



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>

UNIVERSITE HENRI POINCARÉ – NANCY I

2000

PH/N/2000/9

ECOLE DOCTORALE "BIOLOGIE, SANTE ET ENVIRONNEMENT"

DB 24079
THESE

Présentée et soutenue publiquement
le 14 novembre 2000

pour obtenir le titre de



**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE
HENRI POINCARÉ - NANCY I**

Mention Biologie Structurale Moléculaire et Cellulaire

par

Patricia Borde-Chiché

Titulaire du Diplôme d'Etudes Approfondies

« Structures et Fonctionnement des Systèmes Biologiques Intégrés »

(Faculté des Sciences Paris XI – Orsay)

Sujet :

**Régulation *in vitro* du gène de la Glutathion S-Transférase P1-1
dans les cellules leucémiques humaines :**

Rôle de la méthylation du promoteur et du facteur de transcription AP-1

MEMBRES DU JURY

Juges :

Mario DICATO, Professeur (Luxembourg)

Marc DIEDERICH, Docteur (Luxembourg)

Gérard SIEST, Professeur (Nancy, France)

Maria WELLMAN, Docteur (Nancy, France)

Rapporteurs:

Jacques PIETTE, Professeur (Liège, Belgique)

Chantal TRENTESAUX, Professeur (Reims, France)

BU PHARM. ODONTOL.



D 104 054894 6

FACULTE DE PHARMACIE

UNIVERSITE Henri Poincaré - NANCY I

Membres du personnel enseignant

Doyen : Mme Chantal FINANCE

Vice Doyen : Mme Anne ROVEL

DOYENS HONORAIRES

M. BERNANOSE André
M. VIGNERON Claude

PROFESSEURS HONORAIRES

Mlle BESSON Suzanne
Mlle GIRARD Thérèse
M. LECTARD Pierre

M. MIRJOLET Marcel
M. PIERFITTE Maurice

PROFESSEUR EMERITE

M. LOPPINET Vincent

PROFESSEURS

M.	ASTIER Alain	Pharmacie Clinique
M.	ATKINSON Jeffrey	Pharmacologie
M.	BAGREL Alain	Biochimie fondamentale et clinique, Biotechnologies
Mlle	BATT Anne Marie	Toxicologie
M.	BLOCK Jean Claude	Santé et Environnement
M.	BONALY Roger	Biochimie microbienne
Mme	CAPDEVILLE-ATKINSON	Pharmacologie Cardiovasculaire
Mme	FINANCE Chantal	Microbiologie moléculaire
Mme	FRIANT-MICHEL Pascale	Biomathématiques, Biophysique et Audioprothèse
Mlle	GALTEAU Marie Madeleine	Biochimie
M.	HENRY Max	Biologie végétale
M.	HOFFMAN Maurice	Pharmacie clinique
M.	JACQUE Michel	Pharmacodynamie
M.	LABRUDE Pierre	Physiologie
M.	LALLOZ Lucien	Chimie organique
M.	LEROY Pierre	Physico-chimie appliquée à la formulation pharmaceutique
M.	MAINCENT Philippe	Pharmacie galénique
M.	MARSURA Alain	Chimie thérapeutique
M.	MARTIN Jean Armand	Chimie minérale et Minéralogie
M.	MORTIER François	Pharmacognosie
M.	NICOLAS Alain	Chimie analytique et Bromatologie
M.	REGNOUF DE VAINS Jean Bernard	Chimie Thérapeutique
Mme	SCHWARTZBROD Janine	Bactériologie - Parasitologie
M.	SCHWARTZBROD Louis	Virologie - Immunologie
M.	SIEST Gérard	Chimie Biologique
M.	SIMON Jean Michel	Droit et Economie de la Santé
M.	VIGNERON Claude	Hématologie



MAITRES DE CONFERENCES

Mme ALBERT Monique	Bactériologie - Virologie
M. BONNEAUX François	Chimie Thérapeutique
M. CATAU Gérald	Pharmacodynamie
M. CHEVIN Jean Claude	Chimie minérale
M. CHILLON Jean Marc	Pharmacologie
M. COLLIN Jean François	Pôle européen
Mme COLLOMB Jocelyne	Parasitologie
M. COULON Joël	Biochimie
M. DECOLIN Dominique	Chimie analytique
M. DUCOURNEAU Joël	Biophysique, Audioprothèse, Acoustique
Mme FAIVRE-FIORINA Béatrice	GBM - Hématologie
M. FERRARI Luc	Biochimie
Mle FONS Françoise	Biologie Végétale et Mycologie
Mme FUZELLIER Marie Claude	Pharmacognosie
M. GANTZER Christophe	Virologie
M. GIBAUD Stéphane	Pharmacie Clinique
Mme HASENFRATZ-SAUDER Marie Paule	Biologie Végétale
Mle HINZELIN Françoise	Biologie végétale et Pharmacognosie
M. HUMBERT Thierry	Interactions moléculaires
Mle IMBS Marie Andrée	Bactériologie - Virologie et Parasitologie
M. JORAND Frédéric	Santé et Environnement
Mme KEDZIEREWICZ Francine	Pharmacie Galénique
Mme LARTAUD-IDJOUADIENE Isabelle	Pharmacologie
Mme LEININGER-MULLER Brigitte	Biochimie
Mme LETOT Michèle	Bactériologie - Virologie et Parasitologie
Mme LIVERTOUX Marie Hélène	Toxicologie
Mme MARCHAL-HEUSSLER Emmanuelle	Chimie Analytique
Mme MARCHAND-ARVIER Monique	Immunologie - Hématologie
M. MENU Patrick	Physiologie
M. MONAL Jean Louis	Chimie Thérapeutique
M. NOTTER Dominique	Biologie cellulaire
Mme PAULUS Francine	Informatique
Mme PERDICAKIS Christine	Chimie organique
Mme PICHON Virginie	Biophysique
Mme POCHON Marie France	Chimie analytique
Mme ROVEL Anne	Immunologie - Hématologie
M. VISVIKIS Athanase	Toxicologie
Mme WELLMAN-ROUSSEAU Maria Monika	Biochimie
Mme ZINUTTI Colette	Pharmacie galénique

ASSISTANTS

Mme BEAUD Mariette	Biologie Cellulaire
Mme BERTHE Marie-Catherine	Biochimie
M. DANGIEN Bernard	Botanique
Mme MOREAU Blandine	Pharmacognosie
Mme PAVIS Annie	Parasitologie
M. TROCKLE Gabriel	Pharmacodynamie

PROFESSEUR ASSOCIE

Mme GRISON Geneviève	Pratiques officinales
----------------------	-----------------------

PROFESSEUR AGREGE

M. COCHAUD Christophe	Anglais
-----------------------	---------

A mon père,

A Thomas et à notre fils Anthony,

A ma mère, à mon frère,

A tous ceux que j'aime

Remerciements

Je remercie très sincèrement Mr le Professeur Gérard Siest de m'avoir accueillie dans l'Ecole Doctorale Biologie et Santé, et je lui suis particulièrement reconnaissante de m'avoir permis de réaliser ces travaux au Luxembourg. Je suis très honorée qu'il ait accepté de présider ce jury.

Je remercie Mr le Professeur Mario Dicato de m'avoir accueillie au Laboratoire RCMS, de m'avoir permis de développer ce projet au sein de son laboratoire et de m'avoir accordé du temps pour juger ce travail.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à Mme le Docteur Maria Wellman pour avoir dirigé avec bienveillance mais rigueur le déroulement de mes recherches. Qu'elle soit remerciée ici pour la grande liberté qu'elle m'a laissée, pour ses conseils précieux et pour sa sympathie.

Je remercie particulièrement Mr le Docteur Marc Diederich qui m'a guidée tout au long de mes recherches avec patience et encouragement, qui m'a fait partager son expérience et ses compétences. Je lui suis reconnaissante de l'intérêt qu'il a toujours porté à mon travail, de sa patience pendant la rédaction de ce manuscrit, ainsi que de son aide à toutes les étapes de ce travail.

Je remercie vivement Mme le Professeur Chantal Trentesaux et Mr le Professeur Jacques Piette de m'avoir accordé du temps pour juger ce travail en tant que rapporteurs. Leurs avis et leurs remarques ont permis d'améliorer le contenu de cette thèse. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma reconnaissance.

Enfin, je remercie sincèrement tous mes collègues du Laboratoire RCMS (Dr Marc Pauly, Mme Martine Schmitz, Mme Isabelle Kayser, Mme Brigitte Schroell et Mme Manon Berchem), pour leur soutien technique et pour leur amitié sans faille. Je tiens également à remercier le Dr Franck Morceau pour sa disponibilité et ses conseils, tout le temps de notre collaboration.

Je remercie Mr le Professeur Alvaro Puga (University of Cincinnati, USA) pour ses nombreux conseils techniques et scientifiques tout le temps de ma thèse.

Je remercie également le **Ministère de la Culture, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche** qui m'a financée par une bourse de formation-recherche (BFR 97/025) pendant les trois années de préparation de cette thèse.

Ces travaux ont été réalisés au Laboratoire de Recherche sur le Cancer et les Maladies du Sang (RCMS) grâce au soutien financier **de la Fondation "Recherche Cancer et Maladies du Sang"**

Ces recherches n'auraient pas pu aboutir sans l'aide **de l'Action Lions « Vaincre le Cancer »**

de l'Association « Les Amis de la Fondation José Carreras »

**et de l'Association (en formation)
Recherches Scientifiques Luxembourg (RSL)**

TABLE DES ILLUSTRATIONS

I. Tableaux

Tableau I : Quelques exemples de facteurs de transcription appartenant à de la superfamille des récepteurs nucléaires et dont des mutations géniques ont été identifiées ainsi que les pathologies correspondante.	17
Tableau II: Les constituants de la super famille des protéines de la famille AP-1.	20
Tableau III : Classification des différentes GST cytosoliques humaine).	34
Tableau IV : Modification de l'expression des enzymes du métabolisme du glutathion dans des cellules résistantes aux agents chimiothérapeutique.....	42
Tableau V : Facteurs de transcription dont la liaison est affectée par la méthylation de leurs séquences consensus.	48
Tableau VI : Lignées cellulaires utilisées pour l'étude de l'expression de la GSTP1-1 humaine.....	74
Tableau VII: Séquence des oligonucléotides utilisés pour les expériences de retard sur gel.....	95
Tableau VIII: Etat de méthylation de l'ADN de différents clones provenant de lignées cellulaires qui expriment la GSTP1-1.....	113
Tableau IX : Etat de méthylation de l'ADN de différents clones provenant de lignées cellulaires qui n'expriment pas la GSTP1-1.....	115

II. Figures

Figure 1 : Mécanismes d'expression d'un gène eucaryote.	14
Figure 2 : Mécanisme d'initiation de la transcription.	15
Figure 3 : Le métabolisme du glutathion :.....	30
Figure 4 : Représentation schématique de l'effet de la méthylation sur l'expression d'un gène eucaryote.	47
Figure 5 : A : Structure du promoteur basal du gène de la GSTP1-1 avec les éléments de réponse AP-1, Sp1 et NF- κ B. B : Séquence nucléotidique de la région promotrice du gène de la GSTP1-1.....	59
Figure 6 : Régulation de l'expression des facteurs protéiques c-Jun et c-Fos.....	61
Figure 7 : La cascade de transduction.	71
Figure 8 : Représentation schématique des différentes étapes de construction des plasmides d'expression transfectés dans les différentes lignées cellulaires.	85
Figure 9 : Principe de la technique de modification au bisulfite de sodium.....	89
Figure 10 : Origine des lignées cellulaires utilisées.	100
Figure 11 : Expression de l'ARNm de la GSTP1-1 dans les lignées cellulaires étudiées.	102
Figure 12 : Expression de la protéine GSTP1-1 dans différents types de cellules leucémiques.	104
Figure 13 : Représentation des différentes constructions plasmidiques transfectées dans les lignées cellulaires.....	106
Figure 14 : Activité transcriptionnelle du promoteur GSTP1 dans les lignées leucémiques humaines.....	107
Figure 15 : Exemple d'une autoradiographie d'un séquençage typique de deux clones, après modification au bisulfite de la région amplifiée du promoteur GSTP1 (brin complémentaire).	111
Figure 16 : Expression de la luciférase dans les différentes lignées leucémiques après transfection du plasmide pGST1128 méthylé in vitro par la SssI.	118
Figure 17: Séquences des sondes utilisées.	122
Figure 18: Activité liante des facteurs de transcription contenus dans les extraits nucléaires des différentes lignées cellulaires avec la sonde -97.....	124
Figure 19 : Compétition des oligonucléotides froids et des protéines nucléaires de K562 pour la liaison à la sonde -97.....	126

Figure 20 : Mise en évidence d'un complexe de type AP-1 se liant avec la sonde -73 dans les différentes lignées leucémiques.....	129
Figure 21: Spécificité de la liaison entre les protéines nucléaires des cellules K562 et la sonde -73.	131
Figure 22 : Liaison de protéines nucléaires des différentes lignées cellulaires à la sonde TRE.....	134
Figure 23 : Spécificité de la liaison entre les protéines nucléaires des cellules U937 et la sonde TRE.	135
Figure 24 : Identification des protéines contenues dans les cellules exprimant la GSTP1-1.....	138
Figure 25 Effet de différentes concentrations de TPA sur l'expression d'un gène reporter fusionné au promoteur de la GSTP1-1 et transfecté dans les cellules K562.	142
Figure 26: Effet du TPA sur l'expression de l'ARNm de la GSTP1-1 dans les cellules K562.	144
Figure 27 : Effet du TPA sur l'expression de la protéine de la GSTP1-1 dans les cellules K562 et Raji	145
Figure 28: Activité transcriptionnelle des différents fragments du promoteur GSTP1 en réponse au TPA.	147
Figure 29: Effet du traitement par le TPA sur la fixation des protéines nucléaires des cellules K562 (sonde -73).	151
Figure 30: Effet du traitement par le TPA sur la fixation des protéines nucléaires des cellules K562 (sonde TRE).	152
Figure 31: Effet du traitement par le TPA sur la fixation des protéines nucléaires des cellules Raji (sonde -73).	153
Figure 32 : Supershifts avec les anticorps dirigés contre la famille Jun ou Fos.	156
Figure 33: Supershifts avec les anticorps contre les protéines NF-E2.....	157
Figure 34: Effet du traitement par la doxorubicine sur la fixation des protéines nucléaires des cellules K562 (sonde -73).	162
Figure 35: Effet du traitement par l'H ₂ O ₂ sur la fixation des protéines nucléaires des cellules K562 (sonde -73).	163
Figure 36 : Effet du traitement par le TBHQ sur la fixation des protéines nucléaires des cellules K562 (sonde -73).	164
Figure 37: Effet de différents traitements sur la fixation des protéines nucléaires des cellules Raji (sonde -73).	165

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	8
1. INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	12
2. OBJECTIFS.....	24
3. MISE AU POINT BIBLIOGRAPHIQUE	28
3.1 LE SYSTÈME DU GLUTATHION	29
3.2 L'IMPLICATION DE LA GLUTATHION S-TRANSFÉRIASE P1 DANS LA CANCÉROGÉNÈSE.....	36
3.2.1 Variations d'expression dans les tumeurs.....	36
3.2.2 Rôle dans la résistance aux anticancéreux	40
3.3. LA MÉTHYLATION DE L'ADN CHEZ LES MAMMIFÈRES	45
3.3.1 Rôle de la méthylation dans la cancérogénèse	50
3.3.2 Méthylation des gènes du système du GSH.....	53
3.4. LA RÉGULATION DE LA TRANSCRIPTION DU GÈNE DE LA GSTP1	55
3.4.1. Transcription et cancérogénèse.....	55
3.4.2. Etude du promoteur du gène de la GSTP1.....	56
3.4.3. Les facteurs de transcription impliqués dans la régulation de l'expression de la GSTP1-1.....	57
3.4.4. La famille des facteurs de transcription NF-E2.....	66
3.4.5. Les voies de transduction du signal potentiellement impliquées dans l'activation du gène de la GSTP1.....	68
4. MATERIEL ET METHODES	72
4.1 . LIGNÉES CELLULAIRES	73
Matériel.....	73
Méthode.....	75
4.2 . NORTHERN-BLOT	76
Matériel.....	76
Méthode.....	77
4.3. WESTERN-BLOT	79
Matériel.....	79
Méthode.....	80
4.4. TRANSFECTION DES CELLULES	82
Matériel.....	82
Méthode.....	83
4.5. ETUDE DE LA MÉTHYLATION	87
Matériel.....	87
Méthode.....	88
4.6 SÉQUENÇAGE	90
Matériel.....	90
Méthode.....	90
4.7. ETUDE DES FACTEURS DE TRANSCRIPTION.....	91
Matériel.....	91
Méthode.....	94

5. RESULTATS	98
5.1. EXPRESSION DE LA GSTP1-1 DANS DIFFÉRENTES LIGNÉES LEUCÉMIQUES	99
5.1.1. Expression de l'ARNm de la GSTP1-1	101
5.1.2. Expression de la protéine GSTP1-1	103
5.1.3. Mesure de l'activité transcriptionnelle du promoteur GSTP1	105
5.2. ETUDE DE LA MÉTHYLATION DE GSTP1	110
5.2.1. Méthylation des sites CpG dans le promoteur GSTP1	110
5.2.2. Méthylation et activité transcriptionnelle du promoteur GSTP1	117
5.3. RÔLE DES FACTEURS DE TRANSCRIPTION DE LA FAMILLE AP-1 DANS L'EXPRESSION LEUCÉMIE- SPÉCIFIQUE DE LA GSTP1-1	121
5.3.1. Liaison des protéines nucléaires au promoteur minimal	121
5.3.2. Mise en évidence de la spécificité de l'activité liante par compétition.....	125
5.3.3. Ciblage de la région contenant l'élément de réponse aux esters de phorbol.....	128
5.3.4. Comparaison de l'activité liante à un promoteur témoin provenant du gène de la collagénase	132
5.3.5. Identification des facteurs de transcription impliqués par supershifts.....	136
5.4. INDUCTIBILITÉ DE L'EXPRESSION DE LA GSTP1-1 PAR LES ESTERS DE PHORBOL.....	140
5.4.1. Mise au point des conditions de traitement.....	140
5.4.2. Induction de l'ARNm de la GSTP1-1	141
5.4.3. Induction de la protéine de la GSTP1-1.....	143
5.4.4. Induction des facteurs de transcription par le TPA.....	149
5.4.5. Identification des complexes protéiques après traitement au TPA	154
5.5. TRAITEMENT DES CELLULES PAR LA DOXORUBICINE OU PAR UN STRESS OXYDANT.....	158
6. DISCUSSION.....	167
7. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	184
8. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	190
9. PUBLICATIONS ISSUES DE CE TRAVAIL.....	210

Abréviations

ADNc	ADN complémentaire
ARE.....	Site de réponse aux antioxydants (antioxydant response element)
ARNm	ARN messenger
BSA.....	sérum albumine bovine
BSO.....	Buthionine sulfoximine
CaMK.....	calcium/calmoduline protéine kinase
5mC.....	5 méthyl-cytosine
CRE.....	élément de réponse à l'AMPc (cAMP responsive element)
CBP	Protéine de liaison au CRE (CRE binding protein)
DEPC	diethyl pyrocarbonate
DNTP	déoxynucléotide triphosphate
DTT.....	dithiotréitol
ERK.....	Extracellular-signal regulated kinase
GCS.....	gamma-glutamylcystéine synthétase
GGT	gamma-glutamyltransférase
GSH.....	glutathion
GSSG	glutathion disulfide
<i>GSTP1</i>	glutathion <i>S</i> -transférase P1 (gène ou ARNm)
GSTP1-1.....	glutathion <i>S</i> -transférase P1-1 (protéine)
JNK	Jun-NH ₂ terminal kinase
Kb.....	kilobase
LAL.....	leucémie aiguë lymphoblastique
LAM.....	leucémie aiguë myéloblastique
LLC	leucémie lymphoïde chronique
LMC.....	leucémie myeloïde chronique
MAPK	protéine kinase activée par les mitogènes (mitogen-activated protein kinase)
MDR.....	(multidrug resistance)
Pb	paire de base
PKA.....	protéine kinase A
PKC.....	protéine kinase C
PMSF	Phényl méthyl sulfonyl fluoride
ROS.....	espèces réactives de l'oxygène (reactive oxygen species)
SAPK	Stress-activated protein kinase
SDS	sodium dodecyl sulfate
SOD.....	superoxyde dismutase
SRE	élément de réponse au sérum

.....	(serum response element)
SRF	facteur de réponse au sérum
.....	(serum response factor)
SVF	sérum de veau foetal
TBHQ.....	<i>tert</i> -Butylhydroquinone
TCF	Facteur du complexe ternaire
.....	(ternary complex factor)
TGF β	Facteur de croissance β des lymphocytes T
.....	(T cell growth factor β)
TNF	Tumor Necrosis Factor
TPA.....	Phorbol 12-Myristate 13-Acetate
TRE.....	élément de réponse au TPA
.....	(TPA responsive element)

1. INTRODUCTION GENERALE

La récente publication du séquençage du génome humain a révélé l'existence de milliers de nouveaux gènes dont le rôle devra être défini. Par ailleurs, la recherche de l'étiologie de diverses pathologies met en cause des gènes candidats. Pour identifier la fonction d'un gène ou pour confirmer l'implication d'un gène candidat dans une pathologie, un des moyens à la disposition des chercheurs consiste à activer ou à réprimer l'expression de ce gène au sein d'un organisme vivant ou dans un modèle cellulaire et à observer alors les conséquences biologiques de la modification de son expression. L'expression des gènes est contrôlée *in vivo* à différents niveaux (Figure 1 et encadré ci-dessous). Ce contrôle se fait plus particulièrement au niveau de l'initiation de la transcription (Figure 2) :

- **Méthylation de l'ADN**

- **Transcription** (Figure 2)

(Initiation, élongation, terminaison)

- **Régulations post-transcriptionnelles**

(Polyadénylation, épissage, editing, transport et localisation des ARN messagers)

- **Stabilisation des ARN messagers**

- **Traduction**

(Initiation, élongation, terminaison)

- **Modifications post-traductionnelles**

Glycosylation, phosphorylation,...

Promoteurs et Zones de contrôle

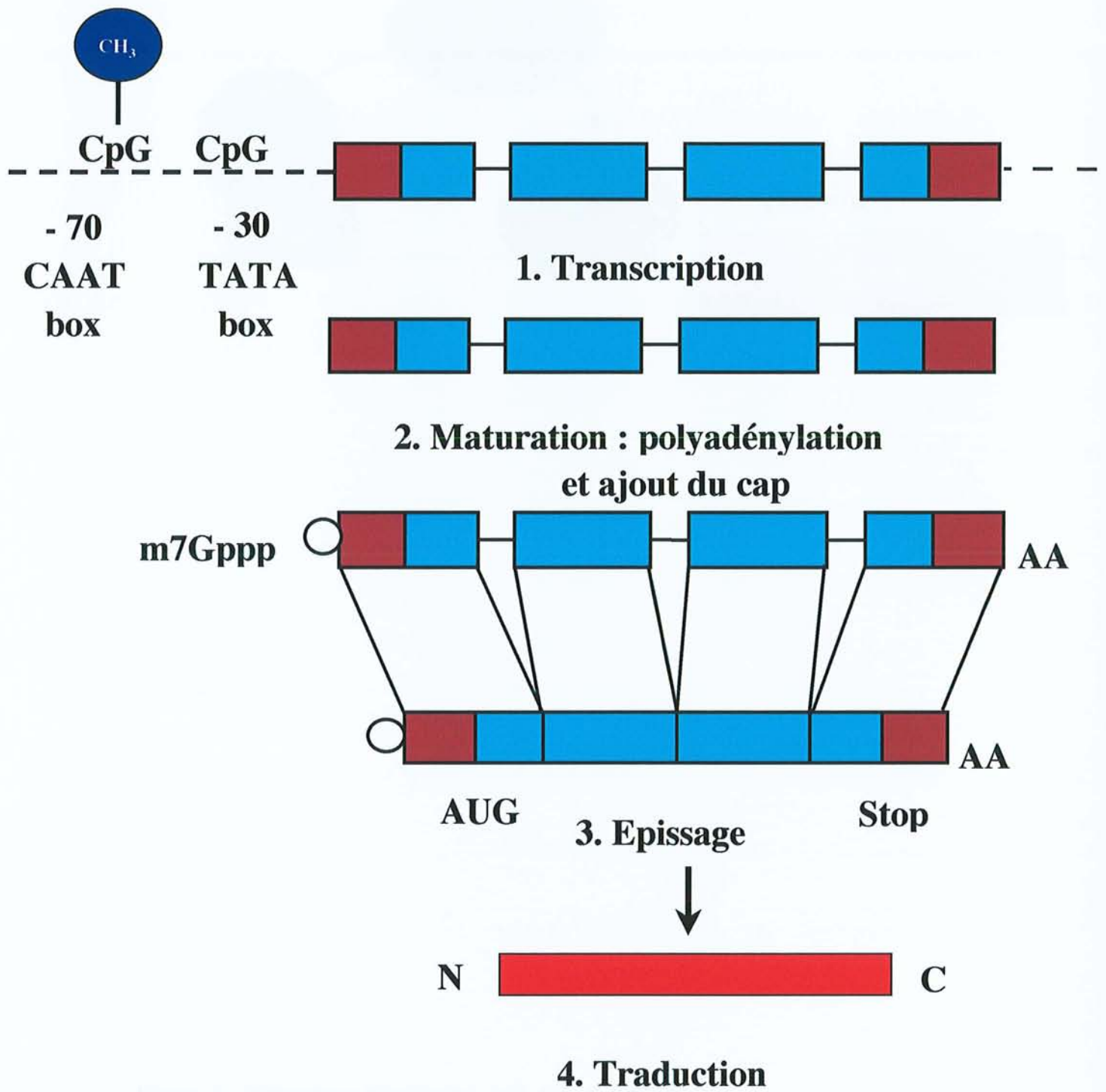


Figure 1 : Mécanismes d'expression d'un gène eucaryote.

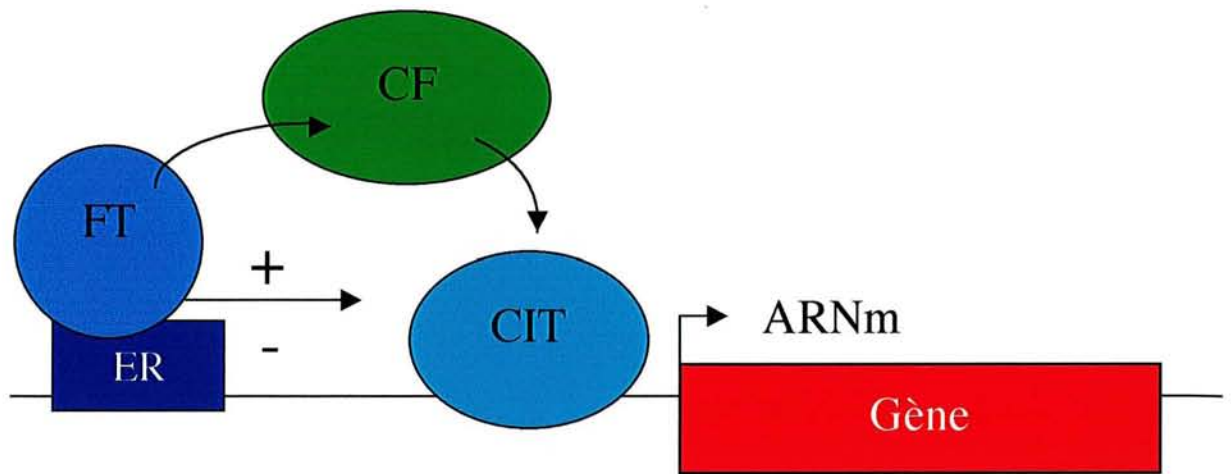


Figure 2 : Mécanisme d'initiation de la transcription.

(ER = élément de réponse, FT = facteur de transcription, CF = co-facteur, CIT = complexe d'initiation de la transcription)

- Des systèmes d'induction de l'expression d'un gène ont été développés. Dans les systèmes qui utilisent des petites molécules comme l'ecdysone (*No et al., 1996*) ou la rapamycine (*Rivera et al., 1996*) comme inducteur de l'expression d'un gène, le promoteur du gène cible doit être modifié pour devenir sensible à ces activateurs exogènes, ce qui empêche d'envisager le développement de ces systèmes chez l'homme.

- Les facteurs de transcription, par contre, constituent un excellent moyen de moduler l'activité des gènes sans avoir à intervenir sur la séquence du gène lui-même. Les mutations des gènes qui codent pour ces facteurs de transcription sont à l'origine de plusieurs pathologies plus ou moins rares, et dont la découverte a permis de comprendre certains mécanismes de la régulation des gènes (Tableau I).
 - On peut ainsi envisager que les facteurs de transcription endogènes deviennent des cibles thérapeutiques en favorisant la liaison à leur site de fixation sur l'ADN, ou en l'empêchant, selon que le facteur de transcription ciblé est activateur ou répresseur de la transcription du gène.
 - Mais on peut également envisager que des facteurs de transcription synthétiques soient introduits dans les cellules pour moduler l'expression d'un gène cible, ces facteurs exogènes devenant en quelque sorte des médicaments.

Les facteurs de transcription sont composés le plus souvent en deux unités, l'une étant l'effecteur, et l'autre servant à la liaison à l'ADN. De nombreux facteurs de transcription des eucaryotes contiennent des domaines de liaison à l'ADN en doigts de zinc, chaque domaine pouvant reconnaître une séquence d'ADN de façon très spécifique. Plusieurs études montrent qu'il est possible de synthétiser des protéines à doigts de zinc qui reconnaissent une séquence cible d'ADN de façon très spécifique, et

Facteur de transcription muté	Maladie(s) identifiée(s)
<ul style="list-style-type: none"> • Anomalies du récepteur aux androgènes 	<ul style="list-style-type: none"> - Syndromes d'insensibilité aux androgènes - Cancer du sein masculin - Maladie de Kennedy - Cancer de la prostate
<ul style="list-style-type: none"> • Anomalies du récepteur aux estrogènes 	<ul style="list-style-type: none"> - Syndrome d'insensibilité aux estrogènes - Cancer du sein
<ul style="list-style-type: none"> • Anomalies du récepteur aux glucocorticoïdes 	<ul style="list-style-type: none"> Syndrome de résistance aux glucocorticoïdes
<ul style="list-style-type: none"> • Anomalies du récepteur aux hormones thyroïdiennes 	<ul style="list-style-type: none"> Syndrome de résistance aux hormones thyroïdiennes
<ul style="list-style-type: none"> • Anomalies du récepteur à la vitamine D 	<ul style="list-style-type: none"> - Rachitisme résistant à la vitamine D - Ostéoporose* - Cancer de la prostate*
<ul style="list-style-type: none"> • Dax-1 	<ul style="list-style-type: none"> Hyperplasie congénitale des surrénales liée au chromosome X
<ul style="list-style-type: none"> • SF-1 	<ul style="list-style-type: none"> Défauts de développement des surrénales, des gonades et de l'hypothalamus
<ul style="list-style-type: none"> • RORα 	<ul style="list-style-type: none"> Ataxies cérébelleuses

Tableau I : Quelques exemples de facteurs de transcription appartenant à de la superfamille des récepteurs nucléaires et dont des mutations géniques ont été identifiées ainsi que les pathologies correspondantes (selon Semenza, 1998).

* le polymorphisme retrouvé pour le récepteur à la vitamine D constitue un facteur de risque de développer une ostéoporose ou un cancer de la prostate, mais n'est pas à l'origine de ces pathologies.

qu'il est possible de coupler cette protéine de liaison à un peptide effecteur qui bloquera ou activera le gène responsable d'une pathologie (*Kim et Pabo, 1998; Kang et Kim, 2000*). Ces études ont permis de montrer que l'utilisation de ces protéines à doigts de zinc semble donner de meilleurs résultats que ceux obtenus avec des oligonucléotides antisens, qui actuellement sont utilisés pour réprimer l'expression d'un gène. Avec un système d'expression inductible des protéines à doigts de zinc, *Kang et Kim (2000)* ont pu modifier la concentration du facteur de transcription exogène, ce qui a entraîné une régulation dose-dépendante de l'expression du gène cible.

Toutefois, l'utilisation des facteurs de transcription pour réguler l'expression d'un gène *in vivo* n'est encore qu'une séduisante perspective. Cela implique, quelle que soit la stratégie envisagée, une parfaite connaissance du rôle des facteurs de transcription, leur effet sur les gènes auxquels ils se lient, leur mode de régulation.

Par exemple le facteur de transcription AP-1, qui est composé de protéines des familles Jun et Fos, est induit par de très nombreux stimuli et par des « stress cellulaires », comme les facteurs de croissance, les cytokines, les neurotransmetteurs ou les radiations UV (*Karin, 1996; Whitmarsh et Davis, 1996*). AP-1 a été initialement décrit comme un facteur de transcription qui médie l'expression des gènes stimulés par l'ester de phorbol 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate ou TPA. Le site de fixation de AP-1, TRE (TPA response element), se rencontre dans le promoteur de très nombreux gènes, des gènes de réponse immédiate tels que c-jun, des gènes qui codent pour des enzymes de détoxification telles que la Glutathion S-transférase P1-1 (*Xia et al., 1991*), la NAD(P)H:Quinone oxydoréductase 1 (*Li et Jaiswal, 1992*), les gènes codant pour la metallothioneine, la collagénase, la stromelysine, des gènes codant pour des cytokines telles que le TGF- β 1, ou l'Interleukine-2 (*Angel et Karin, 1991*). AP-1 intervient dans la régulation de si nombreux gènes, sous l'effet de si nombreux facteurs qu'il semble

difficile dans un premier temps d'imaginer intervenir sur ce facteur de transcription sans entraîner une multitude d'effets indésirables. Mais la régulation du complexe AP-1 lui-même est extrêmement fine et complexe. AP-1 a d'abord été identifié comme un homodimère des protéines Jun ou comme un hétérodimère des protéines Jun et Fos; toutefois de nouvelles protéines capables de se lier aux protéines Jun ou Fos ou à d'autres protéines pour former un complexe AP-1, sont régulièrement identifiées (Tableau II). Or l'affinité de liaison de AP-1 à la séquence ADN cible dépend de la composition du complexe AP-1, de même que la capacité à induire la transcription du gène sur lequel AP-1 est lié dépend également des protéines qui composent AP-1. D'autre part, il existe plusieurs moyens de moduler le complexe AP-1; en effet, les voies de transduction du signal qui agissent sur AP-1 peuvent soit augmenter la quantité d'AP-1 en favorisant la synthèse de ses composants, soit stimuler directement leur activité par phosphorylation. AP-1 est en réalité à un carrefour de plusieurs voies de signalisation, ce qui explique que selon les signaux extracellulaires, l'effet au niveau de la transcription des gènes soit variable.

Certaines études ont montré que AP-1 pourrait être également impliqué dans diverses pathologies; ainsi une surexpression du gène *c-fos* entraîne une transformation maligne du tissu osseux, et est impliqué dans la progression des tumeurs de la peau (*Whitmarsh et Davis, 1996*). Les protéines des familles Jun et Fos sont des régulateurs positifs de la différenciation des cellules hématopoïétiques, notamment de la différenciation myéloïde, et il est possible que des altérations de l'expression ou de la fonction des gènes *fos* et *jun* puissent jouer un rôle dans le développement des syndromes myélodysplasiques et dans leur évolution vers les leucémies (*Liebermann et al., 1998*).

Super famille des composés AP-1	Constituants
Famille des protéines Jun	XBP-1 v-Jun c-jun JunB JunD
Famille des protéines Fos	v-Fos c-Fos FosB Fra-1 Fra-2 LRF-1
Famille des protéines Maf	v-Maf c-Maf MafB MafF MafK MafG NRL
Famille des protéines NF-E2	NF-E2 p45 Nrf1 Nrf2 ECH Cnc
Famille des protéines CRE-BP/ATF	CREB-2 ATF-3 CRE-BP 1,2, 3 CRE-Bpa ATF- α

Tableau II: Les constituants de la super famille des protéines de la famille AP-1 (selon Semenza, 1998).

La chimiothérapie des cancers est basée sur l'utilisation de divers agents cytostatiques et cytotoxiques ayant pour cible les fonctions cellulaires qui contrôlent la croissance et la division cellulaire. Les substances antitumorales employées en clinique humaine sont des agents toxiques d'origine naturelle (alcaloïdes de *vinca*, taxanes...) ou encore des produits de synthèse (agents alkylants, antimétabolites...). Les cellules tumorales exposées à de fortes concentrations de principes actifs développent des phénomènes de résistances qui diminuent l'efficacité thérapeutique des drogues utilisées, et qui constituent pour les cellules des mécanismes de protections vis-à-vis de ces médicaments. Les différents mécanismes de résistance sont les suivants :

- Un changement dans la structure des membranes avec expression de la P-glycoprotéine p170 (codée par le gène MDR-1).
- L'altération de l'expression des cytochromes P-450 conduisant à une modification de la clairance du médicament.
- L'augmentation des processus de détoxification, en particulier celui du système glutathion (GSH) impliquant les enzymes γ -glutamyltransférase (GGT), glutathion *S*-transférase (GST) et γ -glutamylcystéinyl synthétase (GCS).
- L'activation des systèmes de réparations des lésions provoquées par les agents alkylants sur l'ADN.

La Glutathion *S*-transférase P1-1 (GSTP1-1) est surexprimée en cas de développement de résistance aux anticancéreux, mais également dans un certain nombre de tumeurs, en particulier dans les leucémies. Nous avons choisi de limiter notre étude à un type de cancers, les leucémies, étant donné que le rôle du système du GSH dans ces cellules est encore peu étudié, que nous avons la possibilité de collaborer avec un service d'hématologie clinique pour obtenir des échantillons de patients, que de nombreuses lignées cellulaires correspondent aux

différentes catégories de leucémies sont disponibles et qu'il existe de nombreuses résistances aux agents cytotoxiques utilisés pour traiter ces pathologies. Nous allons particulièrement étudier la régulation de la GSTP1-1 dans les cellules K562. Ces cellules correspondent à une lignée établie à partir de cellules prélevées chez une patiente atteinte d'une leucémie myéloïde chronique. Une des thérapeutiques envisagées pour traiter les patients atteints de telles maladies est de stimuler les cellules tumorales pour qu'elles se différencient vers une lignées sanguine, tout en bloquant leur multiplication. Ainsi des résultats ont été obtenus en clinique avec le traitement par l'acide rétinoïque (*Chomienne et al., 1996*). L'intérêt de la lignée K562 est qu'on peut la différencier vers la lignée érythroïde ou vers la lignée mégacaryocytaire selon l'agent utilisé (cytosine arabinoside, doxorubicine ou cadavérine dans le premier cas, esters de phorbol comme le TPA dans le second). Le phorbol-12 myristate-13 acétate (ou TPA) est un puissant modulateur de l'hématopoïèse, en plus d'être un promoteur de tumeur et un activateur de la Protéine kinase C (PKC). Il induit la différenciation des cellules leucémiques promyélocytopiques HL60 ou mégacaryoblastiques MEG01, il différencie les cellules U937 en monocytes-macrophages, mais il a au contraire un effet inhibiteur sur la différenciation de toutes les lignées érythroïdes (*Mignotte et al., 1990; Asiedu et al., 1997*). Cet effet inhibiteur sur la lignée rouge s'accompagne souvent d'une augmentation de l'expression des marqueurs de la lignée plaquettaire. Ainsi les cellules K562 exposées au TPA se différencient vers la lignée mégacaryocytaire comme le prouvent l'acquisition des marqueurs de surface plaquettaire (expression de la glycoprotéine de surface IIb/IIIa ou CD41), la production des mêmes cytokines que les mégacaryocytes, l'arrêt du cycle cellulaire ou les changements morphologiques (*Racke et al., 1997*). En même temps l'exposition des cellules K562 au TPA entraîne une diminution de la transcription du promoteur de la γ -globine et une diminution de la stabilité des ARNm de la globine (*Solomon et al., 1993*). Les voies de transduction qui conduisent à la différenciation des cellules K562 sont encore mal connues. Le TPA est un activateur de la PKC, et la première hypothèse est que la PKC par une cascade de signaux agit sur la différenciation de ces cellules en plaquettes. Nous savons

qu'actuellement onze isoformes différentes de la PKC ont été identifiées (α , β , γ , δ , ξ , η , θ , ι , λ et μ), chacune codée par un gène différent, mais toutes présentant des caractéristiques structurales communes (*Rosson et O'Brien, 1995*). Il semble que la modulation de l'activité des différentes isoformes de la PKC, ainsi que les variations de localisation subcellulaire soient à l'origine de la transduction du signal de la voie des PKC, en particulier dans le cas de la différenciation des cellules hématopoïétiques. Certaines équipes ont étudié les facteurs de transcription mis en jeu par le TPA et susceptibles d'intervenir dans la différenciation des cellules. *Rosson et O'Brien (1998)* ont montré, par exemple, que l'augmentation de la liaison du facteur AP-1 sur sa séquence-cible favorise la différenciation mégacaryocytaire, alors que la diminution de son activité permettra plutôt une différenciation érythroïde des cellules K562.

2. OBJECTIFS

Le but général de notre travail est de mieux comprendre la régulation de l'expression du gène humain codant pour la glutathion *S*-transférase P1-1, impliquée dans le métabolisme du glutathion, dans la chimiorésistance à certains anticancéreux et dans la protection contre le stress oxydant. Nous nous intéresserons en particulier au rôle du facteur de transcription AP-1 et à la place de la méthylation dans cette régulation.

Notre hypothèse générale de travail est la suivante :

Dans le cas des différents modèles cellulaires de leucémies humaines, l'expression basale et inductible de la GSTP1-1 est-elle due à :

- **des différences de méthylation des îlots CpG du promoteur du gène et/ou**
- **des interactions différentielles entre ce promoteur et des facteurs de transcription de la famille AP-1 ?**

Les mécanismes moléculaires à la base de la régulation de l'expression de cette enzyme étant peu étudiés dans le cas des leucémies humaines, ce travail s'intéressera plus particulièrement à la régulation de l'expression de la GSTP1-1 dans cinq lignées leucémiques humaines.

Afin de répondre à notre hypothèse générale, nous nous sommes fixés comme objectif de répondre aux questions suivantes :

- Les cellules leucémiques expriment-elles de façon variable la GSTP1-1 ?

Nous étudierons dans un premier temps les différences d'expression du gène dans les différentes lignées par la mise en évidence de l'expression de l'ARNm du gène *GSTP1* (Northern-blot) et de l'expression de la protéine (Western-blot). Nous étudierons ensuite l'activité du promoteur *GSTP1* dans différentes lignées leucémiques humaines par la transfection transitoire de différentes constructions associant le promoteur ou des

fragments du promoteur à un gène reporter. Cette étape devrait nous permettre de savoir si et dans quelle cellule le promoteur est actif et quelles séquences sont impliquées dans le contrôle de l'activité du promoteur.

- Quel effet la méthylation des régions promotrices a-t-il sur l'expression de la GSTP1-1 dans les cellules leucémiques ?

La méthylation est un mécanisme épigénétique de régulation de l'expression des gènes. Nous étudierons l'importance de ce phénomène dans le contrôle de l'expression de la GSTP1-1. Par la modification de l'ADN au bisulfite suivie d'un séquençage, nous observerons l'état de méthylation du gène *GSTP1* dans les différentes lignées leucémiques. Par transfection de constructions associant des fragments méthylés du promoteur méthylés à un gène reporter luciférase, nous étudierons l'effet éventuel de la méthylation sur l'activité du promoteur du gène *GSTP1*.

- Le promoteur *GSTP1* contrôle-t-il l'expression de l'ARNm qui code pour la GSTP1-1 d'une façon leucémie-spécifique par interaction entre les séquences de réponse de l'ADN et des protéines régulatrices?

Par la technique du retard de migration sur gel, nous étudierons les interactions entre le promoteur et des facteurs de transcription de la famille AP-1, probablement responsables de l'expression basale du gène.

- Les activateurs classiques des facteurs de transcription de la famille AP-1 (esters de phorbol, H₂O₂, doxorubicine) modifient-t-ils l'activité promotrice du gène *GSTP1* ?

Après traitement des lignées leucémiques par le TPA, nous utiliserons la technique du retard de migration sur gel pour mettre en évidence un éventuel effet du TPA sur la liaison des facteurs de transcription, et les techniques du Northern-blot et du Western-blot pour s'assurer de l'effet des esters de phorbol sur l'expression des ARNm et de la protéine GSTP1-1. Après transfection des constructions associant un gène reporter à différents fragments du promoteur et traitement des cellules au TPA, nous étudierons

l'activité du promoteur dans les différentes lignées leucémiques. De la même façon, nous utiliserons différents moyens de produire un stress oxydant pour observer les conséquences de ce stress sur la liaison des facteurs de transcription au promoteur *GSTP1*.

3. MISE AU POINT BIBLIOGRAPHIQUE

Partie I : Glutathion et Chimiorésistance

3.1 Le système du glutathion

Le glutathion (GSH) est un tripeptide ubiquitaire, qui constitue le thiol le plus abondant dans les cellules. Il a pu être montré qu'il joue un rôle central dans la défense cellulaire contre le stress oxydant et les xénobiotiques (*Choi et al., 1997*). Le maintien d'un taux de GSH normal pourrait donc être impliqué dans la résistance à la toxicité de divers oxydants, dont les effets peuvent entraîner une mortalité cellulaire rapide ou une modification des cascades de transduction du signal. Les défenses cellulaires contre les espèces réactives de l'oxygène mettent en jeu des enzymes anti-oxydantes : la superoxyde dismutase et la catalase convertissent respectivement O_2^- en H_2O_2 et H_2O_2 en H_2O , par exemple. Mais le cycle redox du GSH est également très important puisqu'il permet de diminuer les taux des espèces réactives de l'oxygène, ou des produits de la peroxydation lipidique en les transformant en alcools lipidiques non toxiques (*Brown, 1994*). Pendant ce cycle (Figure 3), le GSH est oxydé en glutathion disulfide (GSSG), qui est réduit à son tour en GSH par l'action de la glutathion réductase en présence de NADPH (*Meister, 1989*). Le GSH joue aussi un rôle dans le transport des acides aminés (*Ishikawa, 1993-1*). Mais surtout le GSH est impliqué dans la détoxification des agents cytotoxiques, comme la doxorubicine, le cisplatine, le chlorambucil, le cyclophosphamide, les chloroéthylnitrosourées ou le melphalan, utilisés en chimiothérapie anticancéreuse (*Schröder et al., 1996*). Les anthracyclines, comme la doxorubicine, sont réduites en radicaux semi-quinones par la Cytochrome P450 réductase et les radicaux ainsi formés réagissent avec l'oxygène pour former des anions superoxyde O_2^- . Ce mécanisme serait responsable de la cardiotoxicité des anthracyclines, par peroxydation des lipides (*Wang et al., 1972*). En facilitant le métabolisme des antinéoplasiques, ou en détoxifiant les radicaux libres générés par ces traitements, le GSH pourrait réduire leur cytotoxicité, ainsi que celle des radiations ionisantes. Il a ainsi été montré que l'induction de la résistance au cisplatine et aux

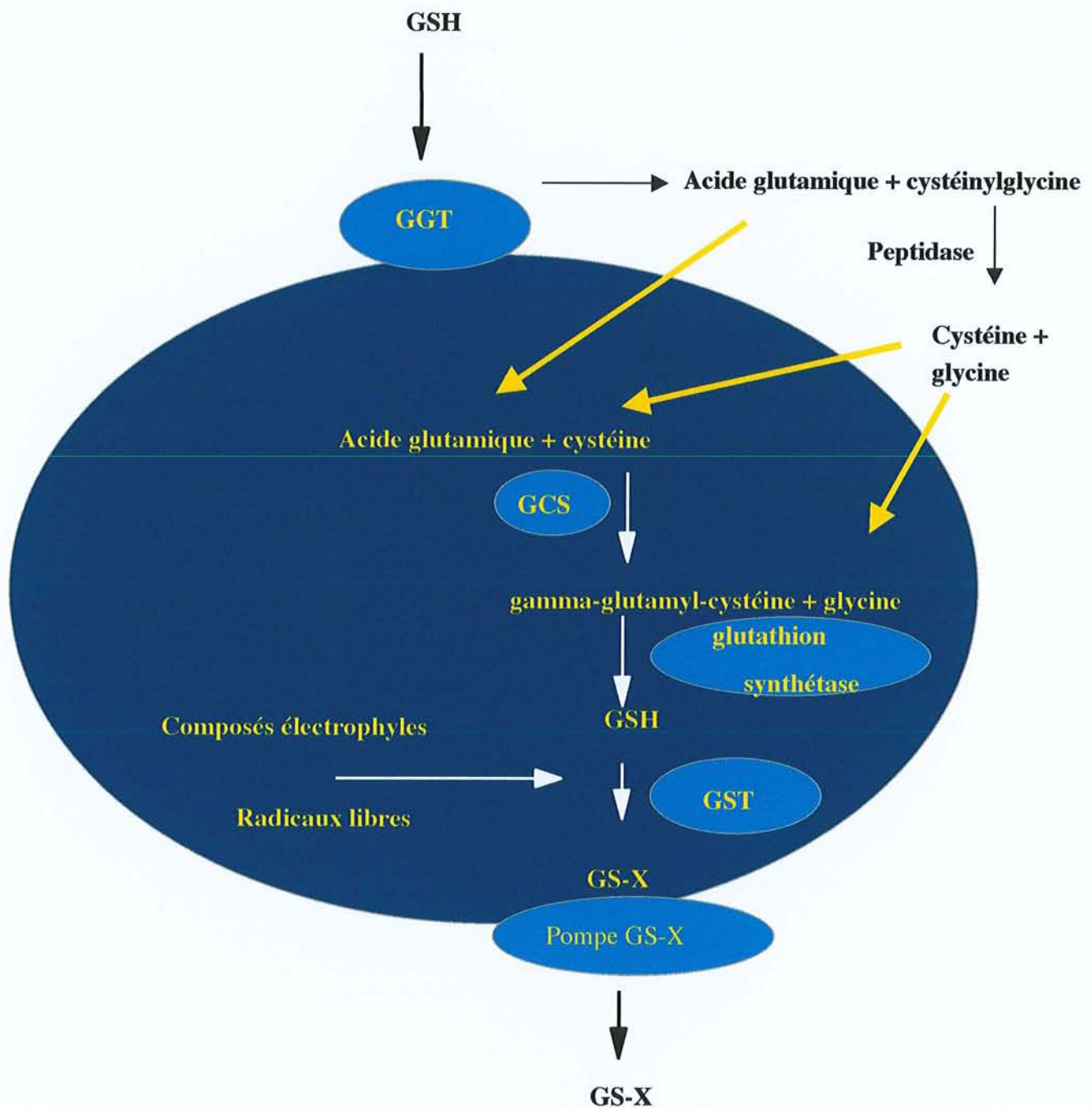


Figure 3 : Le métabolisme du glutathion :

GSH = glutathion, GGT = gammaglutamyltransférase, GCS = gamma-glutamylcystéine synthétase, GST = glutathion S-transférase, GS-X = composé conjugué au glutathion

agents alkylants dans des lignées humaines de tumeurs ovariennes s'accompagne d'une augmentation de 2 à 50 fois du taux de GSH par rapport aux mêmes cellules non résistantes (*Schröder et al., 1996*).

Mais l'efficacité de ces traitements, et en particulier de la doxorubicine, est limitée par les résistances qui sont présentes dès le début du traitement ou qui apparaissent au cours de l'administration. L'efflux très rapide de la molécule hors des cellules est un des mécanismes évoqués pour expliquer cette résistance, mais la rétention de la Doxorubicine n'est pas toujours corrélée à sa cytotoxicité, ce qui suggère que les mécanismes sont multiples. Le GSH pourrait être impliqué dans cette résistance aux anthracyclines en protégeant les cellules contre les radicaux libres produits lors du métabolisme. Ainsi des taux élevés de GSH intracellulaire ont été rapportés à une résistance intrinsèque aux anthracyclines, tandis que les variations d'activité des enzymes de son métabolisme ont été associées à la résistance acquise (*Lutzky et al., 1989*). Enfin, diverses études ont montré l'intérêt d'utiliser du GSH exogène pour prévenir les dommages cellulaires engendrés par l'ischémie-reperfusion, l'hyperoxie hyperbare ou les fibroses pulmonaires idiopathiques, toutes situations pathologiques où le stress oxydant semble être un des mécanismes pathologiques (*Kowalski et al., 1990 ; Younes et Strubelt, 1990 ; Kugelman et al., 1997*). **Les enzymes permettant la synthèse du GSH, sa conjugaison (γ -glutamyltransférase, γ -glutamylcystéine synthétase, glutathion S-transférases), ou l'élimination des conjugués au glutathion, par la pompe GS-X, pourraient également intervenir dans ces phénomènes (*Ishikawa, 1993-2*).**

La γ -glutamylcystéine synthétase (GCS; EC 6.3.2.2) catalyse la première étape de la biosynthèse du GSH intracellulaire, c'est-à-dire la synthèse de γ -glutamylcystéine à partir de cystéine et de glutamate; après la biodisponibilité en cystéine, c'est l'autre étape limitante de cette synthèse. De plus, la GCS subit un rétrocontrôle négatif par le GSH.

