were quantified using an ATP bioluminescence assay kit HSII (Roche Applied Science, Indianapolis, IN) in accordance with the manufacturer's instructions. A standard curve for ATP concentration was plotted using standard ATP solution. ATP levels were calculated and normalized to protein lysate concentrations. To assess the ATP levels produced by mitochondria, the cells were incubated with 1 mM of iodoacetate for 5 min before they were trypsinized. Iodoacetate is an inhibitor of glycolysis as it inhibits glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. Therefore, any ATP generation by the cells following this treatment must be a consequence of OXPHOS activity. After treatment, the cells were subjected to the same procedures as the untreated cells.

Complex IV (cytochrome c-oxidase) activity

Cytochrome *c*-oxidase activity was determined spectrophotometrically with cytochrome *c* (II) as the substrate. The oxidation of cytochrome *c* was monitored at 550 nm at 30°C using a double-wavelength Xenius spectrophotometer from SAFAS (Monaco) and standardized reproducible methods as described by Bernard *et al* (56).

RNA extraction and quantitative real-time RT-PCR

Total cellular RNA was extracted using TRIzol® (Invitrogen, CA) according to the manufacturer's instructions. Total cellular RNA (2 µg) was reverse transcribed at 42 °C for 60 min using the 1st Strand cDNA synthesis kit (Roche Applied Science). Quantitative real-time PCR was carried out for ND1, ND5, CoxI, CoxIII, GLUT-1, HK-2, PFKFB-3, G6PD, DNA-PKcs, Ku70, and tubulin using the SYBR Green method with an ABI instrument. Primer sequences are listed in **supplemental Table S1**. The reactions were cycled 40 times after initial polymerase activation (50 °C, 2 min) and initial denaturation (95°C, 15 min) using the following parameters: denaturation at 95 °C for 15 sec; and annealing and extension at 60°C for 1 min. A final fusion cycle (95 °C, 30 s; 60 °C, 30 s; 95 °C, 30 s) terminated these reactions. The standard curve demonstrated a linear relationship between the cycle threshold (Ct) values and the cDNA concentration. The relative expression of each gene was assessed by considering the Ct and efficiency values, and normalized according to the tubulin expression level.

DNA damage signaling pathway PCR array

The human DNA damage signaling RT² profiler PCR array (SABioscience, Frederick, MD) was used to assess the expression of 84 genes with known roles in DNA damage response. Synthesis of complementary DNA, real-time PCR, and statistical analyses were done according to the manufacturer's instructions. Five housekeeping genes were included as RNA content controls, and the three with the lowest standard deviations across replicates were used in the analysis (GAPDH, ACTB, and B2M). In addition, a genomic DNA control primer set was included in each PCR run which can detect the presence of DNA contamination in each sample.

Cancer pathway lentiviral reporter arrays

The cancer lenti reporter arrays (SABioscience) and FOXO reporter (SABioscience) were used to monitoring the activation of ten cancer-related signaling pathways and AKT/PKB pathway, respectively, in accordance with the manufacturer's instructions. Each lentiviral reporter construct contains a pathway-specific transcription factor-responsive element upstream of firefly luciferase.

Keratinocytes transduced by different shRNAs were seeded on 96-well plates (2×10^4 cells per well) at days 2th or 12th after transduction. One day after, the keratinocytes were incubated with the reporter lentivirus for 24 h at 37°C. After two days (i.e. days 5th or 15th after transduction with shRNAs), keratinocytes harvested by adding 20 μ l of luciferase lysis buffer (Promega). The cell lysates were kept at -80°C and then subjected to luciferase activity assessment using the Luciferase Assay System (Promega) in accordance with the manufacturer's instructions. The change in the activity of each signaling pathway was determined by measuring the activity of luciferase in transduced keratinocytes vs shCtrl-transduced cells. For each lenti reporter, at least three independent experiments were performed in duplicate.

Measurement of intracellular ROS

The intracellular production of ROS was assessed using a CM-H₂DCF-DA cytoplasmic probe or the MitoSOXTM red mitochondrial superoxide indicator (both from Molecular Probes, Invitrogen) (52). Briefly, after addition of CM-H₂DCF-DA (5 μ M) or MitoSOX (5 μ M), the cells were incubated for 15 min at 37 °C in the dark. While CM-H₂DCF is oxidized by cytoplasmic ROS to the highly green fluorescent CM-DCF compound, MitoSOX is targeted to the mitochondria and oxidized by superoxide to a red fluorescence component.

After two washes with PBS, the cells were detached by trypsin-EDTA and immediately analyzed by flow cytometry. Ten thousand individual data points were collected for each sample.

Determination of catalase, CuZnSOD and MnSOD activities

All these assays were performed as previously described (52) using the SOD assay kit-WST (Dojindo Molecular Technologies, Gaithersburg, MD) and the Amplex Red Catalase Assay Kit (Molecular Probes, Invitrogen).

Measurement of NADPH oxidase activity in intact cells

NADPH oxidase activity was assessed based on oxidation of luminol by NADPH-dependent $O_2^{\cdot-}$ production. After trypsinization and washing in PBS, 1×10^6 keratinocytes were put in 50 μ l of PBS supplemented with 0.9 mM $CaCl_2$ and 0.5 mM $MgCl_2$. After adding 200 μ l of the solution containing 0.8 mM glucose, 2 mM luminol, and 500 U/ml horseradish peroxidase, a 96-well plate was incubated for 1 min at 37 °C. Following the addition of 10 ng/ml of phorbol myristate acetate (PMA), the relative light units (RLU) of chemiluminescence were recorded every 30 sec for a total of 90 min at 37 °C using a luminometer.

PCR analysis of mitochondrial deletions

Mitochondrial DNA was prepared using the Mitochondrial DNA isolation kit (BioVision) in accordance with the manufacturer's instructions. The PCR analysis was carried out on 50 ng of mitochondrial DNA using the AccuPrime Taq DNA polymerase system (Invitrogen). Amplification of fragments representing 3895 bp and 4977 bp deletions were carried out using the primers designed to anneal outside the 3985 and 4977 deletions, respectively (the primer sequences and PCR conditions were determined as describe before (24, 57), see **Supplemental Table S2**). In brief, the A1/A2 and C1/C2 primers were designed to anneal outside the 3895 bp and 4977 bp deletions, respectively. To increase the sensitivity and specificity, a secondary nested PCR was performed using the B1/B2 and D1/D2 primers on the primary PCR products. To estimate the total mtDNA content, PCR was carried out with Ref1/2 primers that anneal to both wild-type and deleted mtDNA. The PCR conditions were 94°C for 10 min, 35 cycles of 94°C for 30 s, 56°C for 30 s, and 72°C for 30 s followed by a final extension of 10 min at 72°C. The short (30 s) polymerase extension time during DNA

amplification permitted amplification of only the shorter and deleted mtDNA fragments. Amplification products were visualized in a 1% agarose gel stained with ethidium bromide.

DNA-PK activity assay

DNA-PK activity was assessed using the SignaTECT DNA-dependent protein kinase assay kit (Promega, Madison, WI) in accordance with the manufacturer's instructions. Briefly, after removing of endogenous DNA from 100 µg nuclear extracts cells using DEAE Sepharose, samples were incubated with biotinylated peptide substrate in the presence of [γ - 32 P] ATP for 5 min at 30°C. 20 µl of reactant was spotted onto SAM² membrane. The membrane was then washed, dried and subjected to phosphorimaging system. The enzymatic activity of DNA-PK was calculated and expressed as pmol ATP min⁻¹ µg⁻¹ of protein.

In vitro DNA end-joining assay

In vitro nonhomologous end-joining (NHEJ) repair assay was performed. 400 ng linear plasmid DNA (pUC19) obtained by restriction digestion using *EcoRI* (New England Biolabs, Ipswich, MA), was incubated with 40 µg nuclear cell extracts at 25°C for 2 hours in 50 µl reaction buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 5 mM MgCl₂, 75 mM KCl, 1 mM ATP, 1 mM DTT, 5% glycerol and protease inhibitors). Reactions were performed in duplicate per set of experiments. The repair reactions were stopped by the addition of 1 µl 10% SDS followed by incubation at 65°C for 15 min. The DNA was recovered by quick purification kit (Qiagen). The second set of purified DNA products was cut again with *EcoRI* (10 U) in a 10 µl reaction buffer to investigate the fidelity of the end-joining. The repair products were resolved in 1% agarose gels stained with ethidium bromide. Digital images of the gels were analyzed densitometrically. Repair efficiency was assessed as the conversion of monomeric linear plasmid into multimers products by following formula: [total end-joined product (dimers and multimers)/ total DNA in the lane (end-joined products + monomer)]. Repair fidelity was measured by comparing the percentage of end-joined products that could be recut with *EcoRI* using the following formula: [(% end-joined product before recutting – % end-joined product left after recutting with *EcoRI*)/ % end-joined product before recutting].

Morphological studies of mitochondria and morphometry

To observe the mitochondria network by fluorescence confocal microscopy, keratinocytes grown on 6-well plates were incubated with MitoTracker (Molecular Probes) 150 nM for 20

min at 37°C for. After two washes in PBS, the cells were observed and photographed under a FluoView laser scanning inverted microscope (Nikon). The morphology of the mitochondrial network was studied by using Mitotracker Green (Invitrogen), the objective used was a Plan APOchromat 60.0X/1.4/0.21 oil spring loaded. The images were acquired using the EZ-C1 Gold Version 3.2 build 610, as follow (at 37°C): the pinhole was set at 33.3 μm and the image size was 1024 x 1024. The step size was 0.5 μm, and the acquisition time of the Z-series set at 10 frames per second. The number of images was adapted to the width of each cells determined individually. The reconstitution of the three-dimensional images was performed using Imaris Software (Bitplane). Fifty cells per experimental condition were selected randomly on 5 different images, and the analysis of mitochondrial tubule length was performed with the morphometric software "Morpho. Pro" by Explora Nova (France). It allowed to select automatically the region of interest (*i.e* the mitochondrial tubule), and to calculate the length occupied by the selected pixels. In each cell 25 tubules were measured. The tubules were divided in four categories based on their size, those <5, between 5 and 10, between 10 and 20, and those >20 μm. Results expressed as average percentage of size distribution ± SD of three independent experiments.

Localization and quantification of 8-oxo-dG in nuclear and mitochondrial DNA

8-oxodG adducts in genomic and mitochondrial DNA were quantified using an enzyme-linked immunoabsorbent assay kit (Trevigen) in accordance with the manufacturer's instructions. Briefly, following nuclear and Mitochondrial DNA isolation, 1 μg of DNA was incubated with anti-8-oxodG antibody overnight at 4°C. The samples were then added to 96-well microtiter plates containing bound albumin:8-oxodG adducts and incubated at room temperature for 2 h. The plate was then washed and incubated with a peroxidase-coupled secondary antibody for one hour. After 6 times washing, tetramethylbenzidine substrate was added to each well and incubated for 15 min in the dark. After addition of a stop solution, absorbance read at 450 nm. Results were calculated based on a standard curve run simultaneously.

Xenografts of human keratinocytes

Keratinocytes were transduced with different vectors. Fifteen days post-transduction, keratinocytes were trypsinized, washed in DPBS, and resuspended in DPBS with 25% Matrigel (BD Biosciences). Under a protocol approved by the Committee on the Use and Care of Animals at Columbia University, 2×10^6 human keratinocytes were injected

subcutaneously into 6- to 8-weeks-old NOD/SCID mice (Taconic Laboratories). Tumor formation was monitored at different time intervals. Each tumor was dissected, measured, fixed in 4% paraformaldehyde, embedded in paraffin, and processed for hematoxyline/ eosin staining. Histological assessment of tumor sections was performed by pathologists.

Immunohistochemical and Immunofluorescence staining

Following deparaffinization of formalin-fixed, paraffin-embedded tumor sections, antigen retrieval was performed using microwave oven treatment in a citric acid solution (Vector Laboratories). The sections were then incubated overnight at 4°C with anti-GFP antibody. After incubation with HRP-conjugated secondary antibody, revelation was performed using diaminobenzidine (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). The nuclei were then counterstained with hematoxylin.

For immunofluorescence staining, following deparaffinization of formalin-fixed, paraffin-embedded reconstructed epidermis, antigen retrieval was performed using microwave oven treatment in a citric acid solution (Vector Laboratories). The sections were then incubated one hour at room temperature with antibody against K14, K10, integrin α 6 or integrin β 1, or Ki67 antibody. After incubation with Alexa 488- or 555-conjugated secondary antibody, the nuclei were counterstained with DAPI.

Statistics

Statistical analyses were performed using one-way ANOVA tests, followed by post-hoc Tukey's tests. A *p*-value of < 0.05 was considered significant. Results are presented as means \pm SD.

