



**UNIVERSITÉ
DE GENÈVE**

Archive ouverte UNIGE

<https://archive-ouverte.unige.ch>

Thèse

2006

Open Access

This version of the publication is provided by the author(s) and made available in accordance with the copyright holder(s).

Les kératoses séborrhéiques (KS) : évaluation des modèles rétentionnel et prolifératif

Hsu, Christophe François

How to cite

HSU, Christophe François. Les kératoses séborrhéiques (KS) : évaluation des modèles rétentionnel et prolifératif. Doctoral Thesis, 2006. doi: 10.13097/archive-ouverte/unige:412

This publication URL: <https://archive-ouverte.unige.ch/unige:412>

Publication DOI: [10.13097/archive-ouverte/unige:412](https://doi.org/10.13097/archive-ouverte/unige:412)

UNIVERSITE DE GENEVE

Faculté de Médecine
Section de Médecine Clinique
Département des Neurosciences Cliniques et Dermatologie
Clinique et policlinique de Dermatologie

Thèse préparée sous la direction du Professeur Jean-Hilaire SAURAT

Les kératoses séborrhéiques (KS) : évaluation des modèles rétentionnel et prolifératif

Thèse
présentée à la faculté de médecine
de l'université de Genève
pour obtenir le grade de Docteur en médecine

par

Christophe François HSU

de

Genève (Genève)

Thèse n°

Genève

2005

Table des matières

- I. **Résumé**
- II. **Introduction**
- III. **Etude de l'apoptose (TUNEL, caspase-3, Bcl-2)**
 - **Introduction**
 - **Méthodes**
 - **Résultats**
 - **Discussion**
- IV. **Etude de la prolifération (Ki67, ErbB1)**
 - **Introduction**
 - **Méthodes**
 - **Résultats**
 - **Discussion**
- V. **Etude de l'expression de gènes ciblés par RT-PCR**
 - **Introduction**
 - **Méthodes**
 - **Résultats**
 - **Discussion**
- VI. **Conclusion**
- VII. **Références bibliographiques**

I. Résumé

Les kératoses séborrhéiques sont les tumeurs bénignes les plus fréquentes de la peau dont l'exposition chronique au soleil est l'une des causes possibles. Deux théories non mutuellement exclusives sont avancées pour expliquer le développement de ces lésions mal connues : les modèles rétentionnel et prolifératif. Une meilleure compréhension de cette pathologie permettant de déboucher sur des traitements préventifs et curatifs est nécessaire, car ces lésions concernent une grande partie de la population âgée, et induisent une gêne importante chez de nombreux patients. La présente étude a pour objectif de mieux comprendre les mécanismes biochimiques conduisant au développement des KS. L'analyse comparative des KS et de la peau saine par des techniques génomiques, immunohistochimiques et enzymatiques démontre un modèle rétentionnel des KS avec surexpression de la desmogléine-3, une molécule d'adhésion : il s'agirait ainsi de lésions non prolifératives dont les kératinocytes apicaux sont résistants à l'apoptose photoinduite ainsi qu'à la desquamation naturelle.

II. Introduction

Les kératoses séborrhéiques (KS) sont les «tumeurs» bénignes cutanées les plus fréquentes; elles se développent en général à partir de 40 ans et atteignent l'ensemble de la population de plus de 70 ans. Les KS proviendraient des follicules pileux (Ito et al., 1986; Kirkham, 1997) et sont favorisées par l'exposition aux UV (Yeatman et al., 1997; Kwon et al., 2003). Une étude multicentrique au Royaume-Uni et en Australie (Yeatman et al., 1997) arrive à la conclusion que la prévalence des lésions est augmentée chez les jeunes Australiens par rapports aux jeunes Britanniques. Les KS constitueraient selon certains l'évolution des lentigos solaires (Mehregan, 1975).

Cliniquement, il s'agit d'une lésion bien délimitée avec un degré de pigmentation variable partant du rouge au brun foncé. Ces lésions ne provoquent pas de symptômes mais peuvent rarement être prurigineuses et d'aspect enflammé. La surface des KS est rugueuse ou lisse à la palpation et les lésions sont décrites comme devenant rugueuses et pigmentées avec le temps. Histologiquement, cela correspond à des KS évoluant du type acanthosique ± réticulaire (RA) au type acantho-hyperkératosique (AHK) (Kirkham, 1997). Ce dernier type contient les structures en clocher d'église qui correspondent à des projections des KS.

Les caractéristiques dermoscopiques comprennent (i) des ouvertures en pseudo-comédons, (ii) des kystes miliaires, (iii) des fissures et (iv) une claire délimitation de la peau saine avoisinante avec des bords émiettés (mangés par les mites) (Braun et al., 2002; Stolz et al., 2002; Wang et al., 2004). Le dermatoscope aide le clinicien à différencier les KS (i) des naevi mélanocytaires, (ii) des carcinomes basocellulaires et (iii) du mélanome.

Les principes thérapeutiques largement employées mais somme toute limitées comprennent (i) la cryothérapie à l'azote liquide (Kee, 1967), (ii) le curetage et (iii) l'excision par shave. Ces approches sont destructrices ou excisionnelles et n'ont pas de cible physiopathologique. Toutefois, l'excision par shave permet une analyse histologique en cas de doute diagnostique. De plus ces traitements peuvent aboutir à une hypopigmentation et à la formation de cicatrices, et n'empêchent pas la récurrence des KS. Il existe toutefois un traitement topique de dérivés de vitamine D (tacalcitol, calcipotriol, maxacalcitol) qui aurait montré une efficacité sur des KS en induisant une apoptose *in vitro* (Mitshuhashi et al., site internet de l'université de Yamagata) .

Il existe deux théories expliquant le mécanisme de formation des KS. La première, s'appuyant sur des analyses immunohistochimiques et par hybridation *in situ*, émet l'hypothèse que les KS sont la résultante d'une prolifération de kératinocytes aboutissant à une inhibition de l'apoptose et l'expression de la survivine (Bowen et al., 2004). D'après la seconde, les KS seraient le résultat d'une accumulation de kératinocytes sénescents avec une surexpression de la protéine p16 (Nakamura and Nishioka, 2003). La caractéristique commune de ces deux théories est une inhibition de l'apoptose, laquelle est une composante de la sénescence qui se caractérise par un arrêt du cycle cellulaire, puis la destruction organisée de la cellule (Strasser et al., 2000).

Afin de mieux comprendre les mécanismes biochimiques conduisant au développement des KS, nous avons analysé les modèles rétentionnel et prolifératif des KS en suivant trois axes : (i) l'apoptose, (ii) la prolifération et (iii) la cohésion interkératinocytaire. Les lésions analysées ont été prélevées chez des patients ayant donné leur consentement écrit, suite à projet soumis

à la Commission d'Ethique de la Faculté de Médecine.

III. Etude de l'apoptose (TUNEL, caspase-3, Bcl-2)

Introduction

L'apoptose est un processus biochimique complexe régulé par de nombreuses protéines (Strasser et al., 2000; Zhuang et al., 2000). L'apoptose peut être induite par une exposition aiguë aux UVB; afin de s'assurer que l'on mesure bien une apoptose et non une nécrose, il est recommandé d'utiliser des marqueurs de l'apoptose précoce, laquelle est clairement distincte de la nécrose (Strasser et al., 2000; Lotan, 2003). Le processus menant à l'initiation de l'apoptose par les caspases commence par l'inactivation de Bcl-2, une protéine antiapoptotique. Bcl-2 est une protéine inhibitrice de l'apoptose précoce située sur la membrane mitochondriale externe (Strasser et al., 1997). Elle inhibe l'apoptose en servant de protéine d'ancrage à Apaf-1 (apoptotic protease activating factor) et en diminuant la perméabilité mitochondriale. Son activité est modulée par la liaison à d'autres protéines régulatrices telles que Bax et Bad. Apaf-1 est une protéine agissant en activant des caspases initiateuses telle que la caspase-9 (Cotran et al., 1999). Cette activation d'une cascade de caspases culmine avec l'activation de la caspase-3 et/ou de la caspase-7, laquelle peut être mesurée au moyen d'un substrat spécifique (certaines cellules ne possèdent que l'une des 2 caspases; dans les autres cellules, la caspase-7 est considérée comme redondante). Une fois activée, la caspase-3 (ou la caspase-7) convertit la DNase cytoplasmique en une forme active, ce qui aboutit au clivage intranucléosomique de l'ADN (Cotran et al., 1999).

D'après une étude immunohistochimique, la présence de Bcl-2 est légèrement augmentée dans les KS et fortement augmentée dans les carcinomes basocellulaires (Hussein et al., 2004). L'apoptose tardive est caractérisée par une fragmentation de l'ADN, laquelle peut être mise en évidence sur des coupes fixées par la technique TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated UTP nick end labelling). Le marquage immunohistochimique est donc d'autant plus fort que la concentration d'un nombre de fragments est importante (Okamoto et al., 1999; Pesce and Scalora, 2000).

Dans cette approche de l'étude des KS par l'analyse de l'apoptose, nous avons évalué celle-ci par la méthode TUNEL, l'activité de la caspase-3 et la présence de Bcl-2.

Méthodes

Apoptose par la méthode TUNEL

12 KS confirmées histologiquement (11 patients âgés de 73 à 84 ans) et 8 échantillons de peau normale (5 patients âgés de 48 à 68 ans ayant subi une abdominoplastie) ont été analysées par la méthode TUNEL après avoir été fixées dans du formol. Pour le contrôle positif, un prélèvement de peau (patient de 52 ans) a été irradié à 80 mJ/cm² d'UVB (RMX-3W, Vilber Lourmat), puis immergé dans du milieu de culture (Dulbecco's modified Eagle's medium) et maintenu dans un incubateur à 37°C, avant d'être fixé en formol 24 heures plus tard.

Activité de la caspase-3/7

4 KS ainsi que la peau périlésionnelle ont été prélevées par shave chez 4 patients âgés de 63 à 88 ans, puis les kératinocytes ont été mise en culture selon la méthode décrite plus bas. Une fois les cultures confluentes, les kératinocytes ont été récoltés puis ensemencés dans des plaques à 96 puits protégées de la lumière (Greiner, Bio-one) à raison de 15'000 cellules par puits. Après avoir adhéré pendant 24 heures, les cellules ont été irradiées à des doses croissantes d'UVB; 24 heures plus tard, un substrat spécifique des caspases 3 et 7 (Z-DEVD-R110) a été incubé avec les cellules (kit caspase 3/7 de Beckman-Coulter). Le produit de l'activité de ces enzymes sur ce substrat est hautement fluorescent (Bauer et al., 2005); la fluorescence des puits a été analysée au moyen d'un fluorimètre pour plaques 24 heures après incubation avec le substrat.

Immunohistochimie de Bcl-2

7 KS provenant de patients âgés de 72 à 86 ans, ainsi que 3 prélèvements de peau saine (abdominoplasties de patients âgés de 19 à 48 ans) ont été fixés au formol et enrobés de paraffine pour les analyses immunohistochimiques. Des sections de 5 µm sont déparaffinées au xylène, lavées à des concentrations décroissantes d'éthanol, rincées à l'eau, puis chauffées aux microondes (100 W; 14 minutes) immergées dans un tampon citrate 10 mM pH 6. Après différents lavages (eau, méthanol 50% + eau oxygénée, Tris-HCl 0.1 M pH 7.7, TBS), on ajoute le premier anticorps (anticorps monoclonal anti-Bcl-2 (DAKO) à une dilution 1:100 pendant une heure. Après deux lavages avec du TBS, le deuxième anticorps biotinylé de souris est rajouté à la solution de TBS et incubé 30 minutes à température ambiante. Les lames sont ensuite lavées dans du TBS avant l'adjonction du complexe streptavidine-biotine. Finalement, les lames sont développées avec une solution de diaminobenzidine-H₂O₂, puis bloquées avec de l'eau, contrecolorées avec de l'hémalin, deshydratées puis fixées.