La GCS est composée de deux sous-unités: la grande sous unité de 73 kDa possède l'activité catalytique et le site du rétrocontrôle par le GSH; la petite sous unité de 28 kDa pourrait réguler l'activité cinétique de l'enzyme.

La γ -glutamyltransférase (GGT; EC 2.3.2.2) catalyse le clivage de la liaison glutamyl-cystéine du GSH; c'est une enzyme membranaire dont le site actif est dirigé vers le milieu extracellulaire. Cette réaction produit de la cystéinyglycine qui peut alors être clivée par des dipeptidases en acides aminés, lesquels peuvent pénétrer dans les cellules et servir à la synthèse *de novo* de GSH (*Ishikawa, 1993-2*). La disponibilité en cystéine constitue une des étapes limitantes de la synthèse de GSH. La GGT est constituée de deux sous-unités; la séquence amino terminale de la grande sous-unité contient un domaine hydrophobe qui permet l'ancrage de l'enzyme dans la membrane. Le reste de la sous-unité est fortement glycosylé et est associé à la petite sous-unité (*Meister, 1989*). Cette dernière contient le site de fixation de la partie γ -glutamyl du substrat naturel, le GSH, et améliore l'activité catalytique de l'enzyme. Le GSH extracellulaire n'entrerait dans le milieu intracellulaire qu'après métabolisation par la GGT. Le GSH serait ainsi métabolisé par cette enzyme pour produire un résidu d'acide glutamique et un dipeptide, la cystéinyl-glycine. Ces derniers composés, une fois transportés à l'intérieur de la cellule, pourraient servir à la synthèse intracellulaire de GSH (*Meister, 1995*). Le GSH extracellulaire peut suivre d'autres voies pour entrer dans la cellule. L'une de ces voies consiste à transférer la partie γ -glutamyl d'une molécule de GSH sur une autre molécule de GSH. Le composé formé, le γ -glutamyl-GSH peut entrer dans la cellule et servir à la synthèse de 5-oxoproline et d'acides aminés grâce à la réaction catalysée par la γ -glutamylcyclotransférase. La GGT serait également capable de former de la γ -glutamylcystine dans le milieu extracellulaire par transfert du résidu glutamyl d'un GSH extracellulaire sur la cystine. La γ -glutamylcystine peut ensuite pénétrer dans la cellule, puis par action d'une réductase former la γ -glutamylcystéine. Cette voie permet d'éviter la synthèse du GSH par la GCS. Une étude de *Sweiry et al. (1995)* montre que la GGT, outre sa capacité à former

de la γ -glutamylcystine, peut transporter directement la cystine dans le milieu intracellulaire. En effet en inhibant la GGT par l'acivicine, les auteurs ont montré que le transport de cystine est considérablement réduit. La GGT pourrait donc apparaître comme une pompe à acides aminés. Cette hypothèse est renforcée par les observations de *Frey et al. (1991)* qui laissent supposer que les deux domaines hydrophobes de la GGT cérébrale pourraient former un canal transporteur. *Pawlak et al. (1988)* ont localisé la famille multigénique de la GGT humaine sur le chromosome 22. Les travaux de *Courtay et al. (1994)* ont permis de confirmer cette hypothèse et de mettre en évidence la présence de 7 gènes, dont 5 sont exprimés de façon tissu-spécifique. Chez l'homme un seul gène (le gène 6) code pour le seul ARN messager (ARNm) trouvé à la fois dans le pancréas, le foie, le placenta et le rein foetal.

La glutathion S-transférase P1-1 (GSTP1-1; EC 2.5.1.18) est une protéine dimérique (homo- ou hétérodimérique avec des sous-unité de 23 à 28 kDa) appartenant à une grande famille d'isoenzymes multifonctionnelles, les GST, qui font partie de la classe II des enzymes de détoxification. La réactivité du groupe nucléophile thiol du GSH est une voie importante du métabolisme de nombreux xénobiotiques lipophiles et de composés endogènes possédant un centre électrophile. La conjugaison peut, suivant la nature du substrat électrophile, être non enzymatique ou être catalysée par les GST. Ces enzymes, en conjuguant de nombreux xénobiotiques au glutathion, rendent ces composés hydrosolubles, et permettent leur détoxification. Mais les GST séquestrent également des toxines par une liaison de forte affinité (*Schipper et al., 1997*). Le rôle des GST est donc clairement celui de protéger les cellules contre la cytotoxicité de divers composés. Cette superfamille comprend quatre classes d'enzymes cytosoliques (A, M, P et T) et une classe d'enzymes microsomales (Tableau III). La distribution des isoenzymes de la GST est tissu-spécifique :

Nomenclature	Classe	Lettre grecque	pI	Localisation chromosomique
A1-1	Alpha	ϵ	8,9	6
A1-2	Alpha	δ	8,9	6
A2-2	Alpha	α, β, γ	8,4	6
M1a-1a	Mu	μ	6,1	1
M1b-1b	Mu	ψ	5,5	1
M3-3	Mu	ϕ	5	nd
P1-1	Pi	π	4,7	11
T1-1	Thêta	θ	nd	nd
T2-2	Thêta	—	nd	nd

Tableau III : Classification des différentes GST cytosoliques humaines d'après Mannervik et al.(1992).

- **les GSTA** sont le produit de deux gènes, *GSTA1* et *GSTA2*, qui sont surtout exprimés dans le foie, le rein ou l'intestin grêle,
- **la GSTT1** est abondante dans les érythrocytes . Récemment un polymorphisme de délétion a été retrouvé pour la GST T1-1 leucocytaire qui explique que l'enzyme soit absente chez 25 à 40 % de la population (*Schröder et al. 1992*). L'absence de la GST T1-1 pourrait être associée à l'augmentation de la génotoxicité de certains composés (oxyde d'éthylène, dichlorométhane...) dans les lymphocytes (*Hallier et al., 1993*).
- **la GSTM1-1** est exprimée de façon variable dans les différents tissus humains mais on estime que 40 à 50% de la population a un phénotype nul pour cette isoenzyme à cause d'un polymorphisme de délétion, et n'exprime donc pas la GSTM1-1 (*Tew, 1994*).
- **la GSTP1-1**, produit du gène *GSTP1*, est exprimée comme la GST majoritaire dans le poumon, le sein, le gros intestin ou la vessie (*Commandeur et al., 1995*). Elle présente des polymorphismes de la région codante au niveau des codons 105 et 114, qui lui confèrent des activités catalytiques différentes (*Stanulla et al., 2000*).

3.2 L'implication de la Glutathion S-transférase P1 dans la cancérogénèse

3.2.1 Variations d'expression dans les tumeurs

La surexpression de la GSTP1-1 est associée au développement tumoral et à la carcinogénèse. Mais il n'est pas clairement établi que cette surexpression participe à l'apparition des tumeurs ou n'en soit qu'une conséquence biologique. Quelqu'en soit la signification, une augmentation de l'expression de la glutathion S -transférase P1-1 a été observée dans de nombreux adénocarcinomes et carcinomes des cellules squameuses (côlon, estomac, vessie, poumon, ovaire, testicule, rein) (*Cookson et al., 1997; Henderson et al., 1998*). Le plasma de patients atteints de cancer de la vessie contient des taux plus élevés de GSTA1-1 et de GSTP1-1 que ceux retrouvés chez les sujets sains, alors que les patients atteints de cancers rénaux présentent seulement une augmentation de GSTP1-1. Certaines équipes suggèrent même que des taux élevés de GSTP1-1 pourraient être corrélés à un mauvais pronostic dans le cas de femmes atteintes de cancer du sein sans atteinte ganglionnaire (*Gilbert et al. 1993*). Les sujets qui n'expriment pas la GSTM1-1 ont un risque accru de cancer du poumon, de la vessie ou de cancers colorectaux; de même, ceux qui ont un génotype nul pour *GSTT1* présentent un risque plus élevé de cancers colorectaux, de colites ulcéraives et de syndromes myéloдисplasiques (*Helzlouer et al., 1998*). Un génotype nul pour la *GSTT1* ou la *GSTM1* diminue le risque de rechute de la maladie chez des enfants atteints de LAL (*Stanulla et al., 2000*). Ces observations semblent impliquer les GST dans la cancérogénèse. Mais *Koomägi et al. (1995)* ont montré que la surexpression de la GSTP1-1 peut être la conséquence des conditions d'hypoxie provoquées par une vascularisation insuffisante des tumeurs. Chez des enfants atteints de leucémie aigüe lymphoblastique, l'augmentation de la GSTP1-1, qui est observée dans plus de la moitié des cas, est associée à la rechute des patients (*Sauerbrey et al., 1994*). Le même phénomène a été décrit par *Inoue et al. (1995)* chez des patients atteints de carcinomes pulmonaires. *Stanulla et al. (2000)* ont montré que les enfants atteints de LAL et

homozygotes pour la Val₁₀₅ ont un risque plus faible de présenter une rechute de leur maladie que ceux présentant les autres polymorphismes du gène *GSTP1*. Pour des patients atteints de leucémie aigüe non lymphoblastique, l'expression de la GSTP1-1 est corrélée de façon significative à la réponse à la première induction thérapeutique, à la durée de la première rémission et à la survie à long terme (*Tidefelt et al., 1992*). Dans le cas de leucémie lymphoïde chronique, la GSTP1-1 mais également les isoenzymes A et M sont plus élevées que chez les sujets témoins (*Schisselbauer et al., 1990*).

Au contraire de toutes ces données, l'expression de *GSTP1* est complètement abolie dans les tumeurs de la prostate, par suite de l'hyperméthylation du gène (*Lee et al., 1994*), ce qui indiquerait encore un rôle important de *GSTP1* dans le développement tumoral. Une étude chez la souris a tenté de mettre en évidence le rôle exact de la GSTP dans la carcinogénèse et la résistance aux xénobiotiques en délétant les gènes codant pour cette enzyme (*Henderson et al., 1998*). Leurs travaux ont permis de montrer que la GSTP n'est pas essentielle à la vie, qu'elle n'intervient dans aucune fonction critique de l'organisme. Chez les souris à génotype nul pour la GSTP, ils n'ont pas observé de variations significatives des taux de GSH, ni des activités de la GCS et de la Glutathion synthetase. Par contre, après application cutanée d'un carcinogène puis d'un promoteur de tumeur, le TPA, la formation de papillomes est très significativement augmentée chez les souris à génotype nul pour la GSTP par rapport aux témoins. Cette étude met en évidence qu'une seule enzyme du métabolisme des xénobiotiques peut jouer un grand rôle dans la susceptibilité aux carcinogènes, ce qui peut expliquer que les variations interindividuelles de l'expression de cette enzyme soient un facteur de risque de cancer chez l'homme.

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont impliquées dans la pathogénie de plusieurs maladies comme l'athérosclérose, le cancer, la maladie de Parkinson (*Jenner, 1998*) ou la maladie d'Alzheimer (*Fowler, 1997*), et dans les effets secondaires des radiations, de la chimiothérapie ou dans le vieillissement cellulaire (*Morel et Barouki 1998*). Le métabolisme des ROS dans les cellules tumorales est encore assez mal connu; il semble que des quantités importantes de radicaux libres ou de peroxyde d'hydrogène

soient produites par diverses cellules tumorales, comme les cellules de mélanome, les cellules de carcinome du côlon, les cellules de neuroblastomes ou de cancer de l'ovaire, en l'absence de toute stimulation (*Toyokuni et al., 1995*) et ces cellules pourraient avoir des systèmes antioxydants modifiés par rapport aux cellules saines. On sait par exemple que le stress oxydant est capable d'activer la GSTP1-1 (*Xia et al., 1996; Pinkus et al., 1996*). L'oxygène que nous respirons est réduit en eau par apport d'électrons. Lorsqu'il n'est pas réduit totalement, il se forme des espèces oxydantes très réactives, telles le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le radicale hydroxyle (OH^*) et l'anion superoxyde (O_2^*). Ces espèces (ROS) peuvent oxyder l'ADN, les lipides ou les protéines. Les cellules produisent continuellement et normalement ces dérivés de l'oxygène, d'autant plus que certaines cytokines ou facteurs de croissance physiologiques utilisent cette production comme signal intracellulaire (*Morel et Barouki, 1998*). Il n'y a donc stress oxydant que lorsque la production de ces espèces est augmentée, ou que les systèmes anti-oxydants, en particulier le système glutathion, ne fonctionnent pas. Les facteurs de stress oxydant peuvent être des rayonnements UV, une hyperoxie, l'activation du système immunitaire. L'induction des enzymes de détoxification de phase I par les xénobiotiques, certaines quinones (endogènes ou exogènes comme la doxorubicine), les molécules à cation métallique (Fe, Cu) activent également le métabolisme oxydant et la production d'espèces réactives de l'oxygène. Mais les radicaux libres ne provoquent pas seulement des dégâts cellulaires, ils induisent des gènes qui sont protecteurs, comme l'hème-oxygenase-1 (*Adderley et Fitzgerald, 1999*). Les ROS et le peroxyde d'hydrogène en particulier, ont été impliqués directement dans l'activation des gènes *c-fos* et *c-jun* (*Sen et Packer, 1996*).

Les quinones sont des générateurs de H_2O_2 intracellulaire, qui ont été très largement utilisés *in vitro* pour produire un stress oxydant. Les quinones sont réduites en leurs radicaux semi-quinones par des réductases cellulaires. En présence d'oxygène, les radicaux semi-quinones sont oxydés avec formation de radicaux superoxydes et régénération de la quinone initiale. La dismutation des radicaux superoxydes produit du H_2O_2 (*Kugelman et al., 1994*). Leur toxicité est partiellement limitée par leur

conjugaison directe au GSH. Le *tert*-butylhydroquinone (TBHQ) a été considéré d'abord comme un antioxydant car il est moins réactif que d'autres hydroquinones, comme la ménadione. C'est un inducteur d'enzymes de détoxification de phase II, et il a pu être montré qu'il entraîne une élévation de la concentration intracellulaire de GSH et de l'activité de la GCS dans une lignée d'hépatome murin (*Liu et al., 1996*).

La doxorubicine, chef de file des anthracyclines, est très largement utilisée pour traiter des pathologies hématologiques malignes ou des tumeurs solides, malgré sa grande cardiotoxicité qui en limite l'utilisation. Elle a été isolée d'un champignon microscopique, *Streptomyces peucetius*. L'activité antitumorale des anthracyclines n'est pas entièrement élucidée; elles présentent une forte affinité pour l'ADN et s'intercalent entre les bases de l'ADN, tandis que leur radical sucre interagit avec les désoxyribose-phosphates de l'ADN (*Manfait et al., 1982*). Les anthracyclines sont réduites en radicaux semi-quinones par la cytochrome P450 réductase et les radicaux ainsi formés réagissent avec l'oxygène pour former des anions superoxydes O²⁻. Ce mécanisme serait responsable de la cardiotoxicité des anthracyclines, par peroxydation des lipides (*Wang et al., 1972*). Mais l'efficacité de la doxorubicine est limitée par les résistances qui sont présentes dès le début du traitement ou qui apparaissent au décours de l'administration. L'efflux très rapide de la molécule hors des cellules est un des mécanismes évoqués pour expliquer cette résistance, mais la rétention de la doxorubicine n'est pas toujours corrélée à sa cytotoxicité, ce qui suggère que les mécanismes sont multiples. Le glutathion (GSH) et les enzymes de son métabolisme pourraient être impliqués dans la résistance aux anthracyclines en protégeant les cellules contre les radicaux libres produits lors du métabolisme. Ainsi des taux élevés de GSH intracellulaire ont été rapportés à une résistance intrinsèque aux anthracyclines, tandis que les variations d'activité des enzymes de son métabolisme ont été associées à la résistance acquise (*Lutzky et al., 1989*).

3.2.2. Rôle dans la résistance aux anticancéreux

Le GSH, par ses propriétés nucléophiles, réagit avec de nombreux composés électrophiles utilisés en chimiothérapie. C'est ainsi que certains agents anticancéreux se lient directement au GSH, comme par exemple le cisplatine, le melphalan ou le chlorambucil (*Gouyette 1994*).

Le cisplatine, qui agit en formant des adduits sur l'ADN, est inactivé sans catalyse enzymatique, par conjugaison au GSH. *Godwin et al. (1992)* ont montré que parmi des lignées cellulaires humaines de cancer de l'ovaire, celles qui deviennent résistantes au cisplatine présentent une augmentation très importante de la concentration de GSH intracellulaire alors que les autres systèmes de résistance (MDR, MRP et topoisomérase II) sont inchangés par rapport aux cellules tumorales sensibles au cisplatine. Il semble donc que la résistance au cisplatine soit une conséquence de la conjugaison au GSH, dont la concentration est augmentée dans certaines cellules cancéreuses, sous l'effet de la surexpression des enzymes de son métabolisme.

Outre le cisplatine, de nombreux médicaments peuvent aussi être inactivés par la conjugaison au GSH. Les agents alkylants, comme le melphalan ou le chlorambucil, peuvent être également touchés par ce type de résistance. *Ahmad et al. (1987)* ont mis en évidence dans une lignée lymphoïde de souris L1210 résistante au melphalan, une augmentation de la concentration intracellulaire de GSH qui s'accompagne d'une élévation des ARNm de la GCS et de la GST. Ce résultat permet de conclure que dans cette lignée murine, comme dans le cas des cancers ovariens décrit par *Godwin et al. (1992)*, l'augmentation du taux de GSH intracellulaire est responsable de la chimiorésistance. De même, sur des lignées de carcinome de prostate traitées par le melphalan, *Mulcahy et al. (1994)* ont montré que la chimiorésistance est associée à une augmentation de la concentration de GSH.

Une étude réalisée par *Bransom et al. (1995)* sur des lymphocytes provenant de malades atteints de leucémie lymphoïde chronique, a montré que le traitement simultané par le melphalan et le chlorambucil entraîne une chimiorésistance. Toutefois, contrairement

aux études précédentes, les auteurs n'ont pas observé d'augmentation de la concentration de GSH ni de modification de l'activité GST. Dans ce cas, la chimiorésistance serait due à une augmentation des processus de réparation de l'ADN. En ce qui concerne les chloroéthyl nitrosourées comme le BCNU, la conjugaison avec le GSH demeure leur voie principale d'inactivation (*Gouyette, 1994*). Ce composé est hydrolysé pour produire entre autres, des ions chloroéthyl carbonium, aux propriétés alkylantes. Ces derniers étant fortement électrophiles, ils réagissent avec de nombreux nucléophiles dont le GSH.

De nombreuses études ont montré que des taux élevés de GST peuvent rendre les cellules résistantes aux cytotoxiques utilisés en chimiothérapie (Tableau IV). Les mécanismes par lesquels les GST pourraient intervenir dans la résistance aux anticancéreux sont l'objet de controverses. Le principal mécanisme suggéré est celui de la conjugaison des xénobiotiques au GSH. D'autres possibilités sont évoquées, comme la liaison des médicaments et leur efflux hors des cellules (*Stanulla et al., 2000*). Un autre sujet de débat est la part relative des différentes isoenzymes dans ces mécanismes. Ainsi la GSTA1-1 interviendrait dans la résistance aux agents alkylants (melphalan, chlorambucil) tandis que la GSTM1-1 permettrait la détoxification des nitrosourées (*Commandeur et al., 1995*), notamment dans certaines lignées de tumeurs pulmonaires (*Berhane et al., 1993*). Dans les cellules humaines de carcinome du col HeLa, la chimiorésistance à la doxorubicine, au cisplatine ou au melphalan, est due à la GSTM1-1 (*Hao et al., 1994*). Récemment une étude réalisée sur plusieurs lignées humaines de cancer du côlon a suggéré que la résistance à la doxorubicine observée dans cette pathologie pourrait être liée à une augmentation de l'activité catalytique de la GST, mais surtout à l'augmentation de l'expression de la GSTA1-1 (*Beaumont et al., 1998*). Chez des patients atteints de leucémie lymphoïde chronique et qui présentent une résistance aux moutardes à l'azote ou au chlorambucil, l'activité GST est plus élevée que chez les patients ayant la même leucémie non encore traitée (*Tew, 1994; Zhang et al., 1998*). L'augmentation de la GSTP1-1 après chimiothérapie chez des patientes

Tableau IV : Modification de l'expression des enzymes du métabolisme du glutathion dans des cellules résistantes aux agents chimiothérapeutiques (selon *O'Brien et Tew, 1996*). (+ : augmentation, - : diminution, nd = non déterminé, sm = sans modification)

Agent	Lignée cellulaire	Activité GST	Expression d'isoenzymes
Doxorubicine	MCF-7 (cancer du sein)	+	pi (+)
	MCF-7 (cancer du sein)	+	pi (+), mu (-)
	FLC (leucémie murine)	+	alpha (+)
BCNU	9L2 (gliosarcome de rat)	-	mu (+), pi (-)
	G3361	+	pi (+)
Chlorambucil	Walker 256 (cancer mammaire de rat)	+	alpha (+)
	CHO (cancer de l'ovaire de hamster)	+	alpha (+)
Cisplatine	CHO (cancer de l'ovaire de hamster)	+	pi (+)
Cyclophosphamide	NOS2 (cancer de l'ovaire humain)	+	pi (+)
Acide éthacrinique	G3361 (mélanome humain)	+	pi(+)
	Yoshida (sarcome de rat)	+	nd
Melphalan	HT29 (cancer du colon humain)	+	pi (+)
	MCF-7 (cancer du sein)	nd	pi (+), mu (+)
	HS-Sultan (cancer myéloïde humain)	sm	pi (+)
	G3361 (mélanome humain)	+	pi (+)

atteintes de cancer de l'ovaire est liée à la résistance au cisplatine (*Cheng et al., 1997*). Dans le cas de tumeurs pulmonaires, la surexpression de la GSTP1-1 est associée à celle de la protéine p170, et s'observe lors de la résistance à la doxorubicine (*Volm et al., 1992*). Enfin, *Di Simone et al. (1995)* ont mis en évidence une augmentation significative de l'activité GSTP1-1 chez des patients atteints de leucémie lymphoïde chronique et traités par des agents alkylants, alors que les activités MDR ou MRP demeurent inchangées. Malgré l'apparente corrélation entre la chimiorésistance et l'augmentation des isoenzymes de la GST, la transfection de vecteurs d'expression des différentes GST dans des cellules tumorales humaines n'a pas permis de rendre ces cellules résistantes aux anticancéreux testés (*Schipper et al., 1997*). Par contre, la transfection de l'ADNc codant pour la GSTP1-1 dans des cellules murines (*Puchalski et Fahl, 1990*) ou dans des lignées de cellules tumorales de singe ou de hamster (*Zhang et al., 1998*) a entraîné une résistance envers divers agents alkylants, dont la doxorubicine. D'un point de vue clinique, certaines équipes de chercheurs ont tenté de synthétiser des inhibiteurs des GST qui seraient administrés avec les antinéoplasiques, pour lutter contre l'apparition de la chimiorésistance. Ainsi en 1991, *O'Dwyer et al.* ont effectué un essai thérapeutique en phase I de l'acide éthacrynique. L'inhibition des GST par ce composé a conduit à la potentialisation de la cytotoxicité induite par plusieurs agents anticancéreux. De plus cet inhibiteur non sélectif ne produit pas d'effets indésirables. Le traitement *in vitro* de cellules A2780 de carcinome ovarien humain par le melphalan entraîne le développement d'une résistance croisée melphalan/cisplatine, et les cellules devenues résistantes présentent une activité GST et un taux d'ARNm plus élevé que dans la lignée initiale. Le traitement des cellules résistantes par l'acide éthacrynique renverse le phénotype résistant et restaure l'activité enzymatique. De plus si on traite des cellules A2780 sensibles par le melphalan et l'acide éthacrynique de façon concomitante, on empêche le développement de la résistance (*Caffrey et al., 1999*). Une autre étude *in vitro* a montré qu'en inhibant les GST par des analogues du GSH, on pouvait restaurer la sensibilité au chlorambucil de cellules d'adénocarcinome de

colon (HT-29), ou encore rendre de nouveau sensibles à la vinblastine des cellules de carcinome ovarien (*Morgan et al. 1996*).

A la lumière de tous ces résultats, il s'avère que la GSTP1-1 joue un rôle très important dans la cancérogénèse et dans la résistance aux anticancéreux plus particulièrement dans le cas des leucémies humaines. Il semble donc particulièrement intéressant d'étudier les mécanismes de régulation de cette enzyme.

Partie II : Mécanismes de régulation de l'expression de la GSTP1-1

3.3. La méthylation de l'ADN chez les mammifères

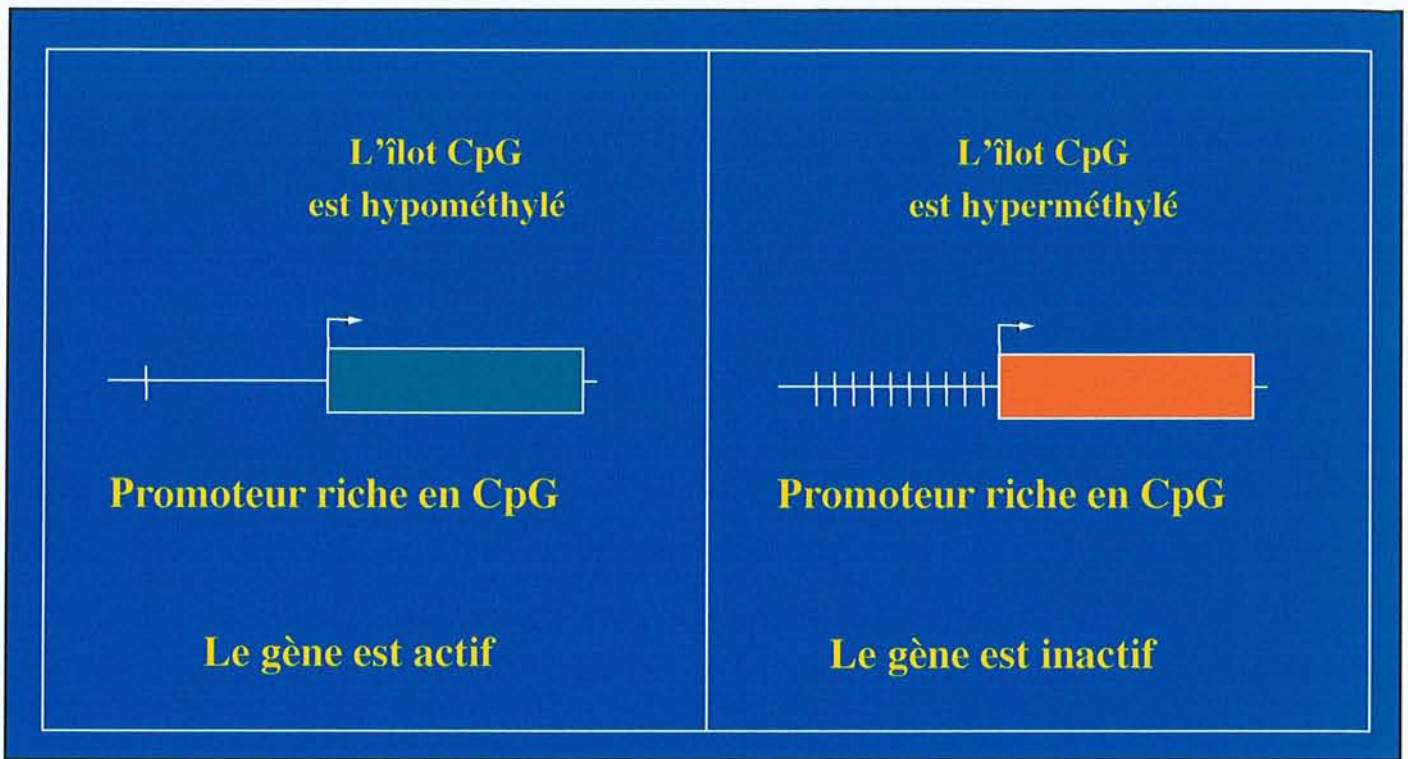
Parmi les nombreux mécanismes dont dispose la cellule pour modifier le taux de transcription ou pour transcrire des gènes auparavant silencieux, la méthylation joue un rôle important. La méthylation de l'ADN résulte d'une modification covalente postréplivative du carbone 5 du résidu de la cytosine (5-meC). La méthylation d'une cytosine dans le dinucléotide CpG est catalysée par une DNA méthyltransférase. Au cours de l'évolution, les dinucléotides CpG ont été progressivement éliminés du génome des eucaryotes et seulement 5 à 10% des CpG prévisibles sont encore présents. Parmi les CpG du génome des vertébrés, en particulier chez l'homme, environ 70 à 80% contiennent des cytosines méthylées, ce qui correspond à une méthylation de 3 à 6% de toutes les cytosines du génome (*Laird et Jaenish, 1996*). Environ 90 % des 5-méthyl cytosines se retrouvent au sein de dinucléotides CpG, mais également dans les séquences de type CpNpG (*Clark et al.1995*). Toutefois, des petites régions de l'ADN de 0,5 à 5 kb, situées tous les 100 kb en moyenne et appelées îlots CpG, sont riches en CG (60 à 70%), ont un ratio CpG/GpC de l'ordre de 0,6, ne montrent aucune diminution de fréquence du dinucléotide CpG au cours de l'évolution et sont non méthylées. Ces îlots CpG sont retrouvés dans les régions 5' régulatrices des gènes ubiquitaires (*Laird et Jaenish, 1996*). Environ la moitié des gènes de la souris ou de l'homme contiennent des îlots CpG, essentiellement des gènes housekeeping qui sont exprimés dans de nombreux tissus.

Il existe deux voies menant à la méthylation de l'ADN. La méthylation d'un brin hémi-méthylé se déroule lors de la réplication de l'ADN pendant laquelle le brin néo-synthétisé est méthylé à l'image du brin maternel afin de maintenir l'empreinte de méthylation. La perte de la méthylation peut être due à des erreurs dans cette activité de maintien de la méthylation. La deuxième voie consiste en l'acquisition d'une nouvelle

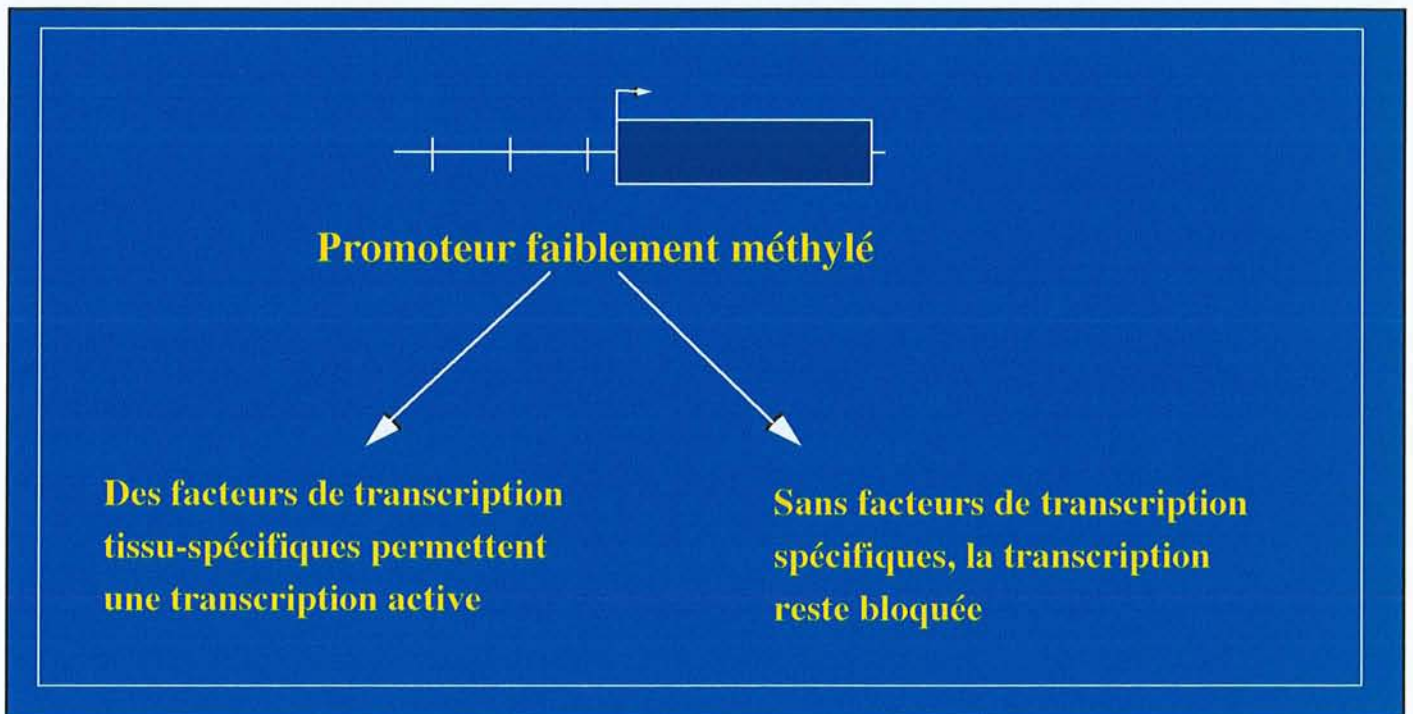
empreinte de méthylation qui ne sera réalisée que par une méthylation *de novo*. Cette méthylation est très active lors du développement embryonnaire et permet la méthylation de brins d'ADN non méthylés.

Le rôle de la méthylation commence à être cerné à la fois chez les procaryotes et chez les eucaryotes. Chez les procaryotes, la méthylation joue un rôle très important dans les mécanismes de défense contre les particules d'ADN étrangères (*Wilson et Murray, 1991*). Chez les eucaryotes, la méthylation jouerait également un rôle de protection en rendant silencieux à la fois des éléments transposables et certaines particules virales, comme le cytomégalo virus ou le virus d'Epstein-Barr (*Barlow, 1993*). Selon l'hypothèse la plus couramment acceptée, la méthylation jouerait un rôle régulateur dans le contrôle de l'expression des gènes lors du développement embryonnaire et lors de la différenciation cellulaire. En plus de ces hypothèses, *Bird et al. (1995)*, pensent que la méthylation permettrait de réduire de façon tissu-spécifique la transcription de gènes sans utilité biologique (Figure 4). Trois modes d'action ont été proposés pour expliquer l'effet de la méthylation de l'ADN.

- Le premier mécanisme incrimine l'interférence directe dans la liaison des facteurs de transcription à leurs sites de fixation sur l'ADN. Ainsi AP-2, CREB, E2F ou NF- κ B se lient à des séquences qui contiennent des résidus CpG, et la liaison de ces facteurs de transcription à leurs cibles est inhibée par la méthylation de ces régions de l'ADN. Le tableau V regroupe les différents facteurs de transcription dont la liaison est affectée par la méthylation de la cytosine. De plus, la méthylation peut également "créer" de nouveaux sites de fixation de facteurs de transcription. La méthylation du site CGAGTCA augmente l'affinité de cette séquence consensus pour le facteur AP-1 (*Tulchinsky et al. 1996*). D'autres facteurs de transcription comme Sp1, au contraire, ne sont pas sensibles à la méthylation de leurs sites de reconnaissance.



A. Exemple d'un gène ubiquitaire



B. Exemple d'un gène tissu-spécifique

Figure 4 : Représentation schématique de l'effet de la méthylation sur l'expression d'un gène eucaryote.

Facteurs de transcription	Séquence consensus	Références
AP-2	CCGCC <u>CGCG</u>	Comb & Goodman 1990
AP-2	CTCC <u>G</u> GGG(C/T)TG	Hermann & al. 1989
Recepteur Ah	TTG <u>CGTG</u>	Shen & Whitlock 1989
CREB/ATF	TGAC <u>GTCA</u>	Iguchi & al. 1989
CREB/ATF	CTG <u>CGTCA</u>	Becker & al. 1989
E2F	TTTT <u>CGCGC</u>	Kovesdi & al. 1987
EBP-80	ATCTG <u>CGC</u> CATATGCC	Falzon & Kuff 1991
Ets	<u>CGGAAG</u>	Gaston & Fried 1995
MLTF	GGCCAC <u>GTGACC</u>	Watt & Molloy 1988
MTF-1	TG <u>CGCCG</u>	Radtke & al. 1996
cMyc, cMyn	CAC <u>GTG</u>	Prendergast & al. 1991
GABP	TTCC <u>G</u> GGC	Yokomori & al. 1995
NF-κB	GGGACTTT <u>CCG</u>	Bednarik & al. 1991
HINF-P	<u>CGG</u> TTTTCAATCTGGT <u>CCG</u>	Van Wijnen & al. 1992
MSPF	ATG <u>CG</u> NNNN <u>CGCCT</u>	List & al. 1994

Tableau V : Facteurs de transcription dont la liaison est affectée par la méthylation de leurs séquences consensus.

Les régions soulignées sont les dinucléotides CpG méthylables. D'après *Zingg et Jones (1997)*.

- Le deuxième mécanisme correspond à la liaison de répresseurs de la transcription sur l'ADN méthylé. Ainsi MeCP-1 et MeCP-2 se lient aux dinucléotides CpG méthylés quelque soit la séquence environnante et bloquent de cette façon la transcription du gène. MeCP-1 se lie à l'ADN méthylé sur les 2 brins. Dans les cellules déficientes en MeCP-1, on a constaté une diminution de la répression des gènes méthylés. MeCP-2 est plus abondante que MeCP-1, et peut se lier à un ADN ne contenant qu'une paire de CpG méthylés. MeCP-2, comme la DNA méthyltransférase, est essentielle au développement embryonnaire. MeCP-2 est composée de deux domaines: un domaine de liaison aux CpG méthylés, et un domaine permettant la répression de la transcription, qui est capable d'agir à distance du promoteur, ce qui suggère que MeCP-2 interagit avec la machine transcriptionnelle ou avec le complexe d'initiation de la transcription.
- Un dernier mécanisme par lequel la méthylation pourrait empêcher la transcription est l'altération de la chromatine. En effet la méthylation ne peut inhiber la transcription qu'après l'assemblage de la chromatine. Or les histones H1 sont impliquées dans la formation et dans le maintien de la structure de la chromatine. Certaines études ont montré que les histones H1 se lient préférentiellement à l'ADN méthylé. Les ADN méthylés ne sont plus transcrits et acquièrent une résistance à la DNaseI, ce qui est caractéristique de la chromatine inactive. La formation de cette forme de chromatine inactive est due à la liaison préférentielle d'histones H1 (*Singal et Ginder, 1999*).

3.3.1 Rôle de la méthylation dans la cancérogénèse

Le rôle de la méthylation dans l'oncogénèse a été envisagé depuis de nombreuses années. Diverses études ont montré des aberrations dans l'activité de la DNA méthyltransférase des cellules tumorales. Selon *Laird et Jaenisch (1994)*, dans un grand nombre de tumeurs, l'hypométhylation est non seulement associée à la transformation de la tumeur mais également à sa progression. Il semble par contre que la méthylation ne joue aucun rôle pour le passage de l'état bénin à l'état malin. L'hypométhylation est très fréquente dans les régions promotrices des protooncogènes notamment dans les leucémies et tumeurs hépatiques. Ainsi, au niveau des protooncogènes c-fos, c-myc, Ha et Ki-ras, le taux de méthylation diminue fortement dans les tumeurs hépatiques. *Spruck et al. (1993)* ont montré que l'oncogène Ha-ras est déméthylé dans la lignée leucémique humaine K562 dans laquelle ce gène est exprimé. Cependant cette déméthylation ne touche que l'extrémité 5' terminale du gène. De plus, un traitement à la 5-azacytidine du gène n'induit pas d'augmentation de l'activité transcriptionnelle de ce dernier. Il semble donc que la déméthylation de la zone régulatrice seule puisse suffire à l'expression de cet oncogène.

Plusieurs mécanismes peuvent expliquer le rôle de la méthylation dans l'oncogénèse:

- On observe un taux élevé de mutation des cytosines au sein des dinucléotides CpG. En effet, les cytosines non méthylées sont déaminées en uracil, mais cette erreur est réparée par une uracil-DNA glycosylase, l'ADN ne devant pas contenir d'uracil. Par contre la déamination d'une méthyl-cytosine conduit à une thymine, il s'agit dans ce cas d'une mutation ponctuelle de type transition car cette mutation n'est pas réparée. La forte probabilité de déamination de la 5-méthyl-Cytosine expliquerait la sous-représentation de cette dernière. *Cooper et al. (1990)* ont étudié 139 mutations ponctuelles à l'origine d'une maladie, dans des cellules germinales. Selon eux, 37% de ces mutations sont localisées dans un dinucléotide CpG. A partir de leurs résultats, ils ont pu déterminer que la 5-mC a un rôle mutagène 46 fois plus

important que les autres nucléotides. Un exemple en est la mutation du gène supresseur de tumeur p53. Des mutations dans ce gène sont retrouvées dans plus de 50% des tumeurs solides chez l'homme. Environ 24% des mutations observées sont des transitions C-T au sein des dinucléotides CpG. Dans certains cancers, la proportion est encore plus importante : ainsi dans le cancer du colon, 46% des transitions sont localisées dans un dinucléotide CpG (*Singal et Ginder, 1999*).

- Une diminution de la méthylation globale apparaît bien avant le développement de la tumeur; on a constaté une réduction du nombre de 5-méthylcytosines dans les adénomes et adénocarcinomes du côlon (*Feinberg et al., 1988*). Des oncogènes spécifiques sont également hypométhylés dans des tumeurs humaines, tels que c-fos, c-myc, Ha-ras et Ki-ras dans des hépatocarcinomes ou des leucémies (*Laird et Jaenisch, 1994*). La déméthylation du gène antiapoptotique bcl-2 corrélée à une augmentation de l'expression de ce gène est observée dans les leucémies lymphoïdes chroniques B (*Singal et Ginder, 1999*).
- Les gènes supresseurs de tumeur sont hyperméthylés. Le gène du rétinoblastome a été le premier gène supresseur de tumeur pour lequel on ait mis en évidence une hyperméthylation des îlots CpG en 5' du gène. Or la méthylation *in vitro* de la région promotrice de ce gène bloque l'activation du promoteur (*Greger et al., 1994*). Le même type d'inactivation a été observé pour le gène VHL (Von Hippel Lindau) dans le cas de carcinomes rénaux (*Herman et al., 1994*). Une des protéines les plus importantes pour la régulation du cycle cellulaire est la protéine p16^{INK4A} inhibitrice de la kinase cycline-dépendante; elle arrête le cycle en G1/S. Cette protéine est indispensable pour maintenir la protéine du rétinoblastome Rb dans sa forme active non phosphorylée. En cas de non fonctionnement de p16^{INK4A}, on observe une dérégulation de la prolifération cellulaire pouvant conduire à une progression cancéreuse. Dans presque toutes les tumeurs, le contrôle du cycle cellulaire par cette voie est perdu, soit par l'altération de la fonction de p16^{INK4A}, soit par une mutation du gène qui code pour la protéine Rb, mais jamais par les deux mécanismes à la fois (*Baylin et Herman, 2000*). La perte d'activité de p16^{INK4A} se produit par délétion, par

mutation ponctuelle ou par hyperméthylation. Dans certains types de tumeurs comme le cancer du côlon, l'inactivation de p16^{INK4A} est due à l'hyperméthylation du promoteur du gène qui code pour cette protéine (Myohänen et al., 1998). Le traitement des lignées cellulaires présentant une hyperméthylation de p16^{INK4A} par la 5-azacytidine a entraîné une activation de la transcription du gène. L'inactivation par hyperméthylation de p16^{INK4A} a été démontrée dans les cancers du cerveau, du sein, du côlon, de la tête et du cou, dans les cancers du poumon non à petites cellules et dans les formes graves des lymphomes non-hodgkiniens (Baylin et al., 1998). La protéine p15 est un inhibiteur des kinases cycline-dépendantes CDK4 et CDK6, intervenant dans le contrôle du cycle cellulaire. L'inactivation de p15 par la méthylation a surtout été observée dans les cancers hématopoïétiques tels que les leucémies myéloblastiques ou lymphoblastiques aiguës et les lymphomes de Burkitt. L'hyperméthylation de p15 et p16 a été retrouvée dans le myélome multiple (Singal et Ginder, 1999). L'expression du gène qui code pour la protéine E-cadherin est également réduite ou supprimée dans les carcinomes mammaires ou hépatiques, et dans des lignées cellulaires de cancer du côlon, de l'estomac ou de la prostate (Melki et al., 2000). Cette protéine sert au maintien du phénotype épithélial et peut supprimer l'invasion par les cellules tumorales et les métastases. Une diminution de l'expression du gène *E-cad* a été corrélée à l'agressivité de la maladie dans les cancers du sein ou de la prostate. Les blastes des leucémies aiguës lymphoblastiques, des leucémies chroniques myéloblastiques ou des leucémies aiguës myéloblastiques n'expriment pas non plus le gène *E-cad*. Cette inhibition de l'expression de la E-cadherin semble liée à une hyperméthylation bi-allélique du gène, au moins dans les leucémies (Melki et al., 2000).

- L'augmentation de l'activité de la DNA méthyltransférase joue un rôle dans l'initiation et la progression des cancers, comme cela a pu être observé dans les tumeurs du côlon ou du poumon. Une surexpression de cette activité enzymatique est à l'origine de la transformation des cellules NIH-3T3 (Mostoslavsky et Bergman, 1997). Le taux de DNA méthyltransférase est également augmenté de 4 à 5 fois dans

les LAM (*Melki et al., 1999*). Mais les mécanismes qui entraînent une élévation de l'activité DNA méthyltransférase dans les cellules néoplasiques ne sont pas encore connus, de même que les mécanismes qui maintiennent une méthylation normale dans les cellules saines et une méthylation aberrante dans les cellules cancéreuses (*Singal et Ginder, 1999*).

Une question se pose de savoir si l'hyperméthylation est un phénomène dû au hasard, ou si certains évènements prédisposent à la méthylation aberrante des îlots CpG. La densité de méthylation des gènes les plus méthylés dans les cancers du côlon augmente avec l'âge des sujets. Les îlots CpG des promoteurs de ces gènes sont peu méthylés chez les sujets jeunes, mais la méthylation s'accroît au fur et à mesure que le sujet vieillit et est maximale dans les cellules devenues cancéreuses. S'il y a une prédisposition de certains gènes à devenir hyperméthylés, les DNA méthyltransférases 3a et 3b pourraient être des facteurs de cette prédisposition, puisqu'il semble qu'elles ne servent pas à maintenir la méthylation mais plutôt à faire une méthylation *de novo* (*Baylin et Herman, 2000*).

3.3.2 Méthylation des gènes du système du GSH

Baik et al. (1992) ont étudié la méthylation de la région 5' du gène de la GGT de rat. C'est dans cette région que se situent les promoteurs I et II qui sont progressivement activés durant l'ontogenèse dans le cas du rein, ou au contraire qui sont tous les deux silencieux dans le cas du foie. La méthylation évolue au cours du développement. Lors du stade fœtal et chez le nouveau-né, le profil de méthylation de la GGT montre des îlots CpG méthylés de façon assez hétérogènes. Par contre chez l'adulte, ces mêmes îlots sont déméthylés. Cependant, la méthylation n'est certainement pas le seul mécanisme qui contrôle l'expression de ces deux promoteurs. En effet, malgré un profil de méthylation du promoteur I identique dans les deux organes, seul le promoteur I présent dans le rein est exprimé. De plus, un traitement à la 5-azaC, agent déméthylant, ne provoque pas l'expression de ces deux promoteurs dans le foie. La méthylation peut

donc être à l'origine de la régulation des promoteurs du gène de la GGT, mais ces deux promoteurs doivent être également sous le contrôle d'autres facteurs spécifiques. Cette hypothèse n'est pas reprise par *Garcia-Gimeno et al. (1995)* qui indiquent que la méthylation des cytosines dans les promoteurs I et II serait directement responsable de l'inactivation de ces derniers.

La région 5' du gène *GSTP1* composée de 400 nucléotides en amont du site de début de la transcription contient 72% de C et de G, ainsi que 41 dinucléotides CpG, et notamment un îlot CpG (*Lee et al., 1994; Jhaveri et Morrow, 1998, Morrow et al., 1992*). La méthylation de ces éléments pourrait être à l'origine de la diminution de l'expression de *GSTP1* dans certains types cellulaires, notamment de lignées humaines de cancer du sein. Ainsi *Jhaveri et Morrow (1998-1)* ont mis en évidence que le gène *GSTP1* est hyperméthylé dans les cellules de cancer du sein qui n'expriment pas *GSTP1*, ou au contraire non méthylé dans les cellules exprimant *GSTP1*. D'autre part ils ont montré que l'expression de *GSTP1-1* peut être relancée par traitement des cellules avec un agent déméthylant qui diminue la méthylation du promoteur de *GSTP1*. Dans le cas de cellules provenant de patients atteints de LAM, le gène *GSTP1* et le gène *Rb* ont été retrouvés essentiellement déméthylés, alors que beaucoup d'autres gènes sont plutôt hyperméthylés chez ces patients, comme le gène de la calcitonine, de la E-cadherin, les gènes *ER* et *p15* (*Melki et al., 1999*). Une étude a rapporté que dans la plupart des cancers de la prostate, il n'y a pas d'expression de la *GSTP1-1*, ce qui est différent de ce qui est généralement observé dans les autres tissus tumoraux, et que dans ces cas-là, les séquences régulatrices de *GSTP1* sont hyperméthylées (*Lee et al., 1994*). Le promoteur de *GSTP1* contient un site AP-1 non méthylable, deux sites Sp1 insensibles à la méthylation; seul le site NF- κ B like pourrait être sensible à la méthylation. Mais il paraît peu probable que ce soit par un effet direct sur la fixation des facteurs de transcription que la méthylation agisse sur la régulation de la transcription.

3.4. La régulation de la transcription du gène de la GSTP1

3.4.1. Transcription et cancérogénèse

La pathophysiologie de la carcinogénèse est basée sur l'extension de mutations somatiques. Par un mécanisme de sélection clonale, les cellules tumorales accumulent les mutations qui leur permettent de proliférer sans subir les divers contrôles normalement en place. Ces mutations sont de deux types: soit elles activent des gènes promoteurs de la croissance cellulaire qu'on appelle des oncogènes, soit elles inactivent des gènes suppresseurs de tumeur qui ont pour fonction de limiter la prolifération des cellules. Le plus souvent ces mutations ne se produisent que dans les tumeurs. Dans de rares cas de gènes suppresseurs de tumeurs, des mutations germinales peuvent entraîner une prédisposition au cancer, comme cela a été décrit pour le gène *WT1* dans le syndrome WAGR (*Wang et al., 1992*), ou pour les gènes *p53* et *Rb*. Dans leur grande majorité, les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs ne codent pas pour des facteurs de transcription, mais plutôt pour des molécules impliquées dans la transduction du signal (récepteurs aux facteurs de croissance), ou pour des kinases qui régulent l'activité des facteurs de transcription. Toutefois certains facteurs de transcription codés par des gènes suppresseurs de tumeur contiennent des mutations somatiques ou germinales à l'origine de la cancérisation. Le gène *Rb* code pour un facteur de transcription qui ne se lie pas directement à l'ADN mais se fixe et régule l'activité d'autres facteurs de transcription de type E2F. Les mutations ou les délétions germinales de *Rb* (qui prédisposent au rétinoblastome et peuvent être transmises de façon autosomale dominante) sont plus rares que les mutations ou délétions somatiques de ce gène (qui entraînent un risque multiplié par 500 de sarcome ostéogénique) (*Williams et al., 1994*). Les mutations germinales de *p53*, qui portent le nom de syndrome de Li-Fraumeni et prédisposent à des tumeurs multiples (*Malkin, 1994*), sont également très rares, alors que les mutations somatiques sont excessivement fréquentes (50% des tumeurs analysées contiennent une mutation de *p53*, d'après *Levine et al., 1991*). *p53* a la propriété d'activer la transcription de gènes qui codent pour des

enzymes impliquées dans la réparation de l'ADN après exposition aux UV ou à des carcinogènes chimiques.

Dans les leucémies et lymphomes, beaucoup de translocations chromosomiques sont retrouvées en plus des mutations, et portent souvent sur des gènes codant pour des facteurs de transcription. Par exemple dans le lymphome de Burkitt, près de 90% des cellules tumorales présentent une translocation t(8;14)(q24;q32) qui juxtapose le locus codant pour les chaînes lourdes d'immunoglobulines à un locus codant pour un facteur de transcription en hélice-boucle-hélice, c-myc (*Semenza, 1998*).

Ces quelques exemples illustrent l'importance des facteurs de transcription d'un point de vue clinique, même si pour l'instant les facteurs de transcription qui régulent l'expression de la GSTP1-1 n'ont pas été directement mis en cause dans la cancérogénèse.

3.4.2. Etude du promoteur du gène de la GSTP1

Morrow et al. (1992) ont étudié la structure du gène *GSTP1* codant pour la GSTP1-1. Ils ont ainsi déterminé que le gène comporte 7 exons et 6 introns s'étendant sur 2,8 kb. La région promotrice de ce gène laisse apparaître quatre motifs de régulation :

- Une TATA box située 29 pb en amont du point de départ de la transcription
- 2 séquences Sp1
- 1 séquence TRE

Un site potentiel de fixation de NF- κ B a également été impliqué dans la régulation de l'expression de la GSTP1-1 (*Xia et al., 1996*).