References

1. Warburg, O. 1956. On the origin of cancer cells. *Science* 123:309-314.
2. Modica-Napolitano, J.S., and Singh, K.K. 2002. Mitochondria as targets for detection and treatment of cancer. *Expert Rev Mol Med* 4:1-19.
3. Gatenby, R.A., and Gillies, R.J. 2004. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer* 4:891-899.
4. Brandon, M., Baldi, P., and Wallace, D.C. 2006. Mitochondrial mutations in cancer. *Oncogene* 25:4647-4662.
5. Clerkin, J.S., Naughton, R., Quiney, C., and Cotter, T.G. 2008. Mechanisms of ROS modulated cell survival during carcinogenesis. *Cancer Lett* 266:30-36.
6. Gottlieb, E., and Tomlinson, I.P. 2005. Mitochondrial tumour suppressors: a genetic and biochemical update. *Nat Rev Cancer* 5:857-866.
7. Sun, W., Zhou, S., Chang, S.S., McFate, T., Verma, A., and Califano, J.A. 2009. Mitochondrial mutations contribute to HIF1alpha accumulation via increased reactive oxygen species and up-regulated pyruvate dehydrogenase kinase 2 in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 15:476-484.
8. Yeung, S.J., Pan, J., and Lee, M.H. 2008. Roles of p53, MYC and HIF-1 in regulating glycolysis - the seventh hallmark of cancer. *Cell Mol Life Sci* 65:3981-3999.
9. Pelicano, H., Carney, D., and Huang, P. 2004. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resist Updat* 7:97-110.
10. Friedberg, E.C. 2000. Rous-Whipple Award Lecture. Nucleotide excision repair and cancer predisposition: A journey from man to yeast to mice. *Am J Pathol* 157:693-701.
11. Cleaver, J.E. 2005. Cancer in xeroderma pigmentosum and related disorders of DNA repair. *Nat Rev Cancer* 5:564-573.
12. van Steeg, H., and Kraemer, K.H. 1999. Xeroderma pigmentosum and the role of UV-induced DNA damage in skin cancer. *Mol Med Today* 5:86-94.
13. Kraemer, K.H., Lee, M.M., and Scotto, J. 1987. Xeroderma pigmentosum. Cutaneous, ocular, and neurologic abnormalities in 830 published cases. *Arch Dermatol* 123:241-250.
14. Hollander, M.C., Philburn, R.T., Patterson, A.D., Velasco-Miguel, S., Friedberg, E.C., Linnoila, R.I., and Fornace, A.J., Jr. 2005. Deletion of XPC leads to lung tumors in mice and is associated with early events in human lung carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:13200-13205.
15. Miccoli, L., Burr, K.L., Hickenbotham, P., Friedberg, E.C., Angulo, J.F., and Dubrova, Y.E. 2007. The combined effects of xeroderma pigmentosum C deficiency and mutagens on mutation rates in the mouse germ line. *Cancer Res* 67:4695-4699.
16. Wijnhoven, S.W., Kool, H.J., Mullenders, L.H., van Zeeland, A.A., Friedberg, E.C., van der Horst, G.T., van Steeg, H., and Vrieling, H. 2000. Age-dependent spontaneous mutagenesis in Xpc mice defective in nucleotide excision repair. *Oncogene* 19:5034-5037.
17. Taylor, R.W., and Turnbull, D.M. 2005. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nat Rev Genet* 6:389-402.
18. Mathupala, S.P., Rempel, A., and Pedersen, P.L. 1997. Aberrant glycolytic metabolism of cancer cells: a remarkable coordination of genetic, transcriptional, post-translational, and mutational events that lead to a critical role for type II hexokinase. *J Bioenerg Biomembr* 29:339-343.
19. Bando, H., Atsumi, T., Nishio, T., Niwa, H., Mishima, S., Shimizu, C., Yoshioka, N., Bucala, R., and Koike, T. 2005. Phosphorylation of the 6-phosphofructo-2-

- kinase/fructose 2,6-bisphosphatase/PFKFB3 family of glycolytic regulators in human cancer. *Clin Cancer Res* 11:5784-5792.
20. Frederiks, W.M., Vizan, P., Bosch, K.S., Vreeling-Sindelarova, H., Boren, J., and Cascante, M. 2008. Elevated activity of the oxidative and non-oxidative pentose phosphate pathway in (pre)neoplastic lesions in rat liver. *Int J Exp Pathol* 89:232-240.
 21. Rossignol, R., Gilkerson, R., Aggeler, R., Yamagata, K., Remington, S.J., and Capaldi, R.A. 2004. Energy substrate modulates mitochondrial structure and oxidative capacity in cancer cells. *Cancer Res* 64:985-993.
 22. Berneburg, M., Kamenisch, Y., and Krutmann, J. 2006. Repair of mitochondrial DNA in aging and carcinogenesis. *Photochem Photobiol Sci* 5:190-198.
 23. Wei, Y.H., and Lee, H.C. 2002. Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and impairment of antioxidant enzymes in aging. *Exp Biol Med (Maywood)* 227:671-682.
 24. Harbottle, A., and Birch-Machin, M.A. 2006. Real-time PCR analysis of a 3895 bp mitochondrial DNA deletion in nonmelanoma skin cancer and its use as a quantitative marker for sunlight exposure in human skin. *Br J Cancer* 94:1887-1893.
 25. Bedard, K., and Krause, K.H. 2007. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 87:245-313.
 26. Chamulitrat, W., Stremmel, W., Kawahara, T., Rokutan, K., Fujii, H., Wingler, K., Schmidt, H.H., and Schmidt, R. 2004. A constitutive NADPH oxidase-like system containing gp91phox homologs in human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 122:1000-1009.
 27. Valencia, A., and Kochevar, I.E. 2008. Nox1-based NADPH oxidase is the major source of UVA-induced reactive oxygen species in human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 128:214-222.
 28. Takemaru, K., Fischer, V., and Li, F.Q. 2009. Fine-tuning of nuclear-catenin by Chibby and 14-3-3. *Cell Cycle* 8:210-213.
 29. Jones, R.G., and Thompson, C.B. 2009. Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. *Genes Dev* 23:537-548.
 30. Robey, R.B., and Hay, N. 2009. Is Akt the "Warburg kinase"?-Akt-energy metabolism interactions and oncogenesis. *Semin Cancer Biol* 19:25-31.
 31. Branzei, D., and Foiani, M. 2008. Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:297-308.
 32. Slupphaug, G., Kavli, B., and Krokan, H.E. 2003. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mutat Res* 531:231-251.
 33. Boehme, K.A., Kulikov, R., and Blattner, C. 2008. p53 stabilization in response to DNA damage requires Akt/PKB and DNA-PK. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:7785-7790.
 34. Bozulic, L., Surucu, B., Hynx, D., and Hemmings, B.A. 2008. PKBalpha/Akt1 acts downstream of DNA-PK in the DNA double-strand break response and promotes survival. *Mol Cell* 30:203-213.
 35. Rouse, J., and Jackson, S.P. 2002. Interfaces between the detection, signaling, and repair of DNA damage. *Science* 297:547-551.
 36. Friedberg, E.C. 2005. Suffering in silence: the tolerance of DNA damage. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:943-953.
 37. Clement, V., Dunand-Sauthier, I., and Clarkson, S.G. 2006. Suppression of UV-induced apoptosis by the human DNA repair protein XPG. *Cell Death Differ* 13:478-488.
 38. Rezvani, H.R., Ged, C., Bouadjar, B., de Verneuil, H., and Taieb, A. 2008. Catalase overexpression reduces UVB-induced apoptosis in a human xeroderma pigmentosum reconstructed epidermis. *Cancer Gene Ther* 15:241-251.

39. Ananthaswamy, H.N., Ouhtit, A., Evans, R.L., Gorny, A., Khaskina, P., Sands, A.T., and Conti, C.J. 1999. Persistence of p53 mutations and resistance of keratinocytes to apoptosis are associated with the increased susceptibility of mice lacking the XPC gene to UV carcinogenesis. *Oncogene* 18:7395-7398.
40. Elstrom, R.L., Bauer, D.E., Buzzai, M., Karnauskas, R., Harris, M.H., Plas, D.R., Zhuang, H., Cinalli, R.M., Alavi, A., Rudin, C.M., et al. 2004. Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. *Cancer Res* 64:3892-3899.
41. Karnauskas, R., Niu, Q., Talapatra, S., Plas, D.R., Greene, M.E., Crispino, J.D., and Rudin, C.M. 2003. Bcl-x(L) and Akt cooperate to promote leukemogenesis in vivo. *Oncogene* 22:688-698.
42. Segrelles, C., Lu, J., Hammann, B., Santos, M., Moral, M., Cascallana, J.L., Lara, M.F., Rho, O., Carbajal, S., Traag, J., et al. 2007. Deregulated activity of Akt in epithelial basal cells induces spontaneous tumors and heightened sensitivity to skin carcinogenesis. *Cancer Res* 67:10879-10888.
43. Lu, C.Y., Lee, H.C., Fahn, H.J., and Wei, Y.H. 1999. Oxidative damage elicited by imbalance of free radical scavenging enzymes is associated with large-scale mtDNA deletions in aging human skin. *Mutat Res* 423:11-21.
44. Adachi, K., Fujiura, Y., Mayumi, F., Nozuhara, A., Sugiu, Y., Sakanashi, T., Hidaka, T., and Toshima, H. 1993. A deletion of mitochondrial DNA in murine doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun* 195:945-951.
45. D'Errico, M., Parlanti, E., Teson, M., de Jesus, B.M., Degan, P., Calcagnile, A., Jaruga, P., Bjoras, M., Crescenzi, M., Pedrini, A.M., et al. 2006. New functions of XPC in the protection of human skin cells from oxidative damage. *Embo J* 25:4305-4315.
46. Melis, J.P., Wijnhoven, S.W., Beems, R.B., Roodbergen, M., van den Berg, J., Moon, H., Friedberg, E., van der Horst, G.T., Hoeijmakers, J.H., Vijg, J., et al. 2008. Mouse models for xeroderma pigmentosum group A and group C show divergent cancer phenotypes. *Cancer Res* 68:1347-1353.
47. Wijnhoven, S.W., Hoogervorst, E.M., de Waard, H., van der Horst, G.T., and van Steeg, H. 2007. Tissue specific mutagenic and carcinogenic responses in NER defective mouse models. *Mutat Res* 614:77-94.
48. Suh, Y.A., Arnold, R.S., Lassegue, B., Shi, J., Xu, X., Sorescu, D., Chung, A.B., Griendling, K.K., and Lambeth, J.D. 1999. Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature* 401:79-82.
49. Vermulst, M., Wanagat, J., Kujoth, G.C., Bielas, J.H., Rabinovitch, P.S., Prolla, T.A., and Loeb, L.A. 2008. DNA deletions and clonal mutations drive premature aging in mitochondrial mutator mice. *Nat Genet* 40:392-394.
50. Cai, S., Xu, Y., Cooper, R.J., Ferkowicz, M.J., Hartwell, J.R., Pollok, K.E., and Kelley, M.R. 2005. Mitochondrial targeting of human O6-methylguanine DNA methyltransferase protects against cell killing by chemotherapeutic alkylating agents. *Cancer Res* 65:3319-3327.
51. Cheo, D.L., Meira, L.B., Burns, D.K., Reis, A.M., Issac, T., and Friedberg, E.C. 2000. Ultraviolet B radiation-induced skin cancer in mice defective in the Xpc, Trp53, and Apex (HAP1) genes: genotype-specific effects on cancer predisposition and pathology of tumors. *Cancer Res* 60:1580-1584.
52. Rezvani, H.R., Cario-Andre, M., Pain, C., Ged, C., deVerneuil, H., and Taieb, A. 2007. Protection of normal human reconstructed epidermis from UV by catalase overexpression. *Cancer Gene Ther* 14:174-186.
53. Rezvani, H.R., Dedieu, S., North, S., Belloc, F., Rossignol, R., Letellier, T., de Verneuil, H., Taieb, A., and Mazurier, F. 2007. Hypoxia-inducible factor-1alpha, a

- key factor in the keratinocyte response to UVB exposure. *J Biol Chem* 282:16413-16422.
54. Rezvani, H.R., Mazurier, F., Cario-Andre, M., Pain, C., Ged, C., Taieb, A., and de Verneuil, H. 2006. Protective effects of catalase overexpression on UVB-induced apoptosis in normal human keratinocytes. *J Biol Chem* 281:17999-18007.
 55. Begg, A.C., McNally, N.J., Shrieve, D.C., and Karcher, H. 1985. A method to measure the duration of DNA synthesis and the potential doubling time from a single sample. *Cytometry* 6:620-626.
 56. Benard, G., Faustin, B., Passerieux, E., Galinier, A., Rocher, C., Bellance, N., Delage, J.P., Casteilla, L., Letellier, T., and Rossignol, R. 2006. Physiological diversity of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Am J Physiol Cell Physiol* 291:C1172-1182.
 57. Berneburg, M., Grether-Beck, S., Kurten, V., Ruzicka, T., Briviba, K., Sies, H., and Krutmann, J. 1999. Singlet oxygen mediates the UVA-induced generation of the photoaging-associated mitochondrial common deletion. *J Biol Chem* 274:15345-15349.