Résultats

Apoptose par la méthode TUNEL

L'apoptose tardive a été analysée par la méthode TUNEL dans des lésions KS provenant de 11 patients, ainsi que des prélèvements de peau saine provenant de 5 patients ayant subi une abdominoplastie. Aucun prélèvement de KS ou de peau saine n'est marqué par la méthode TUNEL (Table 1, Figures 1A - 1E). La technique a cependant bien fonctionné, car le contrôle positif (peau saine irradiée aux UVB) est bien marqué (Table 1, Figure 1F).

Table 1. Résultats de l'analyse de l'apoptose par TUNEL. «0» et «++» indiquent une absence de marquage kératinocytaire et un marquage important dans toutes les couches de l'épiderme.

condition	n	%age moyen	cellules positives
peau saine	5	61.0	0
KS	11	80.6	0
contr TM le positif	1		++

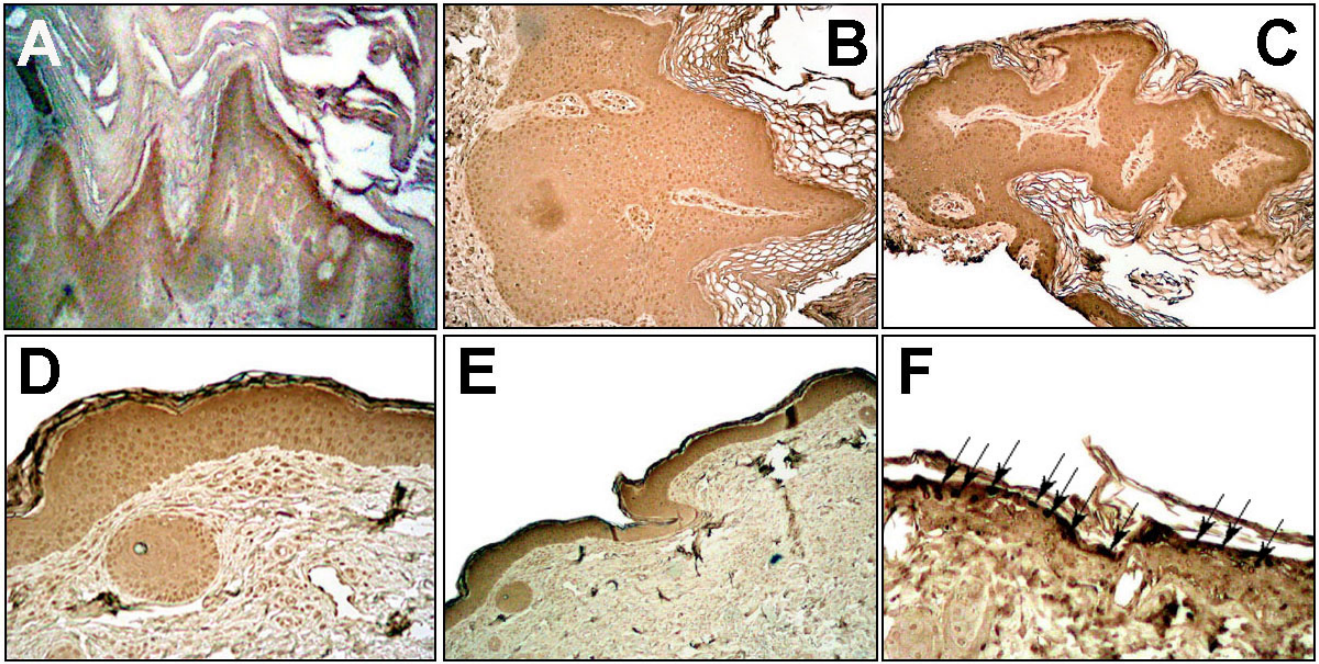


Figure 1. Immunohistochimie de l'apoptose par TUNEL A-C : lésions KS; D-E : zones saines provenant d'abdominoplasties; F : contrôle positif : zone saine (abdominoplastie) exposée à 80 mJ/cm² d'UVB, puis analysée 24 h plus tard. Le marquage du contrôle positif (F) est bien visible, tandis qu'aucun marquage n'est observé dans les lésions KS (A-C) et la peau saine (D-E).

Activité de la caspase-3/7

L'activité relative de la caspase-3/7, un marqueur de l'apoptose précoce, a été déterminée dans des cultures de kératinocytes provenant de lésions KS de 4 patients, et comparée à des cultures de kératinocytes provenant de zones périlésionnelles de ces mêmes patients (Table 2, Figure 2). L'apoptose a été induite par exposition des cultures aux UVB.

Table 2. Rapport d'activité de la caspase-3 dans les cultures de kératinocytes provenant de KS par rapport aux cultures de kératinocytes périlésionnels. SE : erreur standard (= somme des erreurs sur la moyenne).

irradiation UVB (mJ/cm ²)	rapport KS / peau saine (n = 3)	SE
0	0.93	0.19
50	1.11	0.23
100	0.66	0.06
250	0.64	0.05

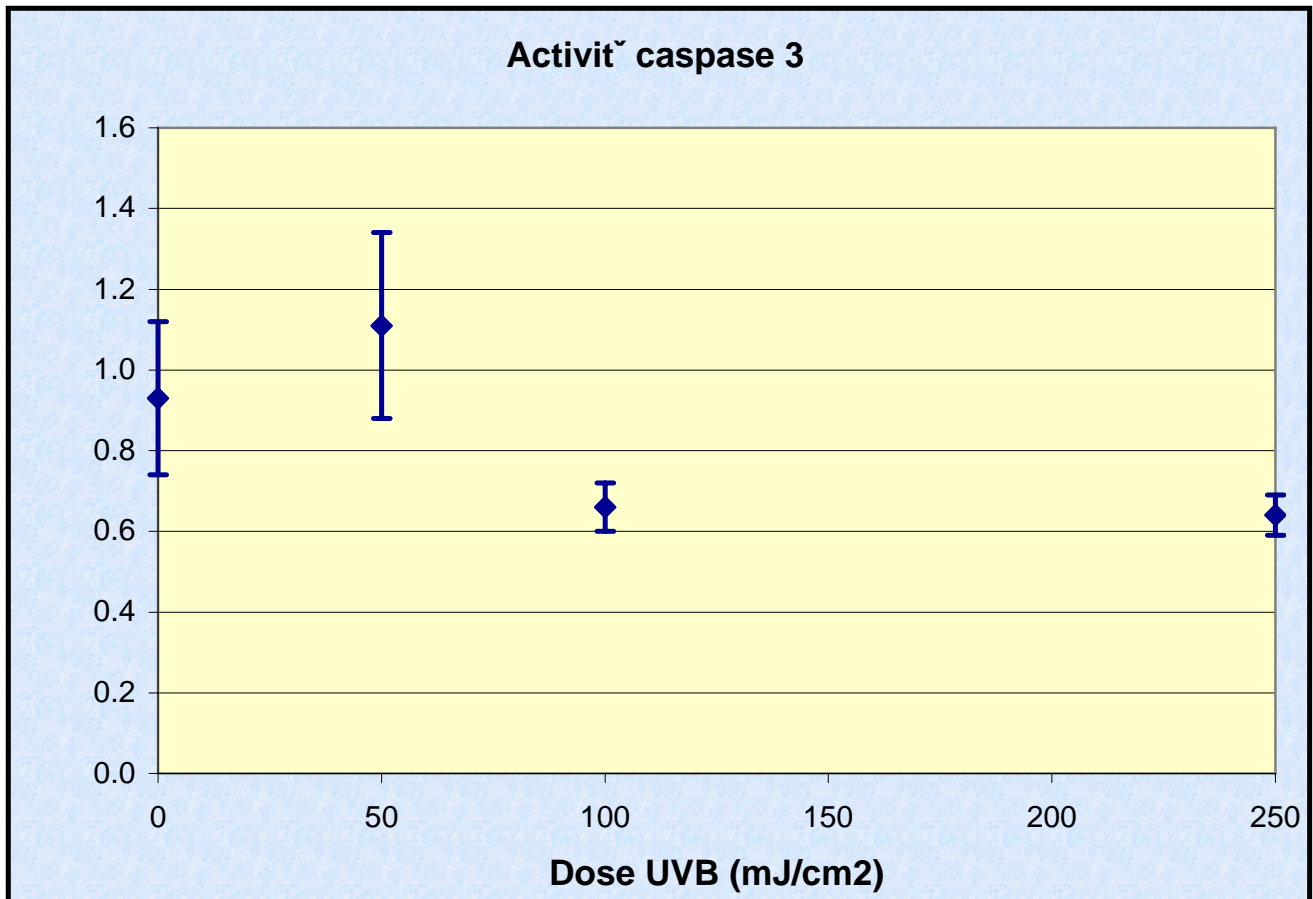


Figure 2. Rapport d'activité de la caspase-3 dans des cultures de kératinocytes provenant de KS par rapport aux cultures de kératinocytes périlésionnels, en fonction de la dose d'UVB.

On observe une tendance à la baisse (non statistiquement significative) pour des doses d'UVB supérieures ou égales à 100 mJ/cm².

Immunohistochimie de Bcl-2

La présence de la protéine Bcl-2 a été analysée par immunohistochimie dans des lésions KS de 7 patients (Figures 3A-3C), ainsi que dans des prélèvements de zones saines de 3 patients (abdominoplastie) (Figure 3D).

Table 3. Résultats de l'analyse de Bcl-2 par immunohistochimie. Intensité du marquage : +, marquage faible (pas de marquage dans les cellules adjacentes); +++, marquage présent dans la plupart des kératinocytes.

condition	n	%age moyen	cellules positives	
			couche basale	granulosa
contr TM les	3	29.3	+++	+
KS	7	75.0	+	+++