En outre l'extrémité 5' (de - 200 à - 1) du gène contient une région riche en C/G (79%).

Chez le rat, la régulation des GST a été très étudiée. Les sous-unités qui composent les différentes classes d'isoenzymes sont codées par des familles de gènes, comme chez l'homme, sauf pour la classe Pi pour laquelle, aussi bien chez l'homme que chez le rat,

les sous-unités sont codées par un seul gène. Les deux sous-unités qui composent la GST Ya chez le rat présentent 86% d'homologie dans la séquence en acides aminés par rapport à la GSTP1-1 (Dixon *et al.*, 1989). Pourtant le contrôle de l'expression de la GSTP1-1 diffère significativement de celle de son homologue chez le rat. La GST Ya n'est pas retrouvée dans les hépatocytes de rat, alors qu'elle est abondante dans les préneoplasies hépatiques ou dans les hépatocarcinomes. La GSTP1-1 est également absente des hépatocytes normaux de l'homme, toutefois on ne la retrouve pas dans les hépatocarcinomes. Les éléments *cis* sont retrouvés entre les nucléotides -1600 et -700, par rapport au site de début de transcription. Deux sites de fixation AP-1-like en tandem ont été identifiés entre les nucléotides -725 et -650, dans le promoteur du gène codant pour la GST Ya, où ils constituent un ARE (antioxidant response element). Les sites AP-1-like contenus dans le promoteur du gène GST Ya, étudiés individuellement, confèrent une activité de base au gène GST Ya plus faible qu'une séquence AP-1 consensus et ils ne sont pas inductibles par le TPA (Friling *et al.*, 1992). Toutefois les deux sites AP-1 imparfaits, à une courte distance l'un de l'autre, agissent de façon synergique pour former un ARE qui est inductible par les composés électrophiles et les antioxydants. Cette séquence ARE est précédée en 5' d'un site de fixation pour un facteur de transcription Ets qui pourrait augmenter l'inductibilité de la liaison aux sites de fixation AP-1. Les produits des gènes *ets* sont une famille de facteurs de transcription qui coopèrent avec d'autres protéines régulatrices pour l'activation de la transcription de promoteurs de divers gènes cellulaires ou viraux. Ainsi, la protéine Ets interagit de façon synergique avec les hétérodimères Fos/Jun qui se lient aux sites AP-1 pour augmenter l'induction de la transcription du gène GST Ya par la β -naphthoflavone (Bergelson *et Daniel*, 1994-1).

3.4.3. Les facteurs de transcription impliqués dans la régulation de l'expression de la GSTP1-1

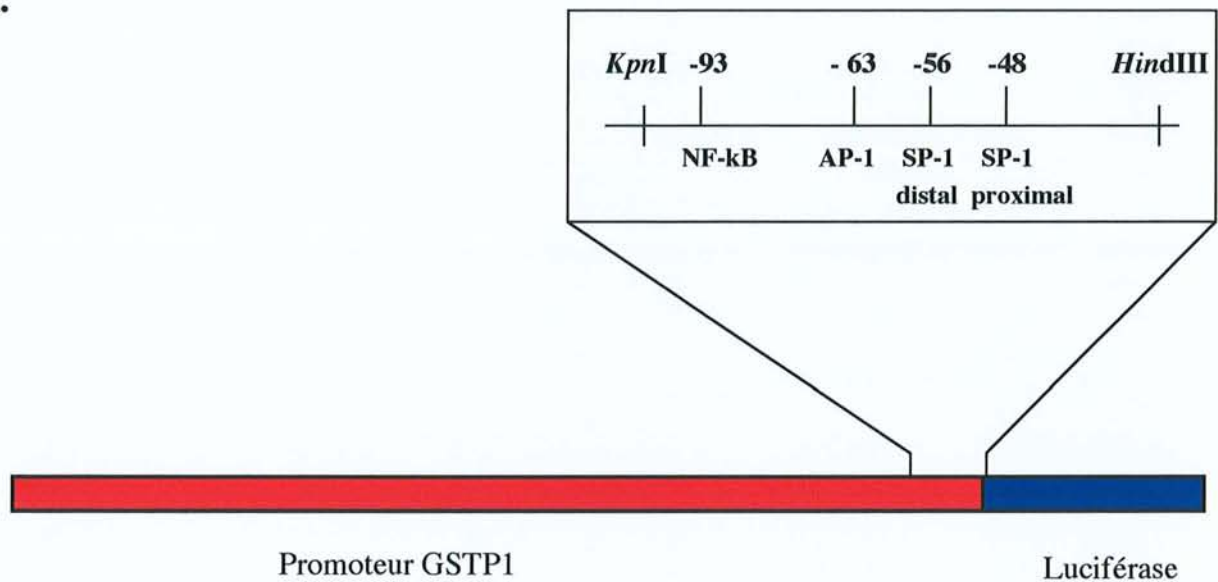
Un certain nombre de sites de fixation potentiels pour des facteurs de transcription ont été mis en évidence dans le promoteur du gène *GSTP1*, en particulier, deux sites de liaison pour Sp-1, un site de liaison pour AP-1 et un site NF-κB like (Figure 5).

AP-1

AP-1 a été initialement décrit comme un facteur de transcription qui permettait l'expression de gènes en réponse à la stimulation cellulaire par le TPA (12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate); on sait maintenant que la liaison de AP-1 est induite par un grand nombre de stimuli comme les facteurs de croissance, les cytokines, les neurotransmetteurs, le peroxyde d'hydrogène, les UV ou le stress cellulaire (*Whitmarsh et Davis, 1996*). AP-1 contrôle l'expression de nombreux gènes tels que celui de la collagénase, de la stromelysine, du TGF-1β ou de plusieurs cytokines. Les complexes AP-1 peuvent agir comme des régulateurs positifs ou négatifs de la transcription en se liant à leurs séquences cibles sur l'ADN ou par des interactions protéines/protéines (*Lieberman et al., 1998*). AP-1 est un hétérodimère composé des produits des membres des familles de gènes de réponse immédiate, *JUN* et *FOS*, ou un homodimère de protéines JUN. Les dimères Jun-Jun et Jun-Fos se lient préférentiellement à la séquence consensus appelée TRE (élément de réponse au TPA, 5'-TGAC/GTCA-3'), qui présente des homologies avec la séquence consensus de type ARE (élément de réponse aux antioxydants, 5'-TGACNNNGC-3').

La famille des facteurs de transcription AP-1 est une famille de protéines régulatrices à motif bZIP (basic region leucin zipper), composée d'homodimères et d'hétérodimères de Jun (c-Jun, Jun B, JunD), de Fos (c-Fos, FosB, Fra1, Fra2) ou de facteurs activant la transcription ATF/CREB (ATF-1, ATF-2, ATF-3, ATF-4, CREB-1 et CREB-2). Les protéines Jun forment des hétérodimères très stables avec les protéines Fos ou les

A.



B.

```

GCTTCCCCGG CCAGCTGCGC GCGACTCCG GGGACTCCAG GCGCCCCCTC TCGGCGCGA      -145
GCCCGGGGTG CAGCGGCCGC CGGGGCTGGG GCCGGCGGGA GTCGCGGGA CCCTCCAGAA      -85
                                         NF-κB
GAGCGGCCGC CGCGTGACT CAGCACTGGG GCGGAGCGGG GCGGGACCAC CCTTATAA      -25
                   AP-1           Sp-1           Sp-1
CTCGGAGGCC GCGAGGCCTT CGCTGGAGTT TCGCCGCCGC AGTCTTCGCCACCAAGTGAG      +36
AGCCGCGGCCCGCTCCCCGG GGATGGGGCT CAGAGCTCCC AGCATGGGGC CAACCCGCAG      +106
CATCAGGCCCC GGGCTCCCCG CAGGGCTCCT CGCCACCTC GAGACCCGGG ACGGGGGCC      +166
  
```

Figure 5 A : Structure du promoteur basal du gène de la GSTP1-1 avec les éléments de réponse AP-1, Sp1 et NF-κB. B : Séquence nucléotidique de la région promotrice du gène de la GSTP1-1.

La région surlignée est la région étudiée pour les retards sur gel. Les régions en jaune correspondent à des motifs de fixation de facteurs protéiques sur l'ADN (Morrow et al., 1989).

protéines ATF, et peuvent également former des homodimères, alors que les membres de Fos ne peuvent pas former d'homodimères (*Karin et al., 1997*).

L'activation de AP-1 est sous le contrôle de mécanismes transcriptionnels, post-transcriptionnels (phosphorylation) et post-traductionnels. La plupart des gènes qui codent pour les composants de AP-1 sont des « immediate-early » gènes, c'est-à-dire des gènes dont la transcription est très rapidement activée en réponse aux stimuli extracellulaires, sans que la synthèse de protéines *de novo* ne soit nécessaire (Figure 6).

Plusieurs éléments *cis* interviennent dans l'induction de *c-fos*:

- Ainsi un élément CRE permet l'induction de *c-fos* en réponse aux neurotransmetteurs et aux hormones, stimuli qui utilisent l'AMPc ou le Ca²⁺ comme seconds messagers pour activer respectivement la Protéine Kinase A ou la Ca²⁺/calmoduline Kinase (CaMK).
- Un autre élément localisé dans le promoteur de *c-fos* est appelé le Serum Response Element (SRE). Le Serum Response Factor (SRF), facteur de transcription de 67 kDa se fixe sur la séquence SRE en réponse à la stimulation par le sérum, les facteurs de croissance, les autres cytokines ou le stress cellulaire, ce qui induirait le promoteur de *c-fos*. Pour se fixer sur le site SRE, le SRF doit se lier au Ternary Complex Factor (TCF). Les protéines TCF, comme par exemple Elk-1, sont activées par phosphorylation par les MAPK (Mitogen-activated protein kinases), en particulier par ERK et JNK.
- Enfin un élément SIE (Sis inducible enhancer) permet l'induction de *c-fos* par fixation des facteurs de transcription STAT1 et STAT3 en réponse aux facteurs de croissance et aux cytokines qui activent les protéines kinases JAK. Cet élément SIE agit en coopération avec le SRE pour permettre l'expression de *c-fos* en réponse à divers stimuli comme le sérum, le TPA ou les facteurs de croissance (*Whitmarsh et Davis, 1996*).

En comparaison le promoteur de *c-jun* est beaucoup plus simple et la plupart des inducteurs de *c-jun* agissent par l'élément *cis* TRE. Cet élément est reconnu par les

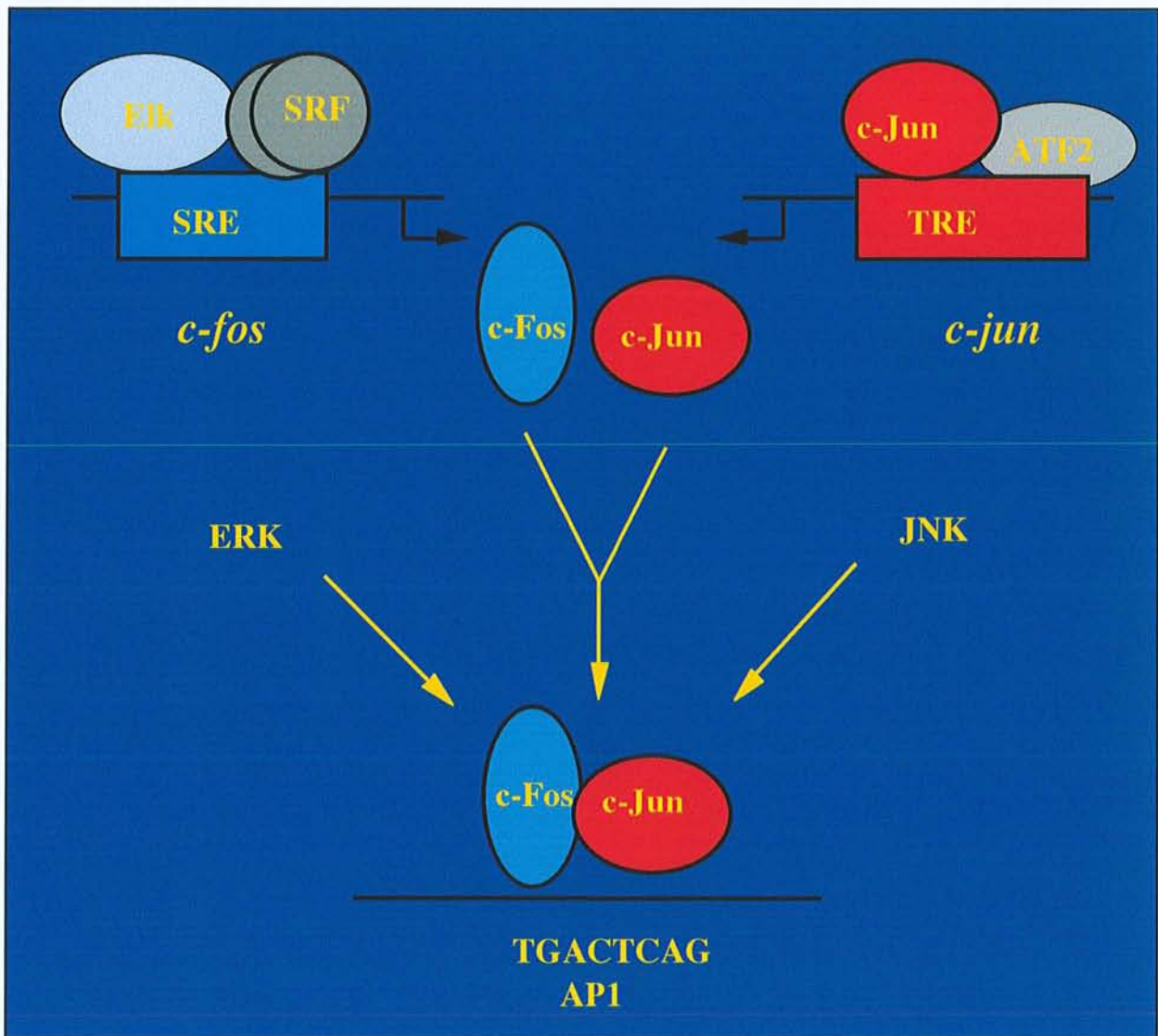


Figure 6 : Régulation de l'expression des facteurs protéiques c-Jun et c-Fos.

Dans le promoteur de *c-fos*, le SRE lie le facteur de transcription dimérique SRF et les facteurs ternaires Elk1 ou SAP-1. L'élément TRE situé dans le promoteur de *c-jun* lie préférentiellement les hétérodimères c-Jun/ATF2. C-Fos et c-Jun forment un hétérodimère AP-1 qui peut se fixer aux éléments de réponse de différents promoteurs de gènes. *D'après Whitmarsh et Davis, 1996.*

hétérodimères c-Jun/ATF2, ATF2 étant constitutivement exprimé dans les cellules. Le promoteur de *c-jun* chez l'homme contient deux éléments distincts TRE-like, appelés *jun1* et *jun2*. Ces deux éléments ont été impliqués dans l'activation de *c-jun* par de nombreux stimuli, en particulier par les espèces réactives de l'oxygène (Beiqing *et al.*, 1996). Très récemment Wong *et al.*(1999) ont mis en évidence une synergie entre le site AP-1/CRE du promoteur de *c-jun* et le site de liaison de Smad3-Smad4 situé dans la région 5' non traduite de ce promoteur. Après exposition aux stimuli qui activent les MAPK impliquées dans la cascade (JNK), c-Jun et ATF2 sont rapidement phosphorylés, ce qui conduit à l'induction de *c-jun* (Karin, 1996 ; Karin *et al.*, 1997). Le site TRE du promoteur de *c-Jun* est occupé de façon constitutive, ce qui signifie que c-Jun et ATF-2 sont phosphorylés directement sur leur site de liaison. Il en est de même pour *c-Fos*, puisque Elk-1 est phosphorylé alors qu'il est lié à l'ADN

L'activité des composants de AP-1 déjà existants ou néo-synthétisés est modulée par leur phosphorylation par les MAPKinases. La phosphorylation de c-Jun au niveau des Sérine 63 et 73 localisées dans le domaine effecteur de la protéine, potentialise sa capacité à activer la transcription du gène cible, soit sous forme d'homodimère, soit sous forme d'hétérodimère. Parmi les MAPKinases, seules les Jun-NH2 terminal kinases (JNK) phosphorylent efficacement c-Jun (Karin, 1996). La phosphorylation sur la Ser73 permet le recrutement d'une CREB binding protein (CBP) qui connecte le domaine phosphorylé activateur de c-Jun à la machine transcriptionnelle (Arias *et al.*, 1994). La déphosphorylation des résidus Thréonine 231, Sérine 249 (tous deux phosphorylés par la caséine kinase II) et Sérine 243 (phosphorylé par une ERK) est indispensable à l'activation de Jun. Cette déphosphorylation est assurée par une phosphatase activée par la PKC (Dalton *et al.*, 1999). La phosphorylation de la Thréonine 232 dans le domaine activateur de c-Fos potentialise l'activité transcriptionnelle de c-Fos, mais c'est une nouvelle protéine kinase FRK qui phosphoryle c-Fos (Deng *et Karin*, 1994).

Pour mettre en évidence les fonctions biologiques d'AP-1, différentes équipes ont étudiées le phénotype de souris dont le gène codant pour un des composants d'AP-1 a été modifié. Ainsi les souris qui n'expriment pas c-Jun ne sont pas viables et présentent des anomalies morphologiques du foie et un œdème généralisé. Celles qui n'expriment pas c-Fos survivent avec des défauts de maturation osseuses, des troubles de l'hématopoïese et du comportement. Au contraire une surexpression de c-Fos entraîne une transformation néoplasique des tissus osseux. Les souris qui n'expriment pas ATF-2 ont une forte mortalité post-natale, et présentent des anomalies de développement du squelette et du système nerveux central (*Whitmarsh et Davis, 1996*). AP-1 permet également de protéger les cellules contre les radiations UV: des fibroblastes qui n'expriment pas c-Fos ou c-Jun sont beaucoup plus sensibles aux UV (*Schreiber et al., 1995*). AP-1 joue un grand rôle également dans le contrôle de l'homéostasie des cellules sanguines par un effet sur l'apoptose, et dans la régulation du développement des progéniteurs hématopoïétiques; les études publiées à ce sujet ont mis évidence plusieurs points: les diverses étapes de la différenciation au sein d'une même lignée sanguine sont régulées par différents complexes AP-1, la différenciation des progéniteurs vers les différentes lignées se fait par des complexes AP-1 différents, et enfin il existe une redondance parmi les complexes AP-1 pour réguler les cellules myéloïdes (*Liebermann et al., 1998*). Toutefois, les gènes cibles de ces complexes AP-1 ne sont pas connus pour chaque effet observé.

ATF/CREB

Les facteurs de transcription de la famille ATF/CREB se lient à la séquence TGACGTCA appelée cAMP responsive element (CRE), qui contient une base supplémentaire par rapport à la séquence consensus TRE. Tous les facteurs de transcription de cette famille se lient à l'ADN sous forme homodimérique, mais ils peuvent également former des hétérodimères entre eux ou avec les membres de la famille AP-1. Ainsi *Dorsey et al. (1994)* ont montré que ATF-2 peut se lier à une protéine Jun (JunB ou JunD) pour former un complexe se fixant à l'élément AP-1. Il a aussi été mis en évidence dans les cellules HeLa que les dimères ATF-1/Fos peuvent se lier aux séquences AP-1 et CRE, et que ATF-1 peut moduler l'activité des complexes Jun/Fos en modifiant leur liaison à l'ADN et leur activité transcriptionnelle (*Chatton et al., 1994*). C'est également par phosphorylation sur les Thréonines 63 et 71 du domaine activateur N-terminal, qu'ATF-2 est activé pour stimuler la transcription. ATF-2 est phosphorylé par les JNK, comme c-Jun, et par la p38 MAPKinase (*Raingaud et al., 1995*).

Sp-1

Sp-1 est un facteur de transcription ubiquitaire, qui a d'abord été isolé dans les cellules HeLa. Sa fonction reconnue est de se lier à une ou plusieurs GC boxes 5'-GGGCGG-3' ou à GT/CACC, présentes dans le promoteur ou l'enhancer de nombreux gènes près du site de début de transcription. Ainsi lié à l'ADN, en coopération avec d'autres composants du complexe RNA polymérase, il initie la transcription. Sp-1 n'est pas le seul facteur qui se lie à ces éléments; les autres membres de cette famille contiennent également un domaine de liaison à l'ADN très conservé, composé de trois doigts de zinc. Lorsque le site de liaison de Sp-1 est éloigné du site de début de transcription, Sp-1 peut également se comporter comme un activateur de la transcription, indépendamment de son rôle dans l'initiation de la transcription, comme cela a été

montré dans le cas du gène du récepteur du thromboxane. Toutefois, dans ces circonstances, et comme cela a déjà été mis en évidence pour d'autres gènes, Sp-1 doit interagir avec d'autres facteurs de transcription pour être efficace (*D'Angelo et al., 1996*). Dans le promoteur du gène *GSTP1*, *Moffat et al. (1996-1)* ont montré que seul le site Sp-1 distal était nécessaire pour l'activation de la transcription du gène. Le stress oxydant inhibe la liaison de ce facteur de transcription à l'ADN. Ainsi le traitement de Sp-1 par le peroxyde d'hydrogène lui fait perdre sa capacité à se lier à l'ADN (*Ammendola et al., 1994*). Sp-1 est par ailleurs insensible à la méthylation de sa séquence ADN cible.

NF-κB

Des séquences de liaison NF-κB-like ont aussi été identifiées dans la région promotrice des gènes codant pour les GST. Le facteur NF-κB est un membre des protéines activatrices de la famille Rel. NF-κB est composé de deux sous-unités, p50 ou NFKB1 et p65 ou RelA, se trouvant dans le cytoplasme à l'état inactif par la liaison à des inhibiteurs tels que IκB-β, IκB-α, IκB-γ et bcl-3. NF-κB, une fois libéré de son inhibiteur, peut alors migrer dans le noyau et se lier à des séquences spécifiques sur le promoteur de gènes codant pour des protéines d'adhésion, des récepteurs membranaires, des cytokines.

In vivo, NF-κB peut être activé par de nombreux stimuli dont l'inflammation, la réponse immunitaire et l'apoptose. La présence d'antioxydants tels que la N-acétylcystéine, la pyrrolidine dithiocarbamate, la thiorédoxine, ou les vitamines C ou E, inhibe cette activation. Deux voies de mise en jeu de NF-κB ont été décrites dans la littérature. Dans la plupart des modèles cellulaires, NF-κB est activé après la dégradation de IκB, lequel est phosphorylé préalablement par les IκB kinases au niveau des résidus Sérine 32 et 36 (*Pando et Verma, 2000*). La phosphorylation de IκB entraîne son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome 26S. *Imbert et al. (1996)* ont réussi à mettre en évidence une activation de NF-κB indépendante des IκB kinases, en utilisant un modèle de

cellules T Jurkat. Dans ce cas, l'activation se fait par le stress oxydant ou le pervanadate. La phosphorylation de I κ B- α sur un résidu Tyrosine active NF- κ B mais sans dégradation protéolytique de son inhibiteur.

La séquence consensus de reconnaissance NF- κ B est composée d'un motif de 12 bases: 5'-GGG(A/G)(C/A/T)CT(C/T)(C/T)CCC-3'. Ainsi on retrouve la séquence, 5'-GGGACCCTCC-3', en position -98 à -89 du gène codant pour la GSTP1-1. L'expression de la GSTP1-1 peut être induite par le peroxyde d'hydrogène comme l'ont montré *Xia et al. (1996)*. Mais la régulation transcriptionnelle de la GSTP1-1 ne semble pas si simple puisque le site NF- κ B fonctionne comme un suppresseur dans le promoteur du gène, dans des cellules de tumeur mammaire humaine, les MCF-7 (*Moffat et al., 1996-2*). Il faut noter que les motifs NF- κ B et AP-1 sont distants de 20 pb permettant des interactions entre protéines.

3.4.4. La famille des facteurs de transcription NF-E2

Le facteur NF-E2 a été initialement décrit comme un facteur de transcription majeur des cellules érythroïdes, qui se lie à la séquence consensus TGCTGA(C/G)TCA(T/C) contenant un élément de réponse au TPA (*Kataoka et al., 1996*). NF-E2 est un facteur hétérodimérique composé d'une grande sous-unité p45 et d'une petite sous-unité p18 qui contiennent toutes les deux un motif b-Zip. La grande sous-unité appartient à la famille des facteurs de transcription CNC (pour cap and collar, identifié d'abord chez la drosophile). La petite sous-unité appartient aux protéines de la famille Maf. Chez la souris, la sous-unité p45 est spécifiquement exprimée dans les cellules érythroïdes, les mégacaryocytes et les mastocytes, tandis que trois protéines ont été récemment identifiées dans les cellules érythroïdes humaines, Nrf1/TCFII/LCR-F1, Nrf2 et NF-E2 (*Kobayashi et al., 1999*), mais NF-E2 est spécifique des lignées sanguines, tandis que Nrf1 et Nrf2 sont ubiquitaires. La sous-unité p18 du complexe NF-E2 est constituée par un des membres de la famille des petites protéines Maf, MafK, MafF et MafG, que l'on retrouve dans des lignées cellulaires hématopoïétiques ou non hématopoïétiques. En

l'absence de p45, les petites protéines Maf se lient à des facteurs de type AP1, et ces complexes reconnaissent alors les sites NF-E2 et empêchent l'activation transcriptionnelle des gènes contenant un site de fixation NF-E2. Une régulation transcriptionnelle positive ou négative peut donc être médiée par les sites NF-E2, en fonction des taux relatifs de p45, des protéines Maf, et des facteurs AP-1 (*Itoh et al., 1995; Kobayashi et al., 1999*). Nrf1 et Nrf2 sont essentiels à la régulation de l'expression du gène de la NADPH-QuinoneOxydoréductase 1 et à son induction par les xénobiotiques et les antioxydants, tandis que l'expression de base de ce gène est réprimée par la surexpression de c-Fos et de Fra-1 (*Venugopal and Jaiswal, 1996*). Chez la souris, les hétérodimères Nrf2/protéines Maf activent l'expression du gène NQO1 directement par fixation au site AP1. Nrf2 est essentiel à l'induction des enzymes de détoxification de phase II comme la NADPH-quinone oxydoréductase, ou la GST (*Itoh et al., 1997*). De nombreux gènes humains (collagénase, metallothionéine, interleukine 2), fixent ces facteurs de transcription agissant en trans sur le site AP-1 suite à une activation par les esters de phorbol (TPA).

3.4.5. Les voies de transduction du signal potentiellement impliquées dans l'activation du gène de la GSTP1

Les MAPK (mitogen-activated protein kinases) sont des sérine/thréonine protéines kinases qui jouent de très nombreux rôles dans de très nombreux types cellulaires. Elles sont elles-mêmes activées par phosphorylation sur les résidus thréonine et tyrosine. Il existe trois sous-familles de MAPK chez les mammifères: les ERK ou extracellular signal-regulated kinases, les JNK/SAPK ou c-Jun NH2-terminal kinase/stress activated protein kinases, et la p38 MAPK. Ces trois familles de protéines sont régulées par des voies de transduction différentes et ont des rôles différents (Figures 7).

1. Les ERK (Figure 7) sont activées par des facteurs de croissance, des cytokines ou les esters de phorbol et jouent un rôle dans la prolifération et la différenciation cellulaire. La stimulation des récepteurs à activité tyrosine-kinases active souvent une cascade mettant en jeu une MAPK/extracellular-signal-regulated kinase kinase kinase (ou MEKK) qui active à son tour une MAPK/ERK kinase (MEK) qui active une MAPK/ERK (Swantek *et al.*, 1997). La voie la plus étudiée met en jeu Raf, MEK1 ou MEK2, puis ERK1 ou ERK2, elle est activée en réponse à des facteurs de croissance comme l'Epidermal Growth Factor (EGF) ou le Platelet-Derived Growth Factor (PDGF). Il existe plusieurs protéines Raf ; ainsi c-Raf-1 active les ERK préférentiellement par MEK1, B-Raf active MEK1 et MEK2, et A-Raf active seulement MEK1 (Whitmarsh *et Davis*, 1996). On ne connaît pas la signification physiologique de cette activation différentielle des isoformes de MEK, puisqu'aussi bien MEK1 que MEK2 est capable d'activer ERK1 et ERK2. Il y aurait également une possibilité d'activer les ERK par la voie de la PKC, mais cette voie est controversée.

Avant cette cascade il y a mise en jeu de petites protéines G. Les petites protéines G telles que ras ou rho, peuvent adopter deux conformations selon la nature du nucléotide guanylique auquel elles sont momentanément associées. Ce sont des protéines

hétérotrimériques, composées des sous-unités α , β et γ . Lorsqu'elles sont liées au GDP, elles se trouvent sous une forme inactive. Elles peuvent alors interagir avec leurs facteurs d'échange, qui en libérant le GDP, favorisent la liaison au GTP et le passage vers la conformation active. Ce changement de conformation permet l'interaction spécifique avec des protéines dites effectrices qui vont déclencher ou poursuivre la cascade d'activation. La libération de $G\beta\gamma$ entraîne la phosphorylation de Shc et l'association de Shc, Grb2 et Sos, ce qui permet l'activation de Ras. Mais $G\beta\gamma$ peut aussi activer directement c-Raf-1, et des voies d'activation de ERK Ras-indépendantes mettant en jeu $G\alpha$ ont également été décrites, notamment dans le cas du récepteur muscarinique à l'acétylcholine M1 (Whitmarsh et Davis, 1996). La conformation GTP permet aussi l'interaction avec les protéines GAP (GTPase activating protein) qui vont activer l'hydrolyse du GTP et induire le retour à l'état inactif. La superfamille des protéines Ras sont des petites protéines G et sont nécessaires à l'activation de ERK par H_2O_2 dans différents types cellulaires, comme les cellules HeLa, Rat1, NIH3T3, PC12, ou les cellules musculaires lisses. Il faut signaler qu'on a identifié trois isoformes de ERK3 et une ERK4 dont la régulation n'est pas encore caractérisée. Une ERK5 activée par MEK5 a aussi été mise en évidence, mais elle ferait partie d'une nouvelle voie de transduction, distincte de celle des autres ERK (Zhou et al., 1995).

2. Les JNK/SAPK et p38MAPK (Figure 7) sont activées par double phosphorylation sur les résidus thréonine et tyrosine dans les motifs tripeptidiques Thr-Pro-Tyr ou Thr-Gly-Tyr respectivement, en réponse à des stress cellulaires (les radiations ultraviolettes, le choc osmotique ou le choc thermique) à des cytokines proinflammatoires comme le $TNF\alpha$ ou l'IL-1, ou à l'activation par des récepteurs couplés aux protéines G. Leur induction entraîne l'apoptose (Aikawa et al., 1997). La p38, dont il existe plusieurs isoformes (α , β , γ et δ), joue un rôle également dans la prolifération, la différenciation et la survie de différents types cellulaires. Ces effets très variés s'expliquent par les différentes cibles que la p38 peut phosphoryler, ainsi que par l'existence des différentes isoformes. La cascade impliquant la p38 consiste en une MEKK non encore identifiée

(qui pourrait être TAK1), qui active la MKK6, qui active ensuite les différentes p38. La MKK3 ne peut activer que les p38 α , p38 γ et p38 δ , alors que la MKK4 peut seulement activer la p38 α (Nebreda et Porras, 2000). L'activation des JNK nécessite la phosphorylation de deux résidus (Thr-183 et Tyr-185) par une JNKkinase, également appelée SEK1/MAPK kinase 4 (MKK4). MKK4 est activée par phosphorylation, qui peut être produite par différentes kinases, comme la MEK kinase 1 (MEKK1) (Wilhelm et al., 1997). Les MEKK qui activent les voies de la p38 et de JNK peuvent être régulées par les protéines G Rho, en réponse à l'IL-1 et au TNF- α . Ras peut aussi activer directement MEKK1.

Seuls Wilhelm et al. (1997) ont étudiés l'activation des JNK/SAPK par les agents alkylants comme le methyl methanesulfonate. Ceux-ci activent également la p38. Il s'avère que l'activation de ces MAPK est complètement inhibée par le traitement des cellules par le GSH ou la N-acétylcystéine, alors que la déplétion du pool intracellulaire en GSH par la BSO, inhibiteur de la GCS, entraîne la suractivation des JNK/SAPK et de la p38. Toutefois tous les agents alkylants ne sont pas capables d'activer ces MAPK, et les agents alkylants utilisés en chimiothérapie anticancéreuse n'ont pas été étudiés. Récemment des approches moléculaires et cellulaires ont montré que les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et les antioxydants pouvaient intervenir directement dans la transduction du signal et par voie de conséquence dans le contrôle de l'expression des gènes. Ces nouvelles voies de recherche font apparaître le lien entre les ROS en tant que signaux intra- ou extracellulaires, et les mécanismes moléculaires des maladies. Chez E.Coli, la régulation redox de la transcription passe par deux facteurs, SoxR (sensible à O₂^{*}) et OxyR (sensible à H₂O₂), qui activent les gènes de défense antioxydantes et ne fonctionnent qu'à l'état oxydé (Nunoshiba et al., 1993). Chez la souris, les espèces réactives de l'oxygène pourraient activer l'expression du gène de la GST Ya par l'intermédiaire de la liaison entre le complexe AP-1 hétérodimérique Fos/Jun et un élément EpRE situé dans la région promotrice du gène et composé de deux séquences adjacentes AP-1 like (Bergelson et al., 1994).

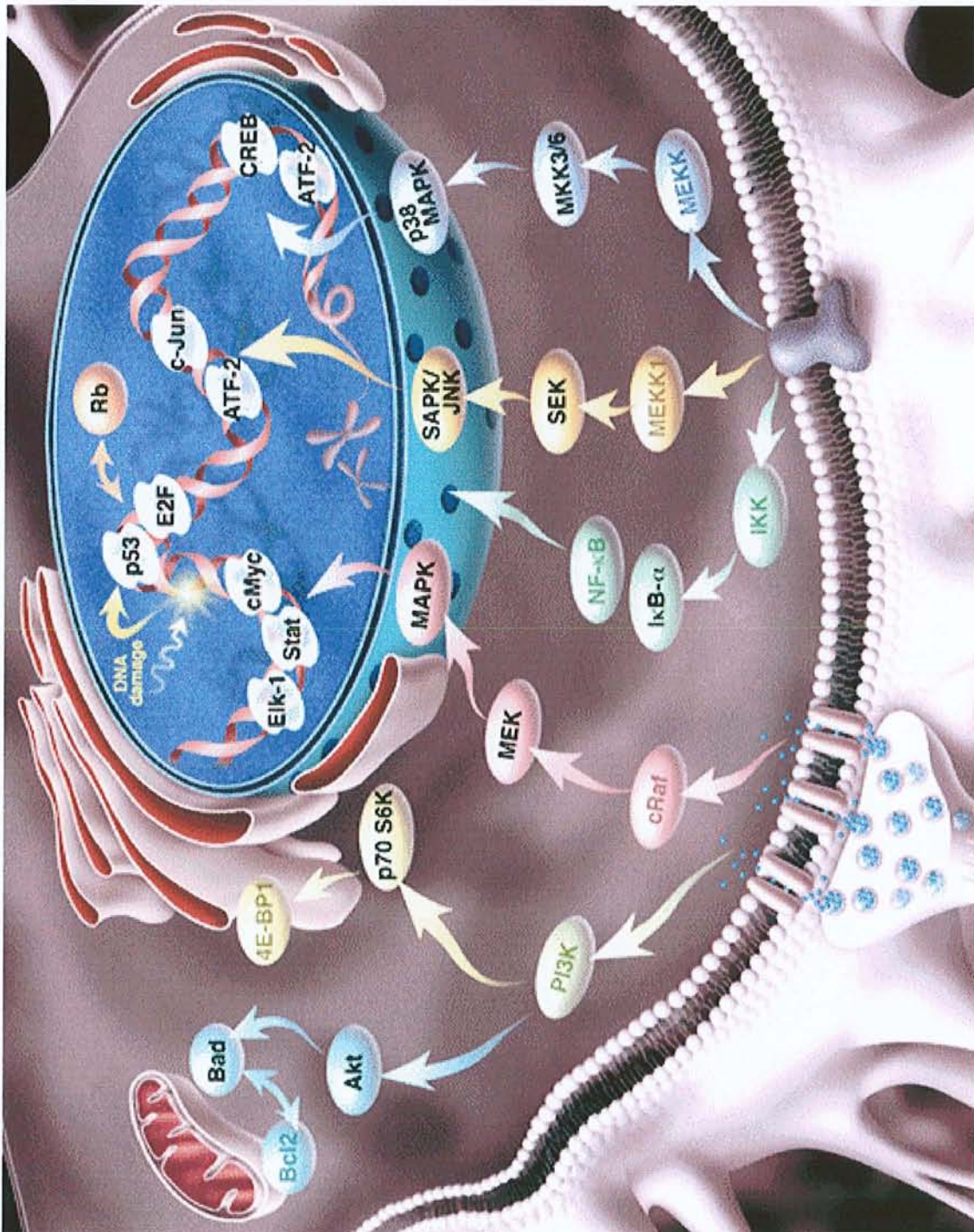


Figure 7 : La cascade de transduction.

Un signal extracellulaire déclenche une cascade de transduction qui est composée de plusieurs étapes : la fixation d'un agoniste à son récepteur membranaire active une GTPase qui active à son tour une MEKK; celle-ci active une MEK qui elle-même contrôle une MAPK. Cette cascade aboutit à l'activation de facteurs de transcription par les MAPK, lesquels vont se fixer sur l'ADN, afin de réguler l'expression de divers gènes.

4. MATERIEL ET METHODES

4.1 . Lignées cellulaires

Matériel

Nous utilisons plusieurs lignées cellulaires différentes provenant de l'American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD) (Tableau VI)

- K562, lignée continue établie à partir des cellules d'une leucémie myéloïde chronique en phase blastique terminale, prélevées dans le liquide pleural d'une patiente de 53 ans (*Lozzio et al., 1975*). Il s'agit de cellules indifférenciées, capables de s'orienter vers l'une des trois lignées circulantes: érythroïde, mégacaryocytaire ou monocyttaire. Les K562 possèdent le chromosome Philadelphie.
- U937, lignée issue de cellules malignes prélevées dans l'épanchement pleural d'un homme de 37 ans atteint d'un lymphome histiocytique diffus. Ces cellules expriment de nombreuses caractéristiques des monocytes, comme l'expression du récepteur au facteur C3 du complément et peuvent être induites vers la différenciation monocyttaire.
- Jurkat, lignée établie à partir des cellules périphériques d'un jeune garçon de 14 ans atteint d'une leucémie aigue T.
- Molt-3, lignée cellulaire provenant de cellules périphériques prélevées chez un jeune homme de 19 ans atteint d'une leucémie lymphoblastique T aiguë en rechute.
- Raji, lignée continue issue de cellules provenant du maxillaire d'un garçon de 11 ans atteint d'un lymphome de Burkitt.
- HEL, lignée provenant de cellules périphériques prélevées chez un homme de 30 ans atteint d'une érythroleucémie

Tableau VI : Lignées cellulaires utilisées pour l'étude de l'expression de la GSTP1-1 humaine.

Lignée	Type de leucémie	Marqueurs de surface	Type cellulaire
JURKAT	Leucémie à cellules T aigüe	CD2+, CD3+, CD4+, CD5+, CD6+, CD7+, CD8-, CD13-, CD19-, CD34+, TCRalpha/beta+, TCRgamma/delta-	cellule souche lymphoïde
K-562	Leucémie myéloïde chronique	CD3-, CD13+, CD19-, CD34-, CD41(+), CD42+, CD45+, CD71+, GlyA(+)	érythroblaste
HEL	Erythroleucémie	CD3-, CD13+, CD19-, CD41+, CD42+, CD71+, GlyA+	érythroblaste
U-937	Lymphome histiocytique	CD3-, CD13(+), CD14-, CD15+, CD19-, CD33+, CD34-, CD68+	monoblaste
MOLT-3	Leucémie lymphoblastique aigüe	CD2+, CD3(+), CD4+, CD5+, CD6+, CD7+, CD8+, CD13-, CD19-, CD34(+), TCRalpha/beta-, TCRgamma/delta-	thymocyte cortical
RAJI	Lymphome de Burkitt	CD3-, CD10+, CD13(+), CD19+, CD20+, CD37+, HLA-DR+, smIgG(+), cyIgG-, smIgM(+), cyIgM+, sm/cykappa-, sm/cylambda-	cellules préB intermédiaires

Milieux de culture: RPMI 1640 au rouge de pyrogallol contenant du glutamax et supplémenté en sérum de veau fœtal 10% (v/v) (GIBCO-BRL, Belgique)

Antibiotiques et antimycotique: 1% (v/v) (GIBCO-BRL, Belgique)

TPA (phorbol-12 Myristate-13 acétate) (Sigma, Belgique): solution stock à 1 mM dans le DMSO, conservée au congélateur à -80°C.

Méthode

Toutes les cellules sont cultivées dans un milieu liquide RPMI 1640, contenant 2 mg/ml de D-Glucose et du Glutamax (Glutamine stabilisée), auquel est ajouté extemporanément un mélange d'antibiotiques (Pénicilline 100 U/ml et Streptomycine 100 µg/ml) et d'antimycotique (amphotéricine B, 25 µg/ml). Les milieux sont supplémentés par du sérum de veau foetal à 10%. Les cellules sont incubées dans une étuve thermostatée à 37°C, saturée en humidité et équilibrée à 5% de CO₂. Les cellules sontensemencées à 50 000 cellules /ml pour les K562 et les U937, à 100 000 cellules /ml pour les Raji et les Jurkat, et à 200 000 cellules/ml pour les Molt-3. Pour le repiquage, tous les deux jours, les cellules sont centrifugées, lavées au PBS, puis réensemencées à la concentration initiale.

Avant traitement les cellules sont cultivées 24h dans du milieu contenant 0,1% de SVF. Puis les cellules sont traitées par le TPA 100 nM (solution stock à 1 mM dans du DMSO) pendant 15, 45, 120, 240 minutes ou 24h. Un témoin est constitué par les cellules traitées pendant 240 minutes par le DMSO 0,01%.

4.2 . Northern-blot

Matériel

- Les ARN totaux sont extraits par le réactif TRIzol (GIBCO-BRL, Belgique).
- Toutes les solutions sont préparées avec de l'eau traitée par le diéthyl-pyrocarbonate (DEPC, ICN, Belgique), puis autoclavées.

Tampon MOPS 10X (pH 7)

MOPS (acide 4-morpholino propane sulfonique)	0,2 M
Acétate de Sodium, pH 4	50 mM
EDTA, pH 8 (acide éthylènediamine tétracétique)	10 mM

Tampon de migration:

Tampon MOPS	1X
Formaldéhyde (Sigma, Belgique)	2%

Tampon échantillon:

glycérol	50%
EDTA	1 mM
Bleu de Bromophénol	0,5%

SSC 20X: pH ajusté à 7,0

NaCl	3 M
Citrate de Sodium	0,3 M

SDS 10%

Hybridation

Tampon Denhart's 50X:

Ficoll	0,5g/l
Polyvinylpyrrolidone	0,5g/l
Sérum albumine bovine	0,5g/l

Tampon de préhybridation pour sonde ADN

Formamide	50%
SSC	6X

EDTA	5 mM
SDS (sodium dodécyl sulfate)	0,1%
ADN de sperme de saumon	200 µg/ml (GIBCO-BRL, Belgique)
ARNt de levure	100 µg/ml (GIBCO-BRL, Belgique)
Denhart's	5X

Préparation des sondes

Fragment d'ADN génomique codant pour la GSTP1 humaine de 0,72 kb (American Type Culture Collection, Rockville, MD).

Sonde GAPDH (Clontech, Pays-Bas) correspondant à un fragment de l'ADNc de 1,0 kb.

RTS RadPrime DNA Labeling system (GIBCO-BRL, Belgique): ce kit de marquage requiert l'utilisation de [α -³²P]-dCTP.

[α -³²P]-dCTP (10 µCi/µl) activité spécifique: 3000 Ci/mmol (ICN, Pays-Bas).

Méthode

Préparation du gel

Agarose	1% dans de l'eau DEPC
Tampon MOPS 10X	20 mM
Formaldéhyde	2%
Bromure d'éthidium	7 µg/ml

Traitement des échantillons

La concentration d'ARN des échantillons est mesurée au spectrophotomètre à 260 nm (une unité de D.O correspond à 40 µg/ml d'ARN).

10 µg d'ARN totaux sont additionnés de:

MOPS 10X	2 µl
Formamide	10 µl
Formaldéhyde	3,5 µl
H ₂ O ad	20 µl

Le mélange est incubé à 55°C pendant 15 minutes puis additionné de 2 µl de tampon échantillon.

La migration des ARNs dans le gel d'agarose 1% se fait à 10V/cm pendant 6h ou pendant une nuit à 4V/cm.

Transfert des ARNs

Après électrophorèse, les ARNs sont transférés sur une membrane de nylon Hybond-N+ (Amersham, Pays-Bas) par un flux ascendant de SSC 20X.

La membrane est alors rincée deux fois dans du SSC 2X, puis séchée au four pendant 1h à 80°C.

Hybridation

La membrane (10 × 10 cm) est mise à préhybrider avec 10 ml de tampon de préhybridation à 42°C, sous agitation dans un tube pendant 2 à 4h dans un four à hybrider (Appligène, Strasbourg). La solution de préhybridation est ensuite remplacée par 10 ml de tampon de préhybridation qui contient la sonde radiomarquée. Le tube est remis au four pendant une nuit. La membrane est alors lavée de la façon suivante :

1 fois 5 min. à température ambiante avec SSC 2X, SDS 0,5%, sous agitation

3 fois 5 min. à température ambiante avec SSC 2X, SDS 0,1% sous agitation.

3 fois 30 minutes à 65°C avec SSC 1X, SDS 0,1%, sous agitation.

Rinçage 1 fois avec du SSC 2X.

Après les lavages, la membrane est mise en contact avec un film d'autoradiographie (Kodak, Sigma, Belgique) en présence d'écrans intensifiants.

Préparation des sondes

Le kit de marquage RTS Rad Prime utilisé permet un marquage rapide des sondes d'ADN. Il contient à l'état lyophilisé le fragment de Klenow de l'ADN polymérase I, les deoxyribonucléotides, les amorces composées d'octamères qui vont s'apparier de façon aléatoire au fragment d'ADNc de la sonde.

50 ng d'ADNc dans un volume de 45 μ l d'eau stérile sont dénaturés par chauffage à 100°C, puis refroidis dans la glace. Le kit est reconstitué avec l'ADN dénaturé et 5 μ l de [α -³²P]dCTP à 3000 Ci/mmol (10 μ Ci/ μ l). Le marquage de la sonde se fait pendant deux heures au bain-marie à 37°C. Les ADN simples brins s'hybrident de manière aléatoire avec les octamères dont les séquences correspondent à toutes celles qui sont possibles, et servent d'amorces pour l'ADN polymérase I. Les brins complémentaires d'ADN ainsi synthétisés ont incorporé le dCTP radiomarqué. La sonde radioactive est ensuite purifiée sur colonne (QIAGEN) et éluée.

4.3. Western-blot

Matériel

Tampon de lyse des cellules

Tris-HCl, pH7,5	50 mM
NaCl	150 mM
Detergent Mix (Pierce)	10%
Phényl méthyl sulfonyl fluoride	1 mM
Aprotinine	1000 U/ml
Leupeptine	30 μ g/ml
O-phénanthroline	1 mM

PBS-T : pour 1l de solution

PBS 10X	100ml
Tween 20	1ml

Tampon d'électrophorèse 10X qsp 1000 ml:

Tris	30 g
Glycine	144 g
SDS	10 g

Tampon de transfert 1X qsp 1000 ml:

Tris	3 g
Glycine	14,4 g
Méthanol	50 ml

Tampon échantillon dénaturant 2X (conservé en aliquots à -20°C)

Tris-HCl, pH6,8	0,125M
Glycerol	20% (p/v)
SDS	4% (p/v)
Bleu de Bromophénol	0,005% (p/v)
2-Mercaptoéthanol	5% (p/v)

Gel de polyacrylamide de concentration à 4%

Polyacrylamide (mono/bis 37,5 :1)	4%
Tris-HCl 0,5M, pH6,8	0,125M
SDS	0,1%
Persulfate d'ammonium	0,1%
TEMED (N,N,N',N',-tétraméthyl éthylène diamine)	0,05%

Gel de polyacrylamide de séparation à 10%

Polyacrylamide (mono/bis 37,5 :1)	10%
Tris-HCl 1,5M, pH8,8	0,375M
SDS	0,1%
Persulfate d'ammonium	0,1%
TEMED	0,05%

Kit de détection pour Western-blot ECL+ (Amersham-Pharmacia, Pays-Bas).

Anticorps dirigé contre la protéine GSTP1-1 (Clontech, Pays-Bas): anticorps polyclonal de souris.

Membrane de PVDF (Amersham-Pharmacia, Pays-Bas).

Méthode

Cette technique combine l'électrophorèse sur gel à une technique de détection immunochimique des protéines.

10⁶ cellules sont lysées directement dans 1 ml de tampon de lyse des cellules. Après 10 minutes à température ambiante, le lysat est centrifugé 10 minutes à 12000g à 4°C. La concentration protéique des échantillons est déterminée par dosage colorimétrique selon la méthode de *Bradford (1996)*. 5 µg de protéines totales sont additionnées de tampon échantillon dénaturant 2X puis portées à 100°C au bain-marie pendant 5 minutes. L'électrophorèse des échantillons est effectuée sous une tension de 70V(concentration)

puis sous une tension de 100V dans le gel de polyacrylamide à 10% (séparation). Après séparation les protéines sont transférées par électrophorèse sur une membrane de PVDF sous une intensité de 200 mA dans le tampon de transfert pendant 1h à 4°C. La saturation de la membrane est effectuée dans un tampon PBS-T additionné de 5% de lait écrémé Gloria sous agitation pendant 1 heure. La membrane est ensuite incubée pendant une nuit à 4°C avec l'anticorps primaire (à une dilution de 1/2000^e pour l'anticorps anti-GSTP1-1). La membrane est alors lavée dans du PBS-T 3 fois cinq minutes puis 2 fois 10 minutes. La membrane est incubée pendant 1h à température ambiante avec un anticorps secondaire (anti-souris pour la GSTP1-1 et dilué à 1/2000^e) couplé à la peroxydase de raifort. Après lavage on visualise la position de la protéine d'intérêt par le réactif chemiluminescent ECL+ et par exposition sur un film Kodak X-Omat.

4.4. Transfection des cellules

Matériel

- Plasmide pSV2Luc (Promega, Pays-Bas): ce plasmide exprime le gène de la luciférase sous le contrôle d'un promoteur SV40. Ces deux éléments ont été insérés dans le polylinker d'un plasmide pGEM3.

- Plasmide pCMV β (Clontech, Pays-Bas): il permet l'expression d'un gène qui code pour la β -galactosidase sous le contrôle d'un promoteur CMV. Il sert à standardiser les résultats de la transfection du pSV2Luc.

- pCRII Topo (Invitrogen, Pays-Bas): ce plasmide sert pour le sous-clonage du produit de la PCR permettant d'obtenir le promoteur *GSTP1* à partir d'ADN génomique humain.

- pGL3-Enhancer (Promega, Pays-Bas): ce plasmide sert de base pour la construction du vecteur d'expression pGST1128 qui contient le promoteur du gène *GSTP1* humain.

- Primers GST1 A-C et GST2 (Eurogentec, Belgique): ils servent à amplifier le promoteur de *GSTP1* à partir d'ADN génomique humain

GST1A : 5'-AAAAAGGATCCGGACCCTCCAGAAGAGCGG-3', région -97 à -79

GST1B : 5'-GGTACCTTTCCTTTCCTCTAAGCG-3', région -405 to -388

GST1C : 5'-GGTACCTCAACAGAAAGTAGGCAGCA-3', région -1184 à -1165

GST2: 5'-AAGCTTCGTACTCACTGGTGGCGAAG-3', région +21 à +39

(numérotation par rapport au site de début de transcription).

- Kit de transfertinfection (Bender Medsystems, Alexis Corp., Suisse)

- SssI méthylase, KpnI, HindIII (New England Biolabs, Pays-Bas)

- Tampon de lyse (Promega, Pays-Bas) pour lyser les cellules en vue de la mesure de la luciférase et de la β -galactosidase.

- Tampon de mesure pour l'activité β -galactosidase

phosphate de sodium (pH 7.3)	100 mM
MgCl ₂	1 mM
2-mercaptoéthanol	50 mM
<i>o</i> -nitrophényl-β-D-galactopyranoside	0.665 mg/ml

Méthode

Cette technique sert à étudier le rôle régulateur de certaines séquences de gènes dans un système cellulaire. Le vecteur d'expression est un hybride contenant un fragment du gène à étudier sous-cloné en amont d'un gène reporter et sous le contrôle d'un promoteur.