Figure legends

Figure 1. Effects of XPC downregulation on mitochondrial metabolism and glycolysis.

Glucose consumption and lactate production (A) as well as the total endogenous ATP level and ATP level produced by mitochondria (B) were measured at the indicated time points after transduction. The glucose uptake, lactate production, and the total endogenous and mitochondrial ATP levels by shCtrl-transduced cells were set to 100% at each time point. The results were then compared to the shCtrl and are expressed as the average percentage of shCtrl \pm SD of three independent experiments. *, $p < 0.05$ for shXPC-transduced cells vs shCtrl-transduced cells and *, $p < 0.05$ for XPC-KC vs control keratinocytes at the indicated time points. (C) The protein expression levels of XPC, ND1, COX3, GLUT-1, HK-2, PFKFB-3, and G6PD were determined by western blot at the indicated days after transduction. β -actin was used as a loading control. (D) The relative activity of complex IV of the mitochondrial respiratory chain was assessed. The mRNA levels of COX1 and COX3, ND1 and ND5 (E), HK-2 and PFKFB-3, and GLUT-1 and G6PD (F) were quantified by quantitative real-time RT-PCR. The results are shown as the average percentage of Ctrl \pm SD of three independent experiments. (G) The mitochondrial network morphology in XPC-KC, shCtrl- and shXPC-transduced keratinocytes was determined by microscopy using Mito Tracker. (H) Length of mitochondrial tubules was measured in 50 cells (25 mitochondrial tubules per cell) per condition. Results are expressed as average percentage of mitochondrial tubule size distribution \pm SD of three independent experiments. *, $p < 0.05$ for shXPC cells vs shCtrl-transduced cells. shCtrl, keratinocytes transduced with control shRNA; shXPC, keratinocytes transduced with shXPC, XPC-KC, keratinocytes isolated from XPC patients.

Figure 2. XPC silencing-induced ROS production leads to mitochondrial DNA deletions.

(A) ROS levels in different cells were measured by flow cytometry using cytoplasmic- and mitochondrial-specific probes at the indicated days after transduction. The ROS level in the shCtrl-transduced cells was arbitrarily set to 1. Results are then assessed as shown at the top of the panels and expressed as the mean \pm SD of three independent experiments. (B) Genomic and mitochondrial DNA oxidation were assessed by quantification of 8-oxodG levels in nuclear genome and mtDNA of different cells. Results are expressed as ng of 8-oxodG per μ g DNA. (C) Mitochondrial DNA was extracted and subjected to PCR, amplifying either reference fragments (Ref) representing total mitochondrial genome or two known deletions (3895 del and 4977 del). (D) NADPH oxidase activity was assessed as shown at the top of the

panels and expressed as the mean \pm SD of three independent experiments. (E) Glucose consumption and lactate production as well as the total endogenous ATP level and ATP level produced by mitochondria were measured in the different transduced cells. * Signifies $p < 0.05$ for different cells vs shCtrl-transduced cells at the indicated time points.

Figure 3. XPC^{KDNHK} cells display increased proliferative capacity associated with an increased fraction of S phase cells and decreased length of S-phase following an initial stalled phase.

(A) The proliferation capacities of shCtrl- or shXPC-transduced keratinocytes were measured by serial cell counts on different days after transduction.

(B) The distribution of cells in the G1, S, and G2 phases was measured at the indicated time intervals after transduction using 7-AAD and BrdU staining. (C) Graphic representation of the distribution of cells in the G1, S, and G2 phases. The percentage of cells in each phase for shCtrl-transduced keratinocytes was considered to be 100%. The results were then compared to the shCtrl and are expressed as the mean \pm SD of three independent experiments. (D) The DNA synthesis time was measured by a BrdU pulse assay. The results are shown as the average percentage of shCtrl \pm SD of three independent experiments. *, $p < 0.05$ for shXPC-transduced cells vs shCtrl-transduced cells at the indicated time points. (E) Total protein extracts were assessed for cell cycle regulators by Western blot analysis. β -actin was used as a loading control.

Figure 4. Knockdown of XPC results in epithelial hyperplasia.

Epidermis reconstructed with XPC-KC, shCtrl- or shXPC-transduced keratinocytes on days 5th and 15th after transduction. (A) Architecture of epidermis were evaluated with H&E staining. Proliferation and differentiation status of epidermis were assessed using immunofluorescence staining of K10, K14, integrin $\alpha 6$, integrin $\beta 1$, and Ki67. The nuclei were marked in blue with DAPI. (B) High proliferation detected with Ki67 staining in a large extension of rete pegs in epidermis reconstructed with XPC^{KDNHK} and XPC-KC. Scale bar: 200 μ m.

Figure 5. XPC silencing drives neoplastic transformation of human keratinocytes via NOX1.

Keratinocytes were transduced with indicated lentivirus. On the 15th day after transduction, cells were injected subcutaneously into NOD/SCID mice. (A) Tumor incidence

after xenografting the different keratinocytes into the mice. **(B)** The *in vivo* tumor growth rate of XPC^{KDNHK} cells injected in mice is enhanced by overexpression of NOX1. **(C)** H&E staining (top pictures) shows that tumors are well-differentiated SCCs with keratin pearl formation. Expression of GFP in tumors confirmed using immunostaining with an anti-GFP antibody (bottom pictures). Scale bar: 100 μ m.

Figure 6. AKT activation in XPC^{KDNHK} triggers NADPH oxidase activation and metabolic alteration. **(A)** To assess activation of different cancer pathways, luciferase-reporter lentivirus were used to transduce the keratinocytes in the indicated conditions at days 5th and 15th. For each reporter, the mean \pm SD luciferase activity is presented as the relative value to the activity in shCtrl-transduced cells (n=3). **(B, C)** Glucose consumption and lactate production **(B)** as well as the total ATP level and ATP level produced by mitochondria **(C)** were measured in the different cells. The results were then compared to the shCtrl and are expressed as the average percentage of shCtrl \pm SD of three independent experiments. **(D)** NADPH oxidase activity, Cytoplasmic and mitochondrial ROS levels were measured in different transduced cells. **(E)** The effect of AKT on XPC silencing-induced genomic and mitochondrial DNA oxidation were assessed by quantification of 8-oxodG levels in nuclear and mitochondrial DNA. **(F)** To assess the effect of NOX1 on activation of AKT, Wnt, and p53 pathways following XPC downregulation, luciferase reporter lentivirus were used as explained in A. *, P<0.05 for indicated cells versus shCtrl; °, P<0.05 for indicated cells vs shXPC-transduced cells

Figure 7. NHEJ activation in XPC^{KDNHK} results in overcoming stalled cell cycle progression and AKT activation. **(A)** The percentage of apoptotic keratinocytes was evaluated by flow cytometry. Results are expressed as the average percentage of apoptotic and necrotic cells \pm SD of three independent experiments. *, p<0.05 for different cells vs shCtrl-transduced cells at the indicated time points. **(B)** The effects of XPC and/or AKT downregulation on the protein expression level of pro- and anti-apoptotic proteins and the major components of NHEJ repair were determined by WB. **(C)** The mRNA level of DNA-PKcs and Ku70 were quantified by quantitative real-time RT-PCR. **(D)** DNA-PK kinase activity was measured in nuclear extracts of various cells. The results were then compared to the shCtrl and are expressed as the mean \pm SD of three independent experiments. **(E)** Nuclear

extract of cells transduced with shCtrl or shXPC were used in *in vitro* end-joining assays. The pUC19 plasmid digested with *EcoRI* was used as monomer DNA substrate. The amount of ligated pUC19 following incubation with various nuclear extracts shows repair efficiency (left side of photomicrograph). Fidelity of repair was assessed by re-digestion of end-joined products with the *EcoRI* (right side of photomicrograph). **(F)** Graphic representation of the end-joining experiment in panel E. Data is expressed as mean \pm SD of the 3 independent experiments.

Figure 8. A model outlining cellular responses to XPC downregulation. For explanations see the text.

Supplementary figures

Figure S1. Vector constructs and analysis of the transduction efficiency. **(A)** Lentiviral vectors constructs used to overexpress EGFP, catalase, CuZnSOD, MnSOD, or NOX1 are shown. Vectors carry an internal cassette for the enhanced green fluorescent protein (EGFP), catalase, CuZnSOD, MnSOD, or NOX1 driven by the promoter of human phosphoglycerate kinase gene (hPGK). Δ U3, R, and U5 are the LTR regions, with a deletion that includes the enhancer and the promoter from U3. CMV is the cytomegalovirus promoter, SD is the major splice donor site, SA is the splice acceptor site, RRE is the rev-response element, cPPT is a nuclear import sequence, and WPRE is a regulatory element of woodchuck hepatitis virus. **(B)** Lentiviral constructs used to inhibit XPC, NOX1, NOX2, AKT, or red fluorescent protein (RFP) expressions are shown. TEEHshRFPW construct was used as the control shRNA (named shCtrl) plasmid. **(C, D)** Transduction efficacy was checked by western blotting analysis **(C)** and also by measuring the specific activity of each antioxidant enzyme in the keratinocytes **(D)** as described in the Methods section.

Figure S2. XPC downregulation results in change of keratinocyt cell size

At 15 days after transduction cells was photographed with light microscopy. **(A)** Light micrographs show that XPC^{KD^{NHK}} cells are larger than the control cells and that AKT downregulation inhibits this modification. **(B)** Surface of 100 cells (per condition) was

measured. Results are expressed as average cell surface \pm SD of three independent experiments. *, $p < 0.05$ for different cells *vs* shCtrl-transduced cells.

Figure S3. Inhibition of NOX1 expression blocks the effect of XPC downregulation on ROS levels. Intracellular ROS levels were measured in keratinocytes at different days following transduction using CM-H₂DCF-DA, the cytoplasmic probe, or MitoSOX, the mitochondrial probe. (A, B) Cytoplasmic (A) and mitochondrial (B) ROS levels were measured in keratinocytes transduced with shCtrl, shXPC, catalase, CuZnSOD, MnSOD, shNOX1, and/or NOX1, and DPI-treated cells by flow cytometry. Data are expressed as the mean \pm SD of three independent experiments. †, $p < 0.05$ for different cells *vs* shCtrl-transduced cells and *, $p < 0.05$ for different cells *vs* indicated corresponding samples.

Figure S4. NOX1 activation in XPC^{KDNHK} triggers metabolic alteration. (A) The relative activity of complex IV of the mitochondrial respiratory chain was assessed. The mRNA levels of COX1 and COX3, ND1 and ND5 (B), HK-2 and PFKFB-3, and GLUT-1 and G6PD (C) were quantified by quantitative real-time RT-PCR at different time intervals following transduction. The results are shown as the average percentage of shCtrl \pm SD of six independent experiments. *, $p < 0.05$ for different cells *vs* shCtrl-transduced cells.

Figure S5. AKT activation in XPC^{KDNHK} triggers metabolic alteration. (A) The protein expression levels of XPC, ND1, COX3, GLUT-1, HK-2, PFKPB-3, G6PD, AKT, phospho-AKT, phospho-GSK-3 β were determined by western blot at the indicated days after transduction. β -actin was used as a loading control. (B) The relative activity of complex IV of the mitochondrial respiratory chain was assessed. The mRNA levels of COX1 and COX3, ND1 and ND5 (C), HK-2 and PFKFB-3, and GLUT-1 and G6PD (D) were quantified by quantitative real-time RT-PCR at different time intervals following transduction. The results are shown as the average percentage of shCtrl \pm SD of six independent experiments. (E) The mitochondrial network morphology in shCtrl-, shXPC, (shXPC+shAKT)-transduced keratinocytes was determined by microscopy using Mito Tracker. Length of mitochondrial tubules was measured in 50 cells (25 mitochondrial tubules per cell) per condition. Results are expressed as average percentage of mitochondrial tubule size distribution \pm SD of three independent experiments. *, $p < 0.05$ for different cells *vs* shCtrl-transduced cells.

Figure S6. XPC silencing-induced epithelial hyperplasia manifestation blocked by AKT downregulation. Epidermis reconstructed with shAKT- and (shXPC+shAKT)-transduced keratinocytes on days 5 and 15 after transduction. The effect of DNA-PK inhibition on reconstruction of epidermis was assessed by treatment of epidermis with NU7026. Architecture of epidermis was evaluated with H&E staining. Proliferation and differentiation status of epidermis were assessed using immunofluorescence staining of K10, K14, integrin $\alpha 6$, integrin $\beta 1$, and Ki67. The nuclei were marked with DAPI and are in blue.