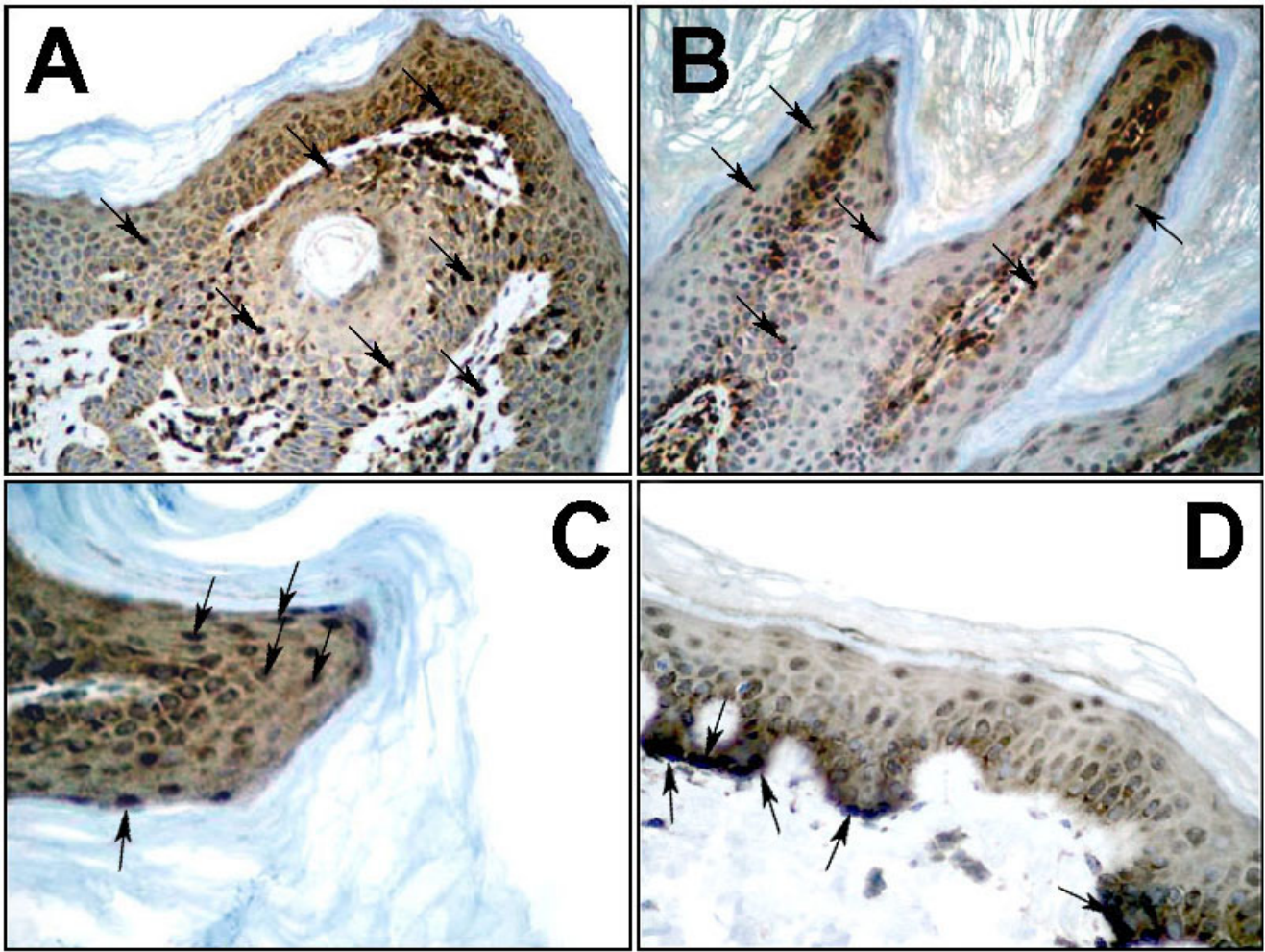


Figure 3. Analyse de Bcl-2 par immunohistochimie dans des lésions KS (A-C) et des zones saines provenant d'abdominoplastie (D). Dans les KS (A-C), on observe un marquage non confiné à la couche basale. Ceci se retrouve dans les lésions avec structures en clocher d'église (B). Par contre, dans les zones saines (D), le marquage est essentiellement confiné aux couches basales.

Discussion

Le rapport KS/peau périlésionnelle pour l'activité de la caspase-3/7 diminue en fonction de la dose d'UVB. Cette différence que l'on observe concerne des kératinocytes ayant grandi dans des cultures cellulaires. Ainsi, la différence observée pourrait être due à des kératinocytes hyperprolifératifs des couches basales, ou au contraire à des kératinocytes hypoprolifératifs, voire sénescents, des couches suprabasales qui ne seraient pas éliminés. Toutefois, on peut émettre l'hypothèse que l'activité de la caspase spécifique à l'ensemble des kératinocytes des KS est inférieure à celle de l'ensemble des kératinocytes de peau normale. Les rapports observés montrent que l'activité de la caspase-3/7 dans les KS est d'environ 60% de celle de la peau normale d'un même patient, suggérant une certaine résistance à l'apoptose photoinduite des kératinocytes des KS par rapport à ceux de la peau saine; cependant, on ne sait pas si cette résistance apparente est d'origine biologique (mécanisme d'apoptose requérant une plus grande dose d'UV) ou physique, par exemple en raison d'une

couche cornée plus épaisse qui diminuerait la dose d'UV reçue par les chromophores intracellulaires.

Signalons que pour certains auteurs les KS enflammées (histologiquement irritées) sont caractérisées par des structures particulières appelées «squamous eddies», se présentant sous forme d'amas de kératinocytes fortement marqués par la méthode TUNEL et qui correspondraient à une tentative d'élimination de la lésion par une entrée en apoptose (Pesce and Scalora, 2000). Toutefois, le marquage par immunohistochimie TUNEL, bien que ne s'opposant pas à une inhibition de l'apoptose dans les KS, ne permet pas d'affirmer que les KS ont un différent degré d'apoptose par rapport à la peau normale, car il n'y a pas de marquage TUNEL positif dans la peau normale en général. La résistance à l'apoptose des kératinocytes des KS dépendrait donc des conditions qui induisent cette apoptose : en effet ces conditions sont multiples, et on peut imaginer qu'elle puissent influencer diversement sur les réponses des cellules; de plus, il faut garder en mémoire que l'apoptose est aussi bien un processus physiologique normal que la conséquence de conditions néfastes à l'organisme.

La distribution de Bcl-2 semble être prédominante dans les couches granuleuses des structures en clocher d'église des KS. Toutefois, les lieux d'expression de Bcl-2 ne coïncident pas avec le marquage de Ki67 (voir plus bas) ou de la distribution de pigment. Ceci suggère que les structures en clocher d'église pourraient se former en raison d'une inhibition de l'apoptose de kératinocytes non nécessairement hyperprolifératifs.

IV. Etude de la prolifération (Ki67, ErbB1)

Introduction

Il existe de nombreux marqueurs de la prolifération cellulaire. Dans cette étude, nous avons choisi d'analyser la protéine Ki67 et le récepteur de l'EGF («epidermal growth factor»).

Ki67 est une protéine qui se lie au «dense fibrillary component» du nucléole; sa fonction est inconnue, mais on observe une forte augmentation de son expression au moment de la mitose (Verheijen et al., 1989; Scholzen and Gerdes, 2000; Brown and Gatter, 2002). Pour cette raison, cette protéine est un bon marqueur de l'état prolifératif d'un tissu et joue un rôle important pour l'évaluation pronostique de nombreux états néoplasiques malins (Brown and Gatter, 2002). Certains auteurs ont évalué à $9.7\% \pm 3.1\%$ la proportion des cellules Ki67-positives dans les lésions KS, mais sans le comparer avec la peau normale (Matsuta et al., 1996). D'autres auteurs ont comparé la proportion de cellules Ki67-positives entre la peau normale ($2,14\% \pm 1,51\%$) et les KS ($4,2\% \pm 6,26\%$) sans qu'il y ait de différence statistiquement significative (Soini et al., 1994).

L'EGF est un important facteur de croissance. Son récepteur, appelé ErbB1, fait partie d'une famille de récepteurs dont l'activation différentielle par homo- ou hétérodimérisation régule de nombreuses voies biochimiques impliquées dans la croissance et la différenciation cellulaires (Cotran et al., 1999; Earp et al., 2003). En particulier, l'action de l'EGF est mitotique pour de nombreuses cellules épithéliales *in vitro*, et l'on retrouve une surexpression du récepteur ErbB1 dans de nombreux types de néoplasies épithéliales (Gamou et al., 1988; Lui and Grandis, 2002; Earp et al., 2003).

Méthodes

Cultures de kératinocytes

Pour la préparation de cultures de kératinocytes (Normand and Karasek, 1995), l'épiderme a été séparé du derme après incubation avec la dispase II (neutral protease grade III, Roche Pharmaceuticals) pendant une nuit à 4°C. Le jour suivant, les échantillons sont émincés puis incubés avec une solution de trypsine-EDTA (Gibco) pendant 15 minutes à 37°C. Après comptage, 100'000 cellules sontensemencées dans des boîtes de Petri, après y avoir ajouté du «coating medium» (Cascade Biologics) 30 minutes auparavant. Le milieu de culture est un milieu semi-défini (i.e. sans sérum, mais avec extraits hypophysaires) (Epilife, Cascade Biologics).

Les 4 échantillons de KS (patients âgés de 56 à 65 ans) et de peau périlésionnelle ont été prélevés par shave. Les cultures ont été évaluées visuellement puis photographiées 5 jours après la mise en culture.

Immunohistochimie de Ki67

41 lésions KS provenant de patients âgés de 49 à 89 ans, ainsi que 15 prélèvements de peau saine d'abdominoplastie (19 à 61 ans) ont été analysés. La procédure de marquage immunohistochimique est semblable à celle utilisée pour le Bcl-2; le premier anticorps est remplacé par un anticorps murin anti-Ki67. Pour l'analyse quantitative des cellules positives, on compte l'ensemble des cellules et celles marquées au Ki67 sur 4 champs consécutifs correspondant à l'ensemble des couches de l'épiderme, au grossissement 40 x (soit environ 750 cellules pour les KS et 150 pour la peau saine), ce qui permet de déterminer le pourcentage de cellules Ki-67 positives. NB Il serait aussi possible de réaliser un comptage linéaire, soit les cellules de la couche basale uniquement, mais en raison de la répartition différente des cellules marquées entre les KS et la peau saine (Figure 5), un tel décompte serait biaisé.

Immunohistochimie de ErbB1

6 KS de patients âgés de 74 à 86 ans, dont 4 du type acantho-hyperkératosique et 2 du type réticuloacanthosique, prélevés par shave, ainsi que deux prélèvements de peau saine provenant d'abdominoplasties (38 et 68 ans) ont été analysés. Le marquage immunohistochimique a été réalisé comme pour le Bcl-2 et le Ki67, en utilisant comme premier anticorps un anticorps monoclonal de lapin anti-ErbB1 (Santa Cruz Technologies).

Western blots de ErbB1

La protéine ErbB1 a été analysée par Western blot dans 3 KS de 2 patients âgés de 72 et 73 ans, et 2 échantillons de peau saine (abdominoplastie, 35 et 61 ans). Les prélèvements ont été homogénéisés mécaniquement, à froid, dans un tampon d'extraction contenant 20 mM de Tris-HCl pH 7.5, 5 mM de MgCl₂, 10 mM d'EDTA, 100 mM de NaCl, 1% de SDS, 10% de glycérol et des inhibiteurs de protéases (Complete, Boehringer), au moyen d'un Polytron (Kinematica). Les extraits ont été soumis aux ultrasons et centrifugés pendant 20 minutes à 13'000g, puis 50 µg d'extraits protéiques ont été analysés par électrophorèse, puis la protéine

ErbB1 identifiée par sa liaison à un anticorps polyclonal anti-ErbB1 de lapin (Santa Cruz Technologies) à une dilution de 1:200.