Construction des vecteurs d'expression

De l'ADN génomique humain a été extrait des cellules circulantes sanguines prélevées chez des donneurs de sang avec des colonnes Qiagen Genomic Tip System, selon les recommandations du fabricant. Les cellules sont d'abord lysées par un tampon du fabricant qui garde les noyaux intacts, en présence d'eau distillée à 4°C. Après centrifugation, les noyaux sont repris par un tampon d'incubation auquel est ajoutée de la protéinase K à 20mg/ml. L'incubation se fait à 50°C pendant 30 à 60 minutes, pendant laquelle les noyaux sont lysés et certaines protéines dénaturées. La solution est ensuite appliquée sur une colonne Qiagen préalablement équilibrée. La colonne est lavée trois fois, puis l'ADN est élué avant d'être précipité par l'isopropanol et lavé à l'éthanol froid à 70%.

Des primers GST1A, GST1B, GST1C et GST2 sont utilisés pour amplifier des fragments d'ADN de différentes tailles du promoteur minimal du gène *GSTP1* humain, selon les séquences déposées à GenBank (Numéro d'accèsion X08058) par *Morrow et al. (1990)*. La PCR a été réalisée sous un volume de 25 µl selon le schéma suivant: 95°C pendant 5 min, puis 30 cycles avec dénaturation à 95°C pendant 1 min, annealing à 57,5°C pendant 1 min, extension à 72°C pendant 90 sec. Les produits d'amplification ont été sous-clonés dans le plasmide pCRII-Topo appelé pCRII-GST-97, puis excisés par digestion enzymatique par *KpnI* et *HindIII* pour être clonés dans le plasmide pGL3-Enhancer déphosphorylé et linéarisé par *HindIII* et *KpnI*. Les constructions finales sont appelées pGST-97, pGST-396 et pGST-1175 (Figure 9). Le plasmide pGST-1175 a

ensuite été digéré par *KpnI*, *HindIII* et *Tth111*. Le fragment résultant purifié a été cloné dans le plasmide linéarisé par *KpnI* et *HindIII*. Cette construction est appelée pGST-516. Le plasmide pGST-396 a été à son tour digéré par *SmaI* et le fragment résultant a été cloné dans le plasmide pGL3-Enhancer linéarisé par *SmaI*. Cette construction est appelée pGST-143. La séquence des différentes constructions a été confirmée par un séquençage dans les deux sens.

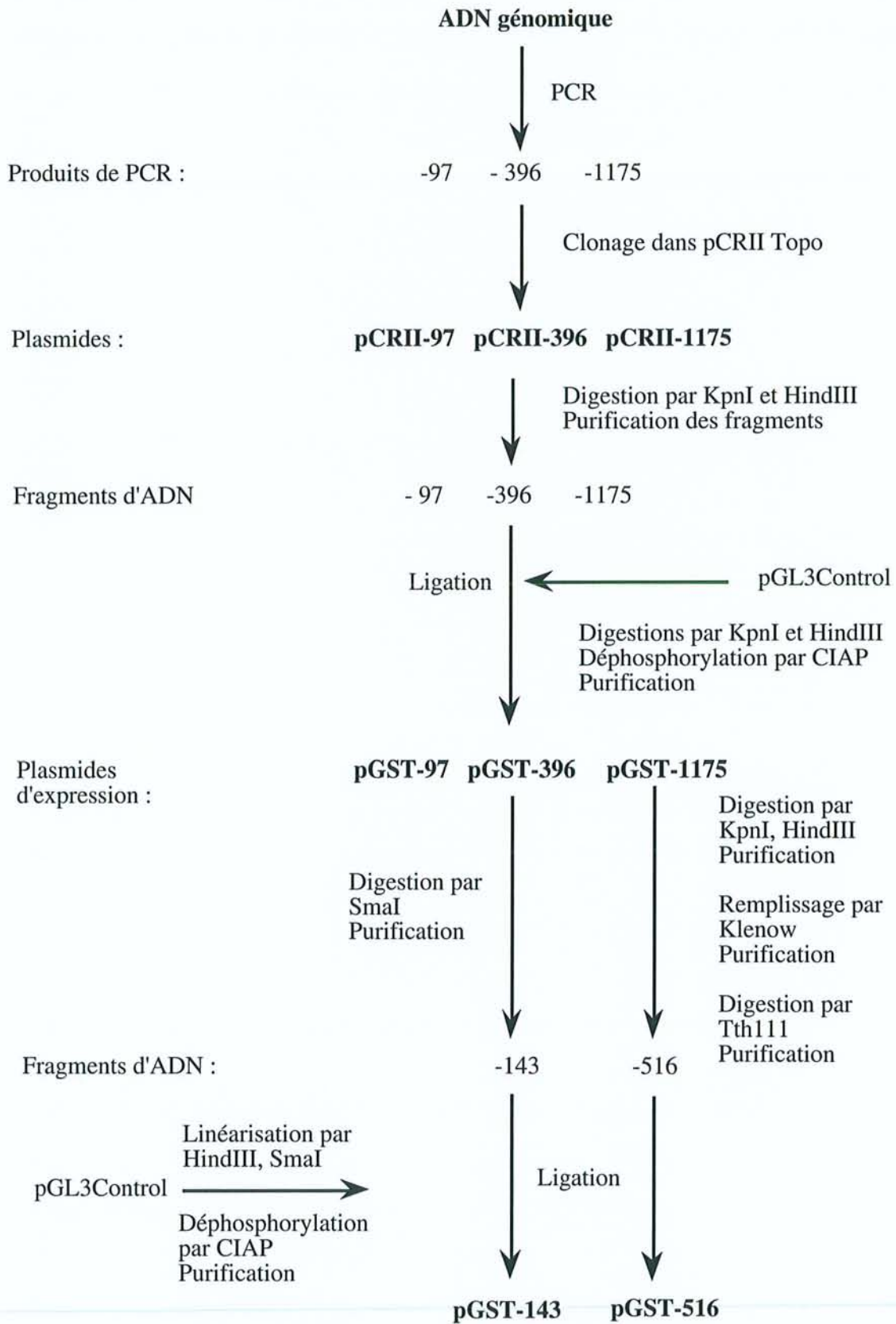


Figure 8 : Représentation schématique des différentes étapes de construction des plasmides d'expression transfectés dans les différentes lignées cellulaires.

Transfections

La transfection est réalisée par électroporation. La création de pores dans la membrane plasmique par un champ électrique permet à l'ADN plasmidique de pénétrer passivement dans le cytoplasme. Les conditions de transfection (temps, voltage, capacité) pour chaque type cellulaire ont été définies dans des travaux antérieurs au laboratoire (*Diederich et al., 1994 et 1995*). Les transfections des cellules K562, U937, Jurkat et Raji ont été réalisées grâce au BioRad Gene Pulser (Biorad Laboratories, Nazareth, Belgium). Une co-transfection est réalisée avec un plasmide qui code pour la β -galactosidase sous le contrôle d'un promoteur cytomégalovirus (CMV). Cette co-transfection sert à standardiser les résultats obtenus par la transfection du plasmide pSV2Luc.

Pour chaque expérience, 5×10^6 cellules à une concentration de 1.8×10^7 cellules/ml sont électroporées avec 20 μ g de plasmide-reporter et 8 μ g de plasmide pCMV β dans les conditions suivantes : 625 V/cm, 500 μ F et 20 msec (K562 et U937), 800 V/cm, 500 μ F et 20 msec (Jurkat), 775 V/cm, 960 μ F et 40 msec (Raji) dans un volume final de 300 μ l qui sont ajoutés aux cellules dans la cuvette d'électroporation. Les cellules sont ensuite transférées dans du milieu neuf complet, après prélèvement d'un aliquot pour l'évaluation du pourcentage de cellules mortes. Après 48h de culture, les cellules sont lavées avec du PBS puis lysées dans 300 μ l de tampon de lyse pour la mesure de l'activité luciférase et de l'activité β -galactosidase. L'émission de lumière résultant de l'activité luciférase est mesurée dans un luminomètre Turner par intégration du pic d'émission de lumière en 15 s à 25°C. L'activité β -galactosidase est mesurée avec 50 μ l de lysat cellulaire. Les résultats de chaque transfection sont normalisés par rapport à l'activité β -galactosidase exprimée par le plasmide contrôle pCMV β cotransfecté.

Tous les résultats sont exprimés par rapport à l'activité luciférase du plasmide pGL3-Contrôle, fixée arbitrairement à 100 %. Chaque résultat représente la moyenne \pm écart-type de trois expériences indépendantes de transfection. Les essais sont répétés deux fois.

Pour les transfections de constructions des plasmides méthylés, les cellules K562 ont été utilisées en phase exponentielle de croissance. 2×10^5 cellules (à 1×10^6 cellules/ml) ont été ensuite transfectées par endocytose médiée par la transferrine, selon les instructions du fabricant. Les cellules sont traitées pendant une nuit avec la desferrioxamine à $50 \mu\text{M}$. Le lendemain, $2 \mu\text{g}$ de chaque construction du plasmide pSV2Luc et $8 \mu\text{g}$ de plasmide contrôle pCMV β sont incubés avec le conjugué Transferrine-Polylysine (TPC) pendant 30 minutes à température ambiante. Les cellules sont centrifugées et resuspendues dans du milieu complet auquel on a ajouté de la desferrioxamine ($50 \mu\text{M}$) et de la Chloroquine ($0,1 \text{ mM}$). On mélange à volume égal la suspension cellulaire et le complexe TPC-plasmide qu'on laisse incuber pendant 4h à 37°C . Après la transfection, les cellules sont reprises avec du milieu complet à 37°C . Au bout de 48h, les cellules sont récupérées et resuspendues dans $300 \mu\text{l}$ de tampon de lyse, pour les mesures des activités de la luciférase et de la β -galactosidase (cf plus haut).

4.5. Etude de la méthylation

Matériel

- Extraction de l'ADN génomique avec des colonnes Qiagen Genomic Tip System 100/G ou 500/G (Westburg, Pays-Bas) selon les recommandations du fabricant.

Bisulfite de Sodium (Sigma, Belgique)

8-Hydroquinone (Sigma, Belgique).

- Purification de l'ADN modifié par colonnes Qiaex II (Qiagen, Westburg, Pays-Bas).

L'adsorption des acides nucléiques sur des particules de silice se fait en présence de fortes concentrations de sel. L'élution de l'ADN est réalisée avec des tampons à faible concentration saline de type Tris.

- Primers pour la PCR

GST1' -98 à -82: 5'-GGGATTTTTTTAGAAAGAG-3'

GST2' +19 à +37: 5'-TACTCACTAATAACRAAAA-3' avec R= A ou G.

Méthode

Il a été montré par *Frommer et al. (1992)* que sur de l'ADN simple brin, le bisulfite de sodium désamine préférentiellement les cytosines en uracyles, et dans une plus faible mesure, les 5-méthylcytosines en thymines. Les auteurs ont donc proposé d'utiliser cette différence de réactivité du bisulfite de sodium pour détecter les résidus 5-méthylcytosine par séquençage.

La modification de l'ADN des différentes cellules par le bisulfite a été réalisée selon la technique décrite par *Frommer et al.(1992)* et modifiée par *Feil et al. (1994)*. 5 µg d'ADN génomique de K562, Jurkat ou U937 sous un volume de 50 µl, ont été dénaturés par NaOH (10N) pendant 15 min. à 37°C. La modification par le bisulfite de sodium 5 M et l'hydroquinone 100 mM a été réalisée pendant 5 cycles de 1 heure, qui consistent en 3 min. à 95°C puis 57 min. à 55°C. Pour chaque lignée cellulaire, on a procédé à six modifications d'ADN indépendantes. Après double purification de l'ADN modifié sur une colonne QiaexII, le brin sens du promoteur *GSTP1* a été amplifié par PCR en utilisant les primers GST1' et GST2' (qui prennent en compte la conversion des bases par la modification au bisulfite). Les PCR ont été réalisées sous un volume de 25 µl selon la séquence suivante: prédénaturation à 95 °C pendant 5 min, dénaturation à 94 °C pendant 30 s, annealing à 51 °C pendant 1 min, et extension à 72 °C pendant 90 s, pendant 30 cycles. Les fragments amplifiés par PCR ont été sous-clonés dans le plasmide pCRII-Topo. Les clones positifs d'au moins trois PCR indépendantes ont été séquencés pour déterminer le profil de méthylation en utilisant le T7 sequencing kit. Après modification au bisulfite, les Cs correspondants à des cytosines non méthylées apparaissent comme des Ts au séquençage, alors que les cytosines méthylées apparaissent comme des Cs (Figure 9).

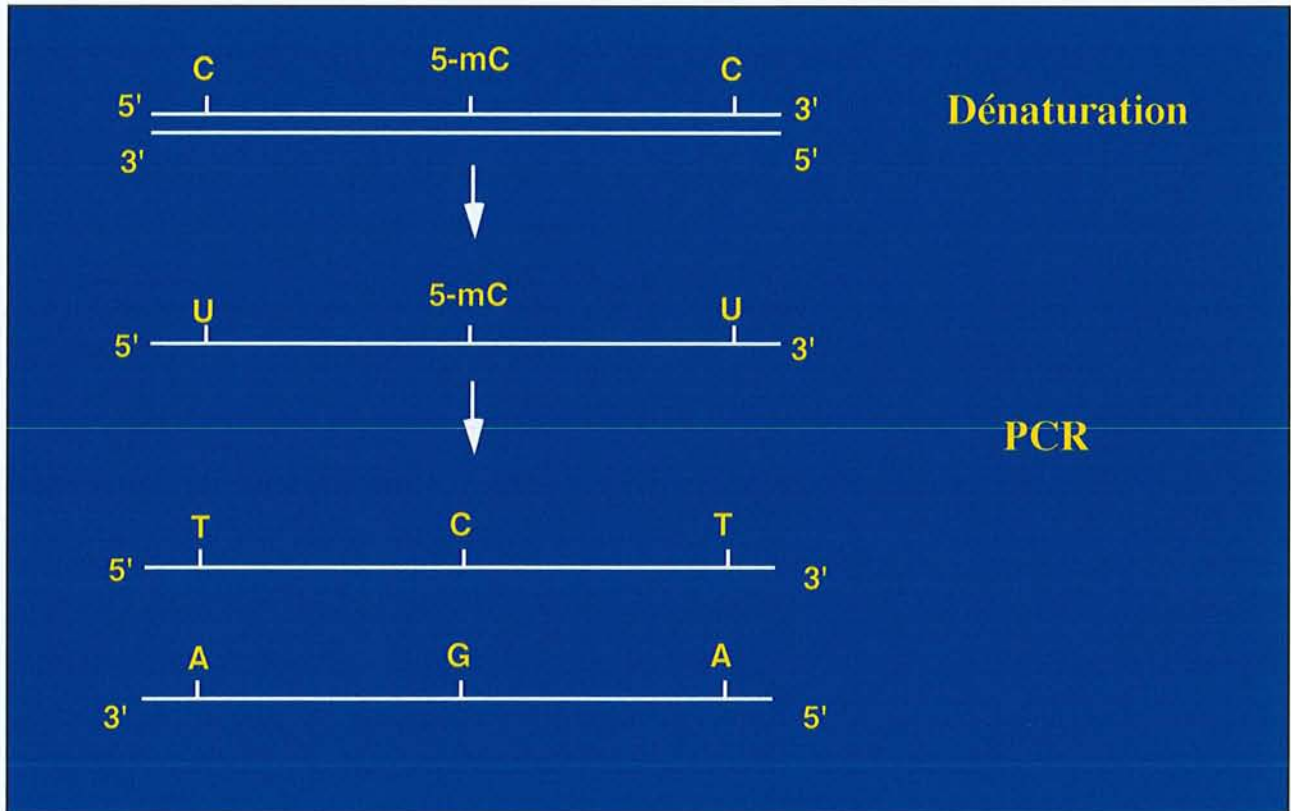


Figure 9 : Principe de la technique de modification au bisulfite de sodium

4.6 Séquençage

Matériel

T7 Sequencing Kit (Amersham Pharmacia).

[α -³³P]- dCTP (ICN, Pays-Bas).

Méthode

Le séquençage est basé sur la technique de Sanger en utilisant le T7 sequencing kit .

Nous avons utilisé l'amorce T7 en 3' du site de clonage multiple de pCRII-TOPO.

2 μ g d'ADN plasmidique ont été dénaturés avec NaOH 0,2 M pendant 10 min à température ambiante, puis l'ADN a été précipité à l'éthanol. Sur le culot, on a ajouté 1,6 pmol d'amorce ainsi que 10 μ l d'eau. La solution est dénaturée pendant 3 min au bain-marie à 100°C, puis refroidie dans la glace. On ajoute 2 μ l de tampon d'hybridation et le mélange est incubé à 37°C pendant 20 min, puis à température ambiante pendant 10 minutes.

L'enzyme T7 DNA polymérase est diluée de façon à travailler à une concentration de 5 U/ml. On prépare un mélange qui contient 2 μ l de l'enzyme diluée, 1,4 μ l d'eau, 3 μ l du C labelling mix (qui contient les dNTP) et 0,6 μ l de [α ³³P] dCTP.

On ajoute 6 μ l de cette solution au mélange d'hybridation et l'ensemble est incubé 5 min à température ambiante.

On ajoute à 4,5 μ l de ce mélange réactionnel, 2, 5 μ l de solution de chasse (ddATP, ddCTP, ddGTP ou ddTTP selon les puits) et l'ensemble est incubé pendant 10 min à 37°C. La réaction est arrêtée avec 5 μ l de solution dénaturante (xylène cyanol/bleu de bromophénol/formamide).

Un gel dénaturant de polyacrylamide à 4% (rapport acrylamide/bisacrylamide = 19/1) est coulé et les échantillons sont déposés après avoir été dénaturés 3 min à 80°C. La migration se fait pendant 2 h à 2500V et 30 mA.

Après migration, le gel est placé dans un bain d'acide acétique 10% pour éliminer l'urée puis séché à 80°C au four avant d'être exposé avec un film Kodak X-Omat.

Methylation des constructions plasmidiques

Tous les plasmides ont été méthylés par la *SssI* méthylase (*M.SssI*) qui méthyle toutes les cytosines au sein d'une séquence de reconnaissance double-brin 5'-CG-3'. 10 µg de plasmide pGST-97 ont été incubés avec 20 unités de *M.SssI* pendant 4h à 37°C en présence de *S*-adenosylmethionine (Solution stock 160 µM), tandis que 10 µg du même plasmide ont été méthylés à blanc en l'absence de *S*-adenosylmethionine pour servir de contrôle. Les plasmides méthylé et méthylé à blanc (même réaction sans *S*-adénosylméthionine) ont ensuite été digérés par *KpnI/HindIII* et reliqués.

La méthylation a été étudiée par digestion du plasmide pGST-97 méthylé et méthylé à blanc par *KpnI/HindIII*. Après digestion les fragments du promoteur ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose, purifiés et reliqués soit dans le plasmide méthylé, soit dans le plasmide méthylé à blanc de façon à obtenir des constructions partiellement méthylées.

4.7. Etude des facteurs de transcription

Matériel

Tous les produits chimiques proviennent de la firme ICN (Belgique), sauf en cas d'indication contraire. Les inhibiteurs de protéases proviennent de la société Roche (Allemagne).

Extraction des facteurs nucléaires

Tampon A (à préparer extemporanément)

Hepes pH 7,9	10 mM
KCl	10 mM
EDTA (acide éthylènediamine tétracétique)	0,1 mM
EGTA (acide éthylèneglycol tétracétique)	0,1 mM
Dithiothréitol (DTT)	1 mM
Phényl méthyl sulfonyl fluoride (PMSF)	0,5 mM
Aprotinine	1000 U/ml

Leupeptine	30 $\mu\text{g/ml}$
O-phénanthroline	1 mM

Tampon C (à préparer extemporanément)

Hepes pH 7,9	20 mM
NaCl	0,4 M
EDTA	1 mM
EGTA	1 mM
DTT	1 mM
Glycérol	20% (v/v)
Phényl méthyl sulfonyl fluoride	1 mM
Aprotinine	1000 U/ml
Leupeptine	30 $\mu\text{g/ml}$
O-phénanthroline	1 mM
Pepstatine	15 $\mu\text{g/ml}$

Marquage des sonde

Solution d'hybridation 5X

Tris pH 7,5	335 mM
MgCl ₂	65 mM
DTT	33 mM
EDTA	6,5 mM

Marquage par la Polynucleotide Kinase (Roche, Allemagne)

[α -³²P]-ATP activité spécifique: 7000 Ci/mmol (ICN, Belgique)

La purification de l'ADN marqué a été réalisée avec une colonne de silice "Qiaquick Removal Nucleotide kit" de QIAGEN (Westburg, Belgique), selon les recommandations du fabricant.

Retard de migration sur gel

Solution d'inhibiteurs de protéases (Roche, Allemagne)

DTT	0,5 mM
PMSF	0,5 mM
Aprotinine	1000 U/ml
o-phénanthroline	1 mM
Leupeptine	30 $\mu\text{g/ml}$

Solution de liaison pH final 8,0

Tris-HCl pH 8,5	50 mM
-----------------	-------

11. **NF-E2 p18** (sc-477) anticorps polyclonal de lapin dirigé contre un domaine carboxy-terminal de la protéine NF-E2 p18 de souris.

12. **Sp1** (sc-420) anticorps monoclonal de souris dirigé contre un domaine interne de la protéine Sp1 d'origine humaine.

Méthode

Extraction des facteurs nucléaires

L'extraction se fait selon la méthode décrite par *Schreiber et al. (1989)*, qui consiste à lyser les membranes plasmiques et nucléaires en milieu hypertonique en présence de détergent et de solutions salines contenant des inhibiteurs de protéases.

Toutes les manipulations doivent se faire à 4°C dès que les cellules sont récupérées de l'étuve de culture. 4×10^6 cellules sont centrifugées puis lavées avec du PBS 1X ; le culot est repris par 400 µl de tampon A et incubé dans la glace pendant 15 min. On ajoute ensuite 25 µl d'Igepal 10% et le mélange est vortexé 10 sec. puis centrifugé 1 min. à 10.000g à 4°C pour sédimenter les noyaux. Le culot est repris par 50 µl de tampon C et la suspension est agitée 15 min. à 4°C et centrifugée 5 min. à 10 000g à 4°C. Le surnageant qui contient les extraits nucléaires est congelé dans l'azote liquide et stocké à -80°C. Les protéines contenues dans l'extrait sont mesurées selon la méthode de *Bradford (1976)*, en utilisant la BSA comme protéine étalon.

Marquage des sondes

Les oligonucléotides utilisés pour les expériences de retard de migration sur gel avec la GSTP1-1 ont été décrits par *Moffat et al. (1996-2)*. Ils couvrent la région promotrice du gène *GSTP1*. Les séquences des oligonucléotides (S) utilisés pour les expériences de retard de migration sur gel, ainsi que leurs séquences complémentaires (AS) sont indiquées dans le tableau VII.

Tableau VII: Séquence des oligonucléotides utilisés pour les expériences de retard sur gel.

Les noms des oligonucléotides, les séquences et les séquences complémentaires, la position des oligonucléotides dans le promoteur *GSTPI* ainsi que la taille des oligonucléotides sont indiqués.

Nom des Oligonucléotides	Séquences	Positions dans le gène <i>GSTPI</i>	Taille (pb)
Prom-105	S AGTCCGCGGGACCCTCCAGAAGAGCGGCCGCGCCGIG <u>ACTCAGCACTGGGG</u> AS CCCCAGTGCTGAGTCACGGCGCCGGCCGCTCTTCTGGA GGGTCCC GCGGACT'	-105 à -54	52
Prom -85	S AGAGCGGCCGCGCCGIGACTCAGCACTGGGG AS CCCCAGTGCTGAGTCACGGCGCCGGCCGCTCT'	-85 à -54	32
Prom-73	S GCCGIGACTCAGCACTGGGG AS CCCCAGTGCTGAGTCACGGC	-73 à -54	20
Prom -61	S CACTGGGGCGGAGCGGGCGGGACCACCCT' AS AGGGTGGTCCC GCCCCGCTCCGCCCCAGTG	-61 à -32	30
Prom -53	S CGGAGCGGGCGGGACCACCCT' AS AGGGTGGTCCC GCCCCGCTCCG	-53 à -33	22
TRE gène humain de la collagénase	S CGCTTGATGACTCAGCCGGAA AS TTCCGGCTGAGTCATCAAGCG		21

NaCl	250 mM
EDTA pH 8,0	2,5 mM
Glycerol	20%
DTT	2,5 mM

Gel de polyacrylamide 5%

Polyacrylamide 30% (29 :1)	8 ml
TBE 10X	2,5 ml
Persulfate d'ammonium 10%	0,5 ml
TEMED	50 μ l

Anticorps pour les supershifts (Santa Cruz Biotechnology, SanverTech, Belgique)

1. **p-c-Jun** (sc-822) anticorps monoclonal de souris dirigé contre les acides aminés 56 à 69 de la protéine c-Jun humaine. Cet anticorps ne réagit qu'avec c-Jun phosphorylé sur la sérine 63.
2. **Jun B** (sc-8051) anticorps monoclonal de souris dirigé contre le domaine carboxy-terminal de la protéine JunB de souris.
3. **Jun D** (sc-74G) anticorps polyclonal
4. **c-Fos** (sc-8047) anticorps monoclonal de souris dirigé contre les acides aminés 210 à 335 de la protéine recombinante c-Fos humaine.
5. **Fra-1** (sc-605) anticorps polyclonal de lapin dirigé contre le domaine amino-terminal de la protéine Fra-1 de rat.
6. **Fra-2** (sc-171) anticorps polyclonal de lapin dirigé contre le domaine carboxy-terminal de la protéine Fra-2 humaine.
7. **Fos B** (sc-8013) anticorps monoclonal de souris dirigé contre les acides aminés 75 à 150 de la protéine FosB d'origine humaine.
8. **Nrf1** (sc-721) anticorps polyclonal de lapin dirigé contre un domaine carboxy-terminal de la protéine Nrf1 humaine.
9. **Nrf2** (sc-722) anticorps polyclonal de lapin dirigé contre un domaine carboxy-terminal de la protéine Nrf2 humaine.
10. **NF-E2** (sc-291) anticorps polyclonal de lapin dirigé contre un domaine carboxy-terminal de la protéine NF-E2 de souris.

1500 ng des oligonucléotides sens et antisens sont hybridés en présence de tampon d'hybridation 5X selon la séquence suivante:

dénaturation à 90°C pendant 5 min

65°C pendant 10 min

37°C pendant 10 min

20°C pendant 10 min

Les sondes double-brins sont alors marquées au ^{32}P par transfert de phosphate du $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP sur l'extrémité 5'-OH de l'oligonucléotide par la Polynucleotide Kinase.

200 ng de l'oligonucléotide double-brin sont mélangé à

2 μl de tampon kinase 10X

1 μl de Polynucléotide Kinase

2 μl de $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP (7000 Ci/mmol)

H_2O qsp 20 μl

Ce mélange est incubé 30 min à 37°C puis 10 min à 75°C. L'ADN marqué est purifié sur colonne de silice QIAGEN.

La quantité d'ADN marqué ainsi que la radioactivité de la sonde sont mesurées.

Retard de migration sur gel

Les extraits nucléaires sont incubés en présence des sondes radiomarquées; les complexes formés par liaison des protéines à l'ADN sont séparés par électrophorèse en gel d'acrylamide en fonction de leur poids moléculaire.

Environ 0,5 ng pour 1 μl de sonde sont incubés avec:

4 μl de solution de liaison

2,5 μl de poly[d(I-C)] à 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$

10 μg d'extrait nucléaire

solution aqueuse qsp 20 μl

Le poly[d(I-C)] permet d'éviter la formation de complexes non spécifiques

L'incubation se fait pendant 15 min. à température ambiante.

On ajoute 5 µl de tampon de dépôt avant la migration en gel de polyacrylamide dans du TBE 0,5X pendant 2h à 200V. Le gel est alors fixé dans un mélange acide acétique 10%/méthanol 20% et séché à chaud par aspiration sous vide. La révélation se fait par autoradiographie.

Pour les expériences de compétition, nous avons fait synthétiser des oligonucléotides correspondant aux sondes -73 et TRE avec des mutations sur le site AP-1/TRE.

TRE: CGCTTGATGACTCAGCCGGAA

TRE-MUT: CGCTTGATGACT**TGG**CCGGAA

-73: GCCGTGACTCAGCACTGGGG

-73-MUT: GGCCG**ATG**CTCA**AG**ACTGGG

Supershift

Les anticorps sont utilisés à une concentration de 200 µg d'IgG/0,1 ml. Ces anticorps ne donnent pas de réaction croisée avec les autres membres de la même famille de protéines.

Le gel de polyacrylamide est le même que pour le retard de migration.

Les extraits nucléaires (10 µg) sont préincubés avec 2 µg d'anticorps pendant 30 min à 4°C dans la glace dans le même mélange que précédemment mais sans la sonde radiomarquée. Ensuite, celle-ci est ajoutée et l'incubation est prolongée pendant 15 minutes à température ambiante. L'ajout de 5 µl de tampon échantillon termine la réaction et les échantillons sont déposés sur le gel de polyacrylamide. Les conditions de migration sont exactement les mêmes que précédemment.

5. RESULTATS

La GSTP1-1 est une enzyme clé dans l'oncogénèse, et cela à plusieurs titres. L'expression de cette enzyme est augmentée dans la plupart des cellules cancéreuses étudiées par rapport aux cellules saines, bien que dans certains types de tumeurs comme le cancer de la prostate, son expression soit complètement abolie. Toutefois, en l'état actuel des connaissances, on ne peut pas affirmer que la GSTP1-1 participe directement à la cancérisation, ou qu'elle n'est qu'un marqueur du processus tumoral. De par son appartenance à l'un des mécanismes de détoxification des xénobiotiques, le système du GSH, la GSTP1-1 est également impliquée dans la résistance à certains anticancéreux, son augmentation rendant les cellules tumorales moins sensibles à la chimiothérapie ou aux radiations. Il semble donc important de bien connaître les modes de régulation de l'expression de cette enzyme, aussi bien d'un point de vue fondamental pour mieux comprendre les mécanismes de la cancérogénèse, que d'un point de vue clinique pour une meilleure utilisation des anticancéreux. De nombreuses études ont déjà été menées sur la régulation de l'expression de *GSTP1*, par contre peu de travaux ont exploré cette régulation dans les leucémies et les lymphomes. Le but de notre étude est donc d'étudier la régulation de la transcription de la GSTP1-1 dans les cellules leucémiques en culture.

5.1. Expression de la GSTP1-1 dans différentes lignées leucémiques

Nous avons choisi pour notre étude cinq lignées cellulaires différentes correspondant à différents types de leucémies humaines (Tableau VI, Matériel et Méthodes) et représentant plusieurs étapes de la différenciation des cellules sanguines (Figure 10). Comme il existe des différences d'expression de la GSTP1-1 entre des cellules d'origine tissulaire différente ou de type tumoral différent, voire entre différentes lignées d'un même type de cancer (cas des cellules de cancer du sein MCF-7 et VCREMS) (*Morrow et al., 1996*), la première partie de notre travail a porté sur la

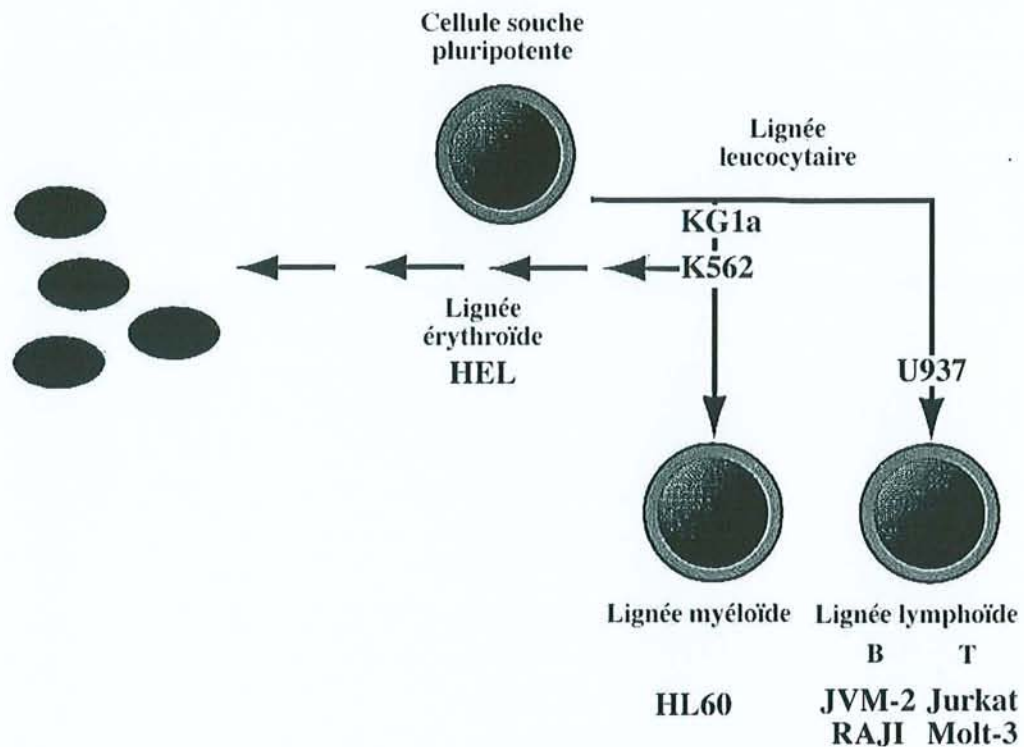


Figure 10 : Origine des lignées cellulaires utilisées.

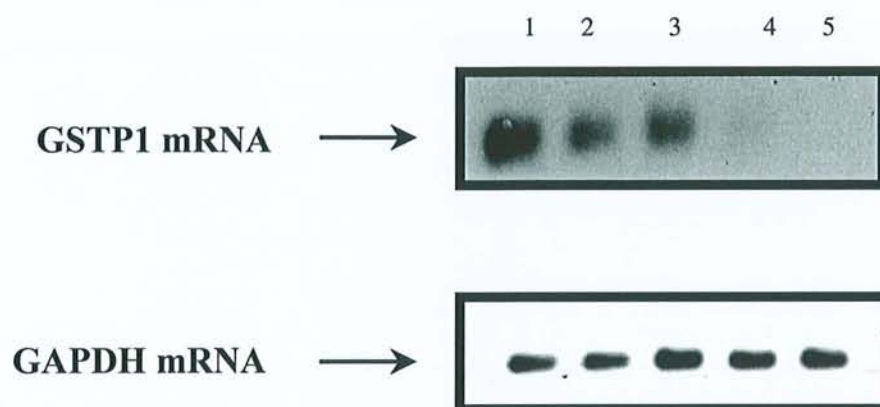
Les érythrocytes et les leucocytes dérivent d'une même cellule souche pluripotente. Celle-ci se différencie en 3 cellules différentes: les cellules pré-B et pré-T, qui donneront les lymphocytes B et T en se différenciant respectivement dans la moelle osseuse et le thymus, et les CFU-GEMM. Ces dernières se différencient à leur tour pour donner les différents progéniteurs leucocytaires qui donnent naissance aux lignées érythroïde et plaquettaire, aux polynucléaires neutrophiles, basophiles, éosinophiles et aux monocytes-macrophages.

5.1.1. Expression de l'ARNm de la GSTP1-1

Dans les différentes lignées leucémiques choisies pour notre étude, l'expression de la GSTP1-1 n'a pas encore été étudiée au niveau des ARNm. Après extraction des ARN totaux, 10 µg de chaque ARN ont été analysés par la technique du Northern blot en utilisant comme sonde l'ADNc de 0,72kb de la GSTP1-1. La figure 11 (A et B) montre que les lignées leucémiques expriment de façon différente l'ARNm de la GSTP1-1. L'ARNm de *GSTP1* est présent dans les cellules U937, les K562, les Jurkat, il est transcrit très faiblement dans les cellules Molt-3, et il est absent dans les cellules Raji. Ce résultat suppose que la transcription du gène *GSTP1* est dépendante du type cellulaire. Afin de standardiser les résultats, nous avons procédé à une deuxième hybridation de la même membrane avec une sonde spécifique de l'ARNm de la GAPDH. Les résultats obtenus ne montrent aucune différence pour la quantité d'ARNm de la GAPDH dans ces différentes lignées cellulaires, ce qui suggère bien que les variations d'expression de l'ARNm de *GSTP1* sont spécifiques des différentes lignées leucémiques étudiées.

Malgré le nombre réduit de lignées étudiées, il semble que l'expression de la GSTP1-1 soit caractéristique des cellules sanguines peu ou pas différenciées: en effet, la lignée Jurkat possédant des caractéristiques de cellule souche lymphoïde exprime l'ARNm de *GSTP1*, alors que la lignée Raji, correspondant à un lymphome de Burkitt, c'est-à-dire à des cellules nettement plus différenciées, n'exprime pas cet ARNm. Les cellules K562 et U937 sont également à un stade précoce de la différenciation, ces deux lignées pouvant être différenciées vers une des lignées sanguines par un traitement approprié. Par contre l'expression de la GSTP1-1 semble indépendante des voies myéloïde ou lymphoïde.

A.



B.

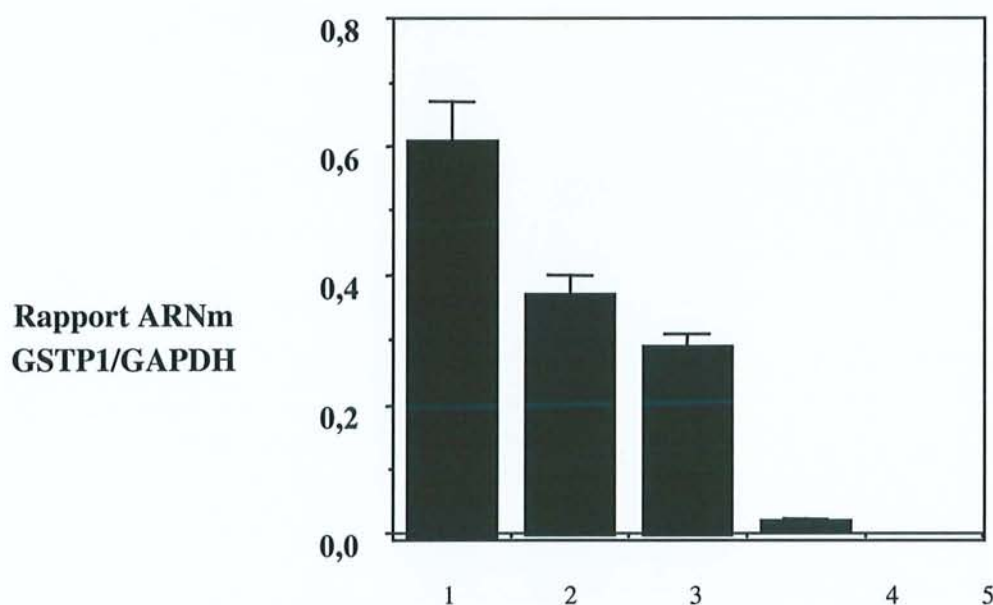


Figure 11 : Expression de l'ARNm de la GSTP1-1 dans les lignées cellulaires étudiées.

A : Les ARN totaux ont été extraits de 5 lignées leucémiques, analysés par la technique de Northern-blot, et hybridés avec une sonde d'ADNc humaine de *GSTP1*. (1) K562, (2) U937, (3) Jurkat, (4) Molt-3 et (5) Raji. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes. **B :** Après quantification du signal pour chaque ARNm (sur Cyclone, Canberra-Packard), le rapport des signaux obtenus pour les ARNm de GST et de GAPDH à chaque temps, est représenté.

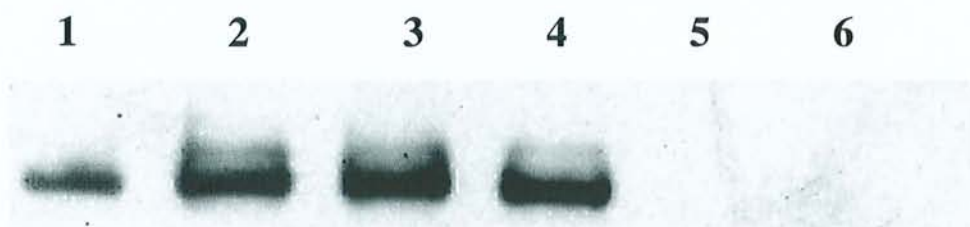
5.1.2. Expression de la protéine GSTP1-1

Par la technique du Western-blot, nous avons vérifié que les différences d'expression des ARNm de la GSTP1-1 sont corrélées à des différences d'expression de la protéine GSTP1-1. Les protéines ont été extraites selon la méthode décrite (voir matériel et méthode) et 5 µg de protéines ont été analysées par Western-blot avec un anticorps monoclonal anti-GSTP1-1. Les cellules Raji et les cellules Molt-3 n'expriment pas la GSTP1-1; par contre les cellules K562, Jurkat et U937, qui expriment l'ARNm de *GSTP1*, expriment également la protéine (Figure 12, pistes 1 à 6).

Nous avons ensuite étudié l'expression de la GSTP1-1 dans des lymphocytes provenant de patients atteints de leucémies. Ces cellules sont toutes des cellules de leucémie lymphoïde chronique de type B (CD5, CD20 et CD19 positives). Comme le montre la Figure 12 (pistes 7 à 11), elles expriment toutes la GSTP1-1.

Shea et al. (1988) avaient déjà étudié l'expression de la GST dans différents types de cancer (côlon, foie, mélanome, sein, rein, lymphome) et montré que la majorité des cellules tumorales expriment une GST correspondant à l'isoenzyme P1. Par contre la plupart des lignées tumorales étudiées dans cet article, en particulier les cellules Raji, n'expriment pas la protéine GSTP1-1. Bien que l'ensemble de leurs résultats ne constituent qu'un trop petit nombre de cas pour être représentatifs, ils ont émis l'hypothèse que les lignées pouvaient perdre le caractère d'expression de la GSTP1-1 au fur et à mesure des passages.

A.



B.

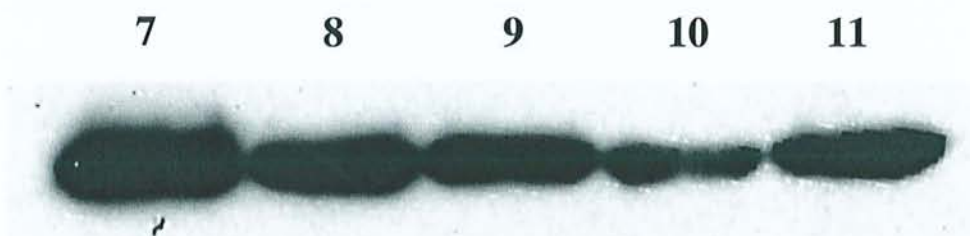


Figure 12 : Expression de la protéine GSTP1-1 dans différents types de cellules leucémiques.

Les protéines totales ont été extraites par lyse, puis analysées par western-blot à l'aide d'un anticorps monoclonal anti GSTP1-1 humaine. **A.** Autoradiographie des différents lignées leucémiques (1) HEL; (2) K562; (3) U937; (4) Jurkat; (5) HepG2; (6) Raji. **B.** (7 – 11) Autoradiographie de différents extraits protéiques de lymphocytes (CD5, CD19 et CD20 positifs) de 5 patients atteints de LLC-B.

5.1.3. Mesure de l'activité transcriptionnelle du promoteur *GSTP1*

Afin de vérifier que l'expression de l'ARNm de la *GSTP1-1* et de la protéine est associée à l'activité du promoteur de *GSTP1* dans les lignées leucémiques, nous avons réalisé une série de constructions insérant des fragments du promoteur du gène de la *GSTP1-1* en amont d'un gène reporter, la luciférase. Ces fragments du promoteur du gène de la *GSTP1-1* ont été obtenus par amplification par PCR à partir de l'ADN génomique humain ou par digestion par des enzymes de restriction à partir des fragments obtenus par PCR. La figure 13 résume l'ensemble des constructions obtenues, et montre la structure détaillée de ce promoteur avec les séquences de régulation préalablement mises en évidence (*Morrow et al., 1990; Moffat et al., 1996-2; Jhaveri et Morrow, 1998-2*).

Les constructions plasmidiques sont ensuite transfectées dans quatre des lignées leucémiques par électroporation. Toutes les transfections ont été réalisées au moins en trois exemplaires et les séries de transfection répétées plusieurs fois. Pour chaque expérience, 10 μ g d'une construction associant le gène de la β -galactosidase à un promoteur cytomégalovirus est co-transfectée pour vérifier l'efficacité de la transcription. Les mesures d'activité luciférase et β -galactosidase sont réalisées 48 heures après la transfection.

Dans les cellules K562 transfectées par la construction pGST-97, nous avons observé une augmentation de l'expression de l'activité luciférase de 1,2 fois par rapport aux cellules transfectées avec la construction témoin, c'est-à-dire le plasmide pGL3-Control (Figure 14). La transfection de cette même construction dans les cellules Jurkat et les cellules U937 a entraîné une augmentation de l'activité luciférase respectivement de 3 et 5,7 fois. Au contraire, après transfection de la même construction dans les cellules Raji nous observons une diminution de l'activité luciférase par rapport au témoin pGL3 Control.

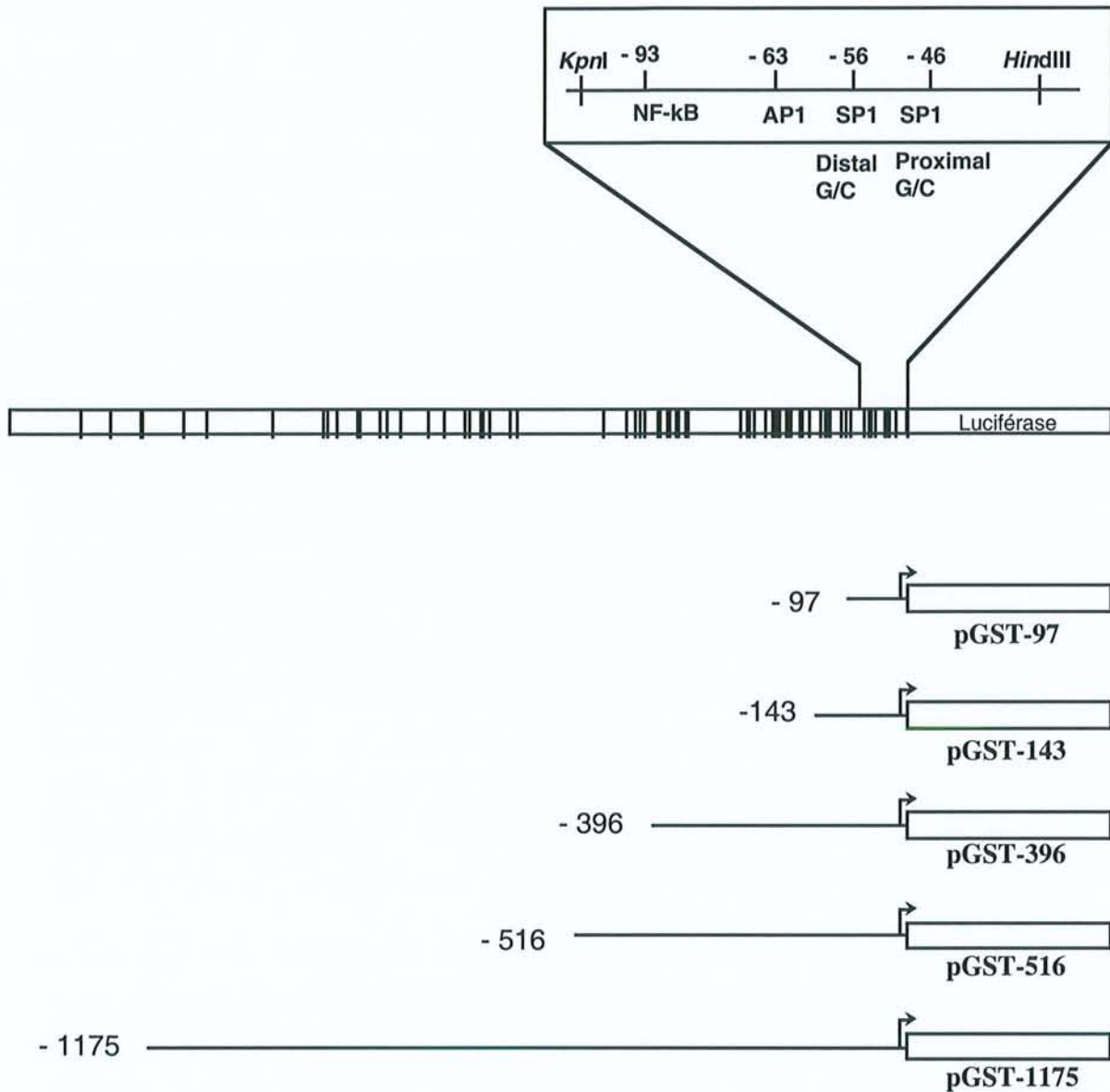


Figure 13 : Représentation des différentes constructions plasmidiques transfectées dans les lignées cellulaires.

A. Structure du promoteur basal du gène de la GSTP1-1 avec les éléments de réponse AP-1, Sp1 et NF-κB, et les dinucléotides CpG du promoteur du gène *GSTP1* : chaque trait vertical représente la position d'un dinucléotide CpG. **B.** Représentation schématique des différentes constructions plasmidiques obtenues.

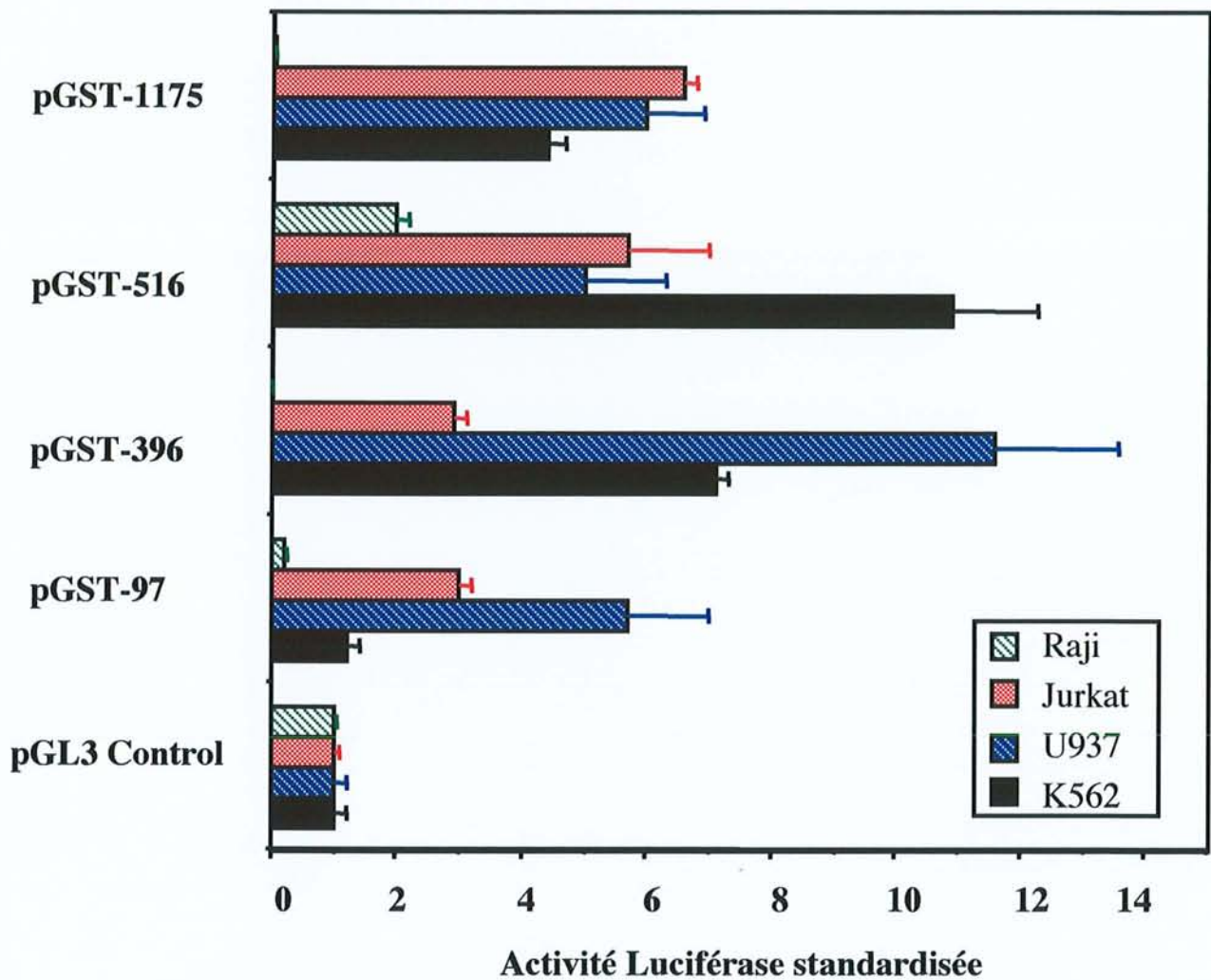


Figure 14 : Activité transcriptionnelle du promoteur *GSTP1* dans les lignées leucémiques humaines.

Chaque lignée cellulaire est transfectée avec un plasmide pGL3-enhancer; toutes les cellules sont co-transfectées avec un plasmide pCMV β d'expression de la β -galactosidase. Chaque barre de l'histogramme représente la moyenne \pm SD de trois expériences indépendantes.