Figure S7. The effects of NOX1 on AKT activation in XPC^{KDNHK}. (A) The effects of NOX1 on the protein expression level of AKT, phospho-AKT, phospho-GSK-3 β and γ H₂AX were determined by western blot at the indicated days after transduction. β -actin was used as a loading control. (B) Apoptotic cells were analyzed by flow cytometry at indicated time intervals after transduction. Results are expressed as the average percentage of apoptotic and necrotic cells \pm SD of three independent experiments. *, $p < 0.05$ for different cells vs shCtrl-transduced cells at the indicated time points.

Figure S8. XPC protein level in cells from XPC patients. Total cell lysates from 3 patients (lanes 2, 3, and 5), 2 control samples (lanes 1 and 4), and one control sample transduced with shXPC (lanes 6) were analyzed by western blot and probed with anti-XPC and anti- β -actin antibodies. Anti- β -actin was used to normalize protein levels.

Supplementary Tables

Table S1. Primer sequences for quantitative real-time PCR

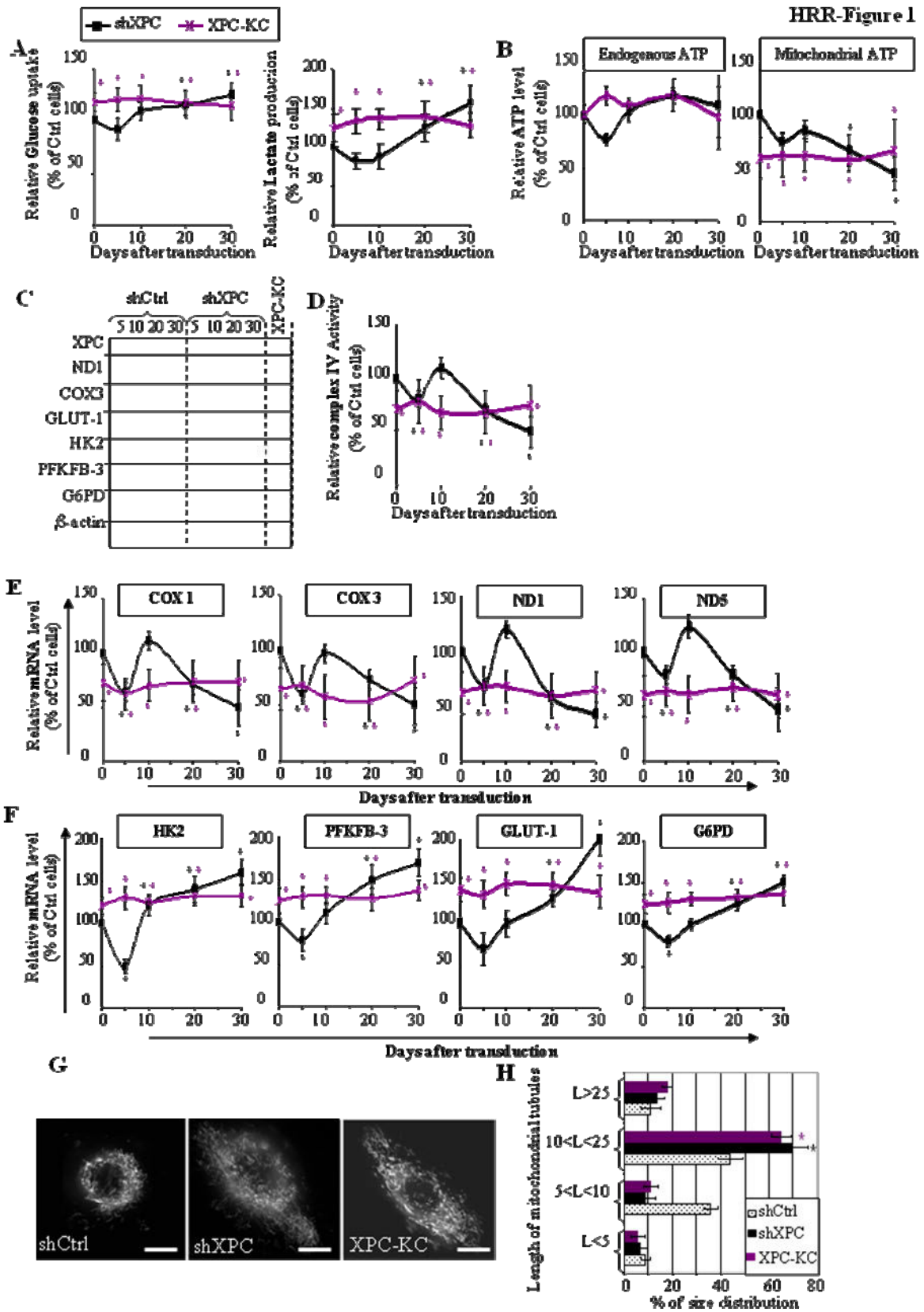
Target gene	SEQUENCE
ND1	F: ACGCCATAAACTCTTCACCAAAG R: TAGTAGAAGAGCGATGGTGAGAGCTA
ND5	F: AGTTACAATCGGCATCAACCAA R: CCCGGAGCACATAAATAGTATGG
Cox I	F: CTGCTATAGTGGAGGCCGGA R: GGGTGGGAGTAGTTCCTGC
Cox III	F: CCAATGATGGCGCGATG R: CTTTTTGGACAGGTGGTGTGTG
GLUT-1	F: GCTACAACACTGGAGTCATC R: GGATCAGCATCTCAAAGGAC
HK-1	F: GCTGGCCGATCAACACCGT R: GCCGTCCGGGGTAGCACA
PFKFB-3	F: GGTGTGCGACGACCCTAC R: GTACACGATGCGGCTCTG
G6PD	F: ATGATGCAGCCTCCTACCAG R: ACAGGGAGGAGATGTGGTTG
Ku70/XRCC6	F: CCGAGATACAGGCATCTTCC R: TCCGCAACAGGTCTTCTAGC
DNA-PKcs	F: CCTTGACACAGTTCCTGAGGT R: TCCTGAGAAGTGGCCCTTT
Tubulin	F: GAGTGCATCTCCATCCACGTT R: TAGAGCTCCCAGCAGGCATT

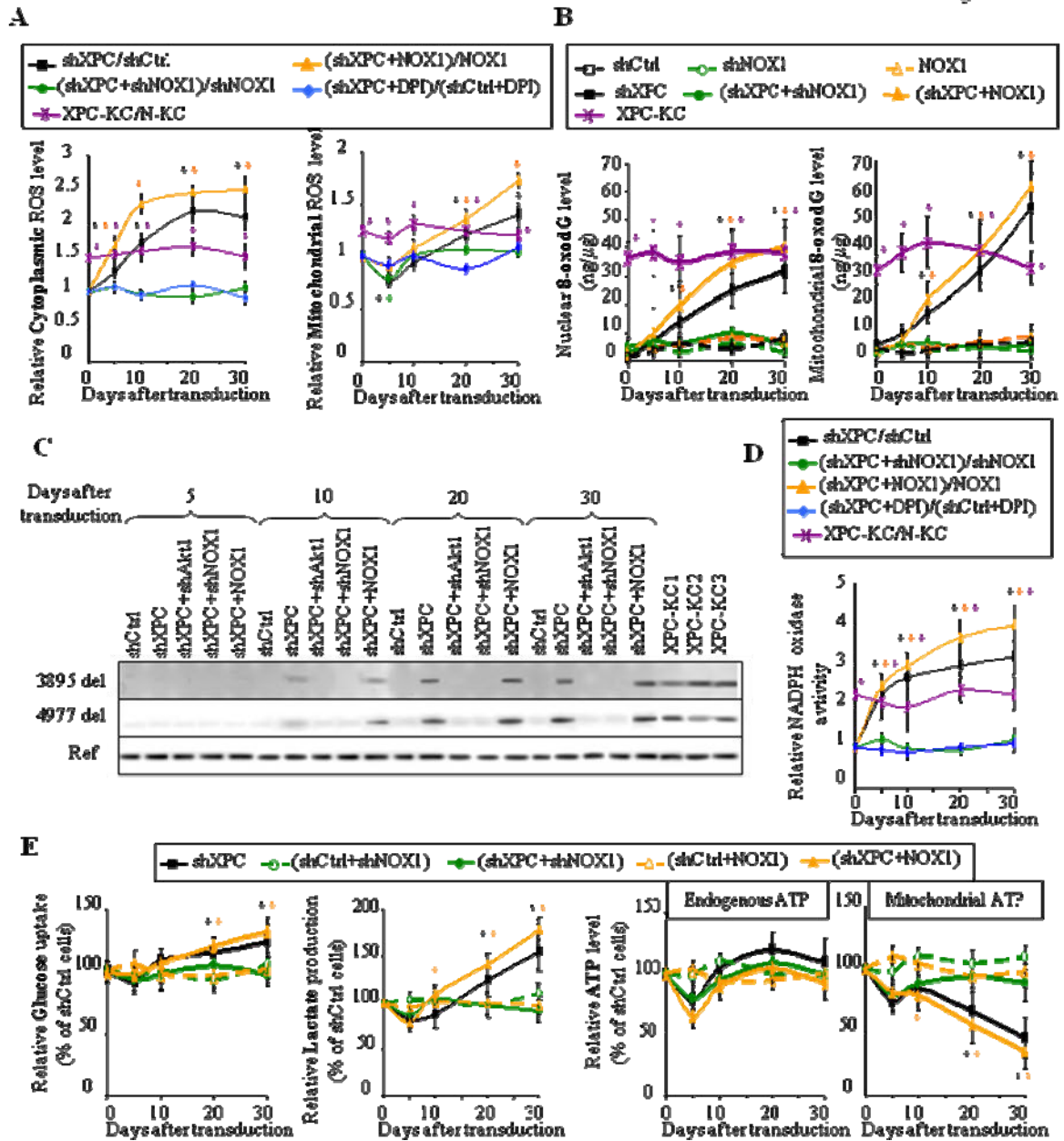
Table S2. Primer sequences used to detect mitochondrial deletions

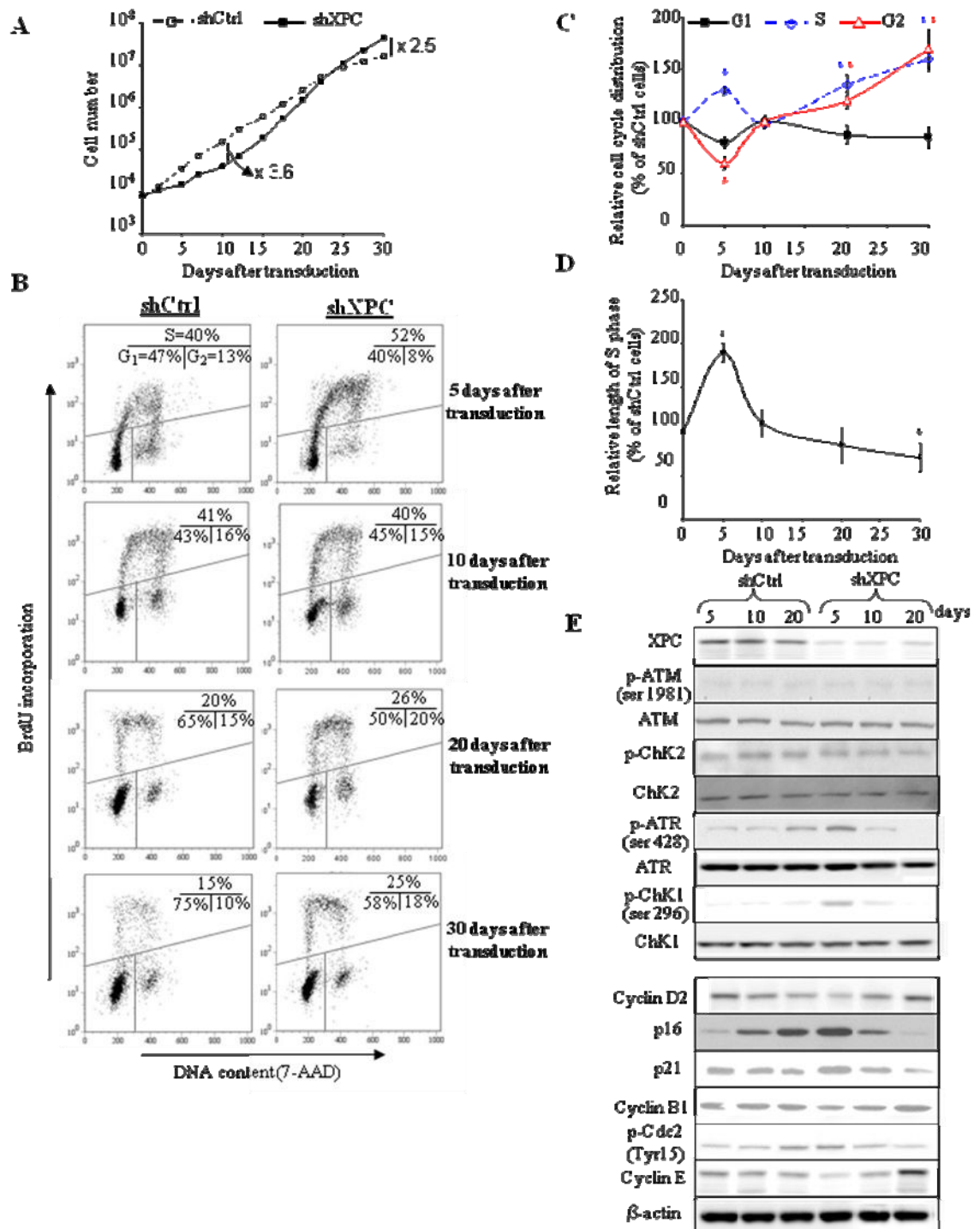
Primer name	SEQUENCE	Position
A1*	5'-CTTTTGGCGGTATGCACTTT-3'	404-423
A2*	5'-GATTATGGATGCGGTTGC TT-3'	4676-4657
B1*	5'-CAACCCTCGCCCATC CTA-3'	491-508
B2*	5'-CCTGCAAAGATGGTAGAGTAGATGAC-3'	4516-4489
C1 [†]	5'-GCAGTAATATTAATAATTTTCATG-3'	7293-7316
C2 [†]	5'-CTAGGGTAGAATCCGAGTATGTTG-3'	13298-13905
D1 [†]	5'-TGAACCTACGAGTACACCGA-3'	7091-7920
D2 [†]	5'-GGGGAAGCGAGGTTGACCTG-3'	13650-13631
Ref1*	5'-GATTTGGGTACCACCAAGTATTG-3'	16042-16066
Ref2*	5'-AATATTCATGGTGGCTGGCAG TA-3'	16125-16102