Résultats

Cultures de keratinocytes

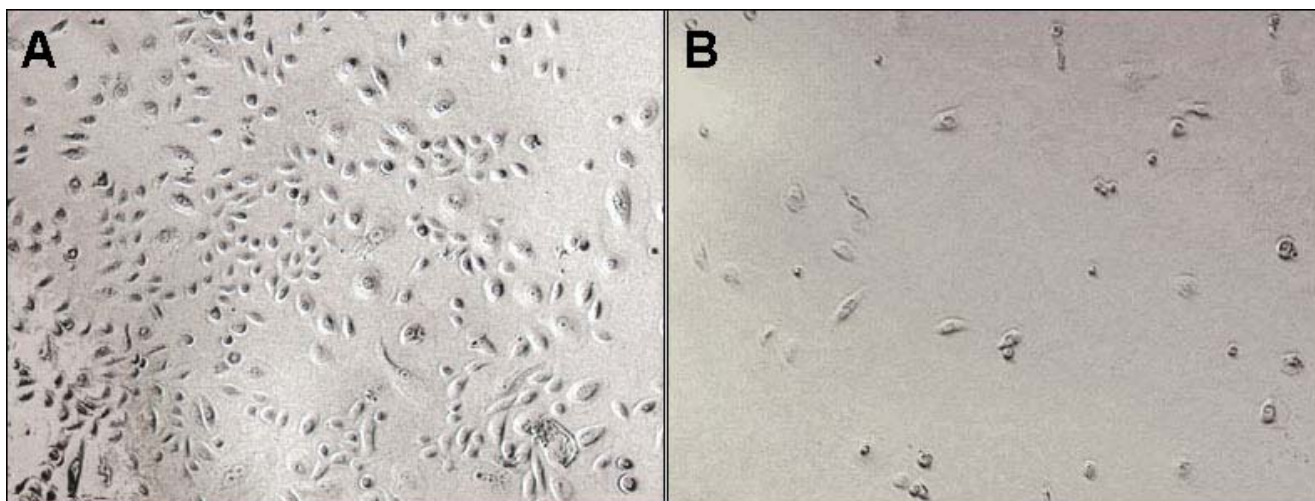


Figure 4. Cultures de kératinocytes. Des kératinocytes de KS (A) et de peau périlésionnelle (B) ont été cultivés *in vitro*. Les images ci-dessus montrent les cultures 5 jours après la mise en culture de l'une des 4 lésions KS excisées. Une autre lésion a donné les mêmes résultats, tandis que pour les 2 autres lésions, les différences de croissance entre les KS et la peau péri-lésionnelle étaient moins marquées; dans ces 2 cas, les cultures ont atteint la confluence en 5 jours.

Immunohistochimie de Ki67

La prolifération a été analysée par immunohistochimie de Ki67 sur des lésions KS de 41 patients et des prélèvements de peau saine de 15 patients (Figures 5 et 6, Table 4).

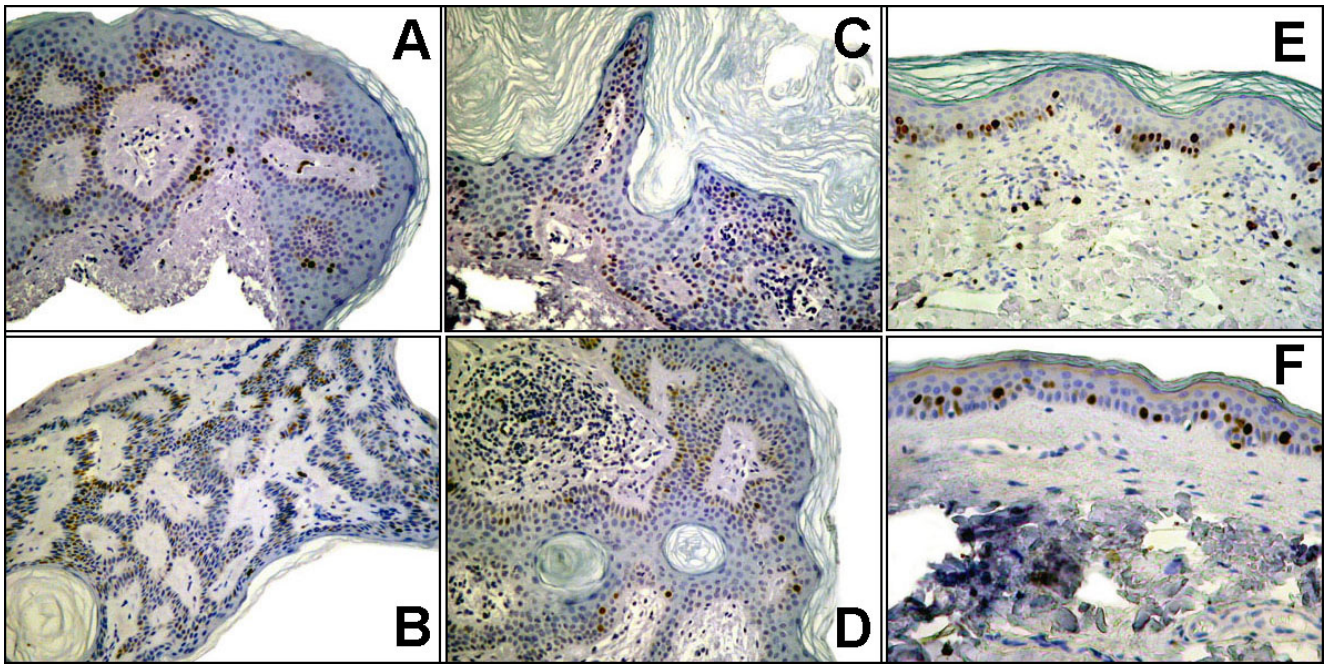


Figure 5. Immunohistochimie de Ki67 dans des KS réticuloacanthosiques (A-B), acantho-hyperkératosiques (C-D), et la peau saine (E-F). Dans l'ensemble des KS (A-D), les cellules positives semblent moins confinées aux couches basales, et d'une manière générale moins nombreuses que dans la peau saine (E-F). D'une manière générale, on attend un gradient décroissant de la couche basale vers la couche granuleuse, suivant ainsi le gradient de la différenciation cellulaire. Le Ki67 étant localisé dans le noyau, un marquage clairement nucléaire exclut en principe un artefact de localisation dû à l'aspect tortueux des lésions KS. Autrement dit, la localisation non confinée aux couches basales, telle qu'elle est observée dans les KS, correspond vraisemblablement à la réalité.

Table 4. Résultats de l'analyse de Ki67 par immunohistochimie. Abréviations : kératoses séborrhéiques (KS) de type réticulo-acanthosique (RA) ou acantho-hyperkératosique (AHK). Les différences entre les KS et la peau saine ont été évaluées par analyse de variance (ANOVA) avec le post-test de Bonferroni.

condition	n	%age moyen	cellules positives (%)	SE	Stat (vs ctrl)
peau saine	15	43.2	8.3	0.7	
KS (tot)	41	75.6	2.3	0.3	p < 0.001
KS (RA)	19		2.0	0.5	p < 0.001
KS (AHK)	22		2.6	0.3	p < 0.001

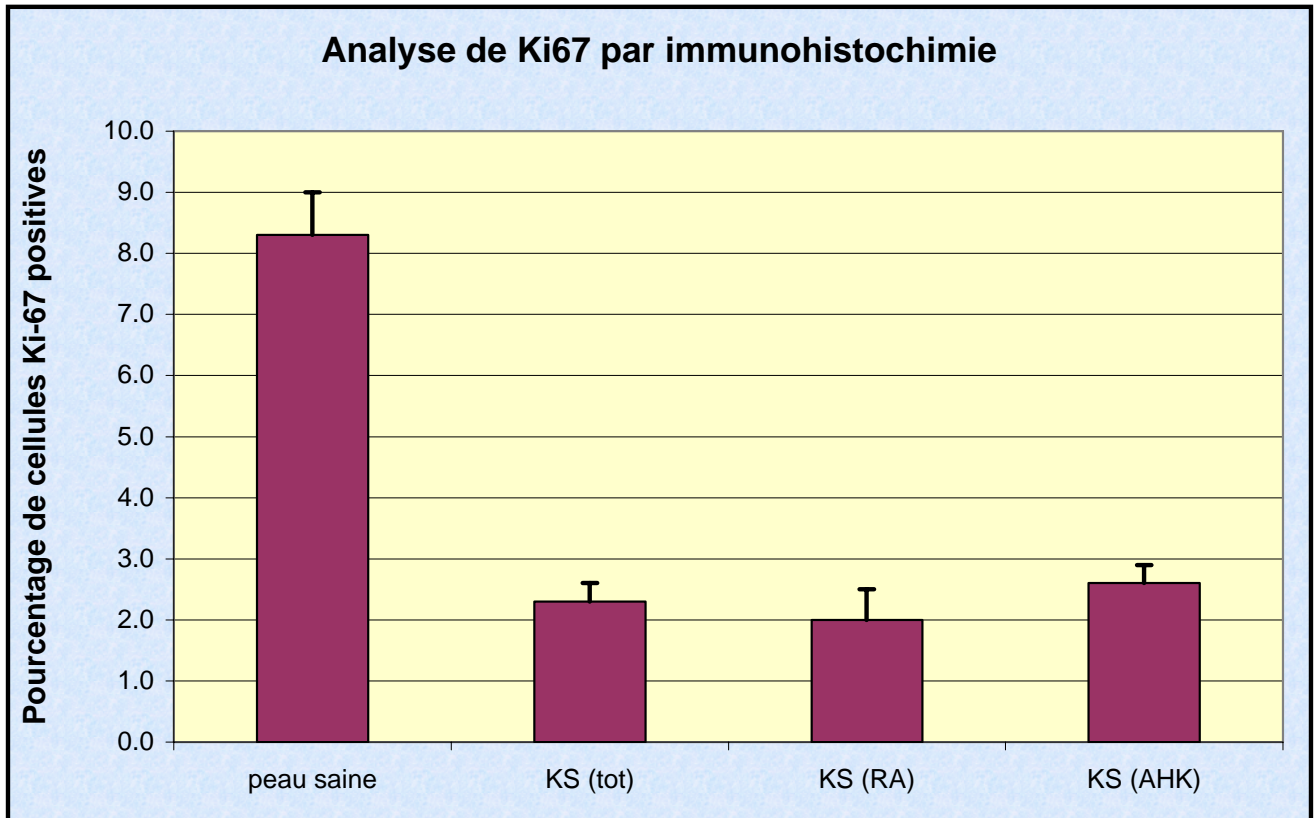


Figure 6. Résultats de l'analyse de Ki67 par immunohistochimie. Analyse statistique ANOVA (Bonferroni) : *** correspond à une différence significative avec $p < 0.001$.

Immunohistochimie de ErbB1

La prolifération a été analysée par immunohistochimie de ErbB1 sur des lésions KS de 6 patients et des prélèvements de peau saine de 2 patients (abdominoplasties).