Ces résultats montrent que les trois lignées (K562, Jurkat, U937) présentant une synthèse active d'ARNm de *GSTP1*, sont également capables de transcrire activement le gène reporter. La lignée K562 qui exprime un taux plus élevé d'ARNm présente une activité de transcription du gène reporter plus faible que celle des lignées Jurkat et U937. Cette observation pourrait peut-être s'expliquer par une stabilité plus grande des ARNm de K562 par rapport à celle des ARNm de Jurkat et de U937. Dans le cas de deux lignées humaines de cancer du sein qui présentent le même taux de transcription du gène *GSTP1* après transfection d'un minigène qui code pour la GSTP1-1, l'ARNm de la lignée HS578T qui exprime normalement la GSTP1-1 est beaucoup plus stable que l'ARNm qui code pour la GSTP1-1 dans les MCF-7 qui n'expriment pas normalement cette enzyme (*Jhaveri et al., 1997*).

Quant à la lignée Raji, elle ne présente que de faibles taux de transcription de la luciférase, ce qui est en accord avec les résultats du Northern blot obtenus préalablement. Toutefois l'activité du promoteur *GSTP1* des Raji n'est pas nulle dans la mesure où nous comparons nos résultats avec un promoteur SV40 possédant une activité basale élevée dans l'ensemble des lignées testées.

Les résultats pour cette partie de l'étude montrent :

- **que l'expression de l'ARNm de *GSTP1* ainsi que celle de la protéine GSTP1-1 est variable selon les lignées leucémiques**
- **que le promoteur minimal (contenu dans la construction pGST-97) du gène codant pour la GSTP1-1 est capable de contrôler l'expression d'un gène reporter lorsqu'il est transfecté dans différentes lignées leucémiques.**
- **que la lignée Raji exprime plus faiblement le gène reporter, ce qui est en accord avec les résultats obtenus par Northern blot ou par Western-blot.**

Lignées cellulaires leucémiques

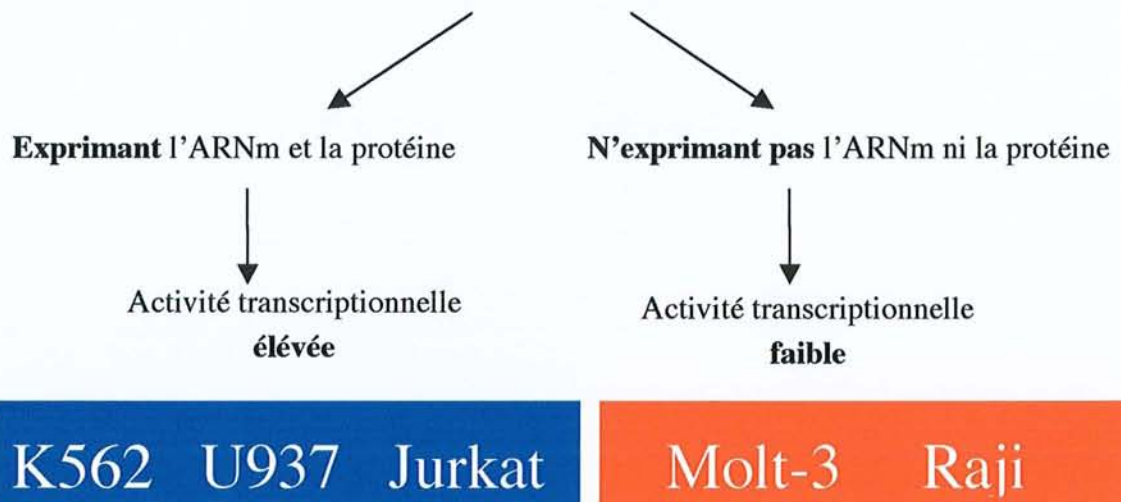


Tableau récapitulatif de la partie I

5.2. Etude de la méthylation de *GSTP1*

Une méthylation aberrante associée à une diminution de l'expression d'un gène suppresseur de tumeur a été décrite pour le gène von Hippel-Lindau, le gène du rétinoblastome, *BRCA1* ou p16 qui code pour un inhibiteur de kinase cycline-dépendante. La méthylation du promoteur *GSTP1* est un des mécanismes impliqués dans la régulation de l'expression de ce gène dans les cellules humaines de cancer du sein ou de carcinome rénal (*Jhaveri et Morrow, 1998-1; Esteller et al., 1998*).

Pour vérifier l'hypothèse selon laquelle la méthylation des résidus CpG régule l'activité du promoteur du gène *GSTP1* dans les cellules leucémiques, et pour déterminer si la méthylation de certains dinucléotides CpG est corrélée avec l'absence d'expression des ARNm dans certains types cellulaires, nous avons défini l'état de méthylation des 15 résidus CpG contenus dans le promoteur *GSTP1* pour les cinq lignées leucémiques qui expriment ou pas la *GSTP1-1*. L'étude de la relation entre la méthylation et l'activité d'un fragment du promoteur minimal de *GSTP1* de 136 pb dans la lignée K562 complète cet objectif.

5.2.1. Méthylation des sites CpG dans le promoteur *GSTP1*

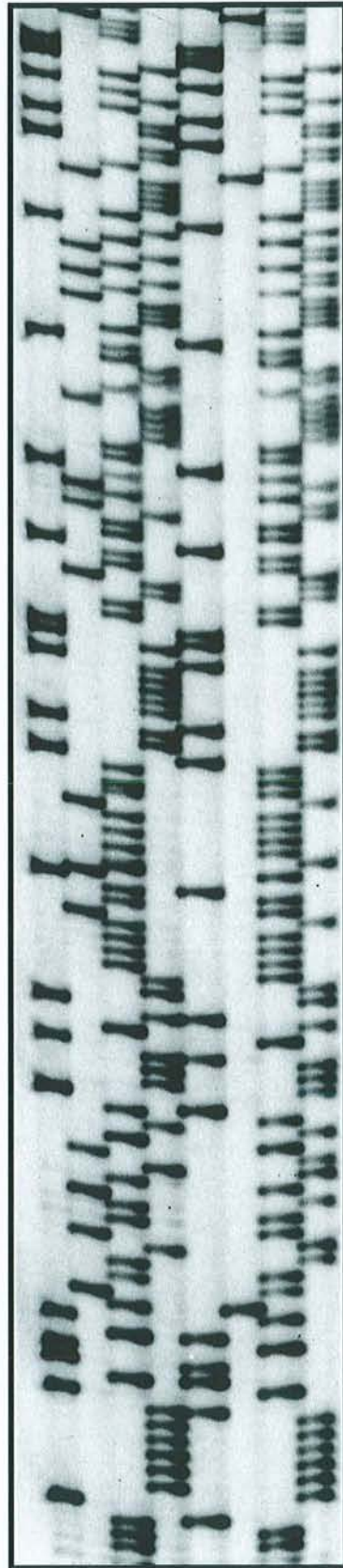
Notre hypothèse est que s'il existe une relation de cause à effet entre la méthylation et l'activité transcriptionnelle du promoteur du gène *GSTP1*, l'expression du gène doit s'accompagner de l'hypométhylation du promoteur *GSTP1*. Par exemple, la lignée K562 qui exprime des taux élevés d'ARNm du gène *GSTP1*, doit, selon notre hypothèse, présenter un promoteur non ou faiblement méthylé. L'étude de la séquence du gène a mis en évidence l'existence de quinze sites CpG dans le fragment de 136 pb du promoteur basal (de -98 à +37, par rapport au site de début de transcription) (Figure 15). L'ADN génomique des cellules K562 modifié par la technique du bisulfite est amplifié par PCR. Les fragments de PCR sont alors sous-clonés dans un plasmide

CpG 15 →
 CpG 14 →
 CpG 13 →
 CpG 12 →

 CpG 11 →
 CpG 10 →
 CpG 9 →
 CpG 8 →

 CpG 7 →
 CpG 6 →
 CpG 5 →

 CpG 4 →
 CpG 3 →
 CpG 2 →
 CpG 1 →



3'

5'

Figure 15 : Exemple d'une autoradiographie d'un séquençage typique de deux clones, après modification au bisulfite de la région amplifiée du promoteur *GSTP1* (brin complémentaire).

Toutes les cytosines ont été converties en thymine tandis que les cytosines méthylées apparaissent comme des cytosines. A gauche tous les CpG sont méthylés (cellules Raji); à droite ils sont majoritairement non méthylés (cellules K562).

pCRII-Topo, puis séquencés (Figure 15). Après modification au bisulfite et amplification, les cytosines qui sont non méthylées avant la modification, apparaissent comme des thymines, tandis que les cytosines qui étaient méthylées apparaissent comme des cytosines sur le gel de séquençage. Le profil de méthylation pour chacune des cinq lignées leucémiques a ainsi été déterminé. Pour effectuer une détermination la plus précise possible, nous avons séquencé de 18 à 27 clones provenant de 3 réactions de PCR indépendantes (Warnecke et Clarck, 1999). Pour chaque clone séquencé, la présence ou l'absence d'une cytosine méthylée au sein des 15 dinucléotides CpG du promoteur a été notée. Pour déterminer s'il existe une différence significative entre les profils de méthylation des 5 lignées leucémiques, nous avons comparé le nombre de sites CpG méthylés, défini pour chaque clone.

Les résultats montrent que l'ADN de toutes les lignées est méthylé à des degrés élevés.

- Les cellules K562 (Tableau VIII), qui expriment la GSTP1-1, présentent un fort degré de méthylation (66,5 %).
- Les cellules Raji (Tableau IX), qui n'expriment pas la GSTP1-1, montrent un pourcentage plus élevé de méthylation (90 %), ce qui suggère que l'inactivation du promoteur et l'absence d'ARNm dans ces cellules pourraient être une conséquence de la méthylation. Un taux élevé de méthylation (82,4 %) est également retrouvé pour l'ADN de la lignée Molt-3 (Tableau IX), qui n'exprime que de très faibles quantités d'ARNm de *GSTP1*.
- Les deux autres lignées Jurkat et U937 (Tableau VIII) qui expriment de façon active l'ARNm de la GSTP1-1, présentent aussi un fort pourcentage de méthylation (respectivement 87,4 % et 90,6 %).

Ces résultats suggèrent que le statut de méthylation du promoteur de 136 pb n'est pas le seul mécanisme qui entre en jeu pour activer ou inhiber la transcription du gène *GSTP1* dans les cellules leucémiques et que le profil de méthylation n'est pas un bon marqueur pour présager de l'expression de la GSTP1-1 dans une lignée cellulaire.

Tableau VIII: Etat de méthylation de l'ADN de différents clones provenant de lignées cellulaires qui expriment la GSTP1-1

Lignée Cellulaire	Site CpG (N°)															Nombre de sites méthylés
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
K562	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	1
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	1
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	1
	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	2
	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	2
	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	2
	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	14
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15
Total (%)	84	63	63	63	58	63	63	63	63	63	63	63	63	63	100	
Jurkat	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	2
	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	8
	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	9
	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	10
	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	12
	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	13
	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	13
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	14
	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	14
	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	14
	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	14
	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	14
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15
	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15
	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15
Total (%)	100	88	88	88	60	84	76	88	88	92	92	92	92	84	100	

Tableau VIII suite: Etat de méthylation de l'ADN de différents clones provenant de lignées cellulaires qui expriment la GSTP1-1

Lignée Cellulaire	Site CpG (N°)															Nombre de sites méthylés
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
U937	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	4
	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	7
	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	10
	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	12
	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	13
	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	13
	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	13
	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	14
	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	14
	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	14
	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	14
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	14
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	14
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	14
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	14
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15
Total (%)	100	100	92,6	96,3	70,4	81,5	85,2	92,6	92,6	88,9	88,9	92,6	92,6	88,9	96,3	

Chaque ligne horizontale représente un clone séquencé; les séquençages ont été réalisés en triple exemplaire à partir de PCR indépendantes dont les résultats ont été combinés pour chaque lignée cellulaire. (+) : site méthylé et (-) : site non méthylé; Total (%) : moyenne du taux de méthylation de tous les clones séquencés pour chaque site CpG.

Tableau IX : Etat de méthylation de l'ADN de différents clones provenant de lignées cellulaires qui n'expriment pas la GSTP1-1

Lignée cellulaire	Site CpG (N°)															Nombre de sites méthylés
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
Molt-3																
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	2
	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	5
	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	8
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	14
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	14
	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	14
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15
Total (%)	94,5	89	83,5	89	78	83,5	83,5	78	83,5	78	78	78	78	67	94,5	
Raji																
	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	3
	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	7
	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	10
	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	11
	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	12
	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	13
	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	13
	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	13
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	14
	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	14
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	14
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15
Total (%)	96,3	96,3	92,5	88,9	88,9	81,5	81,5	88,9	92,5	92,5	92,5	92,5	92,5	81,5	92,6	

Chaque ligne horizontale représente un clone séquencé; les séquençages ont été réalisés en triple exemplaire à partir de PCR indépendantes dont les résultats ont été combinés pour chaque lignée cellulaire. (+) : site méthylé et (-) : site non méthylé; Total (%) : moyenne du taux de méthylation de tous les clones séquencés pour chaque site CpG.

Un grand nombre de clones (issus de trois réactions de PCR différentes à partir de l'ADN extrait des différentes lignées cellulaires) provenant des cellules qui expriment la GSTP1-1, présentent toujours un même dinucléotide CpG déméthylé, localisé au sein du site Sp-1 distal. La déméthylation de ce dinucléotide CpG est beaucoup moins fréquente dans les clones provenant des cellules qui n'expriment pas la GSTP1-1. L'analyse statistique a mis en évidence une différence significative ($p < 0.01$) entre le groupe de cellules exprimant la GSTP1-1 (K562, Jurkat et U937) (Tableau VIII) et le groupe des cellules qui n'expriment pas ou très peu cette enzyme (Molt-3 et Raji) (Tableau IX) pour la méthylation de ce site CpG. Ces données indiquent que la déméthylation du dinucléotide CpG situé dans le site Sp-1 distal pourrait être important pour l'expression du gène *GSTP1*.

5.2.2. Méthylation et activité transcriptionnelle du promoteur *GSTP1*

Pour étudier les effets de la méthylation des CpG sur l'activité transcriptionnelle, nous avons comparé la capacité du promoteur basal *GSTP1* méthylé *in vitro* ou méthylé à blanc à induire la transcription d'un gène reporter dans des cellules K562 transfectées de façon transitoire. Pour méthyler la construction en entier, nous avons utilisé la *SssI* méthylase, qui méthyle tous les dinucléotides CpG. La comparaison des résultats entre les plasmides reporters méthylé et non méthylé, montre que la méthylation réduit l'expression du gène reporter de plus de 96,4 % de l'expression du plasmide reporter non méthylé quelque soit la lignée cellulaire étudiée (Figure 16).

Toutefois, le plasmide lui-même contient un certain nombre de sites CpG méthylables par la *SssI* méthylase. Nous avons voulu savoir quelle est la part de la méthylation du plasmide lui-même, par rapport à celle du promoteur basal, qui est responsable de la diminution de l'expression du gène reporter. Nous avons lié le fragment méthylé *in vitro* du promoteur dans un plasmide pGL3 méthylé à blanc d'une part, et lié le fragment méthylé à blanc du promoteur *GSTP1* dans le plasmide pGL3 méthylé d'autre part. Ces constructions ont ensuite été transfectées dans les K562.

Les résultats (Figure 16) montrent une réduction de l'expression de la luciférase de 96,3% lorsque seul le promoteur est méthylé, et une réduction de 66% lorsque c'est le plasmide qui est méthylé (par rapport à l'expression de la luciférase pour le plasmide et le promoteur non méthylé). Pour les 15 dinucléotides CpG contenus dans le promoteur basal *GSTP1*, la méthylation a entraîné une réduction de 6,4% ($96,3/15$) de l'activité du promoteur par site CpG méthylable. La méthylation des 292 dinucléotides CpG contenus dans le plasmide pGL3 et le gène luciférase a entraîné une réduction de l'activité du promoteur de 0,22% ($66/292$) par site CpG méthylable. L'inhibition de l'expression du gène reporter est bien plus considérable ($6,4/0,22 = 29$ fois) lorsque seul le promoteur est méthylé. Ces données confirment que la diminution de l'activité du promoteur n'est pas due à des effets non spécifiques de la méthylation de l'ADN et appuient de nombreuses études antérieures qui corrélient la méthylation des

A.



pGST-97 non méthylé (U)



pGST-97 méthylé (M)

B.

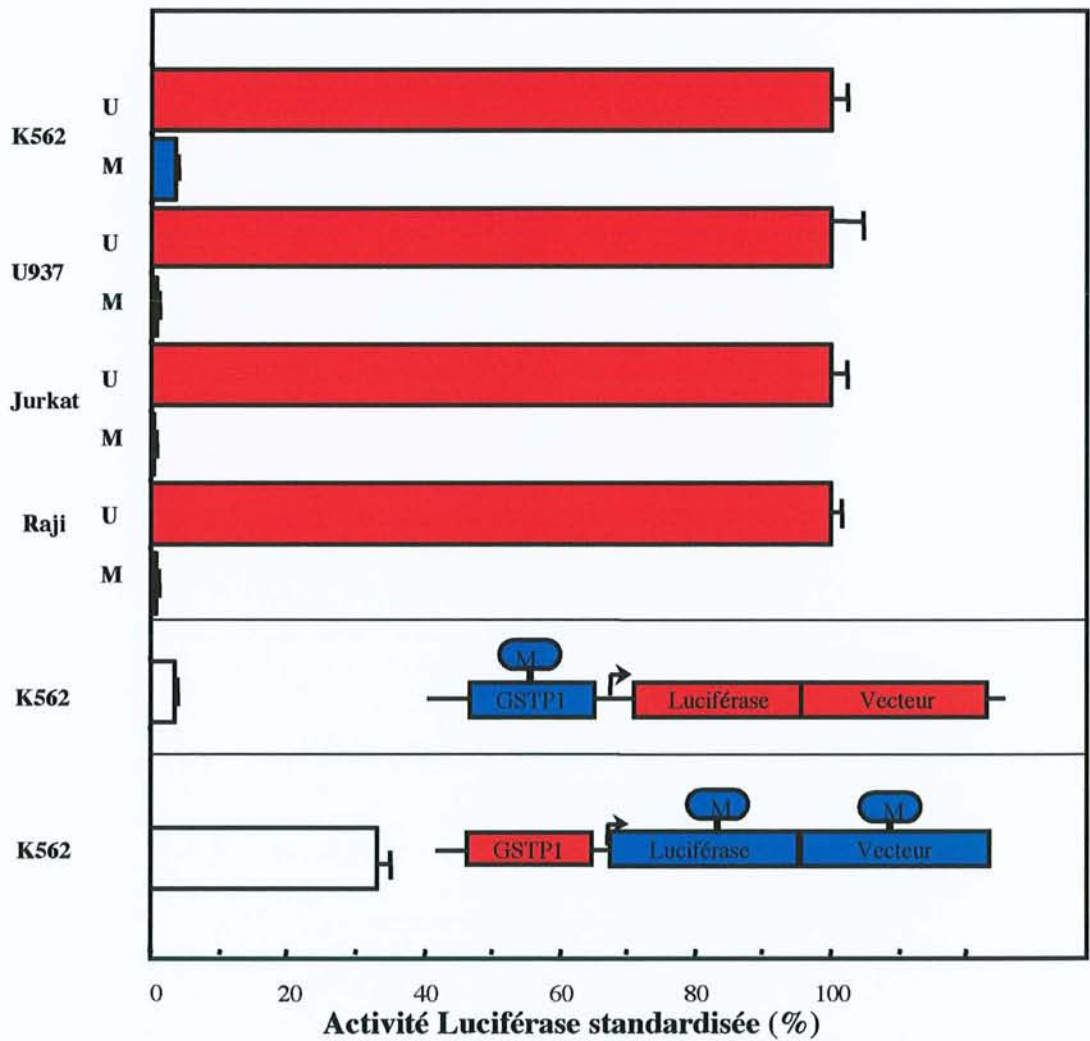


Figure 16 : Expression de la luciférase dans les différentes lignées leucémiques après transfection du plasmide pGST1128 méthylé *in vitro* par la *SssI*.

A. La méthylation de tous les dinucléotides CpG de chaque partie de la construction est représentée par un M. B. Chaque barre de l'histogramme représente la moyenne \pm S.D de trois transfections indépendantes. Les expériences ont été réalisées deux fois.

dinucléotides CpG avec l'inhibition de la transcription des promoteurs du gène p16^{INK4} ou du gène de la globine (*Martinez-Delgado et al., 1997; Singal et al., 1997*).

Mais cela suggère également que la méthylation d'un site privilégié peut réduire de façon significative l'activité du fragment du promoteur *GSTP1* mais que d'autres facteurs indépendants de l'état de méthylation du promoteur, peuvent affecter l'expression du gène reporter.

Les résultats essentiels pour cette partie de notre travail montrent:

- **l'hyperméthylation du promoteur dans les cellules Raji qui n'expriment pas la GSTP1-1, la déméthylation partielle du promoteur dans les K562, mais également une forte méthylation du promoteur dans les U937 et les Jurkat.**
- **que dans toutes les lignées qui expriment l'ARNm de *GSTP1*, l'un des dinucléotides CpG situé au sein du site Sp1 distal est déméthylé de façon significative, ce qui suggère que ce site joue un rôle important dans la régulation de l'expression du gène *GSTP1*.**
- **que la méthylation *in vitro* du promoteur du gène *GSTP1* a un effet inhibiteur sur la transcription du gène reporter dans toutes les lignées étudiées.**

Lignées cellulaires leucémiques

Exprimant l'ARNm et la protéine

N'exprimant pas l'ARNm ni la protéine

Activité transcriptionnelle
élevée

Activité transcriptionnelle
faible

K562 U937 Jurkat

Molt-3 Raji

Démethylation
partielle

Hautement méthylé

Hautement méthylé

Schéma récapitulatif des parties I et II

5.3. Rôle des facteurs de transcription de la famille AP-1 dans l'expression leucémie-spécifique de la GSTP1-1

Nous avons montré jusqu'à présent que les cellules qui expriment la GSTP1-1 peuvent avoir un promoteur partiellement déméthylé (cas des cellules K562), que les cellules qui n'expriment pas la GSTP1-1 ont un promoteur entièrement méthylé (cellules Raji), que les plasmides méthylés *in vitro* ne sont pas exprimés dans les cellules transfectées, et que certaines lignées qui expriment la GSTP1-1 ont un promoteur méthylé (cellules U937 et Jurkat). A la lumière de ces résultats, il apparaît que d'autres facteurs que la méthylation jouent un rôle dans le contrôle de l'expression de la GSTP1-1. La transcription des gènes est contrôlée par la formation de liaisons entre les facteurs de transcription et des séquences spécifiques d'ADN au niveau de régions *cis*-régulatrices. La transcription du gène *GSTP1* est contrôlée particulièrement par la séquence située entre +3 et -97 malgré l'existence potentielle d'éléments régulateurs supplémentaires situés en 5' du promoteur (Moffat *et al.*, 1996-2, Xia *et al.*, 1996, Jhaveri *et Morrow*, 1998-2). Nous avons décidé d'approfondir à présent le rôle des facteurs de transcription dans la régulation de l'expression leucémie-spécifique de la GSTP1-1.

5.3.1. Liaison des protéines nucléaires au promoteur minimal

Afin de mettre en évidence les interactions leucémie-spécifique entre les facteurs protéiques nucléaires et l'ADN du promoteur du gène de la GSTP1-1, nous avons choisi d'utiliser la technique de retard de migration sur gel.

Nous avons d'abord utilisé comme sonde le promoteur basal lui-même, nommé -97, qui présente deux sites de fixation pour Sp-1, un site TRE pour la liaison de AP-1 et un site potentiel de fixation de NF- κ B (Figure 17). Après la réaction de la sonde radiomarquée -97 avec les extraits nucléaires dans un milieu préparé extemporanément, les complexes formés entre protéines et ADN ont été analysés après séparation électrophorétique et

Nf kB put.	ARE/TRE	SP1	SP1
AGTCCGCGGGA CCTCCAGAA GAGCGCCCG CGCCGIGACT CAGCACTGG GCGGAGCGG GCGGACCAC CCTTATAAGG - 97			
		CGGAGCGGG GCGGACCAC CCT	- 53
		CACTGG GCGGAGCGG GCGGACCAC CCT	- 61
	GCCGIGACT CAGCACTGG GCGGAGCGG G		- 73
AGAA GAGCGCCCG CGCCGIGACT CAGCACTGG GCGGAGCGG G			- 85
AGTCCGCGGGA CCTCCAGAA GAGCGCCCG CGCCGIGACT CAGCACTGG GCGGAGCGG G			- 105

Figure 17: Séquences des sondes utilisées.

Le fragment du promoteur -97 contient plusieurs sites potentiels de fixation pour des facteurs de transcription. Les différentes sondes contiennent un ou plusieurs de ces sites.

autoradiographie. Nous avons utilisé une protéine AP-1 purifiée qui est un dimère Jun-Jun à la place d'extraits protéiques nucléaires, pour étudier la capacité de la sonde à lier ce type de complexe AP-1, puisque la séquence du promoteur *GSTP1* contenue dans la sonde met en évidence un site potentiel de liaison pour AP-1.

Deux types de résultats ont été obtenus selon les lignées cellulaires (Figure 18) :

- Trois complexes C1, C2 et C3 sont observés pour les cellules HEL, Jurkat, K562 et U937 et à des intensités variables (respectivement pistes 3, 4, 7 et 8). Le complexe C1 migre à la même hauteur qu'un complexe obtenu après interaction de la sonde -97 et d'une protéine recombinante AP-1 purifiée (dimère Jun/Jun) (piste 2) utilisée en tant que témoin. Les lignées qui présentent ce profil, expriment l'ARNm de la *GSTP1-1* et sont capables de transcrire le gène reporter lorsque le fragment -97 correspondant au promoteur basal entier est cloné en 5' d'un gène reporter.
- Un autre profil de liaison est observé pour les Molt-3 et les Raji (pistes 5 et 6). Pour ces cellules, on observe un complexe C2 et C3.

Ces résultats préliminaires montrent que le promoteur du gène codant pour la *GSTP1-1* fixe plusieurs complexes protéiques et qu'il existe une différence entre les lignées leucémiques qui expriment et les lignées leucémiques qui n'expriment pas la *GSTP1-1*.

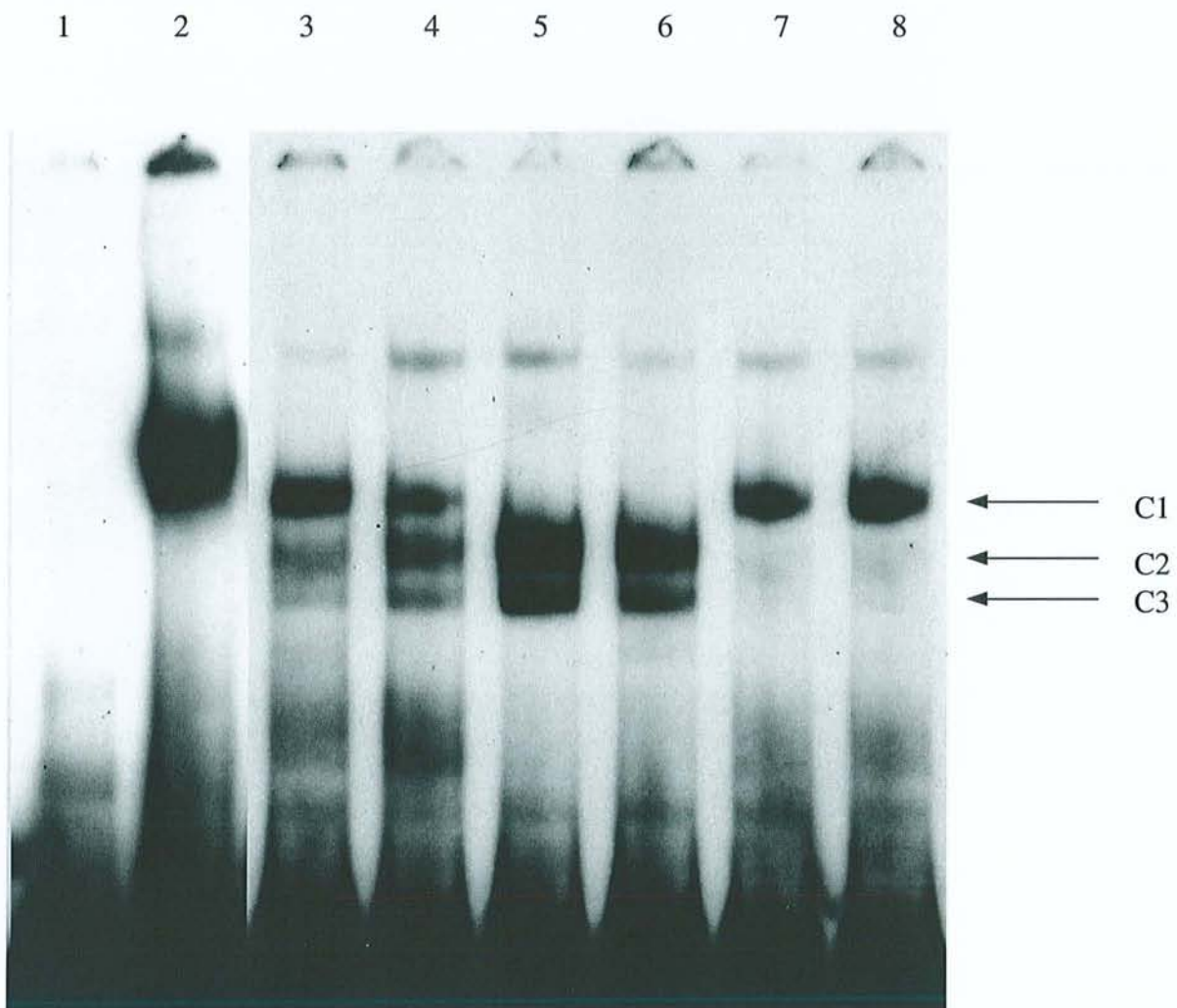


Figure 18: Activité liante des facteurs de transcription contenus dans les extraits nucléaires des différentes lignées cellulaires avec la sonde -97.

10 μ g d'extraits nucléaires des différentes lignées ou 1 fpu d'AP-1 purifiée ont été incubés avec 1 ng de sonde radiomarquée -97 et analysés par retard de migration sur gel. (1) sonde -97 seule ; (2) AP1 purifié ; (3) HEL ; (4) Jurkat ; (5) Molt-3 ; (6) Raji ; (7) K562 ; (8) U937.

5.3.2. Mise en évidence de la spécificité de l'activité liante par compétition

Afin de localiser plus précisément la région du promoteur sur laquelle se fixent le ou les complexes protéiques préalablement observés, nous avons réalisé des expériences de compétition en ajoutant aux extraits nucléaires, un excès de 500 fois molaire d'oligonucléotides froids qui correspondent à des fragments du promoteur -97 (Figure 17). Si une protéine se lie spécifiquement à la sonde, elle va se lier de préférence à la sonde froide en plus grande quantité et la bande radioactive que l'on observait sur le gel va disparaître. Si la liaison est non spécifique, il n'y a pas de compétition et la bande se maintient.

Les cinq oligonucléotides synthétiques double brins -53, -61, -73, -85 et -105 (Figure 17), couvrent des régions différentes du promoteur basal de la GSTP1-1 allant de -30 à -105. L'oligonucléotide -53 couvre uniquement le site Sp-1 proximal, l'oligonucléotide -61 couvre les deux sites Sp-1, -73 couvre le site Sp-1 distal ainsi que le site AP-1. L'oligonucléotide -105 couvre en plus le site putatif NF- κ B alors que l'oligonucléotide -85 ne comprend pas ce site. Nous avons également utilisé le promoteur -97 froid en excès molaire de 200 fois.

Après autoradiographie (Figure 19), nous observons que seuls les oligonucléotides froids couvrant au moins la partie en 5' du promoteur basal sont capables d'entrer en compétition avec certains des complexes protéiques fixés à la sonde (oligonucléotides -73, -85, -97 et -105). Seule la sonde froide correspondant au promoteur entier -97 est capable de déplacer tous les complexes (piste 3), ce qui démontre la spécificité des interactions observées, alors que les oligonucléotides -73, -85 et -105 ne déplacent que le complexe C1 (pistes 6, 7 et 8). Les oligonucléotides -53 et -61 par contre ne sont capables de déplacer aucun des complexes observés (pistes 4 et 5). En comparant les résultats obtenus pour les oligonucléotides -61 et -73, nous pouvons supposer que l'un au moins des complexes contenus dans les extraits nucléaires se fixe

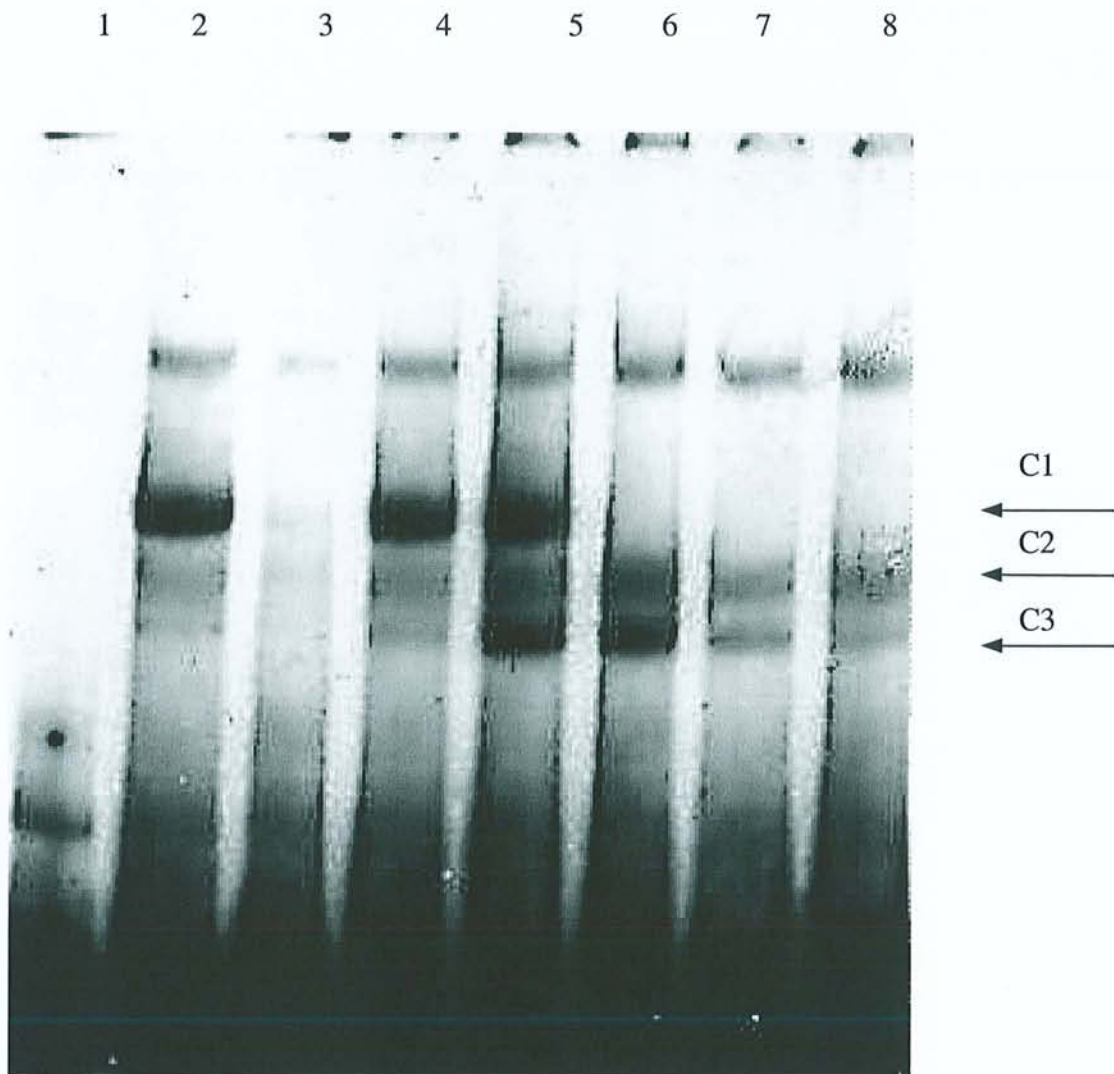


Figure 19 : Compétition des oligonucléotides froids et des protéines nucléaires de K562 pour la liaison à la sonde -97.

10 μ g d'extraits nucléaires des cellules K562 ont été préincubés 16h avec la sonde -97 froide (excès molaire 200x) ou avec les oligonucléotides froids -53, -61, -73, -85 et -105 (excès molaire 500x). Le mélange a ensuite été incubé 15 minutes à température ambiante avec la sonde -97 radiomarquée et analysé par retard de migration sur gel (1) sonde -97 seule ; (2) sonde avec extraits nucléaires de K562 ; (3) compétition avec -97 froide ; (4) compétition avec -53 ; (5) compétition avec -61 ; (6) compétition avec -73 ; (7) compétition avec -85 ; (8) compétition avec -105.

sur la séquence de réponse au facteur de transcription AP-1 contenue seulement dans l'oligonucléotide -73 (et aussi dans les oligonucléotides -85 et -105); en effet seul l'oligonucléotide -73 peut déplacer la protéine liée à la sonde alors que l'oligonucléotide -61 n'en est pas capable.

Ces expériences de compétition ont permis de mieux caractériser un des complexes protéiques qui se fixe sur le promoteur au niveau d'une région comportant un élément de réponse connu, le TPA responsive element (TRE).

5.3.3. Ciblage de la région contenant l'élément de réponse aux esters de phorbol

Afin d'identifier plus précisément les protéines des extraits nucléaires se liant à la séquence TRE, nous avons ensuite utilisé une sonde -73 radiomarquée couvrant uniquement cette région. De cette façon, nous espérons n'observer que la liaison d'une partie des protéines susceptibles de se fixer au promoteur *GSTP1*, celles qui reconnaissent la séquence d'ADN représentée par ce fragment du promoteur *GSTP1*.

Les résultats obtenus avec cette sonde -73 (Figure 20) vont dans le même sens que les résultats précédemment obtenus avec la sonde -97 correspondant au promoteur minimal (Figure 19):

Pour les protéines nucléaires des lignées cellulaires capables de fixer spécifiquement un ou plusieurs complexes sur le promoteur minimal de *GSTP1-1*, on observe la fixation de trois complexes protéiques dont un majeur Cx, sur le fragment -73 contenant l'élément de réponse TRE. En effet les lignées Jurkat, K562 et U937 (pistes 4, 7 et 8 respectivement) fixent un complexe de poids moléculaire voisin de celui du complexe AP-1 qui sert de témoin positif (piste 2). Les deux lignées Molt-3 et Raji ne présentent pas de complexes protéiques de ce type (pistes 5 et 6).

En comparant les résultats obtenus en utilisant comme sonde le promoteur minimal (-97) avec les résultats obtenus pour la sonde -73, nous pouvons affirmer que le complexe intermédiaire Cx, formé avec les protéines nucléaires des lignées leucémiques capables de transcrire l'ARNm de *GSTP1*, est un complexe de type AP-1 d'un poids moléculaire avoisinant celui du dimère jun-jun qui nous a servi de témoin de migration.

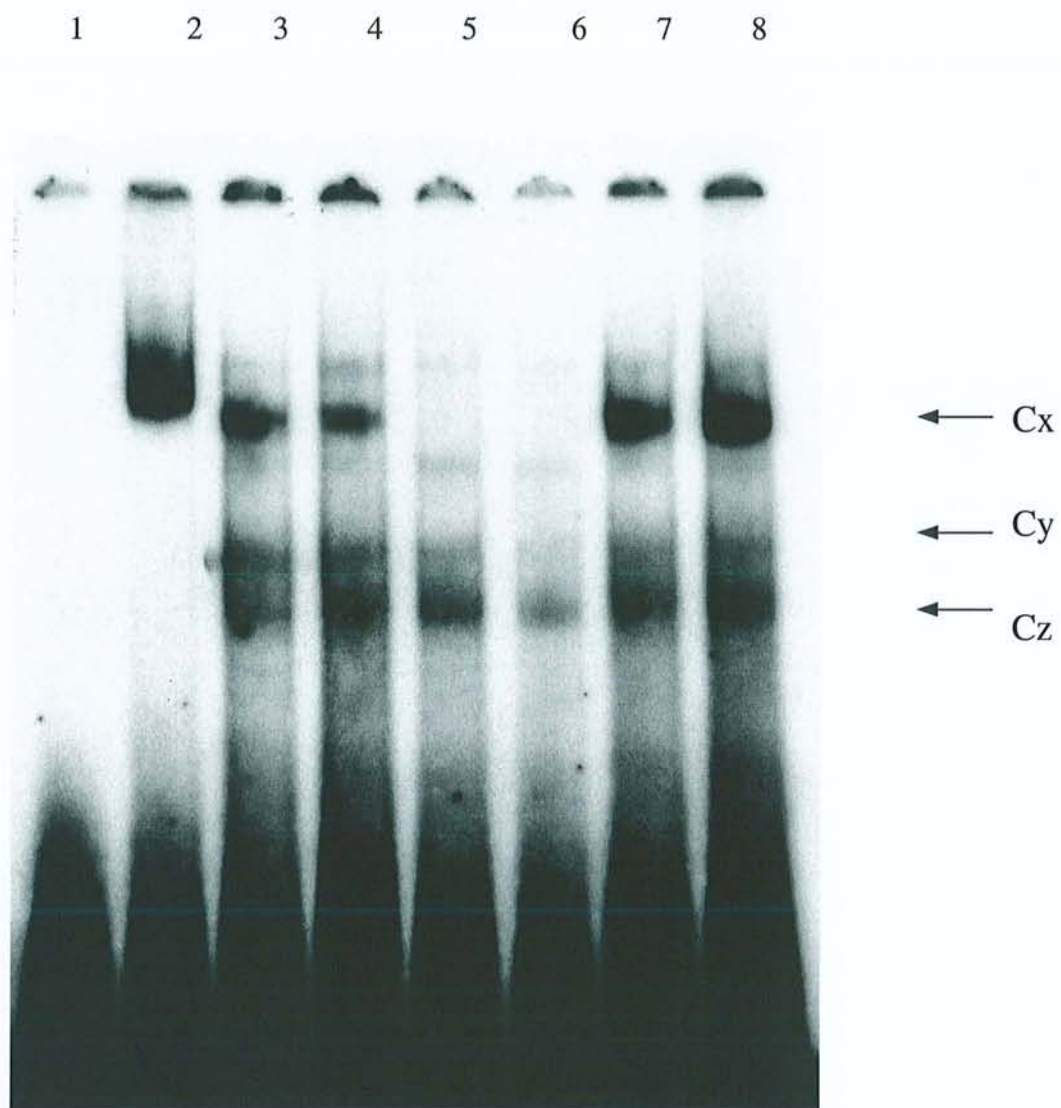


Figure 20 : Mise en évidence d'un complexe de type AP-1 se liant avec la sonde -73 dans les différentes lignées leucémiques.

10 µg d'extraits nucléaires des différentes lignées ou 1 fpu d'AP-1 purifiée ont été incubés avec 0,3 ng de sonde -73 radiomarquée puis analysés après séparation électrophorétique et autoradiographie. (1) sonde -73 seule; (2) AP-1 purifiée; (3) HEL; (4) Jurkat; (5) Molt-3; (6) Raji; (7) K562; (8) U937.

Afin de démontrer la spécificité de l'interaction entre la sonde -73 et le complexe protéique préalablement mis en évidence, nous avons réalisé des expériences de compétitions avec un excès des sondes froides -73 et TRE. Nous avons également synthétisé pour chaque sonde une variante mutée au niveau du site de fixation potentiel TRE (voir Matériel et Méthodes).

Le mélange réactionnel entre les extraits nucléaires provenant de la lignée leucémique K562 et la sonde -73 radiomarquée, a été préincubé en présence d'un excès des différentes sondes froides. Les compétitions avec un excès des sondes TRE ou -73 froides font disparaître le complexe protéique Cx (Figure 21, pistes 3 et 5), alors qu'un excès de sonde TRE mutée froide ou -73 mutée froide ne modifie pas les liaisons protéines/ADN (Figure 21, pistes 4 et 6) démontrant la spécificité du binding préalablement observé.

Ces résultats confirment la spécificité de l'interaction entre le site AP1/TRE du fragment -73 du promoteur du gène GSTP1 et le complexe protéique contenu dans les extraits nucléaires des cellules K562 et qui appartient à la grande famille des protéines AP-1.

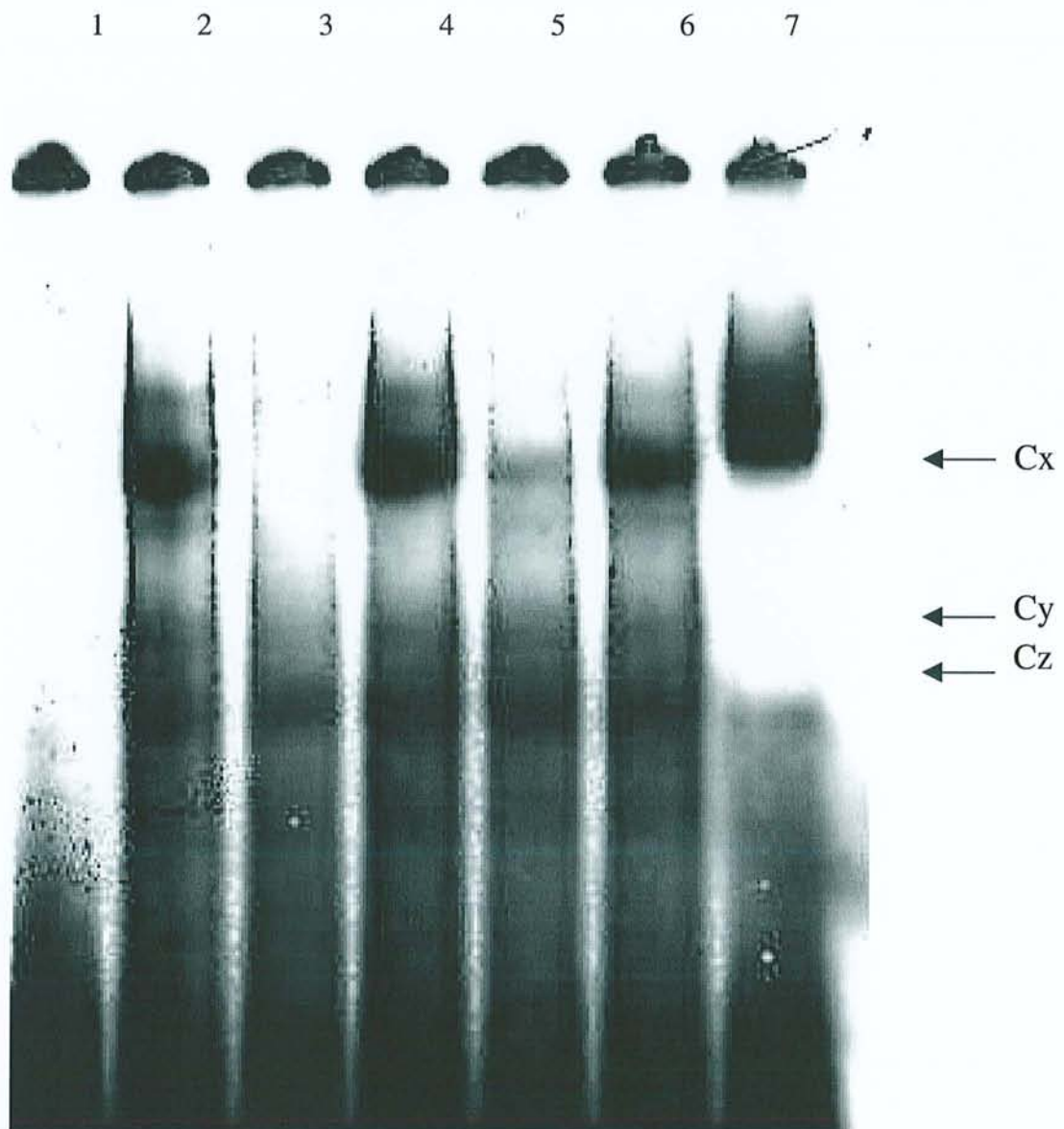


Figure 21: Spécificité de la liaison entre les protéines nucléaires des cellules K562 et la sonde -73.

10 μg d'extraits nucléaires des cellules K562 ont été préincubés 16h avec un excès molaire de 500 fois des oligonucléotides froids -73, -73 muté, TRE ou TRE muté. Le mélange a ensuite été incubé 15 minutes à température ambiante avec 0,5 ng de sonde -73 radiomarquée et analysé par retard de migration sur gel. (1) sonde -73 seule ; (2) sonde avec extraits nucléaires de K562 ; (3) compétition avec -73 froide ; (4) compétition avec -73 muté ; (5) compétition avec TRE ; (6) compétition avec TRE muté ; (7) sonde -73 avec AP1 purifiée.

5.3.4. Comparaison de l'activité liante à un promoteur témoin provenant du gène de la collagénase

La séquence AP-1 contenue dans le promoteur de GSTP1 est identique à la séquence consensus TRE. Toutefois, nous avons également utilisé comme sonde radioactive marquée en 5', un oligonucléotide double brin provenant du promoteur du gène humain de la collagénase et comportant la séquence consensus TRE de façon à vérifier que les extraits nucléaires des différentes lignées leucémiques contiennent des facteurs de transcription de type AP-1 capables de se fixer sur une séquence cible TRE. Ce gène de la collagénase est connu pour être régulé par l'intermédiaire du facteur de transcription AP-1, qui se fixe sur la séquence consensus TRE.

Après autoradiographie (Figure 22), nous observons que deux complexes protéiques Ca et Cb contenus dans les extraits nucléaires des lignées Jurkat, K562 et U937 (pistes 4, 7 et 8), sont capables de se fixer sur la sonde TRE. Ces lignées contiennent donc différentes protéines de la famille AP-1. Ces résultats autorisent l'hypothèse qui consiste à dire que la liaison protéique observée préalablement sur le promoteur basal -97 puis sur le fragment du promoteur -73 est bien due à des facteurs de la famille AP-1. Par contre, il n'y a pas de fixation d'un complexe protéique de type AP-1 à la sonde TRE avec les extraits en provenance de Molt-3 ou de Raji (pistes 5 et 6). La protéine AP-1 purifiée utilisée à la place d'extraits nucléaires forme un complexe Ca en se liant à la sonde TRE (piste 2).

Afin de démontrer la spécificité de l'interaction entre la sonde TRE et le complexe protéique préalablement mis en évidence, nous avons réalisé des expériences de compétitions avec un excès des sondes froides -73 et TRE. Nous avons également synthétisé pour chaque sonde une variante mutée au niveau du site de fixation potentiel TRE (voir Matériel et Méthodes).

Le mélange réactionnel entre les extraits nucléaires provenant de la lignée leucémique U937 et la sonde TRE radiomarquée, a été préincubé en présence d'un excès des différentes sondes froides. Les compétitions avec un excès des sondes -73 ou TRE froides font disparaître le complexe protéique Ca (Figure 23, pistes 3 et 5), alors qu'un excès de sonde -73 mutée froide ou TRE mutée froide ne modifie pas les liaisons protéines/ADN (Figure 23, pistes 4 et 6) démontrant la spécificité du binding préalablement observé.

Ces résultats nous permettent de dire que la liaison protéique observée préalablement sur le promoteur basal -97 puis sur le fragment du promoteur -73 est bien dûe à des facteurs de la famille AP-1.