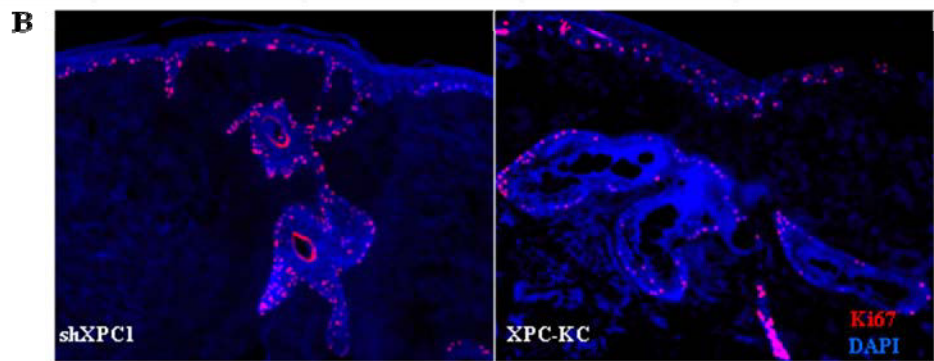
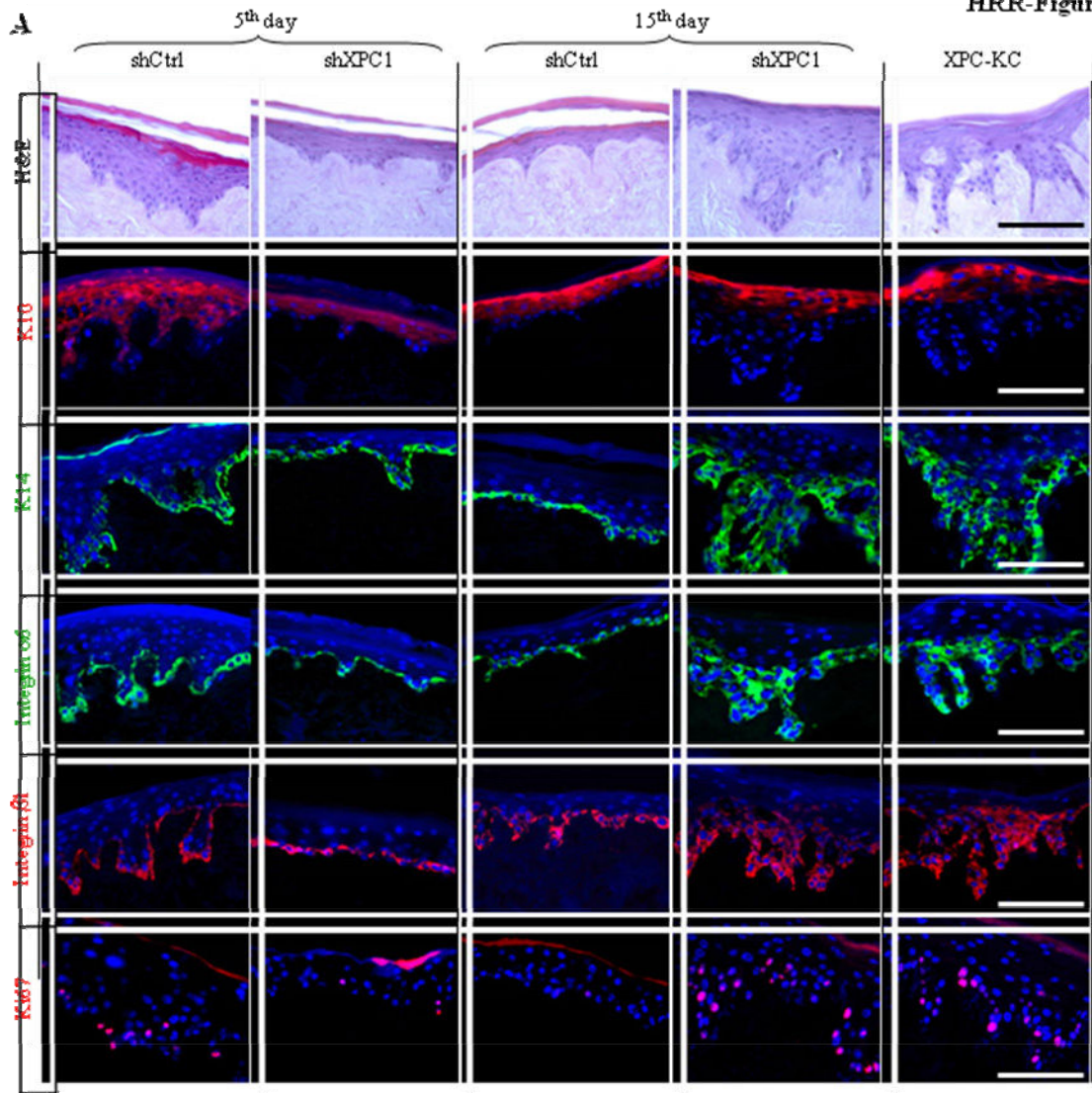
* the primer sequences are according to Harbottle and Birch-Machin (Harbottle and Birch-Machin, 2006).

[†] the primer sequences are according to Berneburg *et al* (Berneburg et al., 1999).







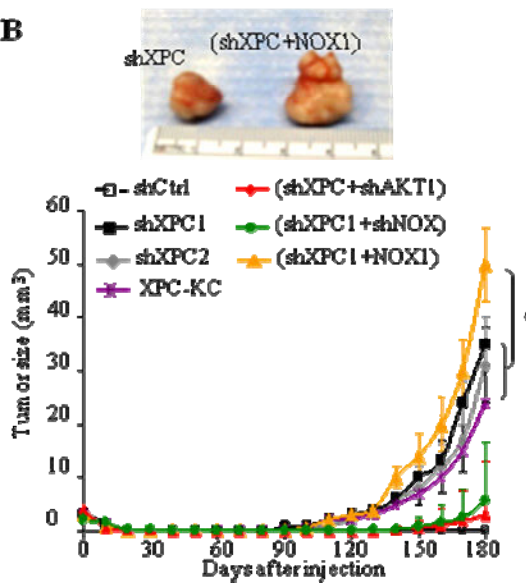


A

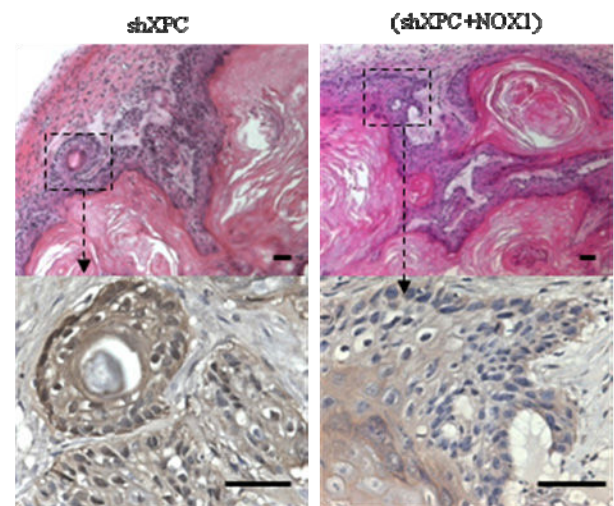
Cells	vectors used for transduction	Tumor-bearing mice/mice injected	mtDNA deletions at injection time	Cytoplasmic ROS level at injection time (% of Ctrl)	Mitochondrial ROS level at injection time (% of Ctrl)
Normal Human Keratinocytes	shCtrl	0/9	-	100	100
	shXPC1	6/9	+	173 ± 17*	133 ± 14*
	shXPC2	5/9	+	184 ± 13*	127 ± 11*
	shNOX1	0/9	-	71 ± 7	83 ± 8
	NOX1	0/9	-	115 ± 9*	116 ± 10*
	(shXPC1 + shNOX1)	2/9	-	75 ± 10	86 ± 9
	(shXPC1 + NOX1)	8/9	+	231 ± 22*	142 ± 14*
	shAkt1	0/9	-	98 ± 7	101 ± 7
(shXPC1+shAkt1)	1/9	-	106 ± 8	103 ± 6	
XPC-KC	-	2/3	+	160 ± 11*	131 ± 6*

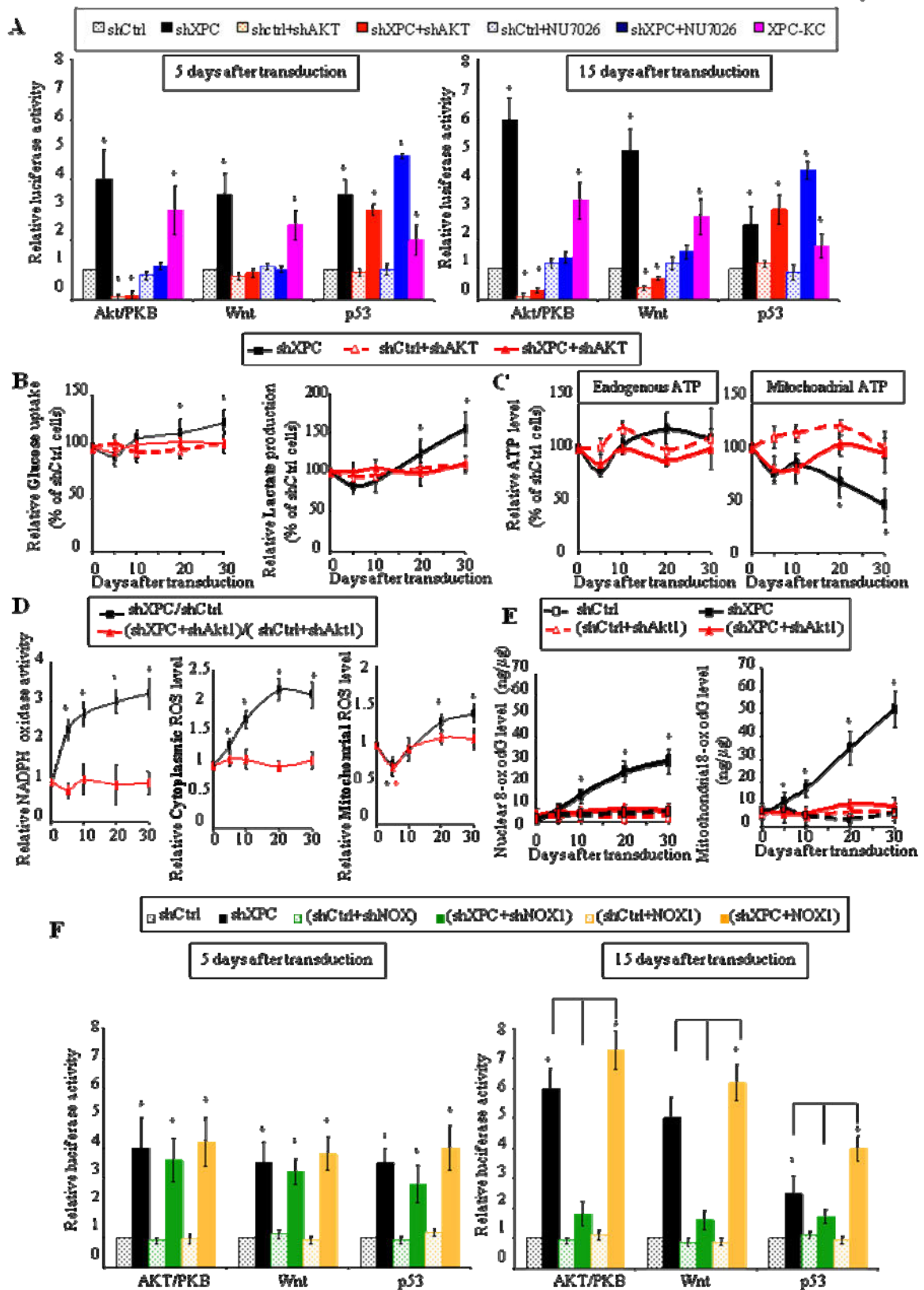
* Signifies P < 0.05 vs counterpart control cells