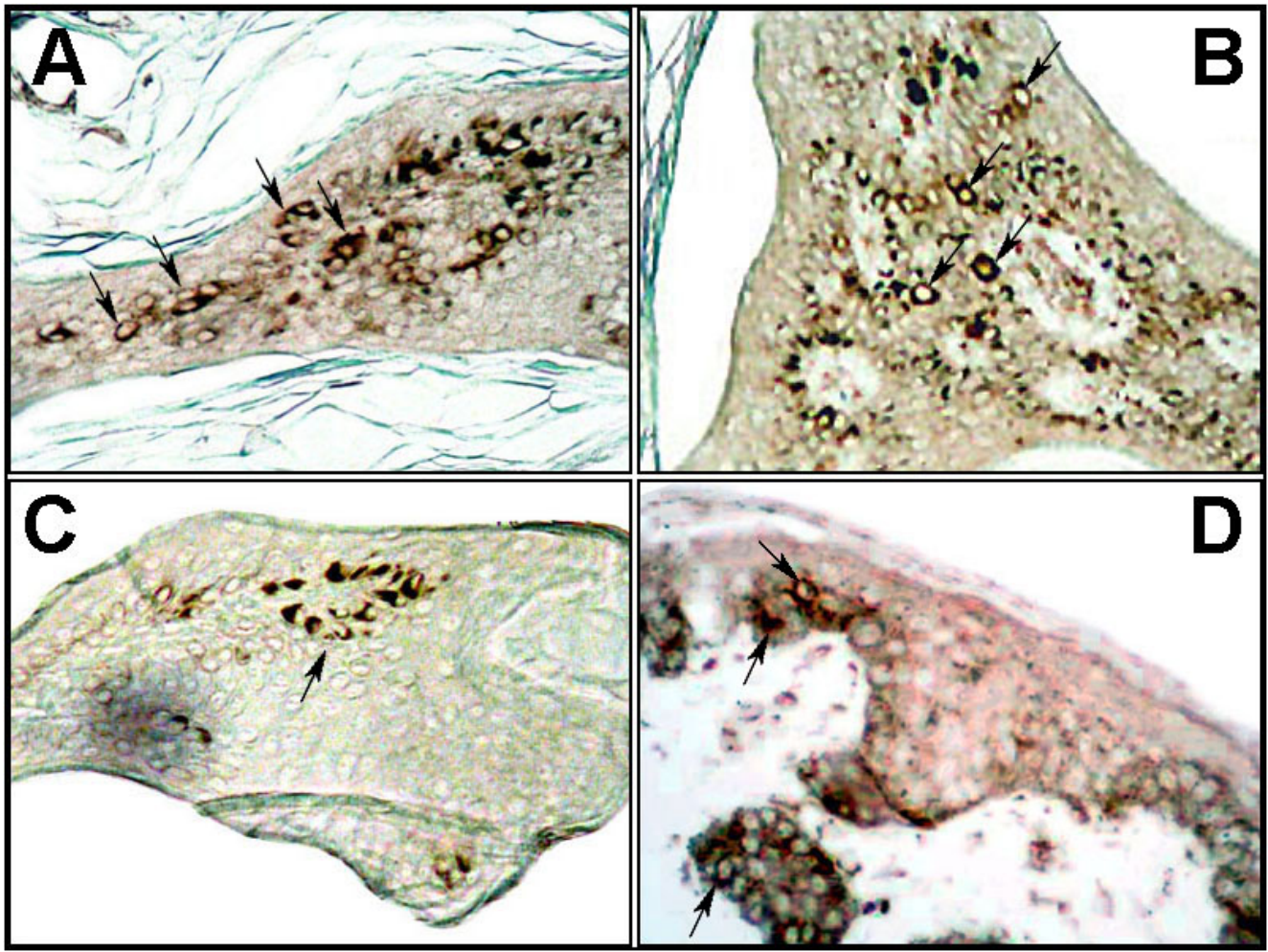


Figure 7. Immunohistochimie de ErbB1 dans des KS (A-C) et la peau saine (D). ErbB1 est un récepteur membranaire dont le marquage immunohistochimique se présente sous forme d'un halo brunâtre (flèches), à ne pas confondre avec des dépôts de mélanine. Bien que le récepteur ErbB1 soit présent dans les structure en clocher d'église (B), sa distribution diffère de celle de Bcl-2 et Ki67.

Table 5. Résultats de l'analyse de ErbB1 par immunohistochimie.

condition	n	%age moyen	cellules positives
peau saine	2	53	+
KS	6	75.5	+

Western blots de ErbB1

Le récepteur ErbB1 a été analysé par Western blot dans des lésions KS provenant de 2 patients, ainsi que dans 2 prélèvements de peau saine (abdominoplasties) (Figure 8).

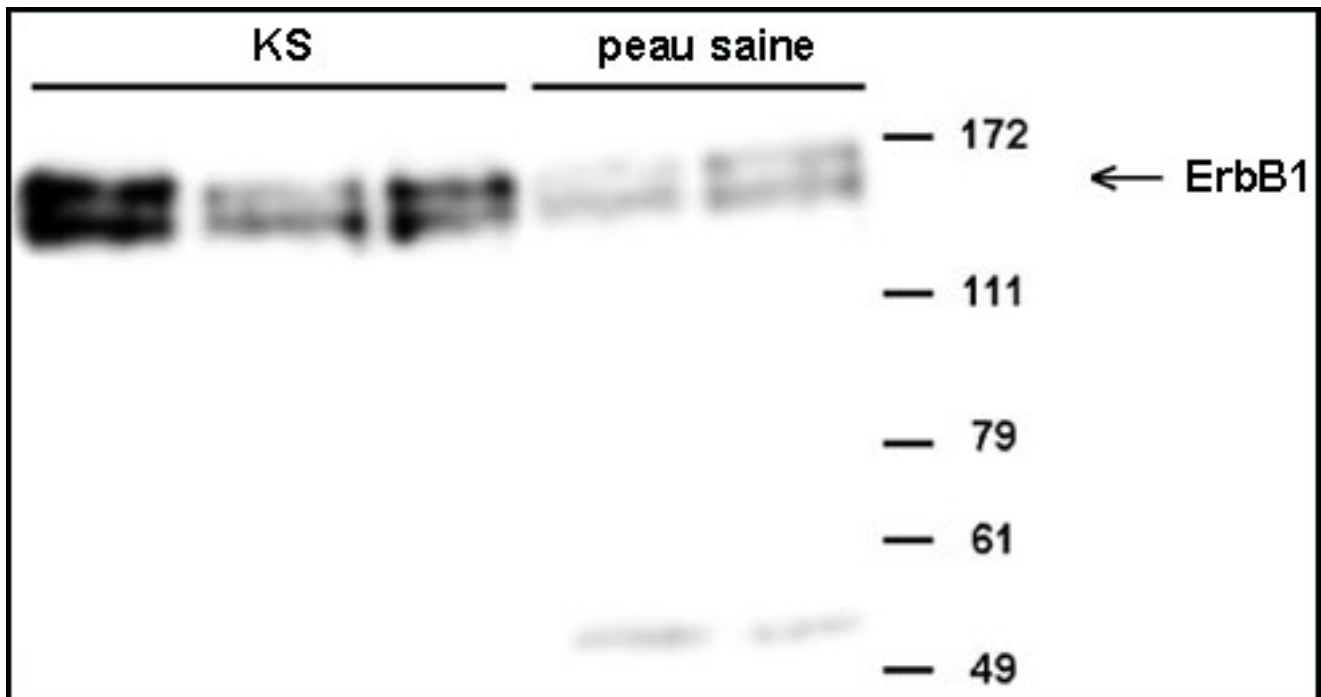


Figure 8. Analyse de ErbB1 par Western blot. La protéine ErbB1 apparaît sous forme de doublet à 170 kD. Son expression dans les prélèvements est clairement plus importante dans les KS que dans la peau saine.

Discussion

L'immunomarquage de Bcl-2 est plus important dans les structures en clocher d'église des KS acanthohyperkératosiques au niveau basal et suprabasal, ce qui suggère, en excluant l'augmentation du marquage dû à un effet de bord, que l'élimination kératinocytaire est diminuée, ou que la prolifération est plus importante en cet endroit. Remarquons que nous n'avons pas évalué quantitativement l'immunomarquage par rapport à la peau normale; nous considérons l'immunohistochimie comme un outil avant tout qualitatif. Toutefois l'absence de corrélation avec le marquage positif de Ki67 en cet endroit plaide en faveur d'une accumulation de kératinocytes.

La localisation de l'immunomarquage d'ErbB1 correspond à celle de Bcl-2, soit dans les structures en clocher d'église de KS acantho-hyperkératosiques. Toutefois, contrairement à Bcl-2, l'immunomarquage se retrouve principalement dans les couches basales de l'épiderme. Ici aussi, on ne trouve pas de superposition avec le marquage de Ki67, réparti de manière plus homogène dans l'épiderme. On a ainsi la présence de cellules marquées par un inhibiteur de l'apoptose (Bcl-2) et par le récepteur à un facteur de croissance épidermique (ErbB1).

L'analyse du récepteur ErbB1 par Western blot indique une présence augmentées de la protéine dans l'ensemble de la lésion KS par rapport à l'ensemble d'une zone saine. Ce résultat suggère en premier lieu que l'ensemble de la KS pourrait être de nature proliférative. Toutefois, la diminution de l'indice de prolifération du Ki67 dans les KS laisse supposer que celles-ci pourraient être composées de kératinocytes:

(i) hyperprolifératifs, ce qu'indiquent la croissance rapide des cultures de kératinocytes de KS par rapport à la peau périlésionnelle 5 jours après la mise en culture, ainsi que l'augmentation de ErbB1 par Western blot. On peut aussi considérer que la méthode de comptage du Ki67 sous-estime la proportion de kératinocytes prolifératifs, car pour un même champ il y a davantage de kératinocytes totaux dans les KS que dans la peau saine, vu l'épaisseur de la lésion. L'augmentation du récepteur ErbB1 signe alors une hyperprolifération des KS par rapport à la peau saine.

(ii) hypoprolifératifs, si l'on considère que le comptage des cellules Ki67-positives est représentatif de l'état de prolifération des KS et que l'augmentation d'ErbB1 par Western blot est un processus réactionnel d'augmentation de la synthèse des nombreuses copies d'ErbB1 mutées mais conservant l'épitope pour l'anticorps utilisé en immunohistochimie. L'apparition de Bcl-2 au bord des KS et les structures en clocher d'église serait ainsi due à un effet de bord artéfactuel.

(iii) en partie hypo- et en partie hyperprolifératifs. Les kératinocytes seraient majoritairement hypoprolifératifs, comme le suggère le comptage de Ki67, tandis que l'augmentation d'ErbB1 et la croissance rapide des cultures - qui suggèrent une hyperprolifération - seraient une réaction à la diminution de la prolifération. Dans les structures en clocher d'église des KS acanthohyperkératosiques - c'est-à-dire les parties caractéristiques des KS les plus développées - on trouverait des kératinocytes normo- ou hypoprolifératifs de type senescent et incapables d'entrer en apoptose.

Il faut garder à l'esprit que l'analyse immunohistochimique est avant tout qualitative, et d'un point de vue numérique considérée comme semi-quantitative. On ne saurait donc conclure de manière univoque à partir de telles analyses.

V. Etude de l'expression de gènes ciblés par RT-PCR

Introduction

Lors de la recherche des gènes modulés dans une condition pathologique donnée, par rapport aux conditions normales, la génomique est d'un grand soutien. On peut ainsi évaluer le rapport du nombre de copies d'ARN messagers codant pour les gènes en question, entre le tissu malade et le tissu sain. Si l'on ne sait pas quels gènes choisir, ou que l'on imagine que des gènes auxquels on n'aurait pas pensé peuvent être modulés, on peut utiliser la technique des microarrays qui permet de couvrir pratiquement l'ensemble du génome. Cette technique a cependant l'inconvénient d'être très coûteuse, relativement peu sensible, et peu précise quant à la quantification. Si l'on a des idées assez précises des gènes potentiellement modulés, on utilisera de préférence la technique de RT-PCR (voir plus bas sous «Méthodes») qui permet à moindre prix et avec une meilleure sensibilité et une meilleure quantification d'évaluer la modulation d'un nombre restreint de gènes bien ciblés. C'est cette technique de génomique que nous avons utilisée, raison pour laquelle nous avons dû cibler les gènes d'intérêt pouvant être modulés dans les KS par rapport à la peau saine. Il n'en reste pas moins qu'il s'agit d'une méthode de screening permettant de comparer les niveaux d'expression d'un certain nombre de gènes dans différentes conditions, avant de se focaliser plus en détail sur les gènes d'intérêt.