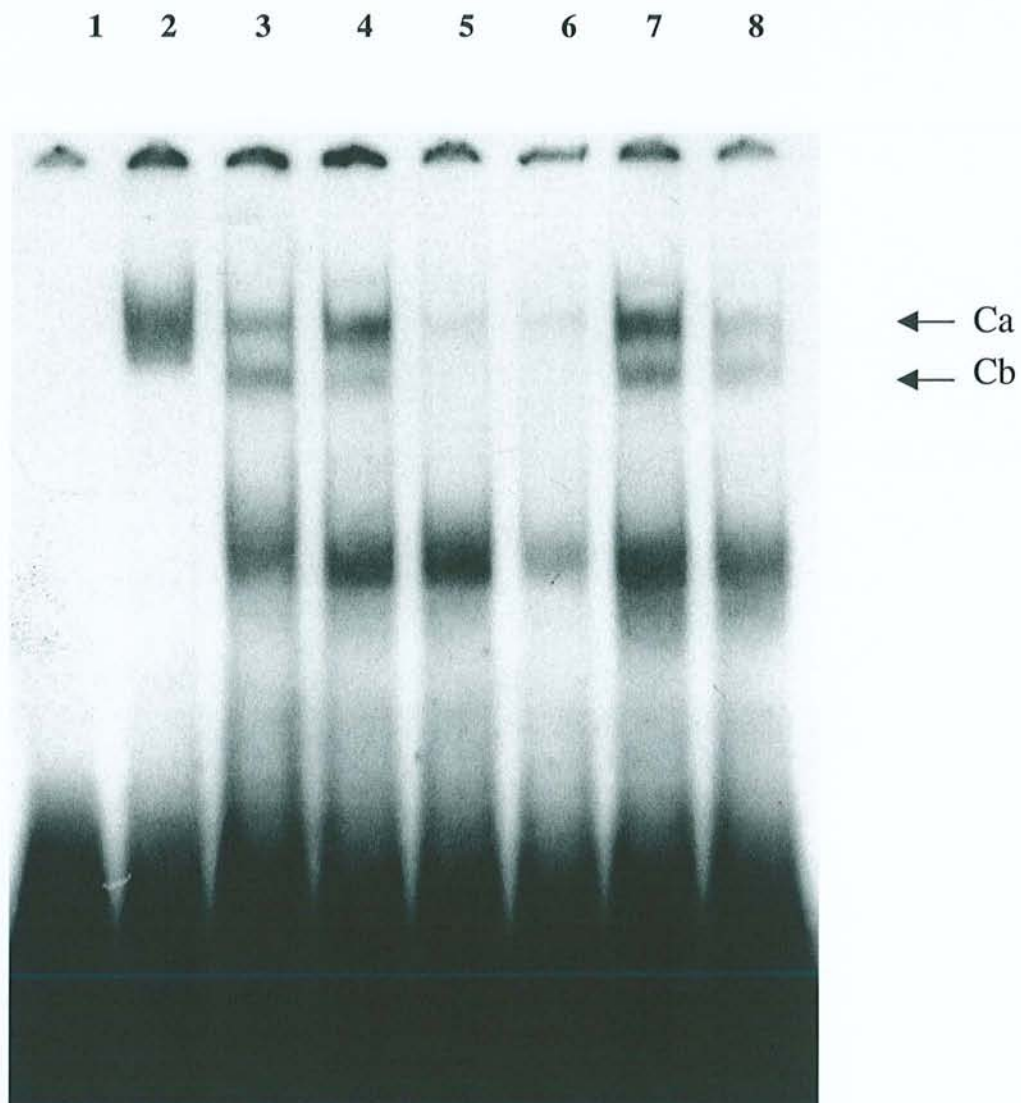


Figure 22 : Liaison de protéines nucléaires des différentes lignées cellulaires à la sonde TRE.

10 μ g d'extraits nucléaires des différentes lignées ou une fpu d'AP-1 purifiée ont été incubés avec 0,75 ng de sonde TRE radiomarquée puis analysés par retard de migration sur gel (1) sonde TRE seule; (2) AP-1 purifié; (3) HEL; (4) Jurkat; (5) Molt-3; (6) Raji; (7) K562; (8) U937.

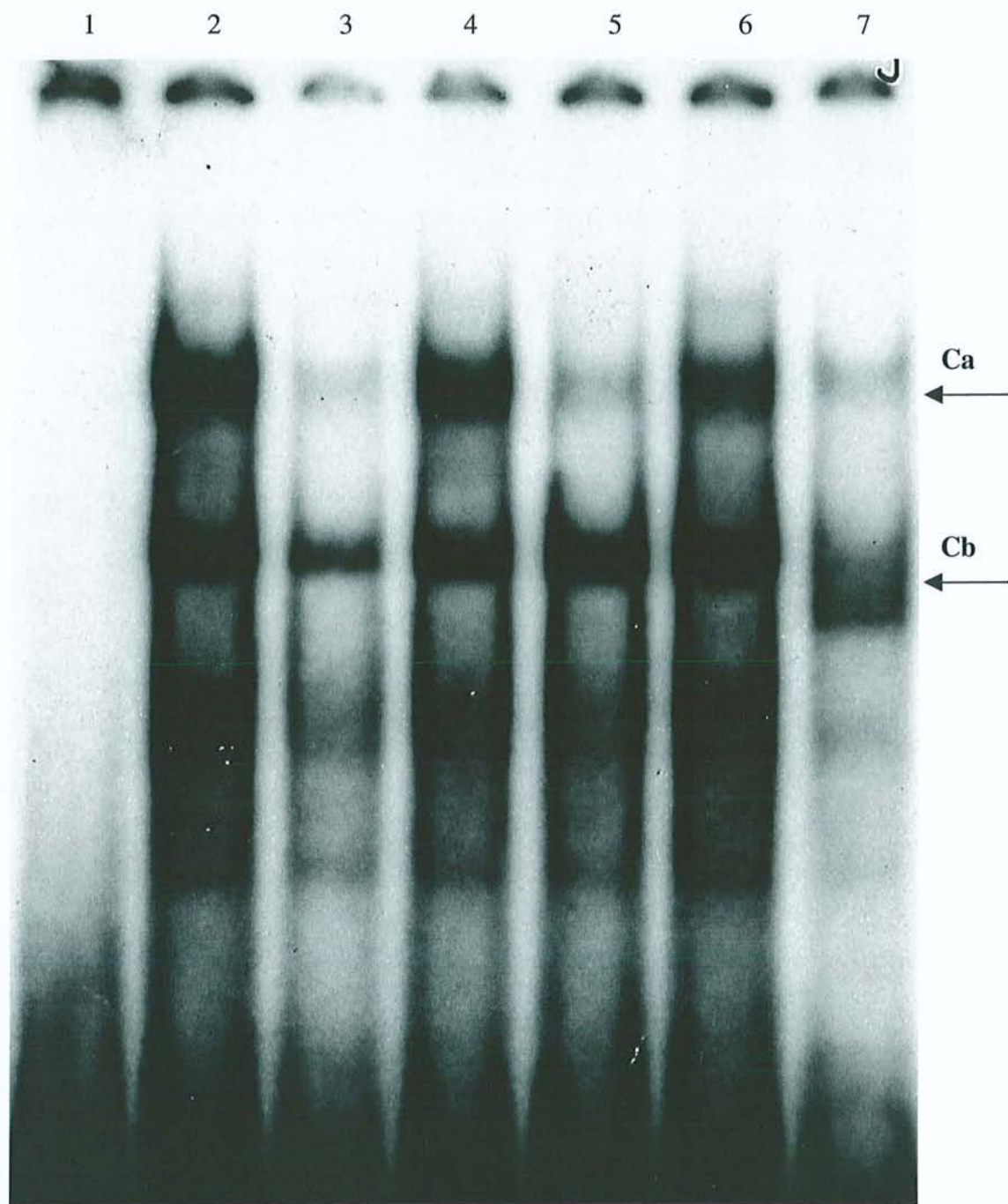


Figure 23 : Spécificité de la liaison entre les protéines nucléaires des cellules U937 et la sonde TRE.

10 μ g d'extraits nucléaires des cellules U937 ont été préincubés 16h avec un excès molaire de 500 fois des oligonucléotides froids -73, -73 muté, TRE ou TRE muté. Le mélange a ensuite été incubé 15 minutes à température ambiante avec 0,5 ng de sonde -73 radiomarquée et analysé par retard de migration sur gel. (1) sonde -73 seule ; (2) sonde avec extraits nucléaires de U937 ; (3) compétition avec -73 froide ; (4) compétition avec -73 mut ; (5) compétition avec TRE ; (6) compétition avec TRE mut.

5.3.5. Identification des facteurs de transcription impliqués par supershifts

Pour tenter d'identifier les protéines contenues dans les extraits nucléaires et qui se lient au promoteur *GSTP1*, nous avons réalisé des expériences de supershift. Les protéines nucléaires ont été préincubées avec un anticorps dirigé contre un des composants de AP-1 avant d'être incubées avec la sonde radiomarquée. Si l'anticorps a reconnu un antigène, l'ensemble protéine nucléaire/ anticorps/sonde va migrer plus lentement que le complexe protéine/sonde, et on observera un supershift. Il est également possible d'observer la disparition de la liaison de la protéine à la sonde si la fixation de l'anticorps sur la protéine gêne la reconnaissance protéine/ADN. Les expériences de compétition que nous avons réalisées, ont suggéré que les complexes protéiques identifiés préalablement pouvaient appartenir à la famille AP-1 et/ou avoir l'affinité pour la séquence TRE. C'est pourquoi les extraits nucléaires des cellules K562 ou U937 exprimant toutes les deux la *GSTP1-1* ont été préincubés avec des anticorps polyclonaux dirigés soit contre famille Jun, soit contre la famille Fos, soit contre la famille NF-E2.

- En utilisant la sonde -73 radiomarquée, la préincubation des extraits nucléaires des cellules U937 avec l'anticorps **anti-Jun** conduit à l'inhibition de la formation du complexe supérieur C1 alors que l'existence des deux autres bandes n'est pas modifiée (Figure 24 A, comparer pistes 2 et 3). Ces résultats signifieraient qu'une protéine de la famille AP-1 contenue dans les extraits nucléaires de U937 peut se lier à la séquence consensus TRE du promoteur *GSTP1*.
- Nous avons validé nos résultats en utilisant comme témoin positif la protéine AP-1 purifiée (Promega) capable de se fixer à la sonde -73 du promoteur *GSTP1* (Figure 24 B). Avec l'anticorps anti-Jun nous obtenons un supershift qui déplace

complètement la bande. Ces résultats nous permettent de valider nos conditions de travail (Figure 24 B).

- D' autres anticorps à notre disposition à ce moment de l'étude et dirigés contre la famille fos (Fra-1) ou NF-E2 (p45) produisent également un supershifts (Figure 24 C).

Dans cette partie de l'étude, nous avons mis en évidence que des protéines contenues dans les extraits nucléaires des cellules leucémiques exprimant *GSTP1*, pouvaient se lier de façon spécifique au promoteur du gène *GSTP1*. Nous avons également montré que ces complexes protéiques contiennent majoritairement Jun, Fra-1 et NF-E2p45.

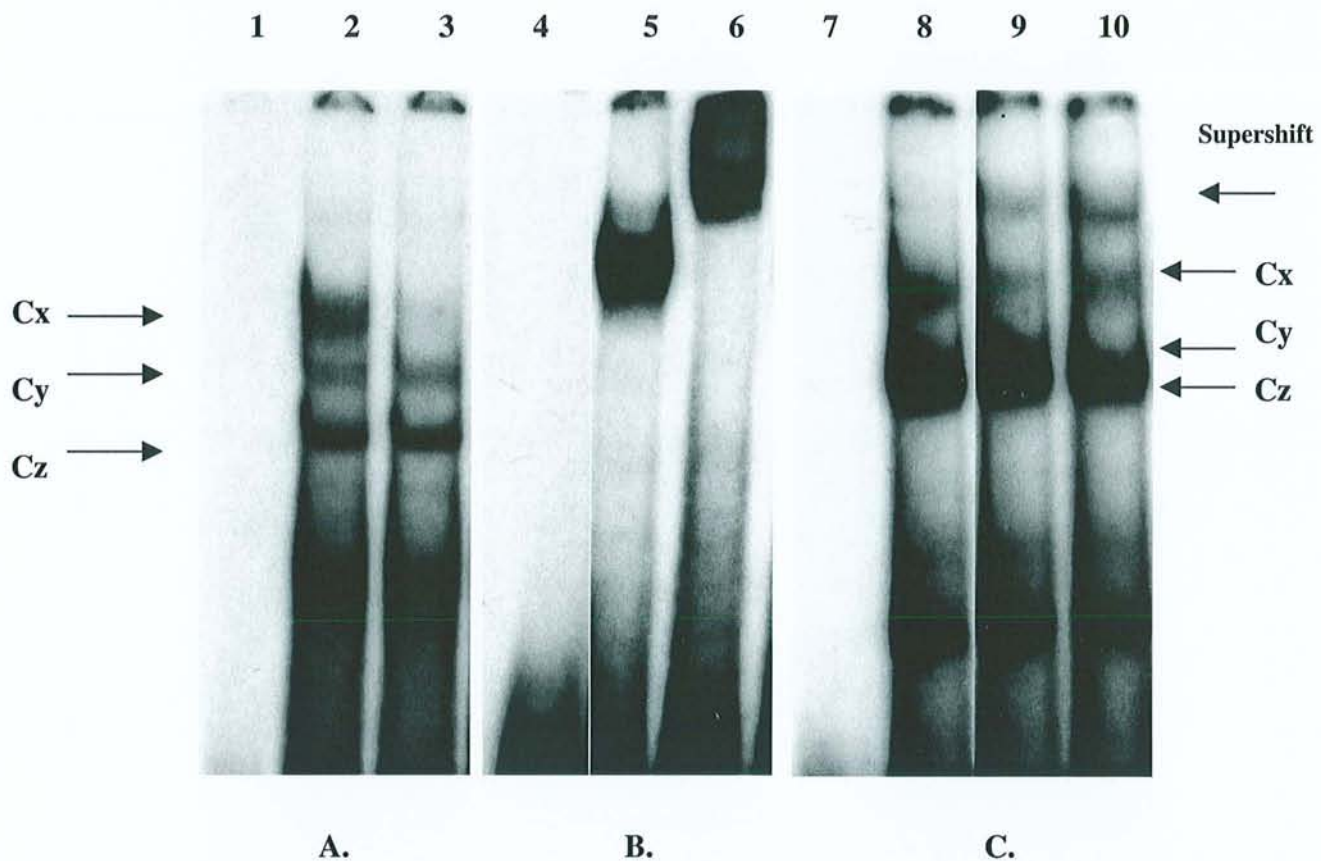
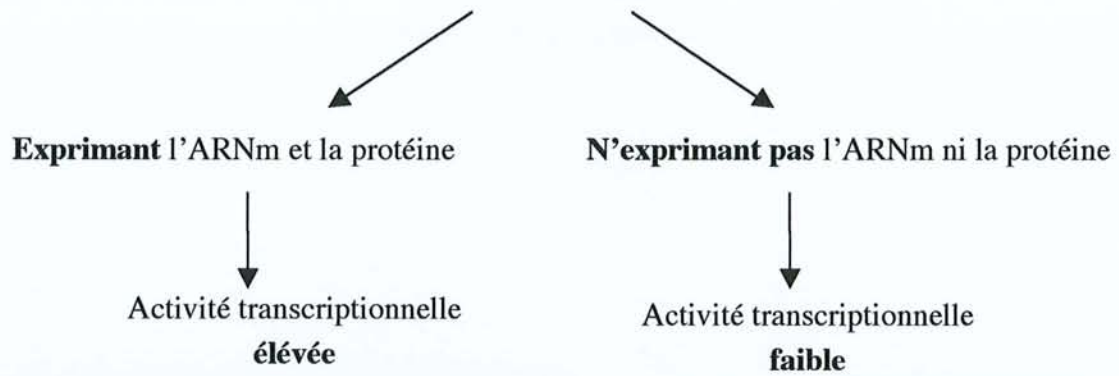


Figure 24 : Identification des protéines contenues dans les cellules exprimant la GSTP1-1.

A : 10 μg d'extraits nucléaires des cellules U937 ont été préincubés avec un anticorps polyclonal dirigé contre Jun : (1) sonde -73 seule; (2) avec extraits nucléaires de U937; (3) et avec anti Jun. **B :** 1 fpu d'AP-1 a été préincubée avec un anticorps anti Jun. (Les mélanges ont ensuite été incubés avec 0,75 ng de sonde -73 radiomarquée puis analysés par retard de migration sur gel). (4) sonde -73 seule, (5) avec AP-1; (6) et avec un anticorps anti Jun. **C :** 10 μg d'extraits nucléaires des cellules K562 sont préincubés avec 4 μg d'anticorps anti-Fra-1 ou anti-NF-E2 p45 à 4°C pendant 20 minutes. Puis les mélanges sont incubés pendant 15 minutes avec 0,25 ng de sonde -73 radiomarquée et analysés par retard de migration sur gel. (7) sonde -73 seule; (8) avec extraits nucléaires de K562; (9) avec anti-Fra-1; (10) ou avec anti-NF-E2 p45.

Lignées cellulaires leucémiques



K562 U937 Jurkat

Molt-3 Raji

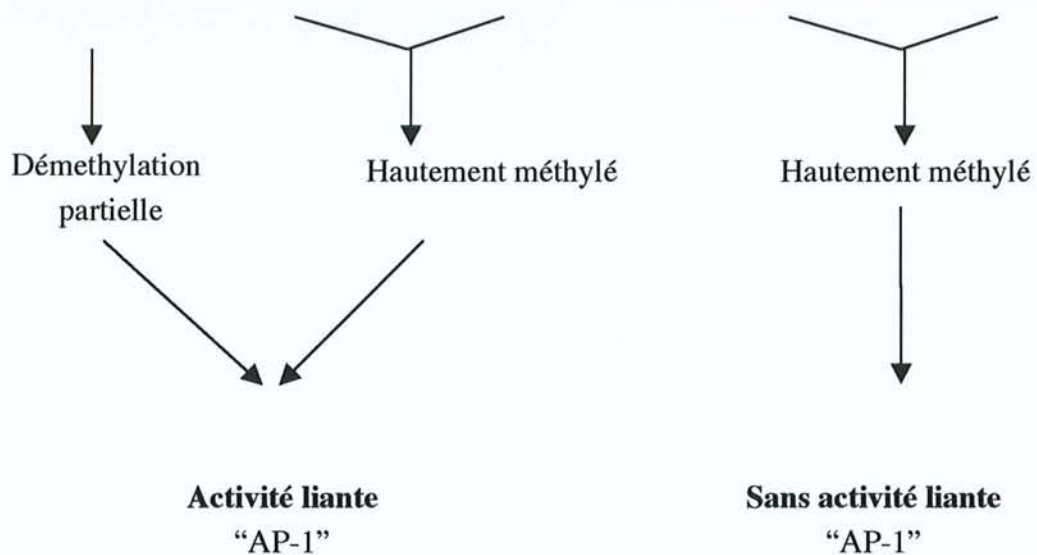


Schéma récapitulatif des parties I à III

5.4. Inductibilité de l'expression de la GSTP1-1 par les esters de phorbol

Jusqu'à présent nous avons étudié l'expression basale de la GSTP1-1 dans nos modèles cellulaires. Pour la suite de notre travail, nous avons décidé de nous intéresser également aux mécanismes qui contrôlent l'expression du gène *GSTP1* en cas de stimulation des cellules par un stress. Les cellules ont été traitées par le TPA, qui est un promoteur de tumeur connu pour activer la fixation de AP-1 sur le site TRE, et pour activer alors l'expression des gènes dont le promoteur contient cet élément. Différentes études ont déjà mis en évidence que le traitement des cellules K562 par le TPA conduit à une augmentation de la liaison de AP-1 sur le promoteur de gènes spécifiques de la lignée érythroïde et une diminution de la liaison de NF-E2 (Mignotte *et al.*, 1990; Solomon *et al.*, 1993; Rosson *et O'Brien*, 1998). L'activité relative de chacun de ces facteurs de transcription, qui est définie par le niveau cellulaire de chaque facteur et leur état de phosphorylation, détermine vers quelle lignée érythroïde ou lymphoïde vont se différencier les cellules K562. La prédominance de NF-E2 conduit à une différenciation érythroïde, alors que la prédominance de AP-1, stimulée par le TPA, différencie les cellules K562 vers les mégacaryocytes (Rosson *et O'Brien*, 1998).

5.4.1. Mise au point des conditions de traitement

Comme nous l'avons précédemment décrit (voir Chapitre 5.1.1.), les cellules K562, Jurkat et U937 expriment des taux variables d'un transcript de 0.7kb correspondant à l'ARNm de la *GSTP1* humaine. Les cellules Molt-3 expriment des taux très faibles de cet ARNm, tandis l'ARNm de la *GSTP1* est indétectable dans les cellules Raji. Nous avons limité notre étude aux cellules K562 et Raji, qui nous semblent représentatives

des deux catégories de cellules leucémiques que nous étudions: celles qui expriment et celles qui n'expriment pas la GSTP1-1.

La concentration de 100 nM a été choisie après mise au point en transfectant des cellules K562 traitées par des concentrations croissantes de TPA, avec une construction associant le promoteur basal du gène de la GSTP1-1 et un gène reporter luciférase (pGST-97, voir figure 13). Nous avons obtenu une induction maximale de l'expression du gène luciférase avec la concentration de 100 nM (Figure 25). Cette concentration est en accord avec celle décrite par la littérature, en particulier pour l'étude des GST (*Bergelson et al., 1994*).

5.4.2. Induction de l'ARNm de la GSTP1-1

Nos cellules ont été traitées pendant des temps variables par 100 nM de TPA, puis elles ont été lavées par du PBS 1X et les ARN totaux ont été extraits.

- Le traitement des cellules K562 par 100 nM de TPA conduit à une augmentation de l'ARNm de *GSTP1*. Cette augmentation est dépendante du temps puisqu'on l'observe déjà 45 minutes après le début du traitement et elle atteint son maximum 16h après le début de la stimulation (Figure 26A). Le TPA, dans les cellules K562, active d'une façon semblable l'induction du gène *mdr1* (augmentation de l'ARNm et expression de la glycoprotéine gp170) avec un effet maximal obtenu entre 5 et 10 heures de traitement (*Osborn et al., 1999*).

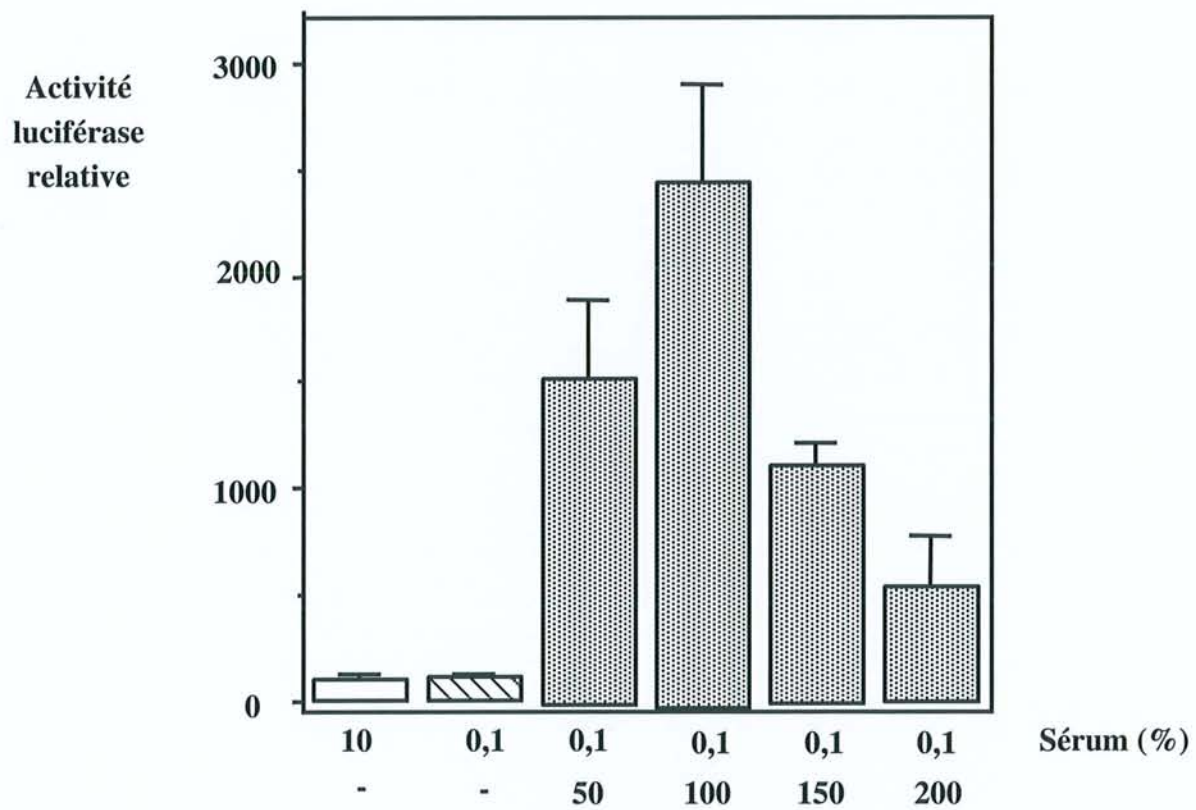


Figure 25 Effet de différentes concentrations de TPA sur l'expression d'un gène reporter fusionné au promoteur de la GSTP1-1 et transfecté dans les cellules K562.

5.4.3. Induction de la protéine de la GSTP1-1

- Notre résultat précédent met en évidence que l'ARNm de la GSTP1-1 dans les K562 est induit sous l'action du TPA. Nous avons alors étudié l'effet du TPA sur la protéine GSTP1-1 elle-même. Nous avons traité les cellules par du TPA à 100 nM pendant différents intervalles de temps puis nous avons lysé les cellules pour obtenir les extraits cellulaires que nous avons étudié par Western blot. Nous observons une augmentation de la quantité de protéine GSTP1-1 à partir de 8 heures de traitement par le TPA (Figure 27A).
- Pour les cellules Raji même traitées à des intervalles prolongés (24h à 48h) (Figure 27B) aucune expression de la protéine ne peut être observée.

Nos résultats montrent que le TPA agit d'une façon optimale à une concentration de 100 nM et induit une augmentation de l'expression de l'ARNm de *GSTP1* dans les cellules K562, ainsi qu'une légère augmentation de la protéine elle-même. De plus, le TPA est sans effet sur les cellules qui n'expriment pas le gène *GSTP1* à l'état de base.

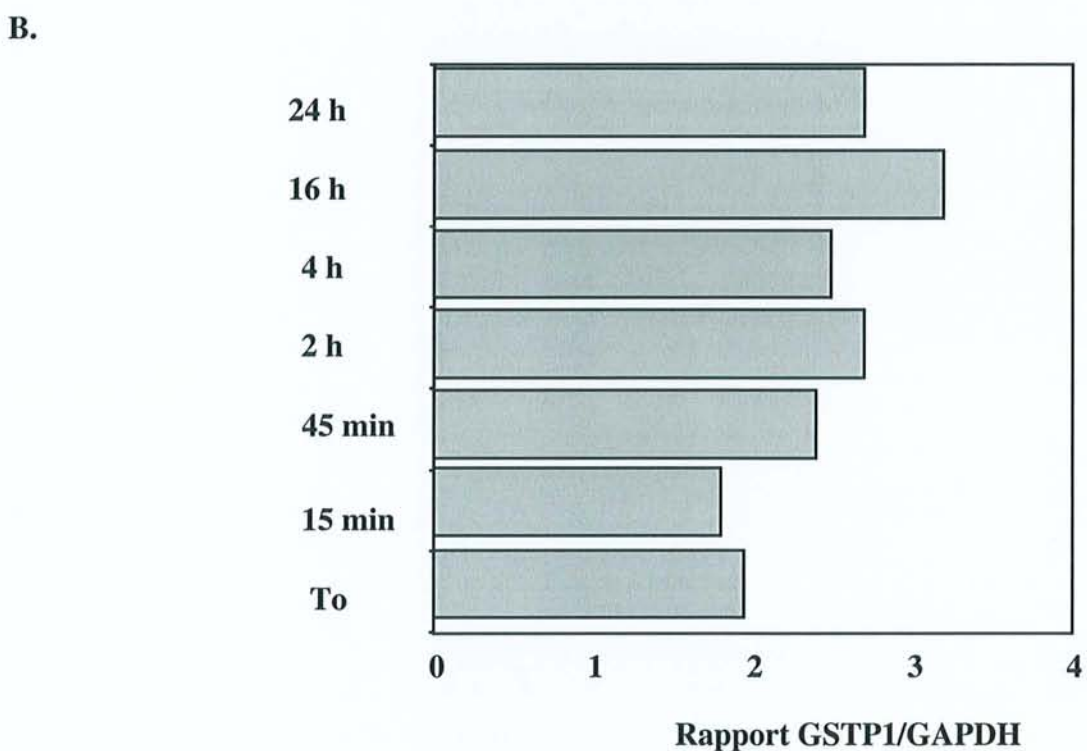
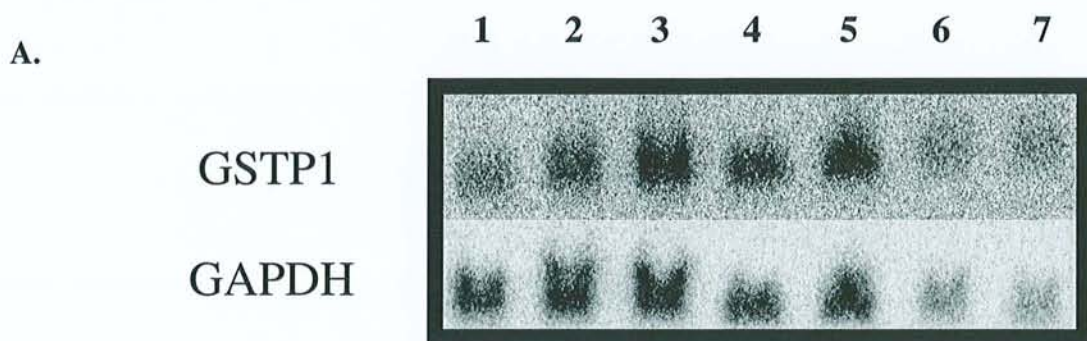
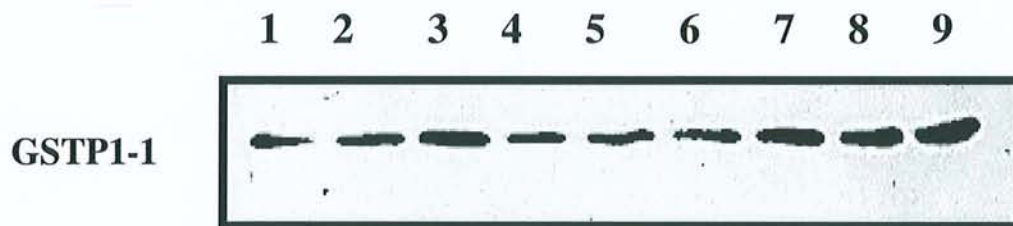


Figure 26: Effet du TPA sur l'expression de l'ARNm de la GSTP1-1 dans les cellules K562.

A : Analyse des ARNm (10 μ g) par Northern-blot dans les cellules K562 non traitées (1) ou traitées par 100nM de TPA pendant 15 minutes (2), 45 minutes (3), 2 heures (4), 4 heures (5), 16 heures (6) ou 24 heures (7). **B.** Après quantification du signal pour chaque ARNm (sur Cyclone, Canberra-Packard), le rapport des signaux obtenus pour les ARNm de GST et de GAPDH à chaque temps, est représenté.

A.



B.

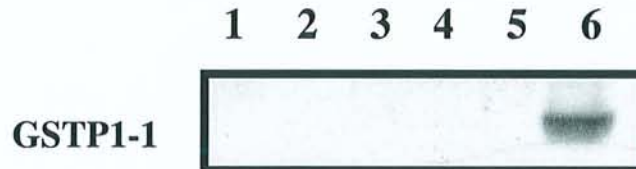


Figure 27 : Effet du TPA sur l'expression de la protéine de la GSTP1-1 dans les cellules K562 et Raji .

A : Les cellules K562 ont été cultivées 24h sans sérum (2 à 9) puis traitées par 100nM de TPA pendant des temps variables. Un témoin correspondant aux cellules cultivées dans un milieu supplémenté de 10 % de SVF a été ajouté (1), temps 0 (2), 15 min (3), 45 min (4), 2h (5), 4h (6), 8h (7), 16h (8) et 24h (9). **B :** Les cellules Raji ont été cultivées 24h sans sérum (2 à 5) puis traitées par 100nM de TPA pendant des temps variables. Un témoin correspondant aux cellules Raji cultivées dans un milieu supplémenté de 10 % de SVF a été ajouté (1), temps 0 (2), 4h (3), 22h (4), 48h (5), témoin K562 (6).

5.4.4. Effet du TPA sur l'activité du promoteur *GSTP1*

Afin de savoir si l'augmentation de l'expression de l'ARNm de *GSTP1* par le TPA est régulée au niveau transcriptionnel, nous avons transfecté les cellules K562 par les différentes constructions déjà utilisées (voir Figure 13). 32h après la transfection, les cellules transfectées ont été traitées par 100 nM de TPA pendant 16h, puis les cellules ont été récoltées, soit 48 heures après la transfection, pour la mesure de l'activité luciférase.

Dans la mesure où le traitement par le TPA influence également l'activité du gène codant pour la β -galactosidase (pCMV β gal), l'activité luciférase est exprimée par rapport à la concentration de protéines contenues dans l'extrait cellulaire, au lieu d'être exprimée par rapport à l'activité β -galactosidase. Dans les cellules K562 traitées au TPA, l'activité luciférase est augmentée de 18 fois par rapport aux cellules non traitées pour la construction pGST-97. Ces résultats suggèrent pour la première fois que le promoteur *GSTP1* contient une séquence inductible par le TPA, dans une lignée leucémique humaine (Figure 28).

Il nous paraît donc probable que le site AP-1/TRE du promoteur de *GSTP1* est un site qui permet de réguler l'expression de la *GSTP1-1* en fonction des différents messages qui arrivent à la cellule dans les cellules leucémiques. *Morrow et al. (1990)* avaient réalisé dans des cellules HeLa, des transfections de constructions contenant le fragment du promoteur -8 à -80 (par rapport au site de début de transcription); bien qu'ils aient mesuré l'expression du plasmide reporter par rapport à la quantité de protéines contenues dans les échantillons, ils n'ont pas mis en évidence d'effet du TPA sur l'expression de *GSTP1*. Ils en ont conclu que le site AP-1 du promoteur *GSTP1* ne répondait pas au TPA. Nos résultats montrent que cet effet du TPA est

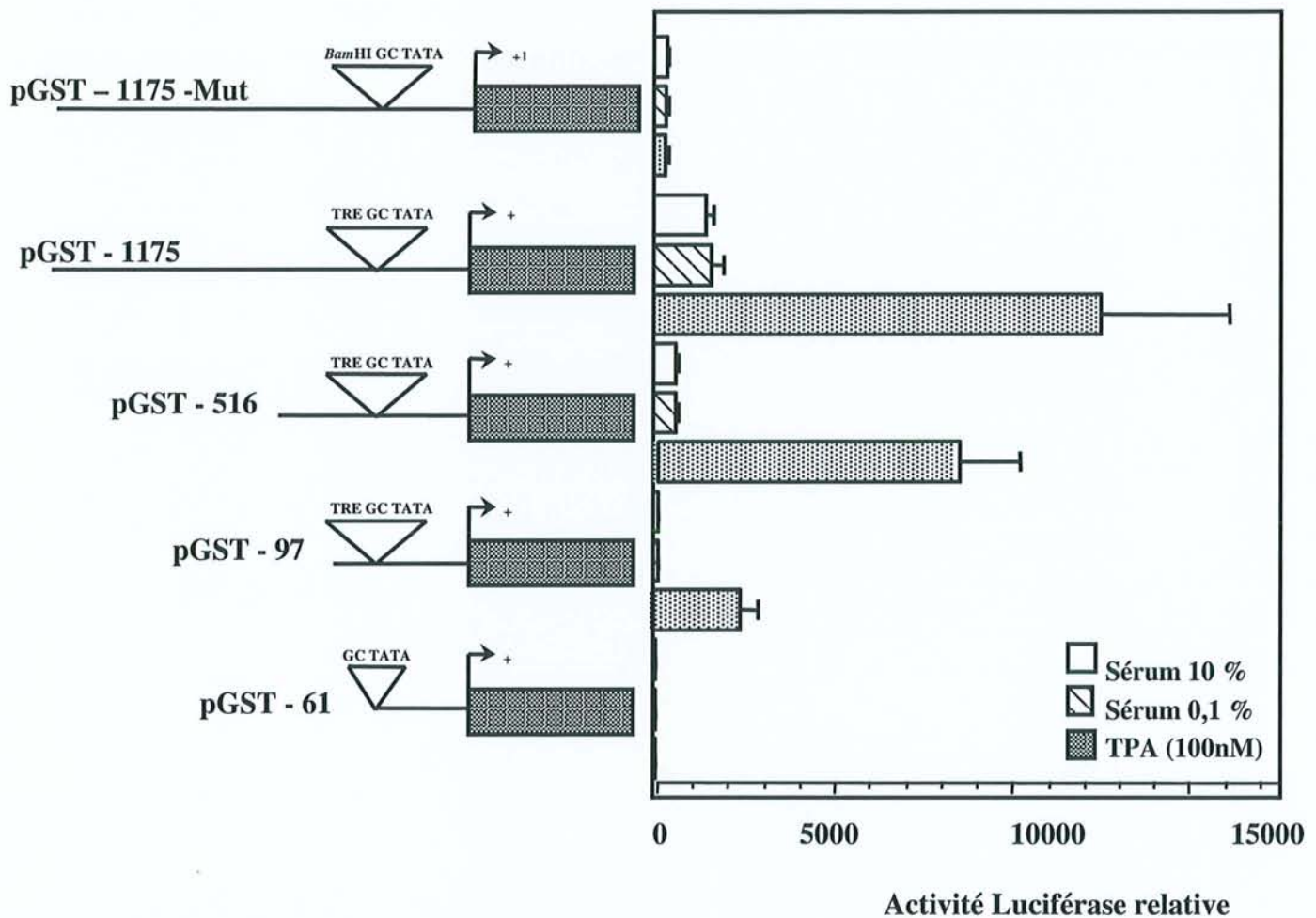


Figure 28: Activité transcriptionnelle des différents fragments du promoteur *GSTP1* en réponse au TPA.

Les cellules K562 ont été cultivées avec 0,1% de sérum de veau fœtal pendant 16h avant d'être transfectées par les différentes constructions (décrites dans la Figure 13). Après 32h, les cellules ont alors été traitées pendant 16h par 100 nM de TPA. L'activité luciférase est mesurée 48h après la transfection. L'activité luciférase est exprimée en pourcentage d'augmentation par rapport à l'activité observée pour la même construction sans traitement, standardisée par rapport à la quantité de protéines et fixée à 100%.

dépendant du type cellulaire étudié. En effet, *McCoy et al. (1995)* ont traité des K562 par 16 nM de TPA après les avoir transfectées avec une construction associant luciférase et promoteur *mdr1*. L'activation de la luciférase commence dès 5 heures de traitement et augmente progressivement jusqu'à atteindre une induction d'environ 14 fois après 10h et 38 fois après 24h de traitement.

L'induction de l'activité luciférase la plus forte (c'est-à-dire 18 fois) est obtenue avec les constructions contenant les plus petits fragments du promoteur (pGST-97), ce qui signifie que ces fragments contiennent les éléments nécessaires à l'induction du gène *GSTP1* par le TPA. Avec des constructions contenant des fragments plus grands du promoteur (pGST-516), nous observons une induction de l'activité luciférase toujours forte (13 fois) légèrement plus faible que celle observée avec pGST-97. Enfin, avec la plus grande construction testée, pGST-1175, l'induction n'est plus que de 8 fois. Il est donc probable que des éléments de régulation négatifs et répondants au TPA se trouvent dans la région du promoteur située entre -97 et -1175. Ces résultats sont en désaccord avec ceux de *Morrow et al. (1990)*, qui n'ont pas pu mettre en évidence de réponse au TPA dans le promoteur *GSTP1* dans la lignée de cancer du col HeLa, bien qu'ils aient travaillé avec une construction contenant 2200 bases en amont du site de départ de la transcription.

Nos résultats montrent pour la première fois que le TPA active le promoteur du gène *GSTP1* humain dans une lignée leucémique, et que les éléments qui répondent positivement au TPA se situent au niveau du promoteur minimal -97.

5.4.4. Induction des facteurs de transcription par le TPA

Nous avons montré que le TPA induit l'activité du promoteur minimal pGST-97 dans les cellules K562. Or nous avons déjà vu que ce promoteur contient plusieurs sites potentiels de liaison pour des facteurs de transcription. En l'absence de toute stimulation, plusieurs complexes protéiques contenus dans les extraits nucléaires des différentes lignées leucémiques, se fixent sur la sonde -73 (voir chapitre 5.3.5). Des expériences de retard de migration sur gel ont été réalisées avec la sonde -73 pour déterminer si l'induction par le TPA du promoteur *GSTP1* est la conséquence d'une augmentation de la liaison des protéines nucléaires au promoteur *GSTP1* ou d'une fixation de nouvelles protéines nucléaires.

- Pour les K562 traitées au TPA, nous observons une induction de la liaison des protéines nucléaires aux deux sondes -73 (Figure 29) et TRE (Figure 30).
- **Pour la sonde -73** (Figure 29A), seule la fixation du complexe supérieur Cx est induite par le traitement. Le maximum de fixation est observé pour les extraits de cellules traitées pendant 2h. Ces résultats sont contradictoires avec les conclusions de *Morrow et al. (1990)* qui montraient que le promoteur de *GSTP1* n'est pas inductible au TPA dans leur système cellulaire. Toutefois cela n'avait jamais été étudié dans le cas de leucémies humaines, et nos résultats qui diffèrent selon la lignée étudiée prouvent que l'effet du TPA est peut-être dépendant du type cellulaire. Le TPA agit par l'intermédiaire de la PKC et induit l'expression de *c-jun* et *c-fos* dans des cellules d'hépatome murin (*Puga et al., 1992*). Des expériences de compétition avec des sondes froides -73 et TRE ainsi que leur homologues mutés démontrent la spécificité du complexe protéique préalablement observé (Figure 29B).

- **Pour la sonde TRE**, après autoradiographie (Figure 30A), nous observons que deux complexes protéiques Ca et Cb contenus dans les extraits nucléaires de la lignée K562 sont capables de se fixer sur la sonde TRE. A partir de 15min de traitement, nous pouvons observer la formation d'un complexe protéique majeur qui s'amplifie en fonction du temps. Le complexe CB disparaît et devient minoritaire. De nouveau une approche par compétition permet de mettre en évidence la spécificité du complexe protéique observé (Figure 30B).

Le traitement par le TPA (100nM, 16h) des cellules Raji n'entraîne aucune modification du profil de liaison des extraits nucléaires traités à la sonde -73 ou à la sonde TRE par rapport aux cellules non traitées (Figure 31A). Nous avons vu que le TPA ne modifie pas l'expression de la protéine et n'active pas l'expression du gène luciférase. Le fait que la liaison des protéines nucléaires au promoteur dans ces cellules n'est pas modifiée par le traitement au TPA permet donc de conclure que le TPA n'active pas le promoteur *GSTP1* dans les cellules Raji.

Toutefois avec la sonde TRE, une faible et transitoire induction du complexe Ca peut être observé vers 2h de traitement (Figure 31B, comparer pistes 3 et 4 à 7 et 8) si l'on compare cellules K562 et Raji..

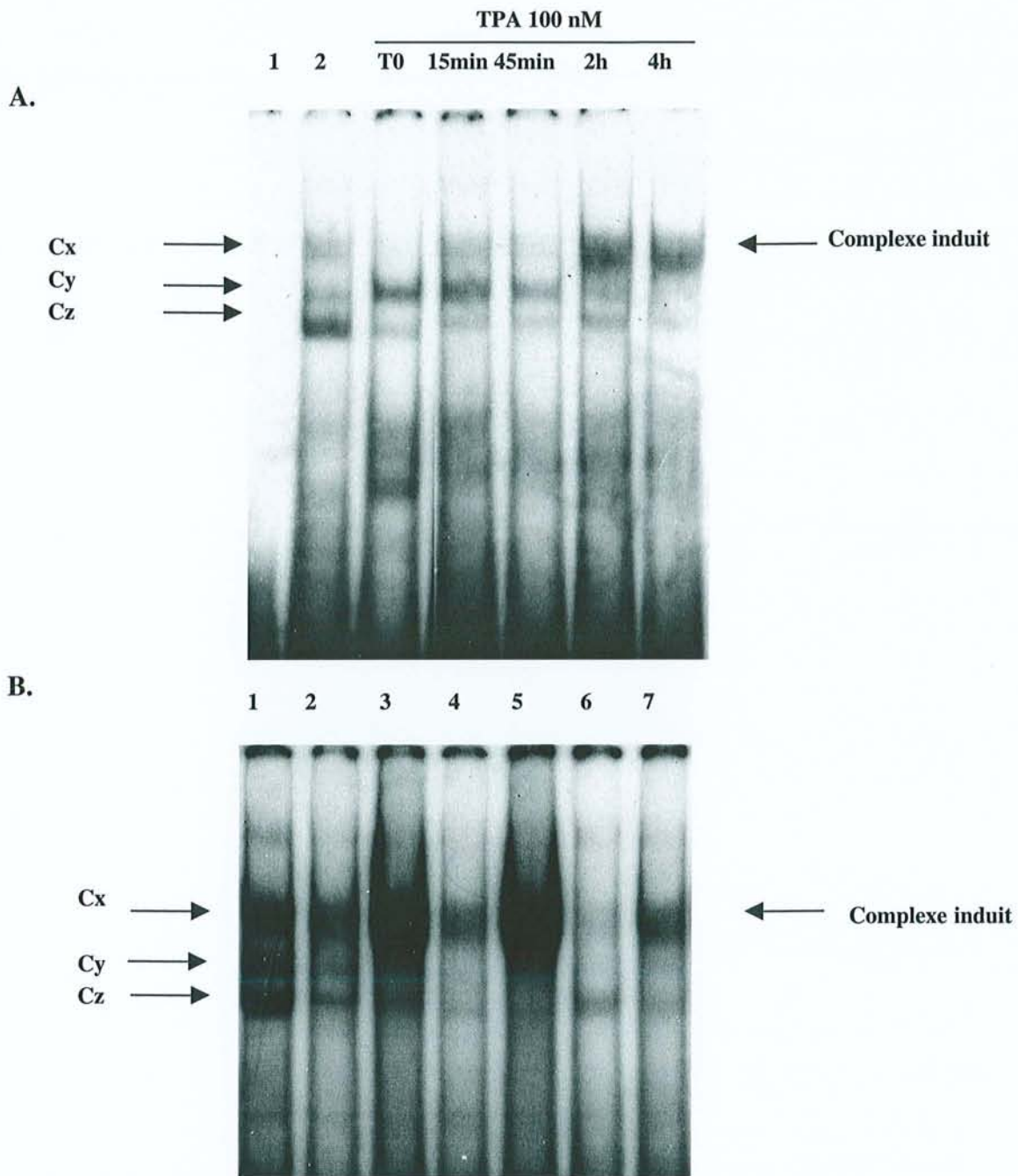


Figure 29: Effet du traitement par le TPA sur la fixation des protéines nucléaires des cellules K562 (sonde -73).

A : 10 μ g d'extraits nucléaires des cellules K562 cultivées pendant 24h (Sérum 0,01 %), traitées pendant des temps variable au TPA (100 nM) et incubés avec 0,3 ng de sonde -73 pendant 15 minutes. (1) sonde -73 seule; (2) avec extraits nucléaires de K562 cultivées (Sérum 10 %); (3 à 7) temps de traitement au TPA 100 nM comme indiqués. **B :** 10 μ g d'extraits nucléaires de cellules K562 ont été préincubés 16h avec un excès molaire de 500 fois d'oligonucléotides froids. Le mélange a été incubé 15 minutes à température ambiante avec 0,5 ng de sonde -73 radiomarquée. (1) sonde avec extraits nucléaires de K562 ; (2) traitement au TPA 100 nM Temps 0, (3) traitement au TPA 100 nM 2h, (4) compétition avec -73 froide ; (5) compétition avec -73 mut ; (6) compétition avec TRE ; (7) compétition avec TRE mut.

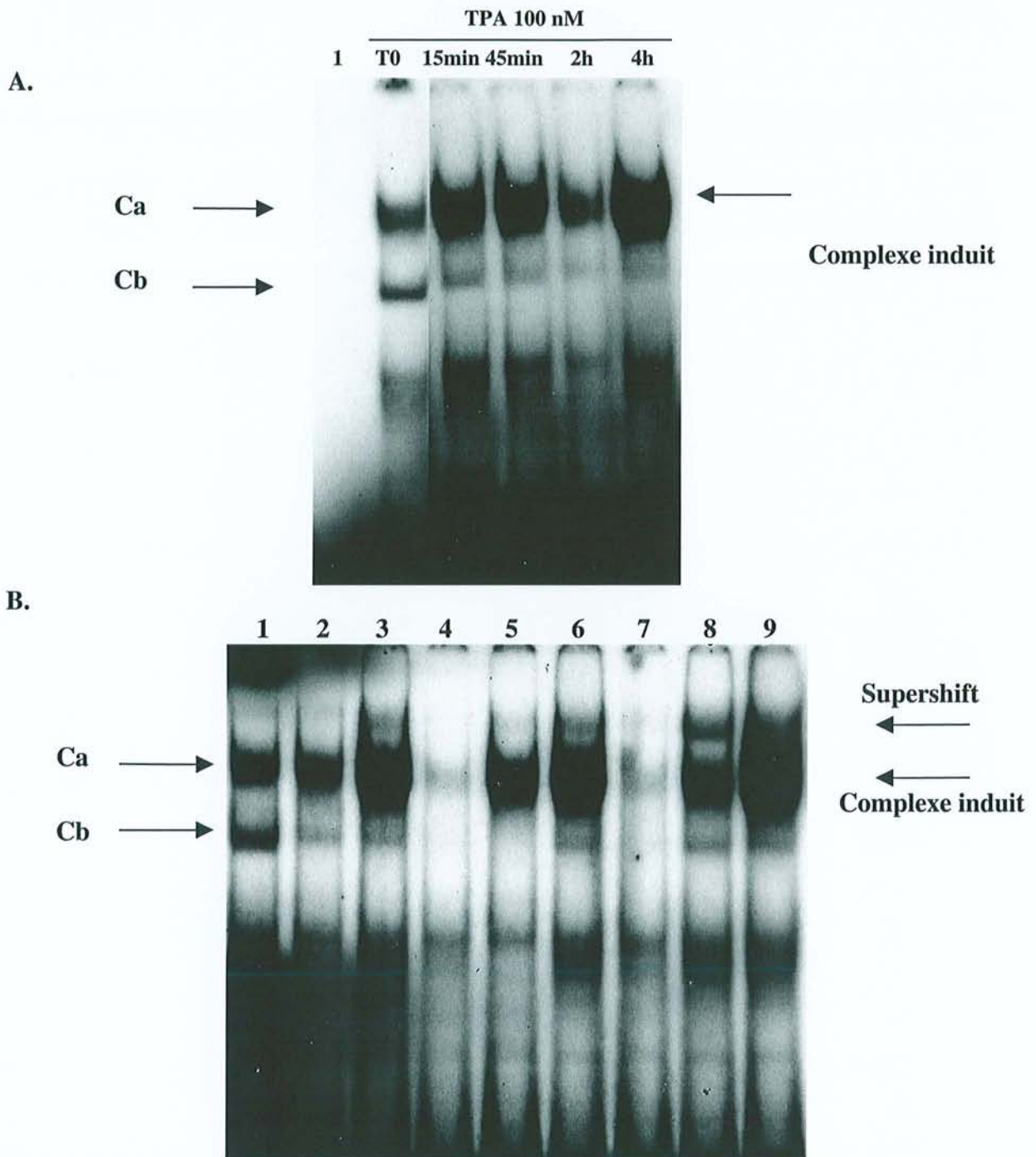


Figure 30: Effet du traitement par le TPA sur la fixation des protéines nucléaires des cellules K562 (sonde TRE).

A : 10 μ g d'extraits nucléaires des cellules K562 cultivées pendant 24h (Sérum 0,01 %), traitées pendant des temps variable au TPA (100 nM) et incubés avec 1 ng de sonde TRE pendant 15 minutes. (1) sonde -73 seule; (2 à 6) temps de traitement au TPA 100 nM comme indiqués. **B :** 10 μ g d'extraits nucléaires de cellules K562 ont été préincubés 16h avec un excès molaire de 500 fois d'oligonucléotides froids ou avec 4 μ g d'anticorps à 4°C pendant 20 minutes à 4°C. Le mélange a été incubé 15 minutes à température ambiante avec 1 ng de sonde TRE radiomarquée. (1) sonde TRE avec extraits nucléaires de K562 (Sérum 10 %); (2) traitement au TPA 100 nM Temps 0, (3) traitement au TPA 100 nM 4h, (4) compétition avec -73 froide ; (5) compétition avec -73 mut ; (6) compétition avec TREmut ; (7) compétition avec TRE, (8) supershift avec c-jun, (9) supershift avec junD.