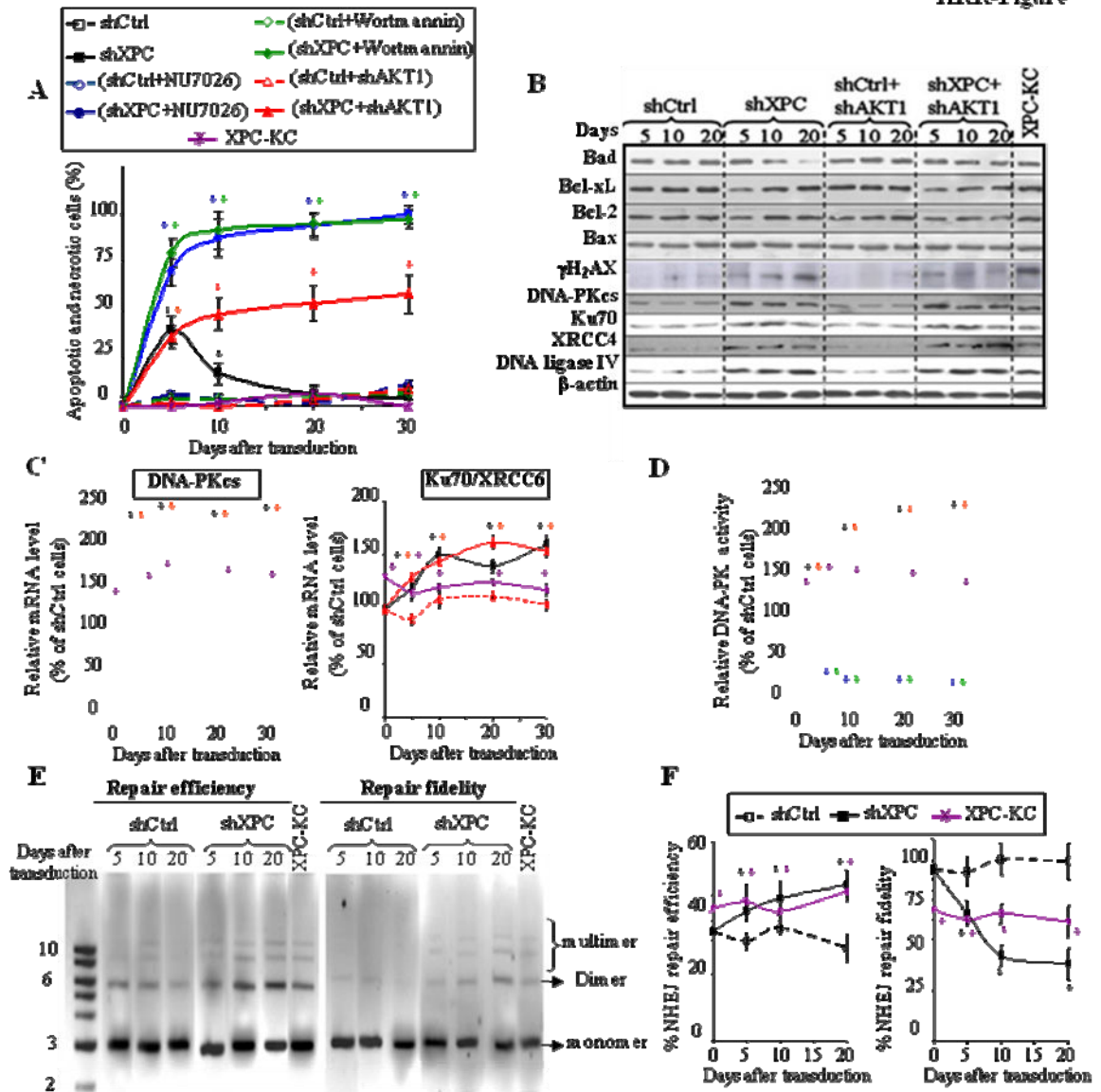
B

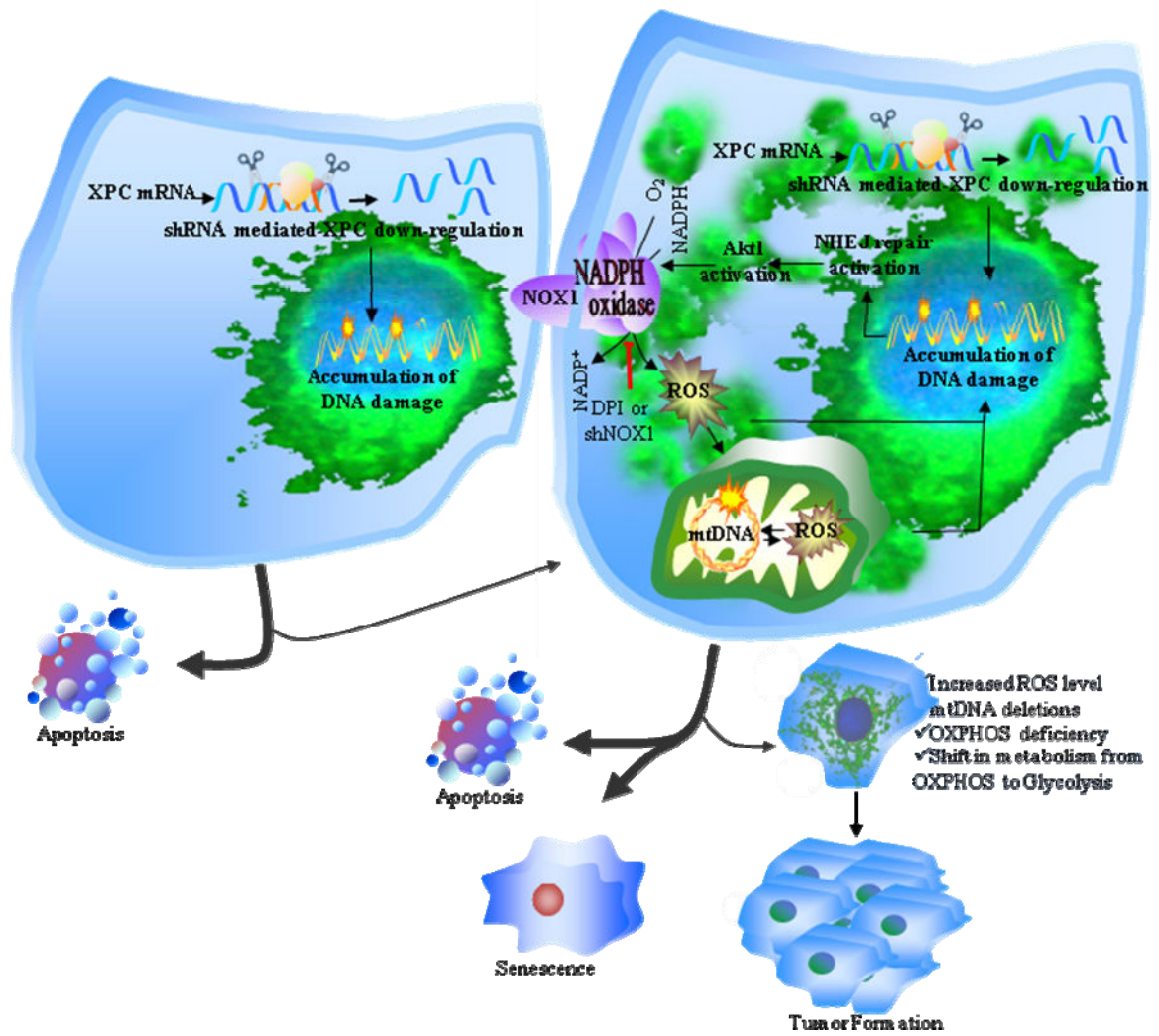


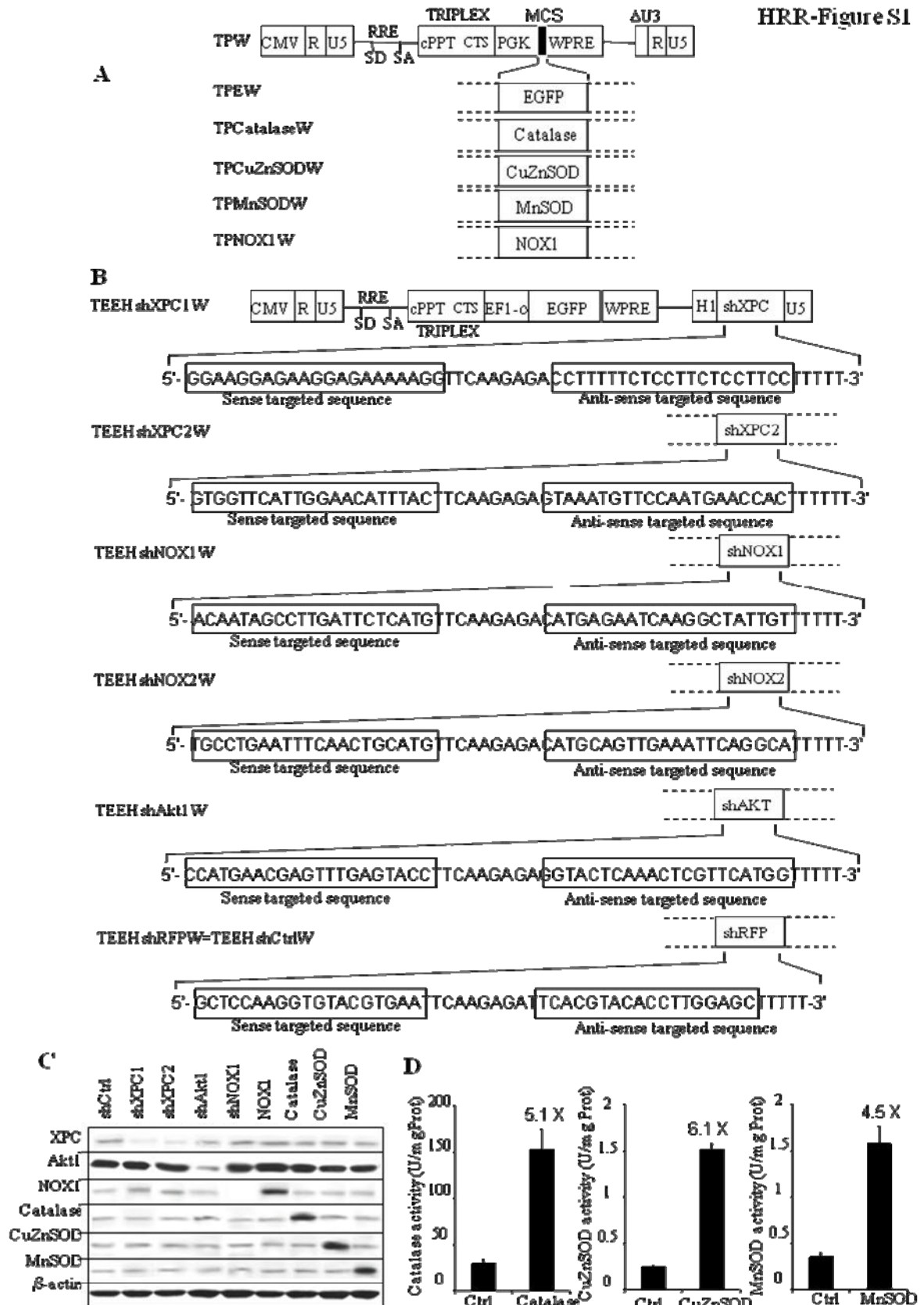
C