A priori, les KS pourraient provenir (i) de défauts dans les molécules d'adhésion interkératinocytaires, (ii) d'une prolifération cellulaire excessive, (iii) de problèmes de différenciation cellulaire, (iv) de dysfonctionnements de l'apoptose, (v) d'une inflammation chronique ou (vi) d'un mécanisme semblable à la formation de nombreux kystes dermiques suite à la présence de xénobiotiques tels que des composés aromatiques polychlorés de la famille des dioxines. Ceci nous a amené à cibler 23 gènes impliqués dans les voies biochimiques sus-mentionnées (Figure 9) :

- molécules d'adhésion : desmocolline, desmoglénines-1 et 3, desmoplakine, envoplakine, périplakine, plakoglobine, plakophiline-1, plectine (Leigh, 2003; Hohl, 2004) (Figure 15)
- prolifération : ErbB1, Gli-1, v-Jun, PCNA (Mikhail and Mehregan, 1982; Angel and Karin, 1991; Dahmane et al., 1997; Mimura and Fujii-Kuriyama, 2003; Karhadkar et al., 2004; Regl et al., 2004)
- différenciation : E-cadhérine, β -caténine, TGF- β (Massagué, 1998; Bienz, 2005; Dihlmann and von Knebel Doeberitz, 2005)
- apoptose : caspase-3 (Strasser et al., 2000)
- inflammation : IKK- α , TNF- α (Senftleben and Karin, 2002)
- voie des xénobiotiques : AhR, ARNT, CYP1A1, CYP1A2 (Mimura and Fujii-Kuriyama, 2003)

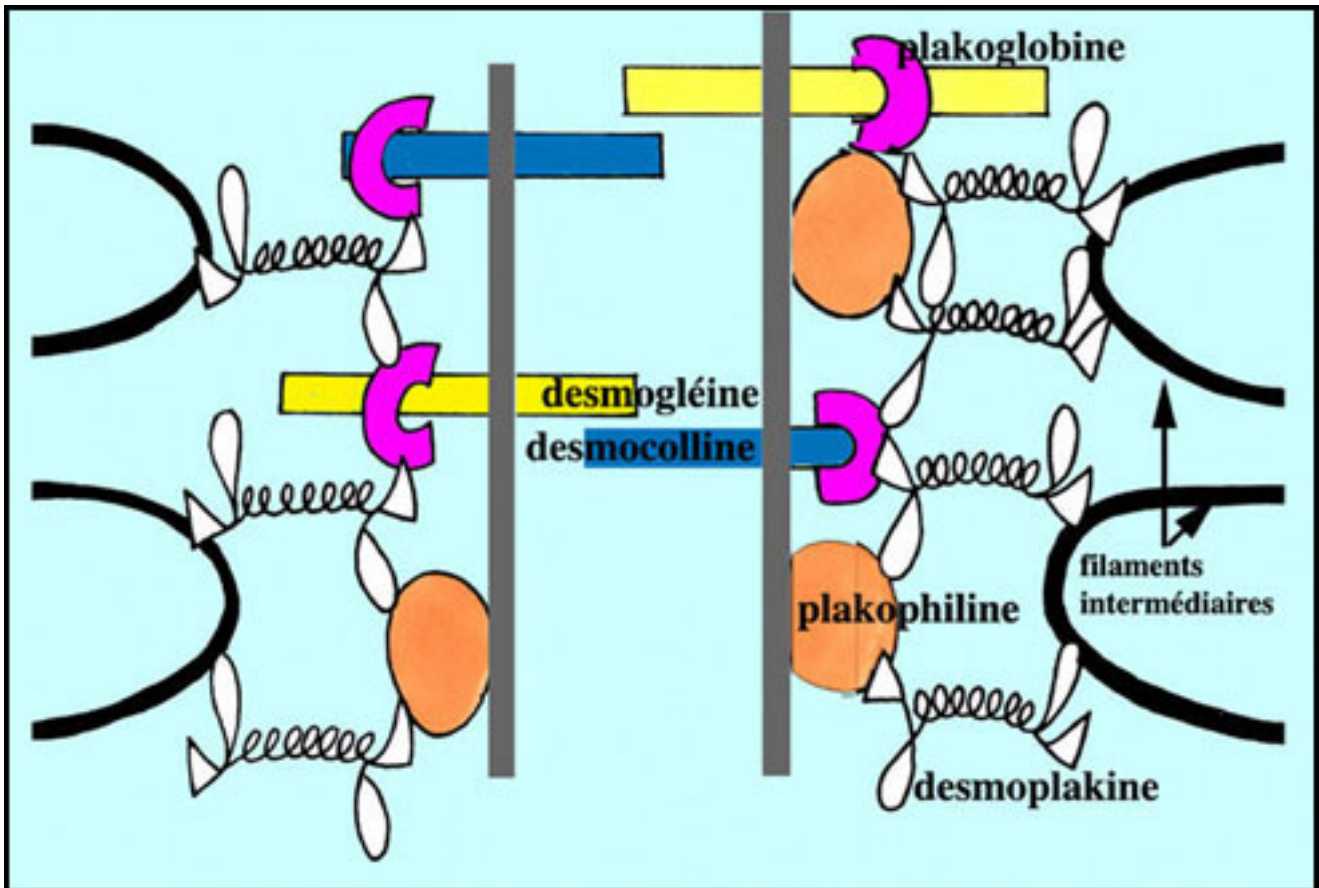


Figure 9. Agencement des molécules d'adhésion interkératinocytaires (Hohl, 2004).

Méthodes

«Real Time-Polymerase Chain Reaction» (RT-PCR)

Principe

A partir de l'ARN total des prélèvements, des copies d'ADN complémentaire (cDNA) sont obtenues puis amplifiées au moyen de cycles de réplication à partir d'amorces et d'enzymes réalisant la réplication d'ADN (DNA polymérase). En suivant le nombre de copies obtenues en fonction du nombre de cycles de réplication, on obtient le rapport du nombre de copies entre les 2 conditions après un nombre de cycles donné. La valeur obtenue est ainsi toujours relative entre différentes conditions. Cette technique s'appelle «Real Time-Polymerase Chain Reaction», abrégée RT-PCR (Ferlin et al., 1997; Vandesompele et al., 2002).

Mode opératoire

L'ARN total a été extrait de 7 lésions KS et 7 zones de peau périlésionnelle à l'aide du BioRobot EZ1 de Qiagen. L'analyse qualitative et quantitative de l'ARN extrait a été réalisée sur un bioanalyzeur 2100 d'Agilent. Le cDNA correspondant à 20 ng d'ARN total a été amplifié par RT-PCR sur un PRISM 7700 d'ABI, en utilisant des primers pour 23 gènes jugés d'intérêt potentiel (voir la liste dans la table 6). Le niveau d'expression des cDNAs a été normalisé d'après la moyenne de 2 gènes d'expression remarquablement constante, codant pour la *TATA box binding protein* (TBP) et l'*Eukaryotic translation Elongation Factor 1 alpha 1* (EEF1A1).

Immunohistochimie de la desmogléine-3

2 KS et 2 zones périlésionnelles d'une patiente de 63 ans ont été prélevées par shave et analysées par immunohistochimie pour la desmogléine-3. Le marquage immunohistochimique a été réalisé comme précédemment, en utilisant comme premier anticorps un anticorps monoclonal de souris anti-desmogléine-3 (Abcam).

Résultats

Analyse de l'expression génétique

L'expression de 23 gènes codant pour des molécules d'adhésion ou des protéines caractéristiques des voies de prolifération, différenciation, apoptose, inflammation ou dioxines, a été analysée par RT-PCR sur 7 lésions KS et 7 échantillons de peau saine périlésionnelle.

Table 6. Rapports d'expression [KS vs peau saine] des gènes étudiés. Les moyennes des niveaux d'expression de 7 KS et 7 zones saines ont été calculées, puis le rapport [moyenne(KS)/moyenne(peau saine)] a été indiqué dans le tableau. Les inductions supérieures à 2 sont indiquées en rouge, les répressions supérieures à 2 en bleu. SE : erreur standard.

Voie biochimique	G ₂ ne	Moyenne	SE
<i>Adhésion</i>	Desmocolline-1	1.31	0.35
	Desmogléine-1	0.97	0.17
	Desmogléine-3	1.93	0.81
	Desmoplakine-1	0.78	0.09
	Envoplakine	1.16	0.46
	P�riplakine	0.61	0.11
	Plakoglobine	0.97	0.23
	Plakophiline-1	0.97	0.20
	Plectine	0.87	0.37
<i>Prolifération</i>	EGFR (ErbB1)	0.82	0.19
	GLI-1	0.06	0.03
	v-jun	0.85	0.32
	PCNA	0.96	0.24
<i>Différenciation</i>	E-cadhérine	0.91	0.16
	β -caténine	0.65	0.08
	TGF-β	0.52	0.12
<i>Apoptose</i>	Caspase-3	0.85	0.12
<i>Inflammation</i>	IKK- α	1.16	0.27
	TNF- α	0.73	0.49
<i>X�nobiotes</i>	AhR	0.43	0.07
	ARNT	0.60	0.09
	CYP1A1	0.35	0.16
	CYP1A2	0.62	0.46