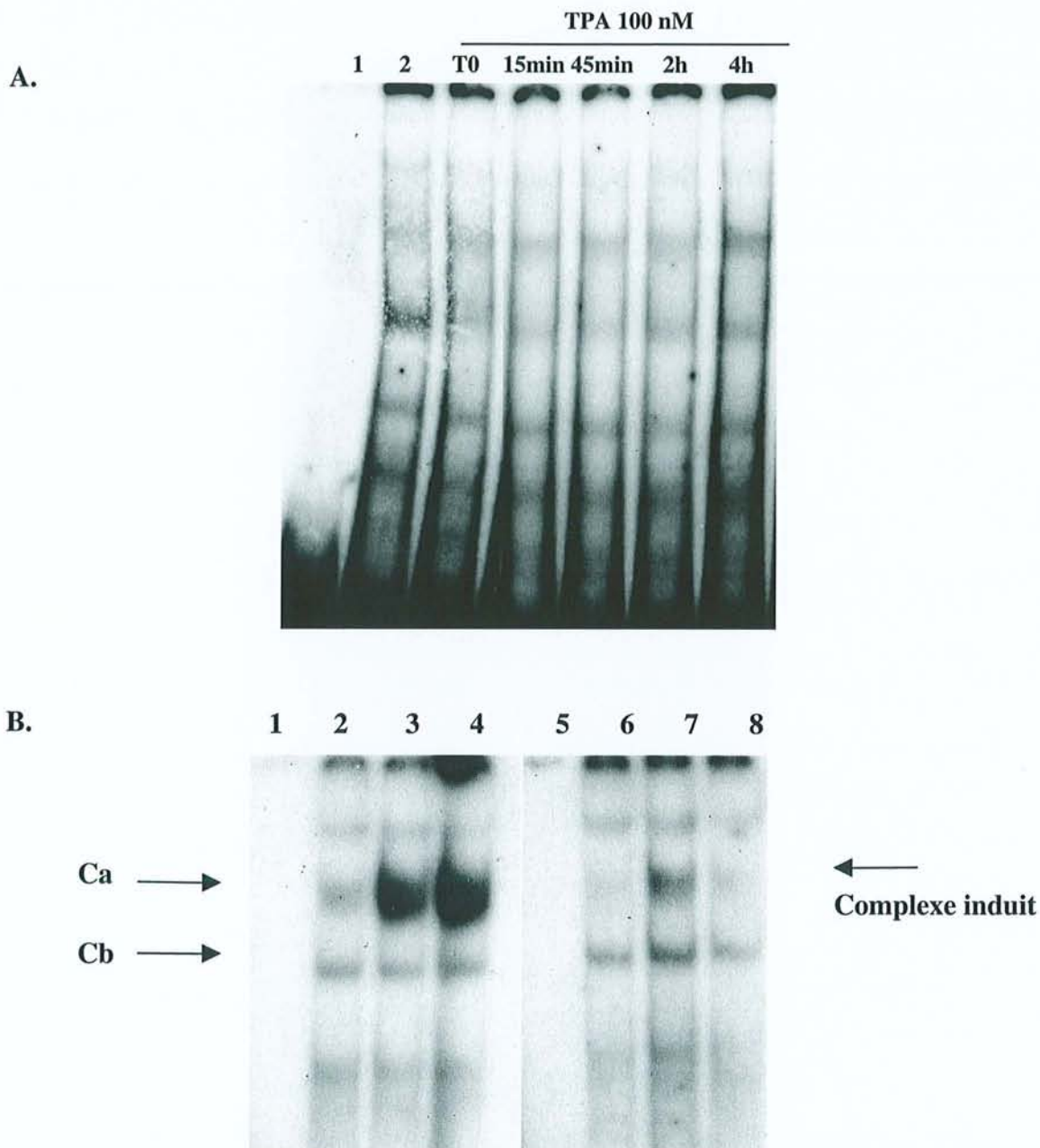


Figure 31: Effet du traitement par le TPA sur la fixation des protéines nucléaires des cellules Raji (sonde -73).

A : 10 µg d'extraits nucléaires des cellules Raji cultivées pendant 24h (Sérum 0,01 %), traitées pendant des temps variable au TPA (100 nM) et incubés avec 0,25 ng de sonde -73 pendant 15 minutes. (1) sonde -73 seule; (2) avec extraits nucléaires de Raji cultivées (Sérum 10 %); (3 à 7) temps de traitement au TPA 100 nM comme indiqués. **B :** Comparaison de l'effet du traitement par le TPA sur la fixation des protéines nucléaires des cellules K562 et Raji (sonde TRE). 10 µg d'extraits nucléaires des cellules K562 ou Raji cultivées au préalable pendant 24h (Sérum 0,01 %) puis traitées au TPA 100 nM sont incubés avec 0,25 ng de sonde TRE pendant 15 minutes puis analysés par retard de migration sur gel. (1) sonde TRE seule; (2) avec extraits nucléaires de K562 (Sérum 0,01 %); (3) avec extraits nucléaires de K562 traitées pendant 2h, (4) ou pendant 4h au TPA, (5) sonde TRE seule; (6) avec extraits nucléaires de Raji (Sérum 0,01 %); (7) avec extraits nucléaires de Raji traitées pendant 2h au TPA, (8) ou pendant 4h.

5.4.5. Identification des complexes protéiques après traitement au TPA

Afin de déterminer le type de protéines nucléaires capables de se fixer sur le promoteur de la GSTP1 après traitement au TPA (100 nM) nous avons entrepris de expériences de supershift en utilisant des anticorps dirigés contre les familles de facteurs de transcription Jun, Fos NF-E2 et NF-E2 related (NRF).

- En ce qui concerne les facteurs de transcription de la famille Jun, les supershifts montrent que le complexe Cx lié à la sonde -73 et induit par le traitement au TPA est composé de la protéine c-jun (Figure 32, piste 4). Le même type de résultat a pu être mis en évidence en réalisant des supershifts avec une sonde TRE (voir figure 30, piste 8). Avec cette sonde un supershift de JunD peut être mis en évidence. Ce type de supershift n'existe pas avec la sonde -73 (Figure 32, piste 5).
- En ce qui concerne les facteurs de transcription de la famille Fos, les supershifts montrent que le complexe Cx contient une quantité nettement plus faible de Fra-1 lié à la sonde -73 après traitement au TPA (Figure 32, piste 9). Les autres membres de la familles Fos (c-fos, FosB, et Fra-2 ne sont pas impliqués dans le complexe observé.
- En ce qui concerne les facteurs de transcription de la famille NF-E2 p45 et related, nous obtenons un supershift avec l'anticorps anti-NF-E2p45 qui déplace le complexe Cy lié à -73 (Figure 33, piste 6) sans obtenir de supershift avec la sous-unité p18, ni avec Nrf-1 et 2.

Cirillo et al.(1999) ont montré dans des cellules HepG2 que le traitement au TPA entraîne une augmentation de la fixation de c-Jun et de Fra-1 sur le promoteur du gène

uPA. Ces mêmes auteurs ont mis en évidence que c-Jun est phosphorylé sur le résidu Ser73 et par conséquent activé par le TPA pendant la première heure de traitement.

Ces résultats montrent que le TPA active la liaison d'un complexe composé de c-jun, qui peut alors induire la transcription du gène *GSTP1*, et la fixation d'une protéine NF-E2p45, ce qui rend cet effet du TPA sur le gène *GSTP1* spécifique des lignées hématopœïétiques.

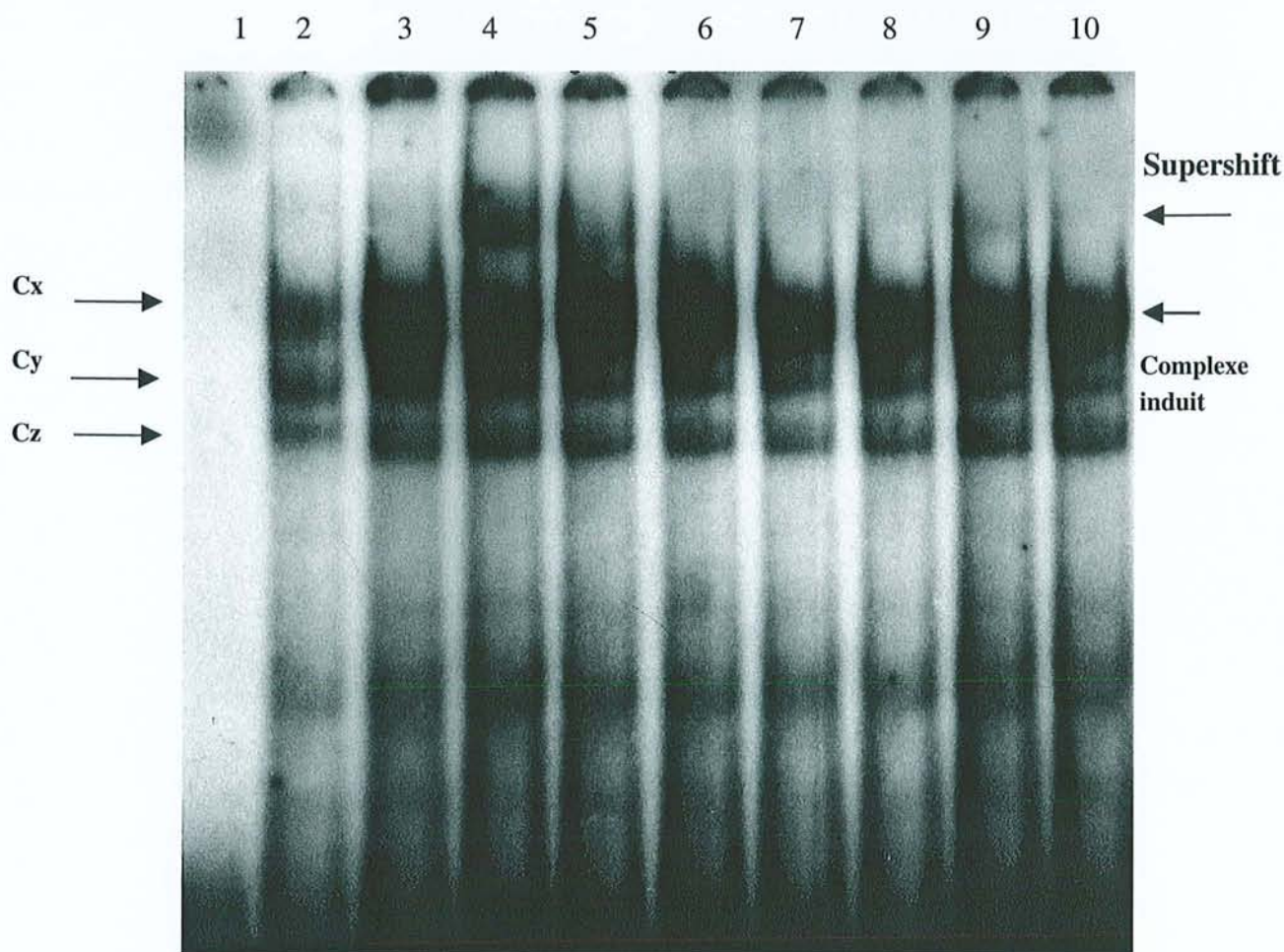


Figure 32 : Supershifts avec les anticorps dirigés contre la famille Jun ou Fos.

10 μ g d'extraits nucléaires de K562 non traitées ou traitées pendant 2h avec 100nM de TPA, sont préincubés avec 4 μ g d'anticorps anti c-jun, anti JunB, junD, FosB, Fra-1 Fra-2 ou anti c-fos à 4°C pendant 20 minutes à 4°C. Puis les mélanges sont incubés pendant 15 minutes avec la sonde -73 radiomarquée (0,5 ng) à température ambiante. La migration est faite en gel de polyacrylamide à 5%, puis le gel est séché et exposé 1 nuit avec le film Kodak X-Omat. (1) sonde -73 seule; (2) sonde avec K562; (3) à (10) : K562 traitées 2h au TPA(3) sonde avec K562 traitées; (4) supershift avec anti c-Jun; (5) supershift avec anti JunB; (6) supershift avec anti-JunD; (7) supershift avec anti c-Fos; (8) supershift avec anti FosB; (9) supershift avec anti Fra-1; (10) supershift avec anti Fra-2.

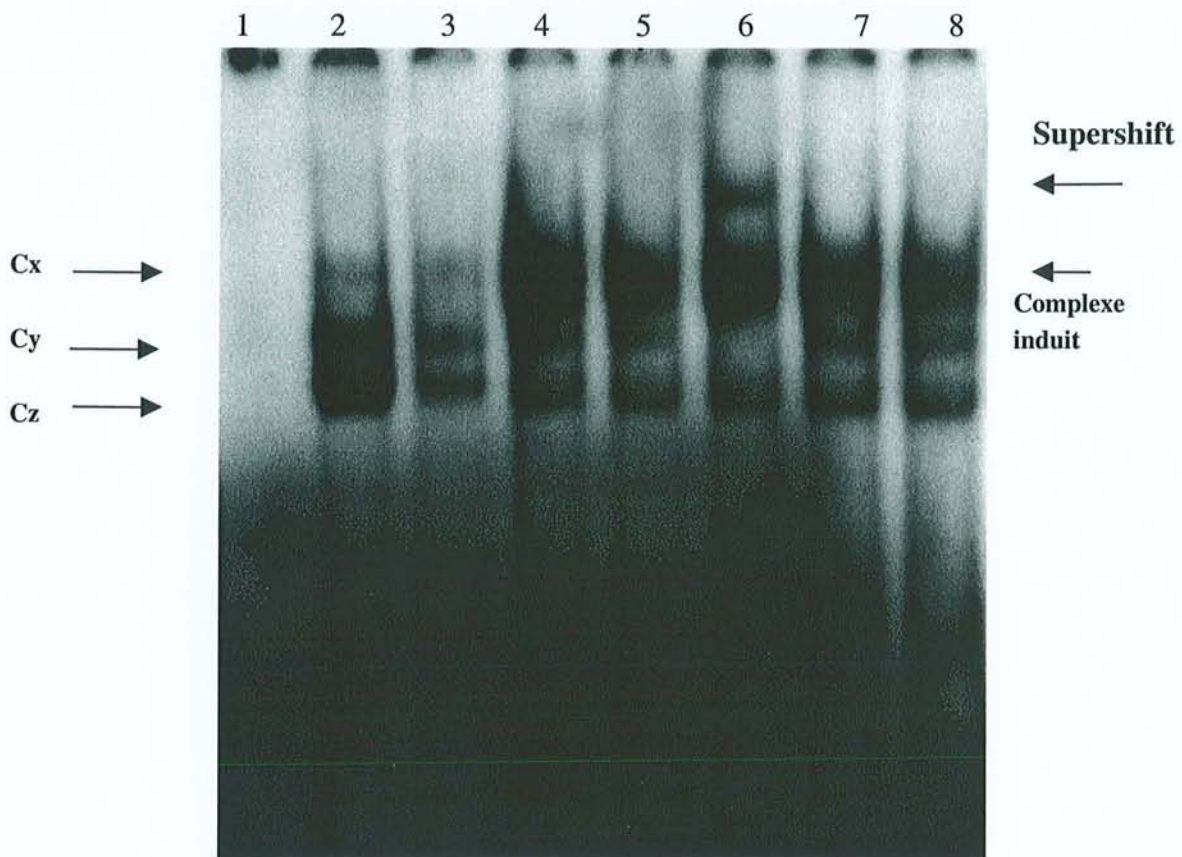


Figure 33: Supershifts avec les anticorps contre les protéines NF-E2.

10 μ g d'extraits nucléaires de K562 non traitées ou traitées pendant 2h avec 100nM de TPA, sont préincubés avec 4 μ g d'anticorps anti NF-E2 p18, anti NF-E2 p45, anti-Nrf1, ou anti Nrf2 pendant 20 minutes à 4°C. Puis les mélanges sont incubés pendant 15 minutes avec la sonde -73 radiomarquée (0,67 ng) à température ambiante. La migration est faite en gel de polyacrylamide à 5%, puis le gel est séché et exposé 1 nuit avec le film Kodak X-Omat. (1) sonde -73 seule; (2) sonde avec K562; (3) sonde avec K562 prétraitées 24h sans sérum; (4) à (8) K562 prétraitées 24h sans sérum puis traitées 2h au TPA ;(4) sonde avec K562 traitées; (5) supershift avec anti NF-E2 p18; (6) supershift avec anti-NF-E2 p45; (7) supershift avec anti-Nrf1; (8) supershift avec anti Nrf2.

5.5. Traitement des cellules par la Doxorubicine ou par un stress oxydant

Il a déjà été montré que l'expression du gène *GSTA1* et du gène *GSTP* chez le rat sont sous le contrôle du stress oxydant, en particulier des radicaux hydroxyles $\cdot\text{OH}$ (*Pinkus et al.*, 1996; *Nakamura et al.*, 2000). Le stress oxydant augmente l'expression d'autres gènes codant pour des enzymes antioxydantes, telles que la γ -glutamyl cystéine synthétase, l'hème oxygénase ou la protéine hsp90 (*Nakamura et al.*, 2000). Il est donc de plus en plus accepté que le stress oxydant stimule une grande variété de voies de transduction du signal et un large éventail d'effets biologiques. Nous avons choisi trois molécules génératrices du stress oxydant (peroxyde d'hydrogène, TBHQ, et doxorubicine) et nous avons voulu observer les effets exercés sur l'expression de la GSTP1-1.

- **Cas des cellules K562**

- **Traitement par la doxorubicine**

Nous avons traité les cellules K562 par de la doxorubicine 2 μM pendant des temps variables, en l'absence de sérum. Les extraits nucléaires ont été préparés comme précédemment et des expériences de retard de migration sur gel ont été réalisées avec la sonde -73.

En ce qui concerne la sonde -73, la Figure 34A montre que la doxorubicine augmente la fixation du complexe protéique Cx sur le promoteur *GSTP1* après 45 minutes de traitement des cellules; cette fixation est maximale à 2h, puis décroît ensuite. Ce complexe est semblable à celui induit par le traitement au TPA. *Pinkus et al.* (1995) ont montré que la doxorubicine chez le rat entraîne une augmentation de la liaison d'AP-1 sur son site de reconnaissance dans le promoteur *GSTY α* , et que cet effet passe par une production de radicaux libres.

En ce qui concerne la sonde TRE, nous pouvons observer un double phénomène (Figure 34B), avec une induction rapide et durable du complexe Ca entre 15min et 4h et une augmentation retardée du complexe Cb qui atteint un maximum vers 2h pour décroître ensuite.

- **Traitement par le peroxyde d'hydrogène**

Nous avons traité les cellules K562 par l' H_2O_2 pendant des temps variables. Les extraits nucléaires ont été préparés comme précédemment et des expériences de retard de migration sur gel ont été réalisées avec la sonde -73 et TRE.

En ce qui concerne la sonde -73, la Figure 35A montre que l' H_2O_2 augmente la fixation du complexe protéique Cx sur le promoteur *GSTP1* transitoirement avec un maximum à 2h de traitement. Ce complexe est semblable à celui induit par le traitement au TPA. Le maximum de fixation est bien obtenu au même temps qu'avec la doxorubicine mais il semble que l'effet du H_2O_2 soit plus ponctuel, ce qui laisserait supposer un mode d'action différent.

En ce qui concerne la sonde TRE, nous pouvons observer (Figure 35B) une induction rapide et durable du complexe Ca entre 15min et 4h et une disparition du complexe Cb.

- **Traitement par le TBHQ**

Nous avons alors traité les K562 par 30 μM de TBHQ (Figure 36) pendant des temps variables. Les extraits nucléaires ont été préparés comme précédemment et des expériences de retard de migration sur gel ont été réalisées avec la sonde -73 et TRE.

En ce qui concerne la sonde -73, la Figure 36A montre que le TBHQ augmente la fixation du complexe protéique Cx sur le promoteur *GSTP1* transitoirement avec un maximum vers 4h de traitement. Ce complexe est semblable à celui induit par le traitement au TPA.

En ce qui concerne la sonde TRE, nous pouvons observer (Figure 35B) une induction rapide et durable du complexe Ca entre 15min et 4h et une induction tardive vers 4h de traitement du complexe Cb. D'après *Yoshioka et al. (1995)*, le TBHQ augmente les ARNm de *c-jun*, *junB*, *fra-1* et *fra-2* après au moins 3 h de traitement, ce qui n'est pas tout à fait compatible avec nos résultats. *Pinkus et al. (1996)* ont montré que le TBHQ agissait en produisant du peroxyde d'hydrogène avant de produire des radicaux hydroxyles, ce qui pourrait expliquer en partie le décalage de l'effet entre le TBHQ et la doxorubicine ou le H₂O₂. De plus ces mêmes auteurs ont montré que l'activation de la GST Ya du rat par le TBHQ passe également par une activation de NF-κB. Chez l'homme, *Xia et al. (1996)* ont mis en évidence un élément NF-κB like qui répond au stress oxydant produit par H₂O₂. Toutefois ils n'ont pas étudié la fixation des facteurs de transcription au promoteur. Pour d'autres auteurs cet élément fonctionnerait plutôt comme un inhibiteur du promoteur *GSTP1* (*Moffat et al., 1996-2*) et ne peut pas être impliqué dans la réponse au stress oxydant.

- **Cas des cellules Raji**

Nous avons réalisé les mêmes traitements avec des cellules Raji en culture (Figure 37) en utilisant le fragment -73 comme sonde radioactive. Les mêmes concentrations et les mêmes temps de traitement n'ont pas entraîné la fixation de complexes protéiques spécifiques sur le fragment -73.

Ces résultats préliminaires montrent que la Doxorubicine, le TBHQ et le peroxyde d'hydrogène activent la liaison d'un complexe protéique comparable à celui qui est induit par le TPA dans les cellules K562 capables d'exprimer la GSTP1-1. Les cinétiques de liaison sur les sondes -73 et TRE diffèrent légèrement d'un composé à l'autre.

Par contre pour la lignée leucémique Raji, aucune fixation d'un complexe protéique spécifique ne se produit.

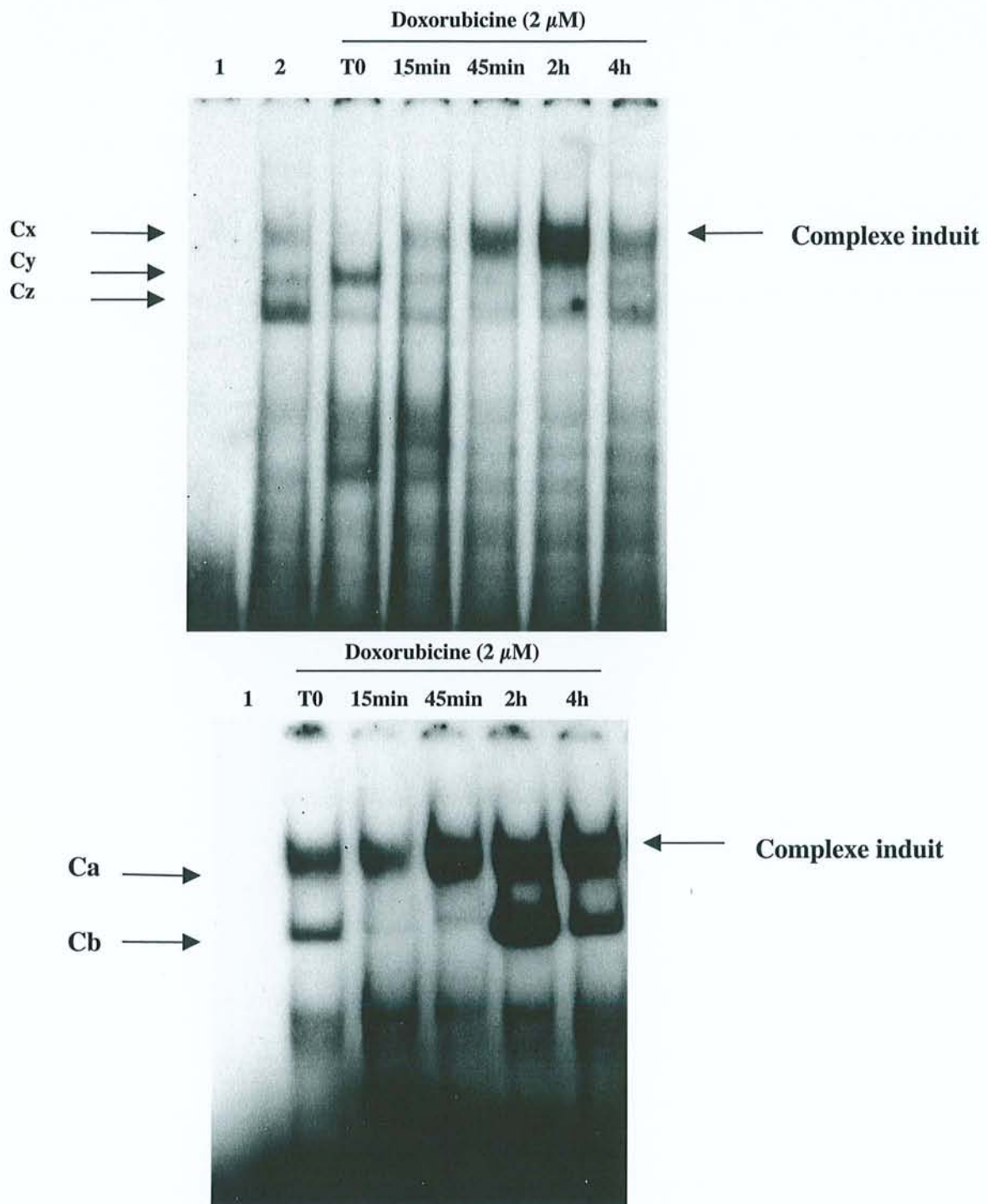


Figure 34: Effet du traitement par la doxorubicine sur la fixation des protéines nucléaires des cellules K562 (sondes -73 et TRE).

A : 10 μ g d'extraits nucléaires des cellules K562 cultivées pendant 24h (Sérum 0,01 %), traitées pendant des temps variable à la doxorubicine (2 μ M) et incubés avec 0,3 ng de sonde -73 pendant 15 minutes. (1) sonde -73 seule; (2) avec extraits nucléaires de K562 (Sérum 10 %); Temps de traitement à la doxorubicine (2 μ M) comme indiqués. **B :** Effet du traitement par la doxorubicine sur la fixation des protéines nucléaires des cellules K562 (sonde TRE). 10 μ g d'extraits nucléaires des cellules K562 cultivées pendant 24h (Sérum 0,01 %), traitées pendant des temps variable à la doxorubicine (2 μ M) et incubés avec 1 ng de sonde TRE pendant 15 minutes. (1) sonde -73 seule; Temps de traitement à la doxorubicine (2 μ M) comme indiqués.

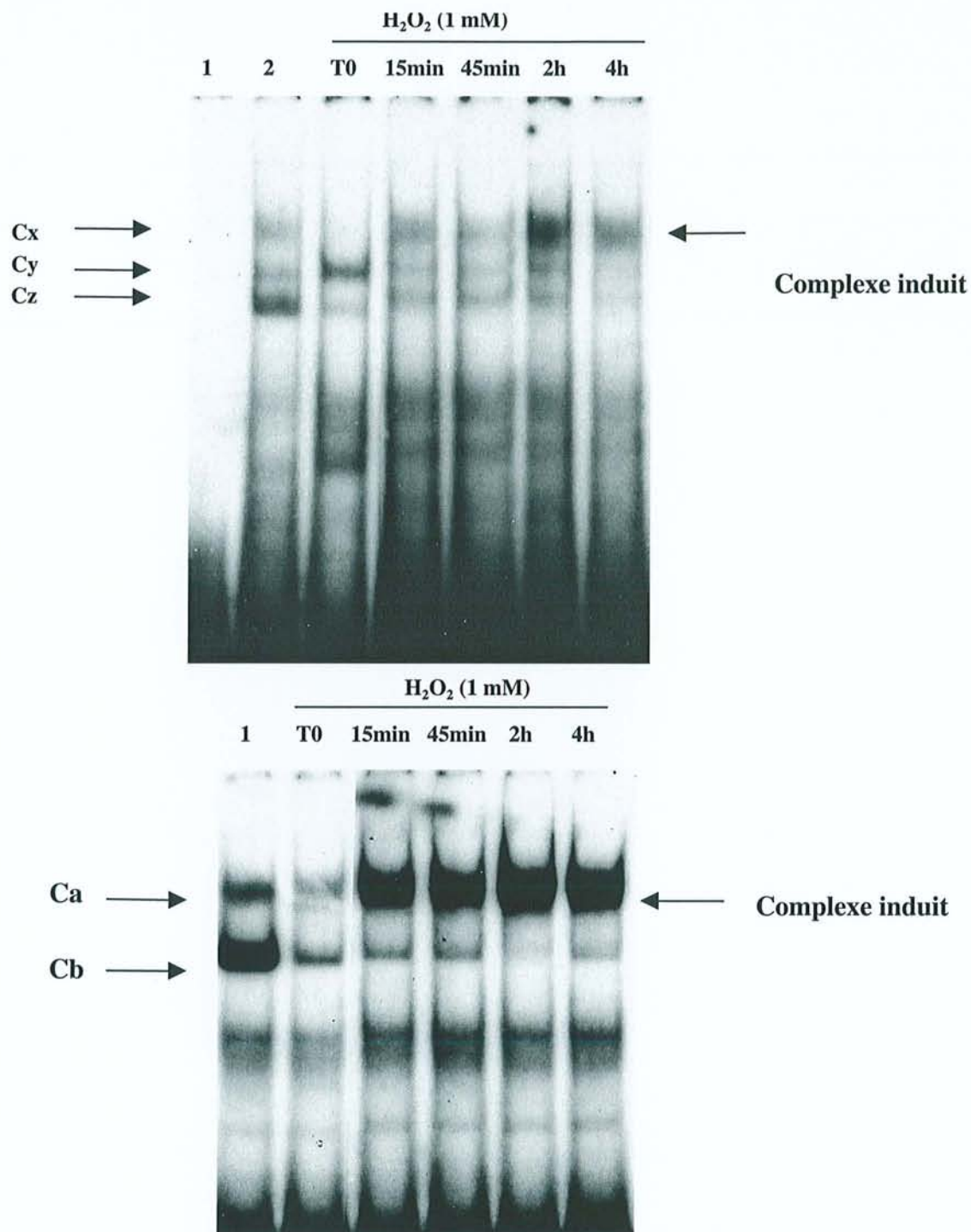


Figure 35: Effet du traitement par l' H_2O_2 sur la fixation des protéines nucléaires des cellules K562 (sonde -73).

A : 10 μ g d'extraits nucléaires des cellules K562 cultivées pendant 24h (Sérum 0,01 %), traitées pendant des temps variable par l' H_2O_2 (1 mM) et incubés avec 0,3 ng de sonde -73 pendant 15 minutes. (1) sonde -73 seule; (2) avec extraits nucléaires de K562 (Sérum 10 %); Temps de traitement par l' H_2O_2 (1 mM) comme indiqués. **B :** Effet du traitement par l' H_2O_2 sur la fixation des protéines nucléaires des cellules K562 (sonde TRE). 10 μ g d'extraits nucléaires des cellules K562 cultivées pendant 24h (Sérum 0,01 %), traitées pendant des temps variable par l' H_2O_2 (1 mM) et incubés avec 1 ng de sonde TRE pendant 15 minutes. (1) sonde -73 seule; Temps de traitement par l' H_2O_2 (1 mM) comme indiqués.

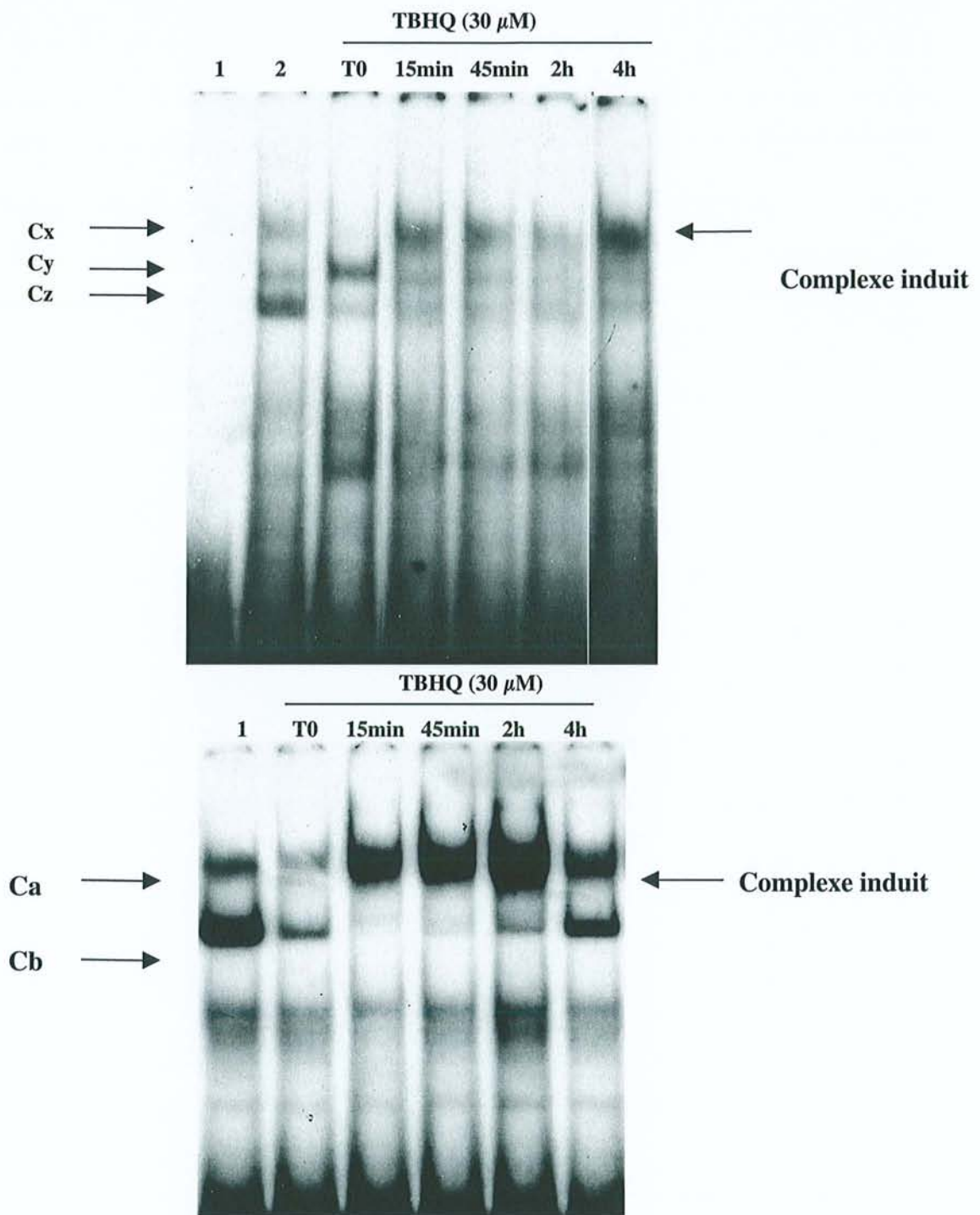


Figure 36 : Effet du traitement par le TBHQ sur la fixation des protéines nucléaires des cellules K562 (sonde -73). **A :** 10 μ g d'extraits nucléaires des cellules K562 cultivées pendant 24h (Sérum 0,01 %), traitées pendant des temps variable par le TBHQ (30 μ M) et incubés avec 0,3 ng de sonde -73 pendant 15 minutes. (1) sonde -73 seule; (2) avec extraits nucléaires de K562 (Sérum 10 %); Temps de traitement par le TBHQ (30 μ M) comme indiqués. **B :** Effet du traitement par par le TBHQ sur la fixation des protéines nucléaires des cellules K562 (sonde TRE). 10 μ g d'extraits nucléaires des cellules K562 cultivées pendant 24h (Sérum 0,01 %), traitées pendant des temps variable par le TBHQ (30 μ M) et incubés avec 1 ng de sonde TRE pendant 15 minutes. (1) sonde -73 seule; Temps de traitement par le TBHQ (30 μ M) comme indiqués.

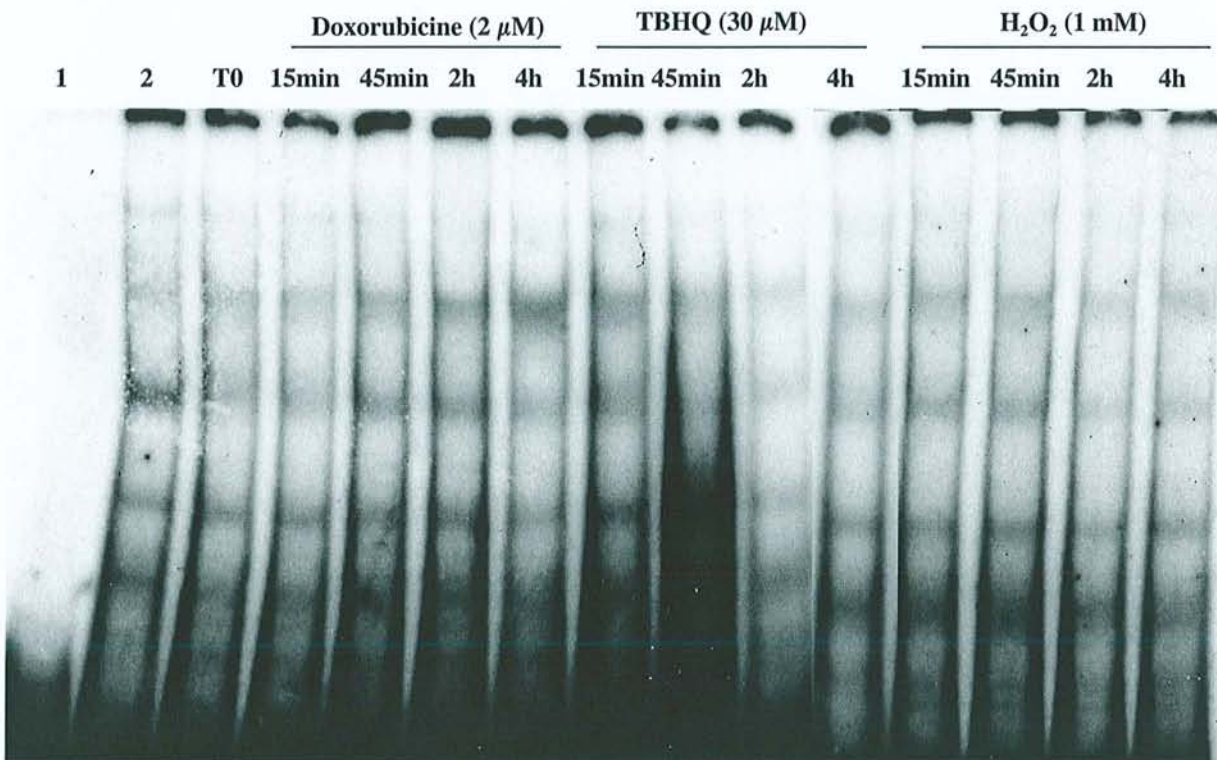


Figure 37: Effet de différents traitements sur la fixation des protéines nucléaires des cellules Raji (sonde -73).

10 μ g d'extraits nucléaires des cellules Raji cultivées pendant 24h (Sérum 0,01 %), traitées pendant des temps variable par le TBHQ (30 μ M) et incubés avec 0,3 ng de sonde -73 pendant 15 minutes. (1) sonde -73 seule; (2) témoin avec extraits nucléaires de K562 (Sérum 10 %); (3) témoin avec extraits nucléaires de K562 (Sérum 0,01 %) sans traitement ; Traitements et temps de traitement comme indiqués.

Lignées cellulaires leucémiques

Exprimant l'ARNm et la protéine

N'exprimant pas l'ARNm ni la protéine

Activité transcriptionnelle élevée

Activité transcriptionnelle faible

K562 U937 Jurkat

Molt-3 Raji

Démethylation partielle

Hautement méthylé

Hautement méthylé

Activité liante "AP-1"

Sans activité liante "AP-1"

Activité liante inductible
(TPA, Dox, H2O2)

Activité liante non-inductible
(TPA, Dox, H2O2)

Schéma récapitulatif des parties I à IV

6. DISCUSSION

L'idée directrice de notre travail est de mettre en évidence la régulation de l'expression de la GSTP1-1, enzyme impliquée dans la cancérogénèse et la résistance aux antinéoplasiques, dans des cellules leucémiques humaines.

Partie I : Expression du gène et de la protéine

Nous avons montré que certaines lignées cellulaires expriment l'ARNm de la GSTP1-1 (K562, U937, Jurkat), ainsi que la protéine elle-même, alors que d'autres lignées (Raji et Molt-3) n'expriment pas cette enzyme. Dans toutes les cellules de patients étudiées, on retrouve par Western-blot une expression de la protéine GSTP1-1. Toutefois, il est probable que chez les patients également, il existe une expression différentielle du gène *GSTP1* selon le type de leucémie dont ils sont atteints. Ainsi, selon *Marie et al. (1995)*, l'ARNm de *GSTP1* est exprimé dans les lymphocytes B et T circulants chez les sujets sains, alors que son expression est très diminuée dans les lymphocytes B de patients atteints de leucémie lymphoïde chronique B. Cette diminution n'est pas retrouvée dans les lymphocytes de patients atteints de leucémie lymphoïde chronique T (*Silber et al., 1992*). Des différences d'expression de la GSTP1-1 entre différentes lignées d'un même type cellulaire ont aussi été retrouvées pour des cellules non hématopoiétiques: comme des tumeurs primaires de cancer du sein (*Moscow et al., 1988*). De plus, une différence d'expression de l'ARNm codant pour la GSTP1-1 a été observée dans deux lignées de cancer du sein VCREMS et MCF7. L'ARNm de la GSTP1-1 reste indétectable dans la lignée MCF-7, alors qu'il est exprimé dans les VCREMS. Cette différence est corrélée à la différence d'expression de la protéine GSTP1-1 elle-même (*Morrow et al., 1996*). Les différences d'expression de la GSTP1-1 pourraient être liées à des différences d'expression du récepteur aux estrogènes dans le cas des tumeurs mammaires.

Partie II : Expression et activité transcriptionnelle

Nous avons également déterminé que le promoteur minimal du gène *GSTP1*, contenu dans la construction pGST-97, est capable d'activer l'expression du gène reporter luciférase à un taux élevé et le fait d'utiliser des constructions plus complètes ne change que peu le résultat. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par *Morrow et al (1992)* qui avaient transfecté deux lignées MCF-7 et HS578T avec des constructions contenant les séquences allant de -8 jusqu'à -2203 pb. Toutefois, dans cette étude, les taux de transcription étaient similaires pour les deux lignées, alors que les cellules MCF-7 n'expriment pas le messager *GSTP1* contrairement aux cellules HS578T. Ces résultats pourraient s'expliquer par des mécanismes de régulation post-transcriptionnelles qui restent à être élucidés. Nos constructions ne contiennent que des séquences allant jusqu'à -1175 pb alors qu'il a été montré que des éléments de régulation positifs ou négatifs se trouvent parfois à plusieurs milliers de pb du site de début de la transcription. Il est parfaitement imaginable que de telles séquences, qui restent à être mises en évidence, influencent *in vivo* la régulation transcriptionnelle de l'expression du gène *GSTP1*, ce qui expliquerait notamment que l'activité du promoteur *GSTP1* ne soit pas nulle dans les Raji, alors que ces cellules n'expriment pas d'ARNm.

Une étude menée par *Jhaveri et Morrow (1998-1)* a mis en évidence que des mécanismes de régulation post-transcriptionnelle des gènes sont certainement impliqués dans l'expression de la *GSTP1-1*, tout au moins dans le cas du cancer du sein. Après transfection transitoire de constructions associant à un gène reporter 2203 pb du promoteur *GSTP1* en 5' et 316 pb de séquences flanquantes en 3', les auteurs n'ont pas pu mettre en évidence de différence significative d'activité du promoteur *GSTP1* permettant d'expliquer que les cellules de la lignée VCREMS expriment la *GSTP1-1*, alors que celles de la lignée MCF-7 ne l'expriment pas. Enfin, après

transfection stable d'un mini-gène codant pour la GSTP1-1 (qui contient tous les introns et les exons, le promoteur et les séquences flanquantes 3' et 5'), l'ARNm transcrit à partir de ce mini-gène présente une stabilité très élevée dans les deux lignées VCREMS et MCF-7.

Par ailleurs, la méthylation du promoteur est responsable de la régulation de l'expression de la GSTP1-1 dans de nombreux types cellulaires (*Millar et al., 2000*). Dans les cellules de cancer de la prostate, la méthylation des îlots CpG du promoteur est à l'origine de l'inhibition de l'expression de la GSTP1-1 (*Lee et al., 1994; Millar et al., 1999*), de même que la méthylation du promoteur empêche l'expression de la GSTP1-1 dans les hépatocarcinomes (*Tchou et al., 2000*). Récemment *Esteller et al. (1998)* ont suggéré que l'hyperméthylation du promoteur de la GSTP1-1 pourrait être responsable de l'inactivation génique de l'expression de la GSTP1-1 dans le cas des carcinomes mammaires et rénaux.

Partie III : Expression et méthylation du promoteur

Dans les lignées leucémiques, nos résultats montrent que les cellules Raji et Molt-3 qui n'expriment pas la GSTP1-1 ont un promoteur hyperméthylé, alors que les cellules K562 ont un promoteur partiellement déméthylé et que les cellules U937 et Jurkat ont un promoteur très méthylé. Nous en déduisons que l'absence d'expression de la GSTP1-1 peut être corrélée à l'hyperméthylation du promoteur, mais que ce mécanisme épigénétique n'est pas suffisant pour inhiber l'expression du gène *GSTP1* dans les cellules leucémiques. *Esteller et al. (1998)* ont montré que les leucémies et les lymphomes présentaient presque toujours un promoteur non méthylé. Toutefois leur étude porte sur des lignées dont la nature n'est pas précisée, et aucune relation avec l'expression de la GSTP1-1 n'a été faite, ni pour les patients, ni pour les lignées étudiés. D'autre part, la région de l'ADN explorée n'est pas exactement la même que celle que nous avons étudiée; nous avons travaillé avec le promoteur basal nécessaire et suffisant à l'expression du gène. Enfin la technique de PCR spécifique de

la méthylation que les auteurs ont employée, ne permet pas de définir avec précision quel dinucléotide est méthylé ou pas. Pour toutes ces raisons nous estimons que les résultats d'*Esteller et al. (1998)* et les nôtres ne sont pas contradictoires. *Melki et al. (1999)* ont montré que le gène *GSTP1* est déméthylé chez les 12 patients atteints de LAM qu'ils ont étudiés. Nous n'avons pas de lignées correspondant à ce type de pathologies, et dans leur étude, les auteurs ne montrent pas si cette déméthylation est corrélée à une expression de la *GSTP1-1* ou pas.

Pour les tumeurs du sein et du rein qu'*Esteller et al. (1998)* ont également étudiées, les cellules qui expriment la *GSTP1-1* ont un promoteur *GSTP1* non méthylé. La relation entre hyperméthylation et non expression du gène *GSTP1*, ou déméthylation et expression de *GSTP1* a été confirmée dans les cancers du sein par *Jhaveri et Morrow (1998-2)* qui ont montré qu'un traitement des cellules présentant un promoteur *GSTP1* méthylé, par l'agent déméthylant 5-aza-déoxycytidine, s'accompagne d'une déméthylation du gène et d'une activation de l'expression de la *GSTP1-1*.

Toutefois, l'hypométhylation d'un gène n'est pas toujours suffisante à elle seule pour permettre l'expression de ce gène, comme nous pouvons le déduire des résultats obtenus avec les K562. *Ianello et al. (1997 ; 2000)* ont montré que la déméthylation d'un gène codant pour une enzyme nécessaire à la spermatogénèse, précède de plusieurs jours l'expression du gène et que la fixation de facteurs de transcription au promoteur de ce gène est également une étape nécessaire à l'expression de ce gène. Dans leurs expériences, lorsque plus de 60% du promoteur est déméthylé, cela n'est pas suffisant pour permettre l'expression du gène, en fonction du stade cellulaire. La disponibilité et le recrutement sur l'ADN des facteurs de transcription sont également des facteurs clés pour le fonctionnement du promoteur.

Un des mécanismes possibles d'inhibition de la transcription par la méthylation est la liaison de deux protéines MeCP1 et MeCP2 qui reconnaissent de façon spécifique l'ADN méthylé (*Nan et al., 1997*). La répression de la transcription par MeCP2 peut se produire, que la séquence méthylée soit proche du site de début de transcription, ou à

distance. Il n'est pas exclu que cette protéine agisse avec d'autres protéines liées à la chromatine. Il a pu être montré que la méthylation du site Sp-1 permet la liaison de la protéine MeCP2, ce qui inhibe l'activation de la transcription du gène humain de la leucosialine (*Kudo, 1998*). La réduction de l'activité du gène reporter méthylé *in vitro* peut s'expliquer par la liaison de protéines sensibles à la méthylation, même si le promoteur lui-même n'est pas méthylé. Toutefois la liaison de MeCP2 ou d'autres protéines sensibles à la méthylation sur le plasmide pGL3 et sur le promoteur *GSTP1*, reste à démontrer.

Nos résultats montrent également que le site Sp-1 distal est significativement plus méthylé dans les lignées qui n'expriment pas la *GSTP1-1* que dans celles qui expriment la *GSTP1-1*, et cela suggère que ce site pourrait être responsable d'une inhibition méthylation dépendante ou d'une activation déméthylation dépendante de l'expression de *GSTP1*. Ce site Sp-1 est essentiel à l'activité du promoteur, comme cela a été montré par des expériences de mutagenèse dirigée (*Jhaveri et Morrow, 1998*). Récemment *Campanero et al. (2000)* ont montré que les facteurs de transcription E2F ne peuvent se lier à leur séquence cible lorsque celles-ci comportent deux dinucléotides CpG méthylés, alors qu'ils se fixent à l'ADN qui ne contient qu'un seul site CpG méthylé. Un seul dinucléotide CpG pourrait donc suffire à empêcher la fixation de facteurs de transcription sensibles à la méthylation. Toutefois cette explication n'est pas valable dans le cas des cellules leucémiques et du promoteur *GSTP1*, puisque le facteur de transcription Sp-1 est insensible à la méthylation de l'ADN. *Millar et al. (2000)* ont également mis en évidence que certains sites CpG situés dans le promoteur *GSTP1* en amont de l'ilôt CpG (situé de -400 à +800 pb) étaient systématiquement méthylés quelque soit le type cellulaire étudié. Dans le cas de ce gène *GSTP1*, une séquence répétée (ATAAA)₁₉₋₂₄ fait la transition entre le domaine de l'ADN qui est hyperméthylé en 5' de l'ilôt CpG, et celui qui n'est pas méthylé et pourrait expliquer comment les méthylases reconnaissent les sites CpG qui doivent être méthylés.

Plusieurs études ont évoqué la possibilité que la méthylation soit allèle-spécifique (*Sakai et al., 1991; Myöhänen et al., 1998*), ce qui expliquerait que les K562 présentent un promoteur déméthylé à 37%, alors qu'on observe une expression de la GSTP1-1. Pour le vérifier, il faut trouver dans la séquence un polymorphisme de restriction, qui permettrait de mettre en évidence une méthylation spécifique d'un seul allèle. *Asimakopoulos et al. (1999)* ont mis en évidence que la méthylation du promoteur du gène *ABL1* dans les cellules K562 est limitée à l'allèle qui porte la translocation Philadelphie t(9;22), alors que l'allèle normal reste non méthylé. Chez les patients, la méthylation du promoteur *ABL1* apparaît liée à la progression de la leucémie myéloïde chronique, et à l'évolution vers une forme plus agressive de la maladie.

La méthylation du promoteur minimal n'est pas absolument nécessaire à la répression de la transcription, puisque les U937 et les Jurkat, qui présentent un fort degré de méthylation sur les autres sites CpG, continuent d'exprimer la GSTP1-1. Dans ces lignées, d'autres facteurs tissu-spécifiques, tels que des facteurs de transcription de la famille AP-1, doivent être impliqués dans le contrôle de l'expression du promoteur *GSTP1*.

Partie IV : Importance du facteur de transcription AP-1

Plusieurs éléments situés dans le promoteur de *GSTP1* peuvent influencer l'expression de cette protéine. Ainsi *Morrow et al. (1990)* avaient montré qu'une région située de -80 à -8 du promoteur *GSTP1* est indispensable à l'expression de l'activité du gène reporter dans le cas de transfections transitoires. Depuis, plusieurs équipes ont montré que l'élément TRE (entre -69 et -60) et une G/C box ou site Sp1 distal (-56 à -51) étaient indispensables à l'expression de base de la *GSTP1* (*Jhaveri et Morrow, 1998; Xia et al., 1996; Moffat et al., 1996-2*). *Moffat et al. (1996)* ont également mis en évidence un élément situé entre -97 et -90, qui permet la fixation d'un répresseur de

l'expression de *GSTP1* dans les cellules MCF7. Cet élément n'est pas actif dans les VCREMS qui expriment la GSTP1-1.

Dans des lignées de cancer du sein, *Moffat et al. (1996-1)* suggèrent un rôle central de Sp-1 dans la régulation de GSTP1-1, toutefois la présence d'un élément répresseur dans le promoteur (-105 à -86) leur a permis de montrer que Sp-1 n'est pas responsable de la différence d'expression de GSTP1-1 entre les lignées qui expriment et celles qui n'expriment pas GSTP1-1. Ces résultats ont été confirmés par d'autres équipes (*Jhaveri et Morrow, 1998-1*). Dans le promoteur de *GSTP1*, deux sites Sp-1 sont proches l'un de l'autre (-57 à -49 et -47 à -39), mais seul le site distal est important et joue probablement un rôle dans la régulation de la transcription de *GSTP1*. Sans le site Sp-1 distal, l'activité du promoteur *GSTP1* n'est pas complète, et cela suggère que l'activité transcriptionnelle basale du promoteur pourrait être régulée par une coopération entre Sp-1 et AP-1. En effet, il semble que les sites de fixation de Sp-1 sont souvent localisés près des sites de fixation d'autres facteurs de transcription, et une synergie entre Sp-1 et NF- κ B a, par exemple, été retrouvée pour le promoteur du VIH (*Perkins et al., 1993*). Une interaction entre Sp-1 et GATA-1 a été mise en évidence dans le cas de la différenciation érythroïde: la coopération entre les deux facteurs de transcription augmente la transcription des gènes qui codent pour la globine (*Merika et Orkin, 1995*). **Nous avons montré que les interactions entre les protéines nucléaires des cellules qui expriment la GSTP1-1 (K562, Jurkat et U937) et les sondes correspondant à des fragments du promoteur *GSTP1* n'étaient pas les mêmes que les interactions observées pour les cellules qui n'expriment pas la GSTP1-1 (Raji et Molt-3).** *Jhaveri et Morrow (1998-1)* ont également montré que les cellules VCREMS qui expriment la GSTP1-1 contiennent plus de complexes protéiques liés à la sonde (qui correspond à peu près à notre sonde -73) que les cellules MCF-7 qui n'expriment pas la GSTP1-1.