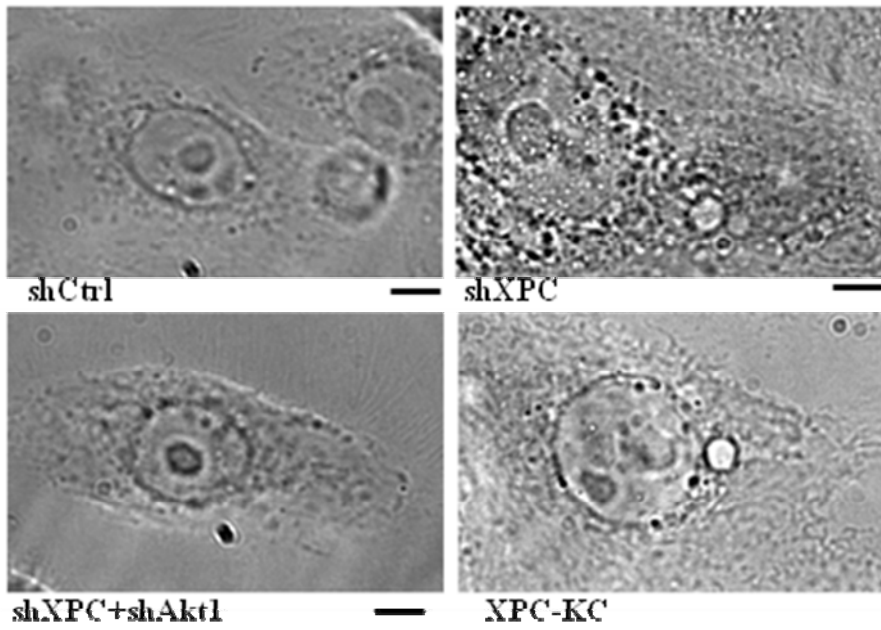




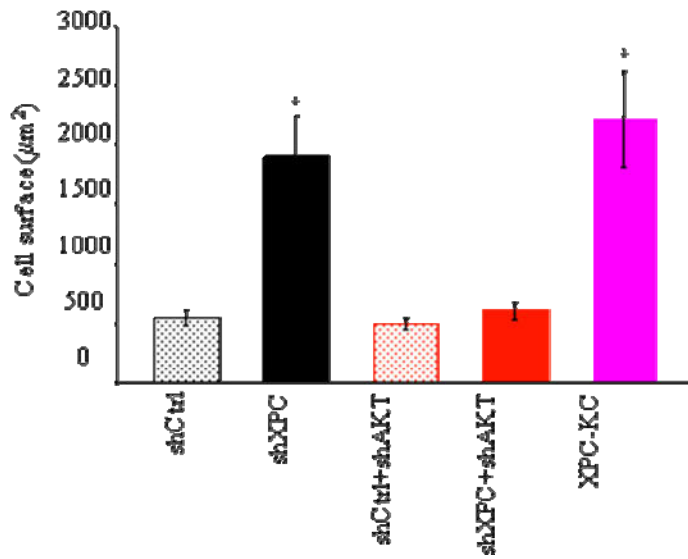


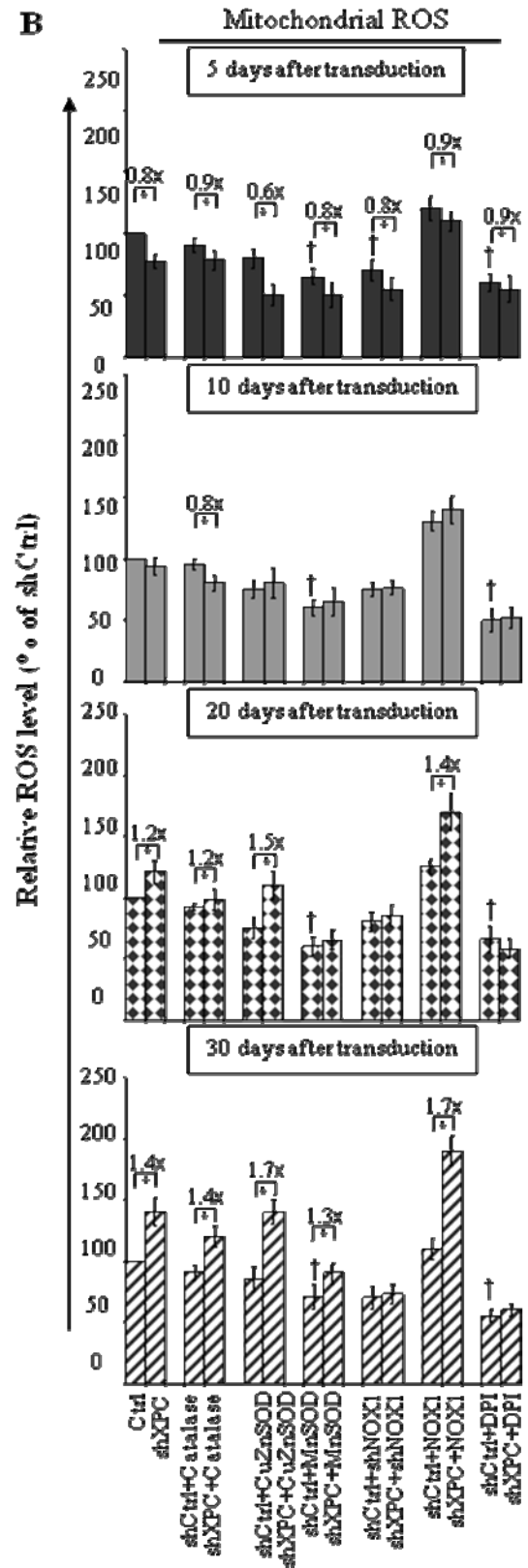
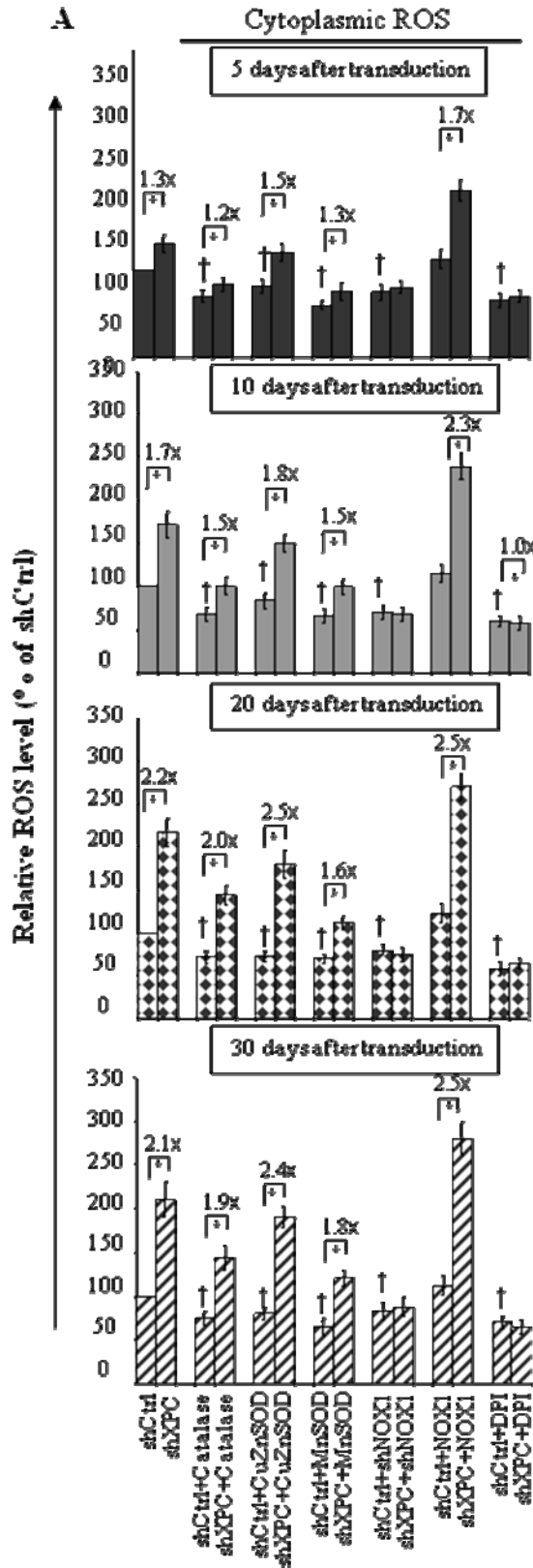