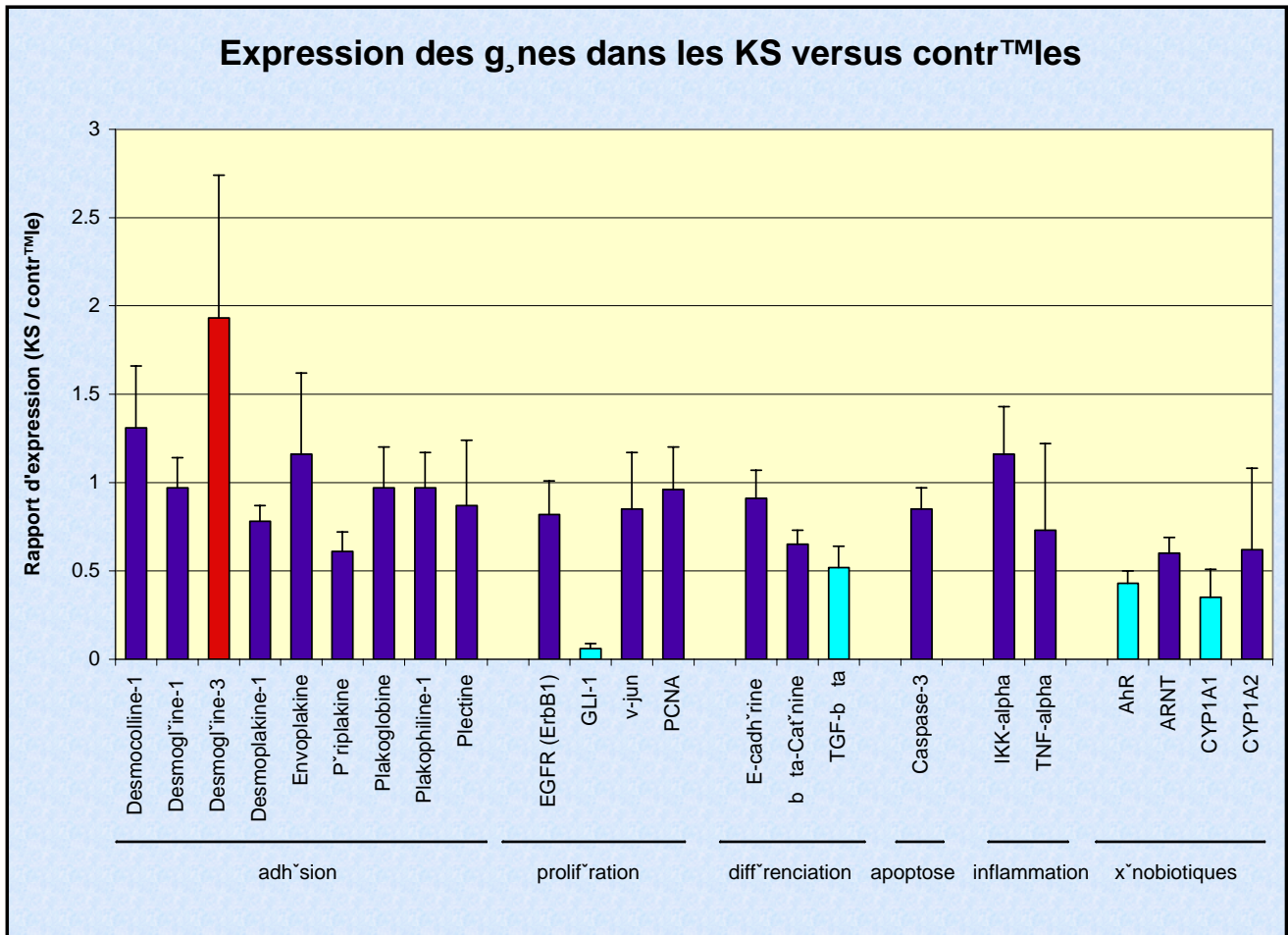


Figure 10. Rapports d'expression [KS vs peau saine] des gènes étudiés

Immunohistochimie de la desmoglène-3

Vu l'expression augmentée du gène codant pour la desmoglène-3, la présence de celle-ci a été analysée par immunohistochimie dans 2 lésions KS et de zones saines périlésionnelles d'une patiente de 63 ans.

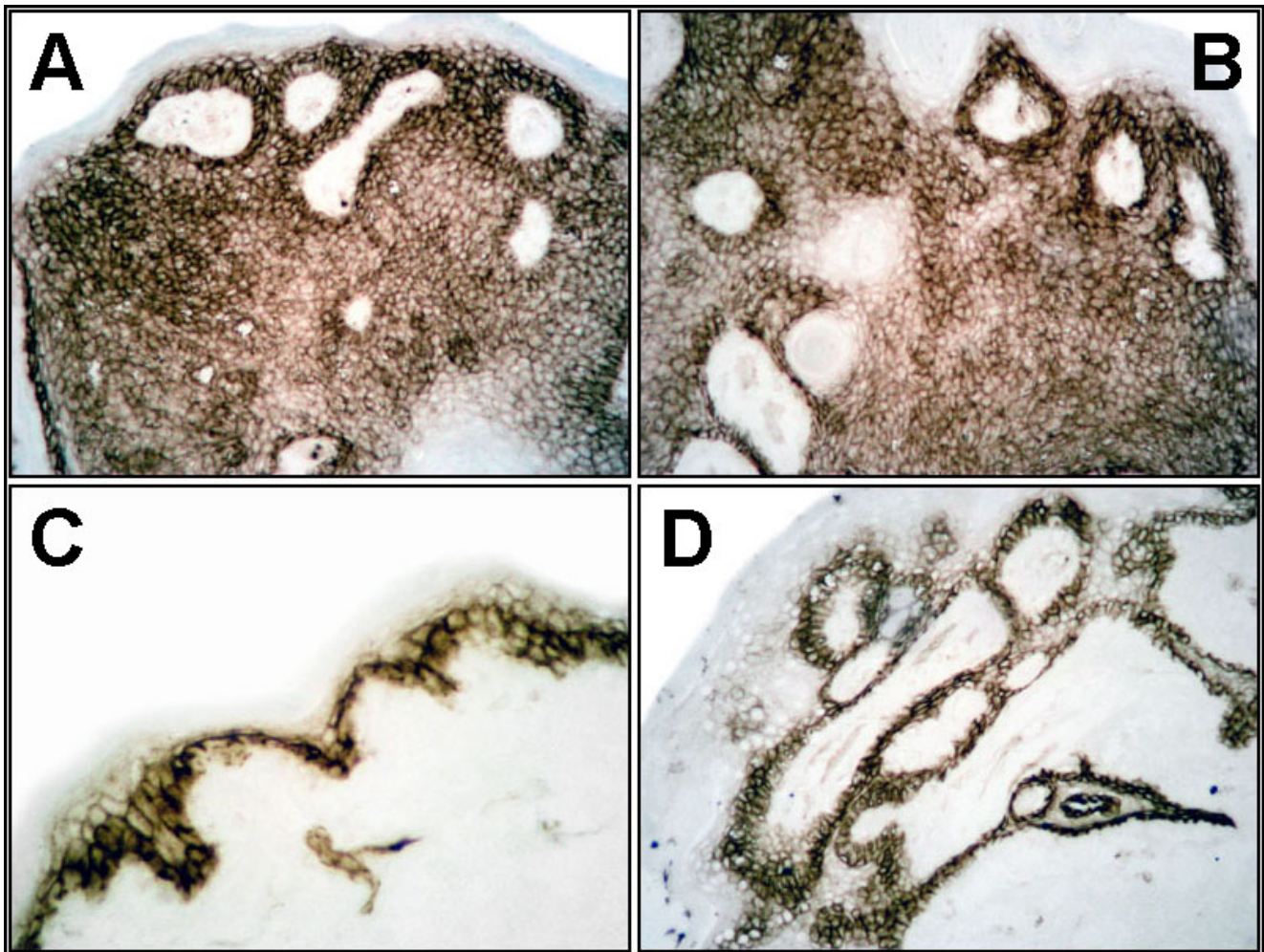


Figure 11. Immunohistochimie de la desmogléine-3 dans des KS (A-B) et des biopsies de peau saine périlésionnelle (C-D). Le marquage de la desmogléine 3 est polarisé mais la proportion de cellules marquées par la desmogléine-3 est visuellement plus importante dans les KS que dans la peau normale.

Discussion

Habituellement, en génomique, on considère les modulations d'un facteur au moins égal à 2. Dans notre étude, un gène est augmenté d'environ 2 fois : il s'agit de la desmogléine-3, une molécule d'adhésion interkératinocytaire. Quatre gènes sont réprimés d'au moins 2 fois : Gli-1, le TGF- β , AhR et CYP1A1. En particulier, Gli-1 est diminué d'un facteur 16; ce gène est en aval de la voie «sonic hedgehog», laquelle joue un rôle important durant la morphogenèse et semble activées dans certaines tumeurs telles que les astrogliomes et les carcinomes basocellulaires (Dahmane et al., 1997; Bale and Yu, 2001; Berman et al., 2002; McCarthy and Argraves, 2003).

D'une manière générale, la tendance de la modulation des 6 voies biochimiques étudiées est la suivante :

- molécules d'adhésion interkératinocytaires : globalement peu modulée, à part la desmogléine-3 augmentée
- prolifération : plutôt réprimée, en particulier la voie «sonic hedgehog»

- différenciation : réprimée, en particulier TGF- β
- apoptose : non modulée
- inflammation : non modulée
- dioxines (TCDD) : réprimée, en particulier AhR et CYP1A1

VI. Conclusion

Cette étude avait pour objectif d'étudier les mécanismes biochimiques de la formation et du développement des KS. Ces lésions bénignes apparaissent avec l'âge, et on estime qu'elles concernent l'ensemble de la population âgée de plus de 70 ans. Si les KS ne posent *a priori* pas de problèmes de santé majeurs, certaines personnes en sont couvertes et en souffrent psychologiquement. Comme c'est parfois le cas pour des maladies de la peau, on observe une discordance entre l'état objectif de la pathologie et le vécu par le patient. Il y a donc un intérêt évident à se pencher sur cette pathologie et trouver un moyen de soulager les personnes qui en souffrent. Le moins que l'on puisse dire, c'est que jusqu'ici ce sujet n'a pas passionné les chercheurs. La littérature est pauvre en articles décrivant des études pertinentes sur le sujet.

C'est dans ce contexte que nous avons tenté d'ouvrir quelques voies potentiellement intéressante pour comprendre cette maladie. Les KS se présentent sous forme de petites lésions hautement cornéifiées. On peut penser que leur origine réside dans une inflammation chronique ou une dysrégulation (i) de la prolifération (néoplasie bénigne), (ii) de la différenciation (production aberrante d'un tissu non physiologique), (iii) de l'adhésion interkératinocytaire (difficulté de décollement des cellules mortes) ou (iv) de l'apoptose (retard à l'apoptose induisant un excès de cellules cornées). Ainsi s'opposent deux théories antagonistes, le modèle hyperprolifératif et le modèle rétentionnel. Ces différentes pistes ont été analysées par génomique, en choisissant des gènes caractéristiques. Cette approche a l'avantage d'évaluer rapidement le niveau d'expression génétique des voies biochimiques d'intérêt, et permet de choisir les pistes à suivre plus en détail.

L'analyse génomique a montré dans son ensemble une tendance à la baisse de l'expression des voies biochimiques étudiées, à l'exception de la desmogléine-3, une molécule d'adhésion interkératinocytaire. Ceci a été confirmé par l'analyse immunohistochimique. La protéine Ki67, un marqueur de la prolifération cellulaire, est clairement diminuée dans les KS par rapport à la peau saine. Bien que la tranche d'âge des patients dont les KS ont été analysées soit nettement plus élevée que celle des contrôles sains (les patients subissant des abdominoplasties sont en effet plus jeunes que ceux consultant pour des KS), ce résultat clair confirme le modèle rétentionnel défendu par la surexpression de la desmogléine-3. D'autre part, les kératinocytes des KS semblent moins sensibles que ceux des zones saines à l'apoptose photoinduite, analysée par l'activité de la caspase-3, ce qui renforce l'idée de l'exposition solaire chronique comme l'une des causes possibles des KS. Au niveau de l'épiderme, la protéine Bcl-2, dont la fonction est antiapoptotique, a une distribution moins basale que dans la peau saine, ce qui suggère que les kératinocytes des KS en fin de différenciation, donc proches de la désquamation, sont plus résistants à l'apoptose que les kératinocytes des zones saines. Autrement dit, ces deux résultats sur l'étude de l'apoptose renforcent le modèle rétentionnel. Concernant la protéine ErbB1, le récepteur du facteur trophique EGF, son augmentation dans les KS révélée par Western blot pourrait indiquer une réponse adaptative à un manque de facteurs trophiques épithéliaux, comme cela a été montré *in vitro* dans des lignées cancéreuses du sein (Santen et al., 2005).

En résumé, les données de cette étude convergent vers un modèle plutôt rétentionnel et potentiellement prolifératif des KS, ce qui confirme leur caractère bénin et non néoplasique (Table, 7, Figure 12). On pourrait poursuivre cette étude en analysant des caractères

oncogéniques dans les KS, et en creusant un peu plus la piste des molécules d'adhésion interkératinocytaires. Les KS apparaissant avec l'âge, une autre approche consisterait à étudier divers paramètres liés au vieillissement tels que le stress oxydant, la capacité réparatrice des dommages à l'ADN ou les carences nutritionnelles. En dernier lieu il s'agira de compiler l'ensemble de ces données biochimiques afin de concevoir un mode de prévention des KS, ainsi qu'un traitement efficace peu invasif.

Table 7. Récapitulation des résultats. L'ensemble des résultats a été résumé en fonction des systèmes biologiques analysés, de la technique utilisée, des paramètres utilisés comme marqueurs desdits systèmes biologiques et de la tendance pour les KS par rapport à la peau saine.

Système biologique	Technique	Paramètre biologique	Tendance
Apoptose (non induite)	Immunohistochimie	Bcl-2	=
Apoptose (UVB-induite)	Activité enzymatique	Caspases-3/7	↘
Prolifération cellulaire	Culture de kératinocytes	Densité cellulaire	↗
	Immunohistochimie	Ki67	↘
	Western blots	ErbB1	↗
	RT-PCR	Gli-1	↘
Différenciation cellulaire	RT-PCR	TGF-β	↘
Xénobiotiques	RT-PCR	AhR	↘
	RT-PCR	CYP1A1	↘
Adhésion cellulaire	RT-PCR	Desmoglïne-3	↗
	Immunohistochimie	Desmoglïne-3	↗

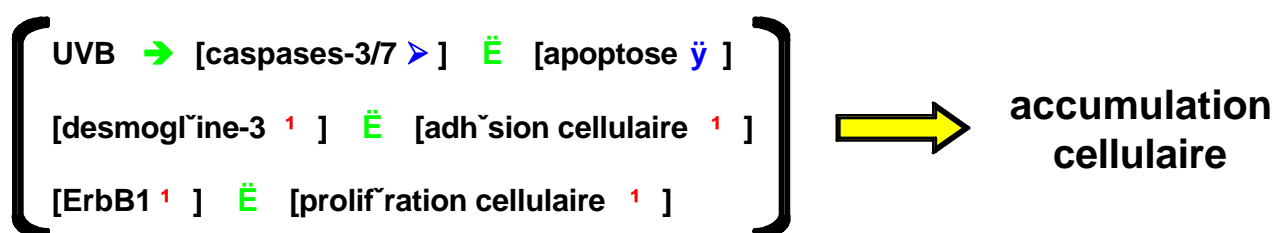


Figure 12. Schéma récapitulatif des résultats. Trois résultats convergent dans le même sens : (1) les UVB diminuent l'activité caspase-3/7, ce qui diminue l'aptitude à l'apoptose; (2) la desmoglïne-3 est augmentée, ce qui accroît l'adhésion cellulaire; (3) le récepteur ErbB1 est augmenté, ce qui favorise la prolifération cellulaire. Ainsi, si l'on a davantage de prolifération cellulaire, moins d'apoptose et moins de desquamation, on aboutit à une accumulation cellulaire, ce que l'on observe dans les KS.

VII. Références bibliographiques

- Angel P and Karin M (1991) The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta* **1072**:129-157.
- Bale AE and Yu KP (2001) The hedgehog pathway and basal cell carcinomas. *Hum Mol Genet* **10**:757-762.
- Bauer C, Bauder-Wuest U, Mier W, Haberkorn U and Eisenhut M (2005) 131I-labeled peptides as caspase substrates for apoptosis imaging. *J Nucl Med* **46**:1066-1074.
- Berman DM, Karhadkar SS, Hallahan AR, Pritchard JI, Eberhart CG, Watkins DN, Chen JK, Cooper MK, Taipale J, Olson JM and Beachy PA (2002) Medulloblastoma growth inhibition by hedgehog pathway blockade. *Science* **297**:1559-1561.
- Bienz M (2005) beta-Catenin: a pivot between cell adhesion and Wnt signalling. *Curr Biol* **15**:R64-R67.
- Bowen AR, Hanks AN, Murphy KJ, Florell SR and Grossman D (2004) Proliferation, Apoptosis, and Survivin Expression in Keratinocytic Neoplasms and Hyperplasias. *Am J Dermatopathol* **26**:177-181.
- Braun RP, Rabinovitz H, Oliviero M, Kopf AW and Saurat JH (2002) Dermoscopic diagnosis of seborrheic keratosis. *Clin Dermatol* **20**:270-272.
- Brown DC and Gatter KC (2002) Ki67 protein: the immaculate deception? *Histopathology* **40**:2-11.
- Cotran RS, Kumar V, Collins T and Robbins SL (1999) *Pathologic Basis of Disease*. W.B. Saunders Company, Philadelphia.
- Dahmane N, Lee J, Robins P, Heller P and Ruiz i Altaba A (1997) Activation of the transcription factor Gli1 and the Sonic hedgehog signalling pathway in skin tumours. *Nature* **389**:876-881.
- Dihlmann S and von Knebel Doeberitz M (2005) Wnt/beta-catenin-pathway as a molecular target for future anti-cancer therapeutics. *Int J Cancer* **113**:515-524.
- Earp HS, 3rd, Calvo BF and Sartor CI (2003) The EGF receptor family--multiple roles in proliferation, differentiation, and neoplasia with an emphasis on HER4. *Trans Am Clin Climatol Assoc* **114**:315-333; discussion 333-334.
- Ferlin T, Guironnet G, Barnoux MC, Dumoulin R, Stepien G and Mousson B (1997) Detection of mitochondrial DNA deletions by a screening procedure using the polymerase chain reaction. *Mol Cell Biochem* **174**:221-225.
- Gamou S, Hirai M, Rikimaru K, Enomoto S and Shimizu N (1988) Biosynthesis of the epidermal growth factor receptor in human squamous cell carcinoma lines: secretion of the truncated receptor is not common to epidermal growth factor receptor-hyperproducing cells. *Cell Struct Funct* **13**:25-38.
- Hohl D (2004) Physiopathologie de la kératinisation, in *Dermatologie et Infections Sexuellement Transmissibles; ch 5.1* (Saurat JH ed) pp 231-240, Masson (4th edition), Paris.

- Hussein MR, Al-Badaiwy ZH and Guirguis MN (2004) Analysis of p53 and bcl-2 protein expression in the non-tumorigenic, pretumorigenic, and tumorigenic keratinocytic hyperproliferative lesions. *J Cutan Pathol* **31**:643-651.
- Ito M, Tazawa T, Ito K, Shimizu N, Katsuumi K and Sato Y (1986) Immunological characteristics and histological distribution of human hair fibrous proteins studied with anti-hair keratin monoclonal antibodies HKN-2, HKN-4, and HKN-6. *J Histochem Cytochem* **34**:269-275.
- Karhadkar SS, Steven Bova G, Abdallah N, Dhara S, Gardner D, Maitra A, Isaacs JT, Berman DM and Beachy PA (2004) Hedgehog signalling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis. *Nature* **431**:707-712.
- Kee CE (1967) Liquid nitrogen cryotherapy. *Arch Dermatol* **96**:198-203.
- Kirkham N (1997) Tumours and Cysts of the Epidermis, in *Lever's histopathology of the skin* (Elenitsas R, Jaworsky C and Jonhson B eds) pp 685-746, Lipincott-Raven, Philadelphia.
- Kwon OS, Hwang EJ, Bae JH, Park HE, Lee JC, Youn JI and Chung JH (2003) Seborrheic keratosis in the Korean males: causative role of sunlight. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* **19**:73-80.
- Leigh I (2003) Biology of keratinocytes, in *Dermatology* (Bologna JL, Jorizzo JL and Rapini RP eds) p Chapter 56, Mosby, London.
- Lotan R (2003) Receptor-independent induction of apoptosis by synthetic retinoids. *J Biol Regul Homeost Agents* **17**:13-28.
- Lui VW and Grandis JR (2002) EGFR-mediated cell cycle regulation. *Anticancer Res* **22**:1-11.
- Massagué J (1998) TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* **67**:753-791.
- Matsuta M, Kimura S, Kosegawa G and Kon S (1996) Immunohistochemical detection of Ki-67 in epithelial skin tumors in formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections using a new monoclonal antibody (MIB-1). *J Dermatol* **23**:147-152.
- McCarthy RA and Argraves WS (2003) Megalin and the neurodevelopmental biology of sonic hedgehog and retinol. *J Cell Sci* **116**:955-960.
- Mehregan AH (1975) Lentigo senilis and its evolutions. *J Invest Dermatol* **65**:429-433.
- Mikhail GR and Mehregan AH (1982) Basal cell carcinoma in seborrheic keratosis. *J Am Acad Dermatol* **6**:500-506.
- Mimura J and Fujii-Kuriyama Y (2003) Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD. *Biochim Biophys Acta* **1619**:263-268.
- Nakamura S and Nishioka K (2003) Enhanced expression of p16 in seborrhoeic keratosis; a lesion of accumulated senescent epidermal cells in G1 arrest. *Br J Dermatol* **149**:560-565.
- Normand J and Karasek MA (1995) A method for the isolation and serial propagation of keratinocytes, endothelial cells, and fibroblasts from a single punch biopsy of human skin. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **31**:447-455.
- Okamoto H, Mizuno K, Itoh T, Tanaka K and Horio T (1999) Evaluation of apoptotic cells induced by ultraviolet light B radiation in epidermal sheets stained by the TUNEL technique. *J Invest Dermatol* **113**:802-807.

- Pesce C and Scalora S (2000) Apoptosis in the areas of squamous differentiation of irritated seborrheic keratosis. *J Cutan Pathol* **27**:121-123.
- Regl G, Kasper M, Schnidar H, Eichberger T, Neill GW, Philpott MP, Esterbauer H, Hauser-Kronberger C, Frischauf AM and Aberger F (2004) Activation of the BCL2 Promoter in Response to Hedgehog/GLI Signal Transduction Is Predominantly Mediated by GLI2. *Cancer Research* **64**:7724-7731.
- Santen RJ, Song RX, Zhang Z, Kumar R, Jeng MH, Masamura A, Lawrence J, Jr., Berstein L and Yue W (2005) Long-term estradiol deprivation in breast cancer cells up-regulates growth factor signaling and enhances estrogen sensitivity. *Endocr Relat Cancer* **12 Suppl 1**:S61-S73.
- Scholzen T and Gerdes J (2000) The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* **182**:311-322.
- Senftleben U and Karin M (2002) The IKK/NF-kappaB pathway. *Crit Care Med* **30**:S18-S26.
- Soini Y, Kamel D, Paakko P, Lehto VP, Oikarinen A and Vahakangas KV (1994) Aberrant accumulation of p53 associates with Ki67 and mitotic count in benign skin lesions. *Br J Dermatol* **131**:514-520.
- Stolz W, Braun-Falco O, Bilek P and Landthaler M (2002) *Color Atlas of Dermatoscopy*. Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin.
- Strasser A, Huang DC and Vaux DL (1997) The role of the bcl-2/ced-9 gene family in cancer and general implications of defects in cell death control for tumourigenesis and resistance to chemotherapy. *Biochim Biophys Acta* **1333**:F151-F178.
- Strasser A, O'Connor L and Dixit VM (2000) Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem* **69**:217-245.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A and Speleman F (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* **3**:research0034.0031-0034.0011.
- Verheijen R, Kuijpers HJ, Schlingemann RO, Boehmer AL, van Driel R, Brakenhoff GJ and Ramaekers FC (1989) Ki-67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-related antigen. I. Intracellular localization during interphase. *J Cell Sci* **92 (Pt 1)**:123-130.
- Wang S, Rabinowitz H and Oliviero M (2004) Dermoscopic patterns of solar lentigines and seborrheic keratosis, in *unknown* (nknown ed) pp 59-70, braun in press.
- Yeatman JM, Kilkenny M and Marks R (1997) The prevalence of seborrhoeic keratoses in an Australian population: does exposure to sunlight play a part in their frequency? *Br J Dermatol* **137**:411-414.
- Zhuang L, Wang B and Sauder DN (2000) Molecular mechanism of ultraviolet-induced keratinocyte apoptosis. *J Interferon Cytokine Res* **20**:445-454.