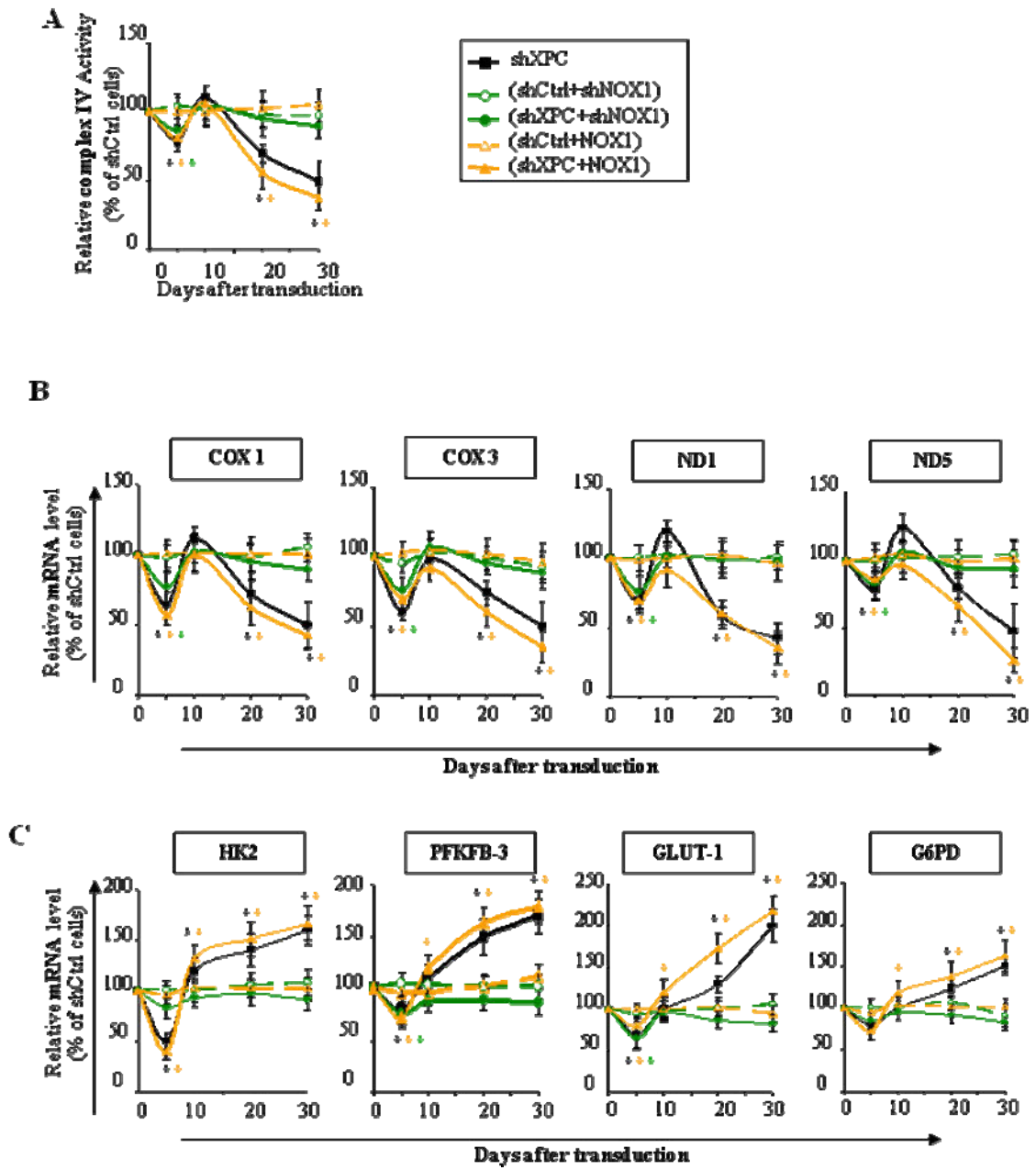
A

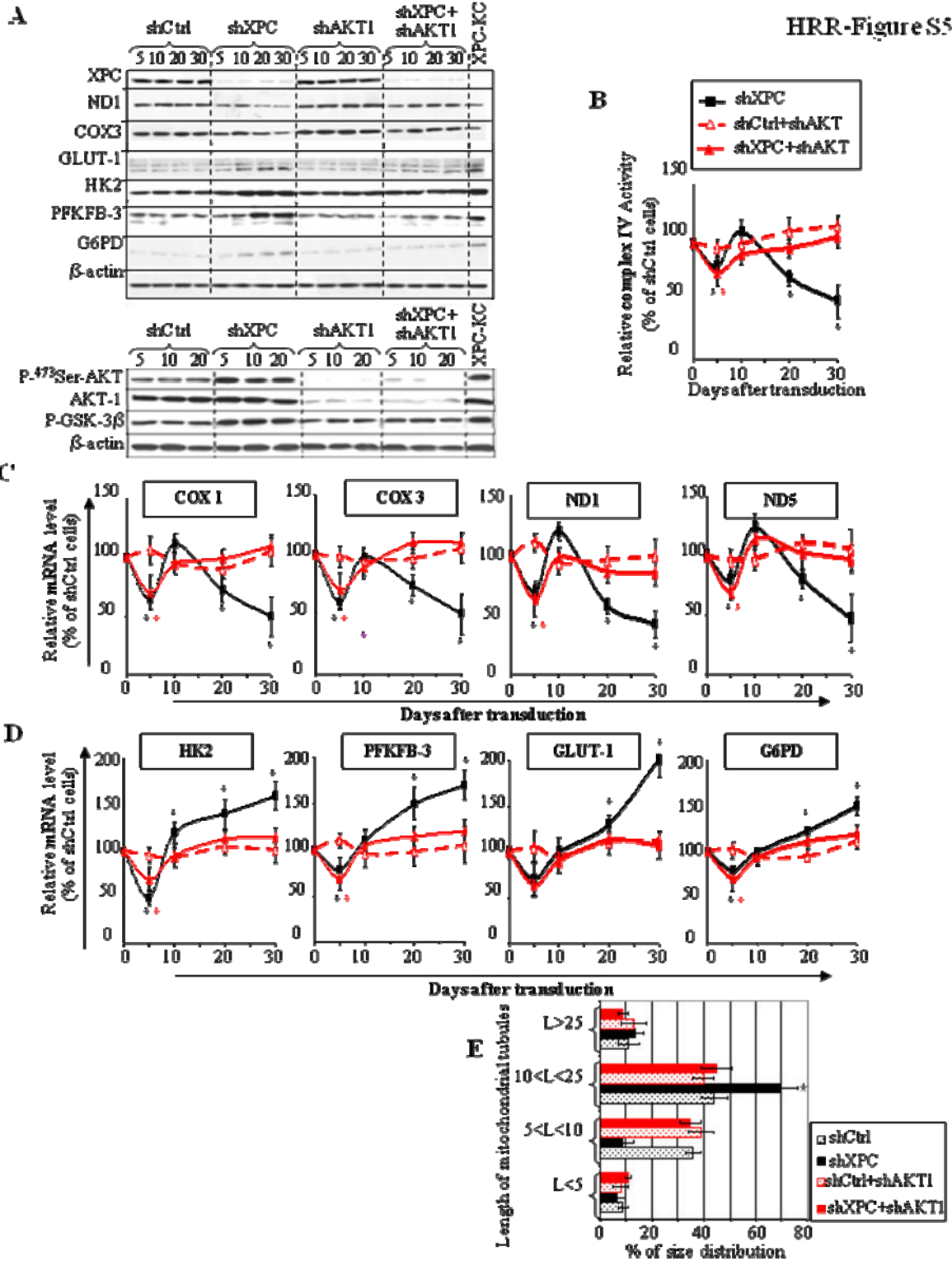


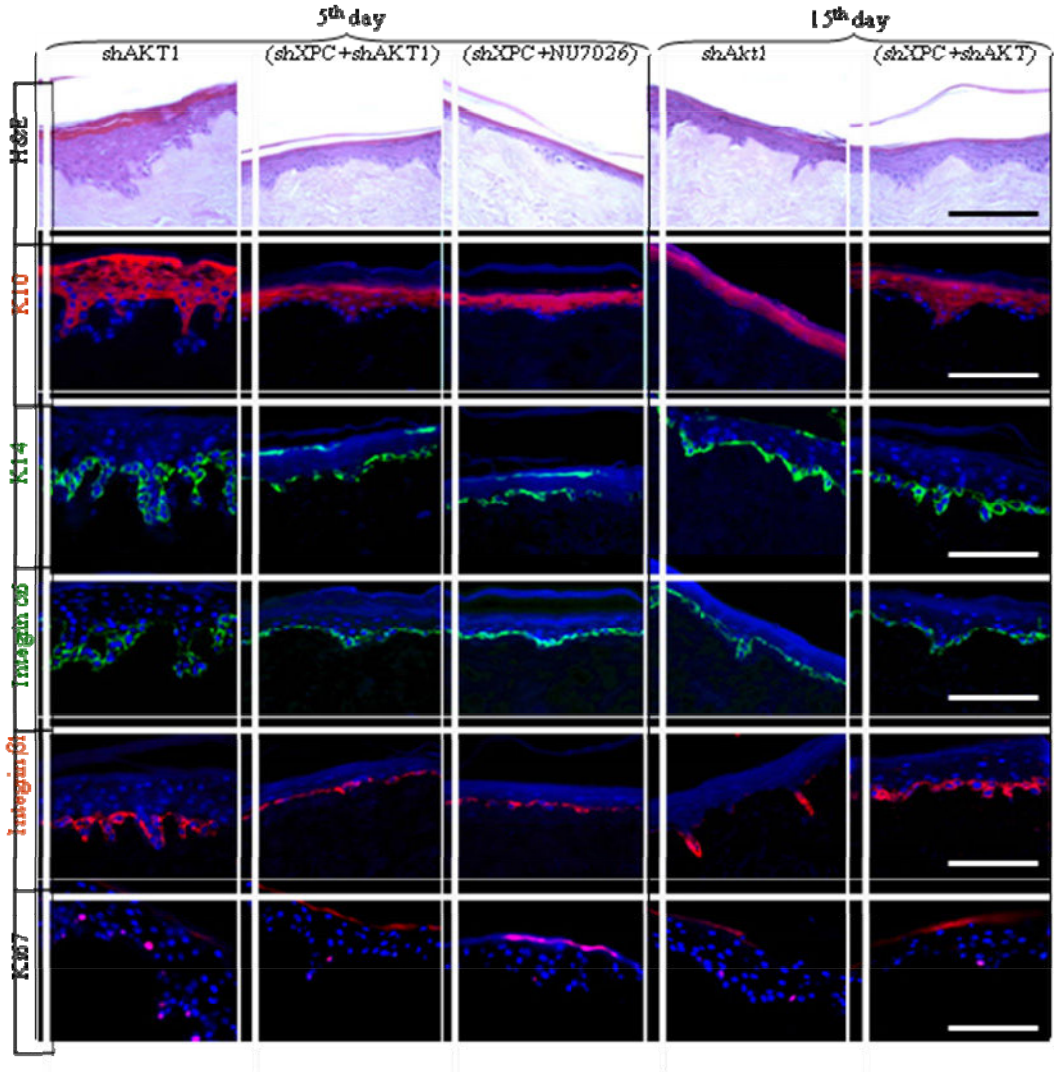
B



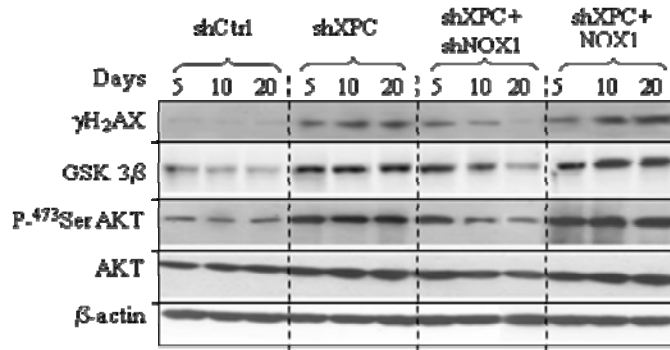




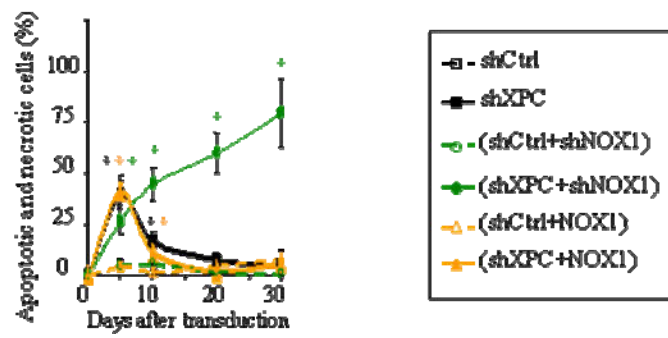




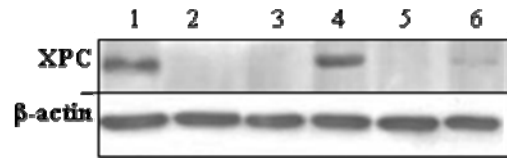
A



B



HRR-Figure S8



AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

**Monsieur Guerino MENEGUZZI, Directeur de Recherche, Université de Nice-Sophia Antipolis,
Nice**

Madame Marie-Dominique GALIBERT, Professeur, Faculté de Médecine, Rennes

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Madame ALI Nsrein

NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 54501
VANDŒUVRE CEDEX

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,
une thèse intitulée :

**"Rôle du facteur de transcription HIF-1 α dans la physiologie cutanée et dans la réponse
à l'exposition UV"**

en vue de l'obtention du titre de :

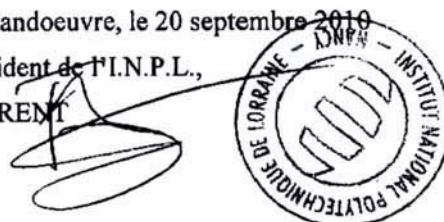
DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : « **Procédés Biotechnologiques et Alimentaires** »

Fait à Vandoeuvre, le 20 septembre 2010

Le Président de l'I.N.P.L.,

F. LAURENT



Résumé

Rôle du facteur de transcription HIF-1 α dans la physiologie cutanée et dans la réponse à l'exposition UV

Le facteur de transcription HIF-1 est un hétérodimère composé d'une sous-unité α et d'une sous-unité β . HIF-1 est capable de reconnaître une séquence consensus appelée HRE (*HIF Response Element*) et de réguler l'expression de plus de 200 gènes cibles impliqués dans divers mécanismes cellulaires. Nous nous intéressons à étudier le rôle de HIF-1 α dans la peau, d'une part dans la régulation des enzymes de la réparation de l'ADN suite à l'irradiation UVB, d'autre part dans la physiologie cutanée.

Nos résultats montrent bien que HIF-1 α régule l'expression des gènes participant à la réparation de l'ADN (XPC et XPD). Ces gènes contiennent dans leurs régions promotrices des HRE de HIF-1 α . La quantification de l'immunoprécipitation de chromatine révèle des HRE putatifs dans les gènes codant pour d'autres protéines de la réparation de l'ADN (XPB, XPG, CSA et CSB), ce qui suggère que HIF-1 α est un régulateur clé de la machinerie de réparation de l'ADN.

Nous avons prouvé que HIF-1 α est indispensable à l'adhésion des kératinocytes par sa régulation exercée sur la laminine-332 et les intégrines ($\alpha 6$ et $\beta 1$). L'absence de l'expression de HIF-1 α empêche aussi la reconstruction des épidermes à partir des kératinocytes humains. Nos résultats ont montré que les souris invalidées pour HIF-1 α développent avec l'âge un phénotype d'inflammation dans plusieurs régions. Ces souris sont très sensibles au moindre stress consécutif à une blessure et une irradiation UVB. L'induction de l'inhibition de HIF-1 α dans des souris inductibles avec le tamoxifène indique un détachement de l'épiderme au niveau des couches supra-basales. Ces souris meurent deux semaines après injection du tamoxifène.

Mots clés: HIF-1 α , réparation de l'AND, laminine-332, intégrines, kératinocytes, épiderme reconstruit

Summary

Role of the transcription factor HIF-1 α in skin physiology and response to UV exposure

The transcription factor HIF-1 is a heterodimer composed of an α and β subunit. HIF-1 is capable of recognizing a consensus sequence called HRE (hypoxia Response Element) and regulate the expression of more than 200 target genes involved in various cellular mechanisms. We are interested in studying the role of HIF-1 α in the skin physiology.

Our results show that HIF-1 α regulates the expression of two main factors (XPC and XPD) involved in nucleotide excision repair through binding on HRE in their promoter regions. Quantitative chromatin immunoprecipitation assays further revealed putative HREs in the genes encoding other DNA repair proteins (XPB, XPG, CSA and CSB), suggesting that HIF-1 α is a key regulator of the DNA repair machinery.

We proved that HIF-1 α is essential for keratinocyte adhesion through its regulation exerted on laminin-332 and integrins (α 6, β 1). The lack of HIF-1 α expression also prevents the reconstruction of epidermis by human keratinocytes. Our results showed that mice constitutively depleted for HIF-1 α in their epidermis develop with age a phenotype of inflammation in several regions. These mice are very sensitive to the stress resulting from wound injury and UVB irradiation. HIF-1 α depletion in the epidermis of inducible mice using tamoxifen results in a detachment of the epidermis in suprabasal layers. These mice die within two weeks after injection of tamoxifen.

Key words: HIF-1 α , DNA repair, laminin-332, integrins, keratinocytes, reconstructed epidermis