L'étude de la fixation des facteurs de transcription au promoteur *GSTP1* a révélé la liaison des facteurs c-jun, Fra-1 et NF-E2 p45 dans les cellules K562. Fra-1

étant très minoritaire, nous en avons déduit que c'est le complexe c-jun/NF-E2 p45 qui permet l'activation de la transcription du gène *GSTP1*.

Ce type de complexe n'est possible que dans des lignées sanguines, puisque NF-E2 p45 est une protéine des cellules hématopoïétiques (Kotkow *et al.*, 1996). Wild *et al.* (1999) ont montré que Nrf2 pouvait former un hétérodimère avec une protéine de la famille Jun (JunD) pour réguler l'expression de la GCS. Nrf2 associé à une protéine Maf est capable de se lier à l'ARE situé dans le promoteur de la GSTA2 de rat ou dans celui de la NAD(P)H:quinone oxydoréductase de rat (Nguyen *et al.*, 2000). Il a été décrit également que NF-E2 p45 peut se lier à c-Jun, junD ou FosB dans des mastocytes de souris stimulés par des IgE, les complexes ainsi formés se fixant sur les sites NF-E2 du promoteur du gène du TNF α (Novotny *et al.*, 1998).

Toutefois il n'est pas exclu que d'autres facteurs de transcription que nous n'avons pas encore cherchés puissent être impliqués dans la fixation au site AP-1. Ainsi les facteurs de transcription de la famille ATF/CREB se lient à la séquence TGACCTCA appelée cAMP responsive element (CRE). Tous les facteurs de transcription de cette famille se lient à l'ADN sous forme homodimérique, mais ils peuvent également former des hétérodimères entre eux ou avec les membres de la famille AP-1. Ainsi Dorsey *et al.* (1994) ont montré que ATF-2 peut se lier à une protéine Jun (JunB ou JunD) pour former un complexe se fixant à l'élément AP-1. Il a aussi été mis en évidence dans les cellules HeLa que les dimères ATF-1/Fos peuvent se lier aux séquences AP-1, CRE, et ATF, et que ATF-1 peut moduler l'activité des complexes Jun/Fos en modifiant leur liaison à l'ADN et leur activité transcriptionnelle (Chatton *et al.*, 1994).

Partie V : Effet des esters de phorbol et de différents inducteurs de stress oxydant. Après avoir étudié l'expression de la *GSTP1-1* à l'état de base, nous avons exploré la régulation de l'expression lors de la stimulation par un ester de phorbol. Nous avons observé que le TPA augmente la fixation des complexes

protéiques au promoteur *GSTP1*, alors que ce promoteur a été décrit comme ne répondant pas au TPA dans les tumeurs solides (*Dixon et al., 1989 ; Xie et al., 1990 ; Morrow et al., 1990*). Pourtant le TPA, dont les effets miment ceux du Diacylglycérol, active la PKC et est un puissant inducteur d'AP-1 (*Dalton et al., 1999*).

Dans les cellules K562, le TPA augmente la fixation d'AP-1 sur le promoteur de gènes spécifiques érythroïdes, ce qui favoriserait la différenciation mégacaryocytaire des K562 (*Solomon et al., 1993*). Au contraire, le TPA diminuerait la liaison du facteur NF-E2, ce qui favoriserait la différenciation mégacaryocytaire (*Mignotte et al., 1990; Rosson et O'Brien, 1998*). La différenciation est un phénomène soumis à des paramètres plus complexes qu'une simple modulation NF-E2/AP-1. En effet, des souris Knock-out pour NF-E2, qui devraient présenter des troubles de la lignée rouge, meurent de thrombocytopenie alors que l'érythropoïèse est presque normale.

Nos résultats montrent qu'après traitement au TPA le complexe AP-1 fortement induit est composé des protéines c-jun et Fra-1. D'autre part le deuxième contient une protéine NF-E2p45. Le TPA entraîne deux phénomènes :

- une augmentation de la fixation de la protéine c-jun et
- la formation d'un nouveau complexe avec NF-E2p45 qui n'existe pas à l'état de base

Les tumeurs sont souvent infiltrées de phagocytes qui génèrent des espèces réactives de l'oxygène au sein de la tumeur, les cellules tumorales elles-mêmes génèrent des oxydants et des radicaux libres (*Szatrowski et Nathan, 1991; Toyokuni et al., 1995*). Le peroxyde d'hydrogène est un élément central du métabolisme des radicaux libres puisqu'il est produit par toutes les formes de stress oxydant et qu'il est nécessaire à la génération secondaire d'espèces réactives de l'oxygène. Par ailleurs, la fixation de protéines au site AP-1 découle de l'état d'oxydation des cellules: la liaison à l'ADN et

la transcription des gènes contenant les sites AP-1 sont augmentées par les antioxydants (*Pinkus et al., 1996*) et les ROS (*Dalton et al., 1999*). Le statut redox de la cellule peut donc influencer l'expression de *GSTP1*. **Nous avons montré que le peroxyde d'hydrogène est capable d'augmenter la liaison d'un complexe protéique de type AP-1 sur le promoteur du gène *GSTP1***, ce qui avait déjà été observé dans les cellules HeLa : *Xia et al. (1996)* ont mis en évidence que le peroxyde d'hydrogène, après 16h de traitement, est capable d'activer la transcription d'une construction contenant le promoteur de *GSTP1* et un gène reporter, transfectée dans des cellules HeLa. Ils ont supposé que cet effet est dû à la présence d'une séquence NF-κB like située dans le promoteur *GSTP1*, bien qu'ils n'aient pas étudié la liaison de facteurs de transcription à cette séquence. Pour *Moffat et al. (1995)* cette séquence NF-κB-like fonctionnerait comme un inhibiteur de la transcription de la *GSTP1-1* dans les VCREMS.

Shacter et al. (2000) ont mis en évidence dans des cellules tumorales en culture, que l'administration de peroxyde d'hydrogène en même temps que des antinéoplasiques permettaient aux cellules cancéreuses de survivre au traitement. Lors du traitement de cellules d'un lymphome de Burkitt par le VP-16 et le peroxyde d'hydrogène, les cellules meurent par nécrose après une nuit d'incubation alors que ces mêmes cellules après traitement par le VP-16 uniquement meurent par apoptose après 4 heures. En plus de l'allongement de la durée de vie des cellules, la rupture des cellules nécrotiques entraîne le relargage dans le milieu environnant des enzymes lysosomiales, ce qui conduit à l'inflammation, à la destruction tissulaire et à la production accrue de radicaux libres (*Lee et Shacter, 1999*). Cet effet inhibiteur de l'apoptose du peroxyde d'hydrogène est indépendant du mode d'action des anticancéreux utilisés (anthracyclines, inhibiteurs de la topoisomérase II, alkylants ou inhibiteurs du métabolisme). Ces observations suggèrent que l'administration d'un antioxydant en association avec un anticancéreux pourrait en augmenter l'efficacité

thérapeutique. *Chinery et al. (1997)* ont montré dans un modèle de tumeur colorectale que les antioxydants vitamine E et pyrrolidinedithiocarbamate (PDTC), qui diminuent la croissance tumorale lorsqu'ils agissent seuls, peuvent également augmenter l'efficacité des agents antinéoplasiques 5-Fluorouracil et doxorubicine *in vitro*, ainsi que l'efficacité du 5-FU *in vivo* chez la souris. D'autres antioxydants comme le DMSO ou le Desféral, se sont également révélés capables de prévenir l'effet du peroxyde d'hydrogène sur l'apoptose (*Shacter et al., 2000*). Il semblerait que le peroxyde d'hydrogène puisse diminuer l'ATP intracellulaire, alors qu'une certaine dose d'ATP est nécessaire à l'apoptose. Ces résultats ouvrent des perspectives thérapeutiques, la combinaison d'antioxydants et d'anticancéreux pouvant éventuellement apporter des améliorations à la prise en charge des patients atteints de cancer.

Nous avons également traité les cellules par la Doxorubicine, anthracycline utilisée en clinique dans certains types de leucémies, et qui produit un stress oxydant dans les cellules, à l'origine de la cardiotoxicité de cette molécule.

La doxorubicine à des concentrations subtoxiques (40 nM) est capable de différencier les K562 vers la lignée érythroïde. Cette anthracycline n'induit pas la transcription des gènes érythroïdes, mais augmente la stabilité des ARNm de la porphobilinogène-désaminase et de GATA-1, contrairement à une autre anthracycline, l'aclacinomycine qui agit sur la transcription (*Morceau et al., 1996*). Leurs résultats indiquent que la Doxorubicine agit à un niveau post-transcriptionnel en augmentant la demi-vie des ARNm des gènes érythroïdes, alors que nos résultats montrent que cet anticancéreux augmente la fixation d'un facteur de transcription de type AP-1 sur le promoteur *GSTP1*. Toutefois l'étude de *Morceau et al. (1996)* portaient sur la différenciation érythroïde des K562 et uniquement sur les marqueurs de cette différenciation, alors que nous étudions la régulation de l'expression d'une enzyme de détoxification de phase II.

Enfin, le TBHQ augmente également la liaison du même complexe protéique au promoteur du gène *GSTP1* dans les cellules K562. Selon *Favreau et Pickett (1997)*, le TBHQ active la liaison de complexes AP-1, tout en perdant sa capacité à activer la transcription des gènes AP-1-dépendants. En effet, le TBHQ augmente la liaison de Fra-1 et Fra-2 dans les HepG2 ou les cellules HeLa; or ces facteurs de transcription ne possèdent pas de domaine transactivateur leur conférant une activité transcriptionnelle. Nous n'avons pas encore vérifié la composition du complexe protéique, dont la liaison au promoteur *GSTP1* est induite sous l'effet du TBHQ. D'après *Yoshioka et al.(1995)*, le TBHQ augmente l'expression de l'ARNm de Fra-1 après trois heures de traitement des cellules HeLa, et l'anticorps anti-Fra-1 retarde le complexe formé sous l'action du TBHQ, entre une sonde TRE et les protéines nucléaires des cellules HeLa, alors qu'il est inactif sur les complexes formés sous l'effet du TPA.

Les séquences Antioxidant response element (ARE) ont été retrouvées dans la région 5' des gènes NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 (NQO1) chez le rat et l'homme, du gène GST placentaire du rat, et des gènes GST Ya chez le rat et la souris. Ces séquences permettent une augmentation de l'expression de ces gènes à l'état de base dans les cellules tumorales par comparaison aux mêmes cellules saines, et une induction de l'expression sous l'action des xénobiotiques, antioxydants et du stress oxydant. Un certain nombre de séquences ARE, qui sont composées d'environ 40 pb, contiennent une ou plusieurs copies de séquences TRE ou TRE-like. *Xie et al. (1995)* ont montré que seuls les gènes contenant au moins deux séquences TRE au niveau de l'élément ARE pouvaient répondre aux xénobiotiques et antioxydants, alors qu'il suffit d'une séquence TRE consensus au sein de l'ARE pour que le gène réponde au TPA. Ils en ont conclu que les gènes contenant seulement une séquence TRE ne répondait pas aux xénobiotiques et antioxydants. Le gène humain *GSTP1* code pour une enzyme de détoxification de phase II, mais ne contient pas de séquence ARE, selon *Xie et al.(1995)*. Pourtant nos résultats montrent que l'antioxydant TBHQ est

capable d'activer la fixation de facteurs de transcription au promoteur *GSTP1*. Et en effet, *Rushmore et al. (1991)* ont déterminé par des expériences de mutation et de délétion que la séquence 5'- puGTGACnnnGC-3' (où n représente n'importe quel nucléotide) est suffisante pour l'activation transcriptionnelle par les antioxydants phénoliques dans les HepG2. Cette séquence ARE consensus a été encore précisée par *Wasserman et Fahl (1997)* pour devenir TA/CAnnA/GTGAC/TnnnGCA/G. Les trois premiers nucléotides mis à part, la séquence contenue dans le promoteur du gène *GSTP1* correspond à cette séquence ARE consensus (GCGCCGTGACTCAGCA) et contient une séquence TRE au sein de la séquence ARE. *Prester et Talalay (1995)* ont étudié le mode d'action des inducteurs monofonctionnels des enzymes de phase II, comme le TBHQ. Ils ont conclu de leurs études que ces inducteurs ne peuvent pas agir par l'intermédiaire des protéines AP-1, mais par des protéines non identifiées qui se lient spécifiquement aux séquences ARE, selon la définition de *Rushmore et al. (1991)*. *Dalton et al. (1999)* en rassemblant les données de la littérature, ont montré que le facteur de transcription AP-1 se lie à la séquence ARE uniquement si celle-ci correspond également à une séquence TRE, comme c'est le cas pour le gène humain *NQO1* ou le gène *GSTP1*. C'est pourquoi le TBHQ dans notre expérience peut activer la fixation des mêmes protéines que le TPA, sur le promoteur *GSTP1*. Nous n'avons pas étudié la composition des complexes induits par le TBHQ, mais les travaux de *Yoshioka et al. (1995)* suggèrent que le TBHQ induit la protéine Fra-1, ce qui laisse supposer que l'activation de la liaison au promoteur n'entraîne pas d'augmentation de l'expression de la *GSTP1-1*. Enfin, l'effet du TBHQ peut être dépendant du type cellulaire: le TBHQ active Nrf2 et sa liaison à un site ARE situé dans le promoteur de la NAD(P)H:quinone oxydoréductase de rat dans les cellules HepG2 mais pas dans les cellules HeLa (*Nguyen et al., 2000*).

La transduction du signal conduisant à l'activation de l'expression des gènes par les séquences AP-1/ARE, en particulier l'induction des enzymes de détoxification de phase

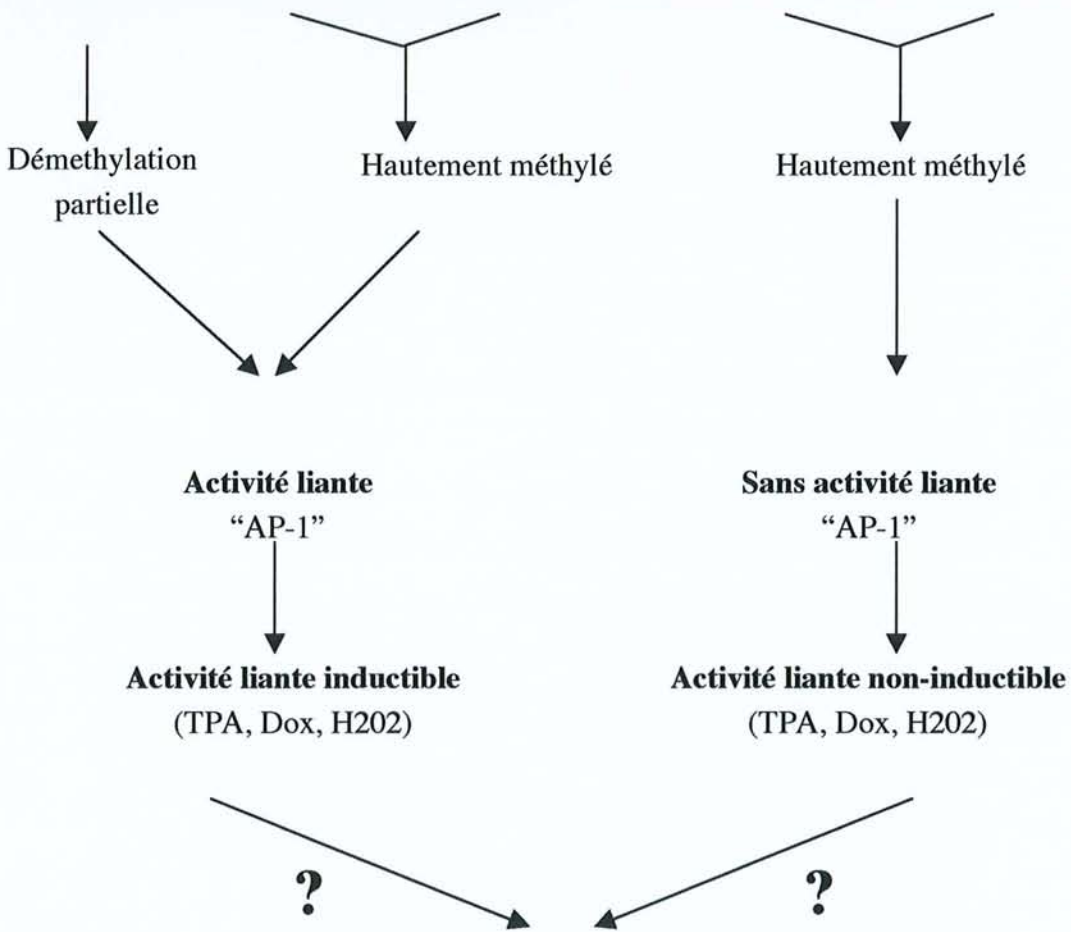
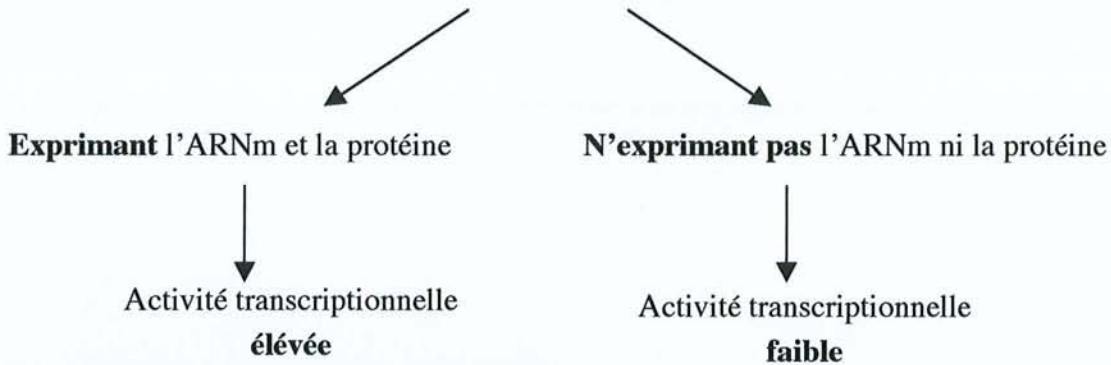
II, met en jeu une voie MAPK qui nécessite l'activation initiale de Raf1 (*Yu et al., 1999*). Une voie typique de transduction du signal par les MAPK consiste en trois kinases : une MAPK kinase kinase (ou MEKK) qui phosphoryle et active une MAPK kinase, qui à son tour phosphoryle et active une MAPK. Une voie très connue est celle qui aboutit à l'activation Ras-dépendante de ERK. Dans cette voie Ras est activée par un signal extracellulaire qui recrute Raf et l'active. Raf est une MEKK qui à son tour active une MEK, qui active alors une ERK par une double phosphorylation sur un résidu thréonyle (183) et un résidu tyrosyle (185). La voie des ERK régule deux processus antagonistes, la prolifération cellulaire et la différenciation cellulaire. Ce paradoxe peut s'expliquer d'une part, par le fait que l'effet des ERK est dépendant du type cellulaire: dans certaines cellules, comme les NIH-3T3, les ERK entraînent la différenciation, tandis que dans d'autres, comme les cellules PC12 par exemple, les ERK stimulent la prolifération (*Racke et al., 1997*). D'autre part la localisation subcellulaire et le temps de maintien à l'état activé des ERK peut également influencer la réponse cellulaire: la différenciation des cellules PC12 nécessite une activation prolongée des ERK qui doit durer de plusieurs heures à plusieurs jours, alors que la prolifération d'autres cellules se produit en réponse à une activation transitoire des ERK. De plus, les ERK ont une localisation essentiellement cytoplasmique dans les cellules sans stimulation, alors que le traitement par le TPA entraîne une localisation nucléaire des ERK au bout de 3 heures (*Wahlen et al., 1997*).

Les esters de phorbol peuvent activer Raf1 et une voie MAPK. De plus, le TPA agit par l'intermédiaire de la PKC et induit l'expression de *c-jun* et *c-fos* dans des cellules d'hépatome murin (*Puga et al., 1992*), et induit la différenciation mégacaryocytaire dans les K562 (*Racke et al., 1997*). Ainsi il a pu être montré que la PKC α peut activer la cascade de transduction Raf1/MEK/ERK. Dans les K562 la PKC α qui est essentiellement cytosolique dans les cellules non traitées, passe dans le noyau lors de la stimulation par le TPA (*Osborn et al. 1999*) alors que les PKC β nucléaires ou les

PKC ζ cytosoliques et nucléaires ne sont pas affectées dans leur localisation par le traitement au TPA.

Cirillo et al. (1999) ont montré que les voies JNK et ERK2 étaient nécessaires à l'induction du gène de l'uPA par le TPA dans des cellules HepG2. Ces résultats sont en désaccord avec ceux d'*Osborn et al. (1999)* qui montrent l'absence d'effet du TPA sur les voies JNK et p38 dans des cellules K562. Il semble donc que les effets du TPA soient dépendants du type cellulaire. Pour *Racke et al. (1997)*, le TPA active la voie ERK par l'intermédiaire de la PKC, comme le montre le blocage de l'effet du TPA par un inhibiteur de MEK1, le PD098059, qui bloque la voie ERK. Toutefois les auteurs limitent cet effet du TPA à l'induction de la différenciation mégacaryocytaire des K562. Le TPA active les ERK 1 et 2 de façon rapide et transitoire, puisque l'activation maximale est obtenue 30 minutes à 1 heure après le début du traitement des K562 à une dose induisant la différenciation mégacaryocytaire, et que l'activité retrouve son taux de base en 12 heures environ (*Wahlen et al., 1997*). Une étude préliminaire nous a permis de confirmer que la voie des JNK n'était pas activée par le TPA, dans les K562 dans nos conditions de travail.

Lignées cellulaires leucémiques



Transduction du signal Schéma récapitulatif

7. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'exposition de cellules humaines à des quantités mêmes faibles de composés électrophiles (quinones, peroxydes,...) conduit fréquemment à une élévation des taux de glutathion et à l'induction des enzymes de détoxification de phase II, comme les GST, la GGT, la NAD(P)H:quinone oxydoréductase, l'époxide hydrolase ou les glucuronosyltransférases. Ces enzymes sont largement distribuées et détoxifient les composés électrophiles, ce qui protège les cellules contre les effets toxiques et tumorigènes des carcinogènes. Mieux comprendre les mécanismes chimiques et moléculaires à l'origine de l'induction de ces enzymes est donc capital pour les stratégies de chimoprévention des cancers.

Nous avons essayé au cours de nos travaux d'appréhender la régulation de l'expression de la GSTP1-1, afin de mieux définir son rôle dans la cancérogenèse et la résistance aux anticancéreux. Nous avons vu que des mécanismes complexes entrent en jeu.

- Nous avons mis en évidence une expression différentielle spécifique de l'ARNm et de la protéine GSTP1-1 entre les lignées leucémiques humaines. La transfection dans les cellules leucémiques de constructions associant au gène reporter luciférase différents fragments du promoteur *GSTP1*, a montré que le promoteur minimal -97 est actif dans les lignées qui expriment la GSTP1-1, et inactif dans les autres lignées.
- Pour explorer les raisons de cette expression différentielle, nous avons étudié la méthylation du promoteur *GSTP1*. Nous avons observé l'hyperméthylation du promoteur dans les cellules Raji qui pourrait expliquer l'absence d'expression de la GSTP1-1. Les cellules K562 présentent un promoteur partiellement déméthylé ; par contre, les cellules Jurkat et U937 ont un promoteur très méthylé alors qu'elles expriment la GSTP1-1. Les expériences de transfection de constructions méthylées du promoteur *in vitro* ont montré que la méthylation inhibe l'activité promotrice dans les cellules K562, ce qui renforce l'idée que la méthylation a un rôle

important. Nous avons montré également qu'un dinucléotide CpG est constamment déméthylé au sein du site Sp-1 distal du promoteur pour les cellules qui expriment la GSTP1-1.

- La méthylation n'étant visiblement pas le seul mécanisme en jeu, nous avons ensuite étudié la fixation des facteurs de transcription. Le profil de liaison des protéines nucléaires observé pour les cellules qui expriment la GSTP1-1 est différent de celui obtenu pour les cellules qui n'expriment pas la GSTP1-1. Le complexe protéique qui se fixe sur le promoteur des cellules K562 et U937 à l'état de base, appartient à la famille des protéines AP-1. Il est composé des protéines c-jun, Fra-1 et NF-E2 p45, ce qui le rend spécifique des lignées sanguines.
- Par la suite, nous avons étudié la régulation de l'expression de la GSTP1-1 en cas de stimulation des cellules par un ester de phorbol. Le TPA augmente la quantité d'ARNm de *GSTP1* dans les cellules qui expriment la GSTP1-1, il stimule l'activité du promoteur lors des expériences du traitement des cellules transfectées, enfin il augmente la liaison du complexe AP-1 sur le promoteur, et modifie la composition des complexes mis en jeu.
- Nous avons également soumis les cellules à un stress oxydant par des traitements des cellules avec la Doxorubicine, le TBHQ ou le peroxyde d'hydrogène. Quelque soit le traitement utilisé, nous avons vu qu'il active toujours la fixation du même complexe AP-1 sur le promoteur *GSTP1*.

Toutefois, nombreuses sont encore les expériences nécessaires pour répondre à plusieurs questions non encore résolues.

- Nous devons d'abord identifier les protéines dont la fixation au promoteur est augmentée sous l'effet d'un stress oxydant. Il n'est pas certain que les complexes de facteurs de transcription induits soient composés de la même façon.

- Nous envisageons également de traiter les cellules transfectées avec nos différentes constructions (voire figure 13) par les agents produisant un stress oxydant, de façon à mettre en évidence un effet éventuel de ce stress sur l'activité transcriptionnelle du gène.
- Pour confirmer le rôle important de la méthylation du promoteur dans la régulation de l'expression de la GSTP1-1, nous voulons ensuite traiter les cellules avec l'agent déméthylant 5-azacytidine et voir si les cellules Raji qui n'expriment pas la GSTP1-1 et ont un promoteur hyperméthylé se mettent à transcrire le gène.
- Le fait que des cellules expriment la protéine GSTP1-1 ne signifie pas forcément que son activité spécifique et la conjugaison des électrophiles avec le glutathion sont augmentés . C'est pourquoi nous nous proposons de corréler le statut de méthylation à l'activité spécifique et l'activité de conjugaison de la GSTP1-1. Les différences de méthylation du promoteur observées entre les cellules K562 d'une part et les cellules U937 et Jurkat d'autre part, se traduisent peut-être par une différence d'activité enzymatique, plutôt que par une différence d'expression des ARN messenger.
- Nous n'avons pas encore abordé la possibilité d'une régulation de l'expression au niveau post-transcriptionnel. La régulation de la stabilité des ARNm joue un rôle primordial dans l'expression des gènes, car elle permet le contrôle de leur dégradation ou de leur accumulation selon l'activité de transcription des gènes. Différents mécanismes influent sur la demi-vie des ARNm, comme des facteurs cis tels que la polyadénylation des ARN, des séquences des régions 3'-non traduites (NT), les régions 5'-NT et les coiffes, ou comme des facteurs trans, tels que des protéines de liaison aux queues polyA ou aux région riches en AU. L'étude de la

stabilité des ARNm permettra peut-être d'expliquer les différences observées entre les cellules qui expriment la GSTP1-1.

- Nous devons également aborder la même étude avec des cellules leucémiques provenant de patients, pour observer si l'expression différentielle que nous avons mise en évidence *in vitro* existe chez les malades, aussi bien entre ceux atteints du même type de leucémies qu'entre patients présentant des hémopathies différentes. En effet, il serait intéressant de savoir si les mécanismes de régulation de l'expression de la GSTP1-1 sont variables d'une pathologie à une autre, mais également d'un patient à un autre en fonction de l'évolution de la maladie, ou des traitements déjà reçus par exemple.
- Enfin, il nous apparaît primordial d'étudier des voies de transduction du signal mise en jeu lors de cette régulation. Les différentes étapes de la transduction du signal conduisant des xénobiotiques jusqu'à la fixation des protéines Jun, Fos et NF-E2 sur les séquences AP-1 et à l'induction coordonnée des gènes des enzymes de détoxification, restent pratiquement inconnues. Les ROS qui sont produites par le métabolisme des xénobiotiques et agents oxydants, sont impliquées dans l'induction de plusieurs facteurs de transcription, mais ne constituent que le début de la cascade de transduction. Les facteurs de transcription, qui représentent la fin de la cascade sont phosphorylés et activés par des MAPK. Des travaux préliminaires nous ont permis de confirmer que la transduction du signal ne passe pas par la voie des JNK dans les cellules leucémiques traitées au TPA, résultats déjà observés par d'autres équipes dans d'autres types cellulaires.
- A l'avenir nous envisageons de remplacer notre approche classique qui consiste à étudier un ARN messager et une ou deux familles de facteurs de transcription par une approche par « Microarray ».

- Nous essayerons de comprendre les mécanismes moléculaires qui sont mises en jeu au cours d'une induction (ou d'une activation) de la GSTP1-1 par la doxorubicine au niveau des rapporteurs des différentes voies de signalisation cellulaire. Pour cela, nous commencerons par comparer différentes activités kinasiques des cellules traitées à celles des cellules non traitées grâce à l'emploi du système PhosphoSpotsTM (Jerini) qui permet de caractériser un grand nombre de kinases cellulaires. Ceci nous conduira vers la possibilité de mettre en évidence des rapporteurs des principales voies de signalisation connues que nous pourrions explorer ultérieurement.
- Ensuite des Arrays d'ADNc permettront de comparer l'induction de cascades de transduction du signal plutôt que de suivre les différents gènes individuellement. Ainsi nous comptons utiliser des systèmes de type « SmartarrayTM » (Origene) réunissant un ensemble de 200 à 300 facteurs de transduction.

Ce type d'approche nous permettra de sélectionner rapidement un nombre de gènes candidats intéressants. C'est certainement cette approche de l'étude des voies de transduction du signal et de l'expression des gènes qui apportera le plus de réponses utilisables pour transformer les mécanismes de contrôle en cibles thérapeutiques novatrices et en moyens de diagnostic de routine puissants.

8. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Adderley S.R., Fitzgerald D.J. (1999). Oxidative damage of cardiomyocytes is limited by Extracellular Regulated Kinases 1/2-mediated induction of cyclooxygenase-2. *J. Biol. Chem.*, **274** (8), 5038-5046.

Ahmad S., Okine L., Le B., Najarian P., Vistica D.T. (1987). Elevation of glutathione in phenylalanine mustard-resistant murine L1210 leukemia cells. *J. Biol. Chem.*, **262** (31), 15048-53.

Aikawa R., Komuro I., Yamazaki T., Zou Y., Kudoh S., Tanaka M., Shiojima I., Hiroi Y., Yazaki Y. (1997). Oxidative stress activates extracellular signal-related kinases through Src and Ras in cultured cardiac myocytes of neonatal rats. *J. Clin. Invest.*, **100**, 1813-1821.

Ammendola R., Mesuraca M., Russo T., Cimino F. (1994). The DNA-binding efficiency of Sp1 is affected by redox changes. *Eur. J. Biochem.*, **225** (1), 483-489.

Angel P., Karin M. (1991). The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim. Biophys. Acta*, **1072**, 129-157.

Arias J., Alberts A.S., Brindle P., Claret F.X., Smeal T., Karin M., Feramisco J., Montminy M. (1994). Activation of cAMP and mitogen responsive genes relies on a common nuclear factor. *Nature*, **370**, 226-229.

Asiedu C., Biggs J., Kraft A.S. (1997). Complex regulation of CDK2 during phorbol ester-induced hematopoietic differentiation. *Blood*, **90** (9), 3430-3437.

Asimakopoulos F.A., Shteper P.J., Krichevsky S., Fibach E., Polliack A., Rachmilewitz E., Ben-Neriah Y., Ben-Yehuda D. (1999). ABL1 methylation is a distinct molecular event associated with clonal evolution of chronic myeloid leukemia. *Blood*, **94** (7), 2452-2460.

Baik J.H., Siegrist S., Giuli G., Lahuna O., Bulle F., Guellaen G. (1992). Tissue- and developmental-stage-specific methylation in the two kidney promoters of the rat gamma-glutamyl transpeptidase gene. *Biochem. J.*, **287**, 691-694.

Barlow D.P. (1993). Methylation and imprinting : from host defense to gene regulation? . *Science*, **260**, 309-310.

Baylin S.B., Herman J.G. (2000). DNA hypermethylation in tumorigenesis. *TIG*, **16** (4), 168-174.

Baylin S.B., Herman J.G., Graff J.R., Vertino P.M., Issa J.P. (1998). Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Adv. Cancer Res.*, **72**, 141-196.

Beaumont P.O., Moore M.J., Ahmad K., Payne M.M., Lee C., Riddick D.S. (1998). Role of glutathione S-transferases in the resistance of human colon cancer cell lines to doxorubicin. *Cancer Res.*, **58**, 947-955.

Beiqing L., Chen M., Whisler R.L. (1996). Sublethal levels of oxidative stress stimulate transcriptional activation of *c-jun* and suppress IL-2 promoter activation in Jurkat T cells. *J. Immunol.*, **157**, 160-169.

Bergelson S., Daniel V. (1994-1). Cooperative interaction between ETS and AP-1 transcription factors regulates induction of glutathione S-transferase Ya gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **200** (1), 290-297.

Bergelson S., Pinkus R., Daniel V. (1994-2). Intracellular glutathione levels regulate Fos/Jun induction and activation of glutathione S-transferase gene expression. *Cancer Res.*, **54**, 36-40.

Berhane K., Hao X. H., Egyhàzi S., Hansson J., Ringborg U., Mannervik B. (1993). Contribution of glutathione transferase M3-3 to 1,3 bis (2-chloroethyl)-1-nitrosourea resistance in a human non-small cell lung cancer cell line. *Cancer Res.*, **53**, 4257-4261.

Bird A., Tate P., Nan X., Campoy J., Meehan R., Cross S., Tweedie S., Charlton J., Macleod D. (1995). Studies of DNA methylation in animals. *J. Cell. Sci. Suppl.*, **19**, 37-39.

Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.

Bramson J., McQuillan A., Aubin R., Alaoui-Jamali M., Batist G., Christodopoulos G., Panasci L.C. (1995). Nitrogen mustard drug resistant B-cell chronic lymphocytic leukemia as an in vivo model fo crosslinking agent resistance. *Mut. Res.*, **336**, 269-278.

Brown L.A. (1994). Glutathione protects signal transduction in type II cells under oxidant stress. *Am. J. Physiol.*, **266**, L172-L177.

Caffrey P.B., Zhu M., Zhang Y., Chinen N., Frenkel GD. (1999). Rapid development of glutathione S-transferase-dependent drug resistance in vitro and its prevention by ethacrynic acid. *Cancer Lett.*, **136**, 47-52.

Campanero M.R., Armstrong M.I., Flemington E.K. (2000). CpG methylation as a mechanism for the regulation of E2F activity. *Proc. Natl. Acad.Sci. USA*, **97 (12)**, 6481-6486.

Chatton B., Bocco JL., Goetz J., Gaire M., Lutz Y., Keding C. (1994). Jun and Fos heterodimerize with ATF α , a member of the ATF/CREB family and modulate its transcriptional activity. *Oncogene*, **9 (2)**, 375-385.

Cheng X., Kigawa J., Minagawa Y., Kanamori Y., Itamochi H., Okada M., Terakawa N. (1997). Glutathione S-transferase π expression and glutathione concentration in ovarian carcinoma before and after chemotherapy. *Cancer*, **79**, 521-527.

Chinery R., Brockman J.A., Peeler M.O., Shyr Y., Beauchamp R.D., Coffey R.J. (1997). Antioxidants enhance the cytotoxicity of chemotherapeutic agents in colorectal cancer: a p53-independent induction of p21^{WAF/CIP1} via C/EBP β . *Nature Med.*, **3 (11)**, 1233-1241.

Choi J., Liu RM., Forman HJ. (1997). Adaptation to oxidative stress: quinone-mediated protection of signaling in rat lung epithelial L2 cells. *Biochem. Pharmacol.*, **53 (7)**, 987-993.

Chomienne C., Fenaux P., Degos L. (1996). Retinoid differentiation therapy in promyelocytic leukemia. *FASEB J.*, **10 (9)**, 1025-1030.

Cirillo G., Casalino L., Vallone D., Caracciolo A., De Cesare D., Verde P. (1999). Role of distinct mitogen-activated protein kinase pathways and cooperation between Ets-2, ATF-2, and Jun family members in human Urokinase-type plasminogen activator gene induction by interleukin-1 and tetradecanoyl phorbol acetate. *Mol. Cell. Biol.*, **19 (9)**, 6240-6252.

Clark S.J., Harrison J. & Frommer M. (1995). CpNpG methylation in mammalian cells. *Nat. Genet.*, **10**, 20-27.

Commandeur J.N.M., Stjntjes G.J., Vermeulen N.P.E. (1995). Enzymes and transport systems involved in the formation and disposition of glutathione S-conjugates. *Pharmacol. Rev.*, **47 (2)**, 271-330.

Cookson M.S., Reuter V.E., Linkov I., Fair W.R. (1997). Glutathione S-Transferase pi class expression by immunohistochemistry in benign and malignant prostate tissue. *J. Urol.*, **157**, 673-676.

Cooper D.N., Krawczak M. (1990). The mutational spectrum of a single base-pair substitutions causing human genetic disease: patterns and predictions. *Hum. Genet.*, **85**, 55-74.

Courtay C., Heisterkamp N., Siest G., Groffen J. (1994). Expression of multiple gamma-glutamyltransferase genes in man. *Biochem. J.*, **297**, 503-508.

D'Angelo D.D., Oliver B.G., Davis M.G., McCluskey T.S., Dorn II G.W. (1996). Novel role for Sp1 in phorbol ester enhancement of human platelet thromboxane receptor gene expression. *J. Biol. Chem.*, **271** (33), 19696-19704.

Dalton T.P., Shertzer H.G., Puga A. (1999). Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **39**, 67-101.

Deng T., Karin M. (1994). c-Fos transcriptional activity stimulated by H-Ras-activated protein kinase distinct from JNK and ERK. *Nature*, **371**, 171-175.

Di Simone D., Testi R., Caracciolo F., Capochiani E., Ambrogi F., Grassi B., Petrini M. (1995). Glutathione S-transferase activity and multidrug resistance phenotype in chronic lymphocytic leukemia : Do they have any clinical relevance? *Haematologica*, **80**, 103-107.

Diederich M., El Yaagoubi M., Gerardin P., Wellman M., Siest G. (1995). Characterization and regulatory effect of gamma-glutamyltransferase messenger RNA untranslated regions in human leukemia. *Leukemia*, **9** (8), 1332-1337.

Diederich M., Wellman M., Siest G. (1994). Localization of a regulatory region on the 5'-untranslated region of human hepatoma HepG2 gamma-glutamyltransferase mRNA and response to dexamethasone and antisense oligonucleotide treatment. *FEBS Lett.*, **356**, 307-310.

Dixon K.H., Cowell I.G., Xia C.L., Pemble S.E., Ketterer B., Taylor J.B. (1989). Control of expression of the human glutathione S-transferase π gene differs from its rat orthologue. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **163** (2), 815-822.

Dorsey MJ., Tae HJ., Sollenberger KG., Mascarenhas NT., Johansen LM., Taparowsky EJ. (1995). B-ATF: a novel human bZIP protein that associates with members of the AP-1 transcription factor family. *Oncogene*, **11(11)**, 2255-2265.

Esteller M., Corn P.G., Urena J.M., Gabrielson E., Baylin S.B., Herman J.G. (1998). Inactivation of Glutathione S-transferase P1 gene by promoter hypermethylation in human neoplasia. *Cancer Res.*, **58**, 4515-4518.

Favreau L.V., Pickett C.B. (1997). The antioxidant response element. In: *Oxidative stress and signal transduction*, Forman H.J., Cadenas E., Chapman et Hall, New-York, 272-288.

Feil R, Charlton J, Bird AP, Walter J, Reik W. (1994). Methylation analysis on individual chromosomes: improved protocol for bisulphite genomic sequencing. *Nucleic Acids Res.*, **22**, 695-696.

Feinberg AP., Gehrke CW., Kuo KC., Ehrlich M (1988). Reduced genomic 5-methylcytosine content in human colonic neoplasia. *Cancer Res.*, **48 (5)**, 1159-61.

Fowler C.J. (1997). The role of the phosphoinositides signalling system in the pathogenesis of sporadic Alzheimer's disease : a hypothesis. *Brain Res. Brain Res. Rev.*, **25 (3)**, 373-380.

Frey A., Meckelein B., Weiler-Guttler H., Mockel B., Flach R., Gassen H.G. (1991). Pericytes of the brain microvasculature express gamma-glutamyl transpeptidase. *Eur. J. Biochem.*, **202**, 421-429.

Friling R.S., Bergelson S., Daniel V. (1992). Two adjacent AP-1-like binding sites form the electrophile-responsive element of the murine glutathione S-transferase Ya subunit gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 668-672.

Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, Molloy PL, Paul CL. (1992). A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci USA*, **89**, 1827-1831.

Garcia-Gimeno M.A., Coloma J. (1995). Effect of DNA methylation on protein-DNA interactions upstream of the gamma-glutamyl transpeptidase gene. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **35**, 21-30.

Gilbert L., Elwood L.J., Merino M., Masood S., Barnes R., Steinberg S.M., Lazarous D.F., Pierce L., d'Angelo T., Moscow J.A., Townsend A.J., Cowan K.H.

(1993). A pilot study of Pi-class glutathione S-transferase expression in breast cancer : correlation with estrogen receptor expression and prognosis in node-negative breast cancer. *J. Clin. Oncol.*, **11**(1), 49-58.

Godwin A.K., Meister A., O'Dwyer P.J., Hamilton T.C., Anderson M.E. (1992). High resistance to cisplatin in human ovarian cancer cell lines is associated with marked increase of glutathione synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , **89**, 3070-3074.

Gouyette A. (1994). Les résistances liées au système du glutathion. *Bull. Cancer*, **9**, 69-73.

Greger V., Debus N., Lohmann D., Hopping W., Passarge E., Horsthemke B. (1994). Frequency and parental origin of hypermethylated RB1 alleles in retinoblastoma. *Hum. Genet.*, **94**, 491-496.

Hall A.J., Vos H.L., Bertina R.M. (1999). Lipopolysaccharide induction of Tissue Factor in THP-1 cells involves Jun protein phosphorylation and Nuclear Factor κ B nuclear translocation. *J. Biol. Chem.*, **274** (1), 376-383.

Hallier E., Langhof T., Dannappel D., Lentbecher M., Schröder K, Georgens H.W., Muller A., Bolt H. M. (1993). Polymorphism of glutathione conjugation of methyl bromide, ethylene oxide and dichloromethane in human blood : influence of the induction of sister chromatid exchanges in lymphocytes. *Arch. Toxicol.*, **67**, 173-178.

Hao X.Y., Widersten M., Ridderstrom M., Hellman U., Mannervik B. (1994). Co-variation of glutathione S-transferase expression and cytostatic drug resistance in HeLa cells : establishment of Mu glutathione transferase M3-3 as the dominating isoenzyme. *Biochem. J.*, **297**, 59-67.

Helzlouer K.J., Selmin O., Huang H-Y., Strickland P.T., Hoffman S., Alberg A.J., Watson M., Comstock G.W., Bell D. (1998). Association between glutathione S-transferase M1, P1, and T1 genetic polymorphisms and development of breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, **90** (7), 512-518.

Henderson C.J., Mc Laren A.W., Moffat G.J., Bacon E.J., Wolf C.R. (1998). Pi-class glutathione S-transferase: regulation and function. *Chem. Biol. Interact.*, **111-112**, 69-82.

Herman G.J., Latif F., Weng Y., Lerman M.I., Zbar B., Liu S., Samid D., Duan D-S. R., Gnarr J.R., Linehan W.M., Baylin S.B. (1994). Silencing of the *VHL*

tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **91**, 9700-9704.

Ianello R.C., Gould J.A., Young J.C., Giudice A., Medcalf R., Kola I. (2000). Methylation-dependent silencing of the testis-specific *Pdha-2* basal promoter occurs through selective targeting of an activating transcription factor/cAMP-responsive element-binding site. J. Biol. Chem., **275** (26), 19603-19608.

Ianello R.C., Young J., Sumarsono S., Tymms M.J., Dahl H-H. M., Gould J., Hedger M., Kola I. (1997). Regulation of *Pdha-2* expression is mediated by proximal promoter sequences and CpG methylation. Mol. Cell. Biol., **17** (2), 612-619.

Imbert V., Rupec R.A., Livolsi L., Pahl H.L., Traenckner E. B., Mueller-Dieckmann C., Farahifar D., Rossi B., Auberger P., Baeuerle P.A., Peyron J.F. (1996). Tyrosine phosphorylation of I κ B- α activates NF- κ B without proteolytic degradation of I κ B- α . Cell, **86**, 787-798.

Inoue T., Ishida T., Sugio K., Maehara Y., Sugimachi K. (1995). Glutathione S-transferase pi is a powerful indicator in chemotherapy of human lung squamous-cell carcinoma. Respiration, **62**, 223-227.

Ishikawa T. (1993-1). Glutathione S-conjugate export pump. In: Structure and function of glutathione S-transferases , Tew K.D., Pickett C.B., Mantle T.J., Mannervik B., Hayes J., CRC Press, Boca Raton Eds, 512-549. (1)

Ishikawa T., Ali-Osman F. (1993-2). Glutathione-associated cis-diamine dichloroplatinum(II) metabolism and ATP-dependent efflux from leukemia cells. J. Biol. Chem., **268** (27), 20116-20125.

Itoh K., Chiba T., Takahashi S., Ishii T., Igarashi K., Katoh Y., Oyake T., Hayashi N., Satoh K., Hatayama I., Yamamoto M. (1997). An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. Biochem. Biophys. Res. Commun., **236** (2), 312-322.

Itoh K., Igarashi K., Hayashi N., Nishizawa M., Yamamoto M. (1995). Cloning and characterization of a novel erythroid cell-derived CNC family transcription factor heterodimerizing with the small Maf family proteins. Mol. Cell. Biol., **15** (8), 4184-4193.

Jenner P. (1998). Oxidative mechanisms in nigral cell death in Parkinson's disease. Mov. Disord., **13** (1), 24-34.

Jhaveri M.S., Morrow C.S. (1998-1). Methylation-mediated regulation of the glutathione S-transferase P1 gene in human breast cancer cells. *Gene*, **210**, 1-7.

Jhaveri M.S., Morrow C.S. (1998-2). Contribution of proximal promoter elements to the regulation of basal and differential glutathione S-transferase P1 gene expression in human breast cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **1396** (2), 179-190.

Jhaveri M.S., Stephens T.E., Morrow C.S. (1997). Role of transcriptional processes in the regulation of glutathione S-transferase P1 gene expression in human breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **237**, 729-734.

Kang J.S., Kim J-S. (2000). Zinc finger proteins as designer transcription factors. *J. Biol. Chem.*, **275** (12), 8742-8748.

Karin M. (1996). The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *Phil. Trans. R.Soc. Lond. B.*, **351**, 127-134.

Karin M., Liu Z-G., Zandi E. (1997). AP-1 function and regulation. *Current Opinion Cell Biol.*, **9**, 240-246.

Kataoka K., Noda M., Nishizawa M. (1996). Transactivation activity of Maf nuclear oncoprotein is modulated by Jun, Fos and small Maf proteins. *Oncogene*, **12**, 53-62.

Kim J-S., Pabo C.O. (1998). Getting a handhold on DNA: design of poly-zinc finger proteins with femtomolar dissociation constants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 2812-2817.

Kobayashi A., Ito E., Toki T., Kogame K., Takahashi S., Igarashi K., Hayashi N., Yamamoto M. (1999). Molecular cloning and functional characterization of a new Cap'n'collar family transcription factor Nrf3. *J. Biol. Chem.*, **274** (10), 6443-6452.

Koomägi R., Mattern J., Volm M. (1995). Up-regulation of resistance-related proteins in human lung tumors with poor vascularization. *Carcinogenesis*, **16**, 2129-2133.

Kotkow K.J., Orkin S.H. (1996). Complexity of the erythroid transcription factor NF-E2 as revealed by gene targeting of the mouse p18 NF-E2 locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 3514-3518.

Kowalski D.P., Feeley R.M., Jones D.P. (1990). Use of exogenous glutathione for metabolism of peroxidized methyl linoleate in rat small intestine. *J. Nutr.*, **120**, 1115-1121.

Kudo S. (1998). Methyl-CpG-binding protein MeCP2 represses Sp1-activated transcription of the human leukosialin gene when the promoter is methylated. *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 5492-5499.

Kugelman A., Choy H.A., Liu R., Shi M.M., Gozal E., Forman H.J. (1994). Gamma-glutamyl transpeptidase is increased by oxidative stress in rat alveolar epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, **11**, 586-592.

Kugelman A., Choy HA., Liu R., Shi MM., Gozal E., Forman HJ. (1997). Gamma-glutamyl transpeptidase is increased by oxidative stress in rat alveolar L2 epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, **11** (5), 586-592.

Laird P. W., Jaenisch R. (1994). ADN methylation and cancer. *Hum. Mol. Genet.*, **3**, 1487-1495.

Laird P. W., Jaenisch R. (1996). The role of ADN methylation in cancer genetics and epigenetics. *Annu. Rev. Genet.*, **30**, 441-464.

Lee W.H., Morton R.A., Epstein J.I., Brooks J.D., Campbell P.A., Bova G.S., Hsieh W.S., Issaacs W.B., Nelson W.G. (1994). Cytidine methylation of regulatory sequences near the pi-class glutathione S-transferase gene accompanies human prostatic carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, **91**, 11733-11737.

Lee Y-J., Shacter E. (1999). Oxidative stress inhibits apoptosis in human lymphoma cells. *J. Biol. Chem.*, **274** (28), 19792-19798.

Levine A.J., Momand J., Finlay C.A. (1991). The p53 tumour suppressor gene. *Nature*, **351**, 453-456.

Li Y., Jaiswal A.K. (1992). Identification of jun-B as third member in human antioxidant response element-nuclear proteins complex. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **188**, 992-996.

Liebermann D.A., Gregory B., Hoffman B. (1998). AP-1 (Fos/Jun) transcription factors in hematopoietic differentiation and apoptosis (Review). *Int. J. Oncol.*, **12**, 685-700.

Liu R-M., Hu H., Robison T.W., Forman H.J. (1996). Differential enhancement of γ -glutamyl transpeptidase and γ -glutamylcysteine synthetase by tert-butylhydroquinone in rat lung epithelial L2 cells. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, **14**, 186-191.

Lozzio CB., Lozzio BB. (1975). Human chronic myelogenous leukemia cell line with positive Philadelphia chromosome. *Blood*, **45**, 321-334.

Lutzky J., Astor M.B., Taub R.N., Baker M.A., Bhalla K., Gervasoni J.E. Jr, Rosado M., Stewart V., Krishna S., Hindenburg A.A. (1989). Role of glutathione and dependent enzymes in anthracycline-resistant HL60/AR cells. *Cancer Res.*, **49**, 4120-4125.

Malkin D.(1994). Germline p53 mutations and heritable cancers. *Annu. Rev. Genet.*, **28**, 443-465.

Manfait M., Alix A.J.P., Jeannesson P., Jardillier J-C., Theophanides T. (1982). Interaction of adriamycin with DNA as studied by resonance Raman spectroscopy. *Nucleic Acids Res.*, **10**, 3803-3816.

Mannervik B., Awasthi Y.C., Board P.G., Hayes J.D., Di Ilio C., Ketterer B., Listowsky I., Morgenstern R., Muramatsu M., Pearson W.R. (1992). Nomenclature for human glutathione transferase. *Biochem. J.*, **282**, 305-306.

Marie JP., Simonin G., Legrand O., Delmer A., Faussat AM., Lewis AD., Sikic BI., Zittoun R. (1995). Glutathione S-transferase π , α , μ and *mdr1* mRNA expression in normal lymphocytes and chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, **9**, 1742-1747.

Martinez-Delgado B., Fernandez-Piqueras J., Garcia M.J., Arranz E., Gallego J., Rivas C., Robledo M., Benitez J. (1997). Hypermethylation of a 5' CpG island of p16 is a frequent event in non-Hodgkin's lymphoma. *Leukemia*, **11**, 425-428.

McCoy C., Smith D.E., Cornwell M.M. (1995). 12-*o*-Tetradecanoylphorbol-13-acetate activation of the *MDR1* promoter is mediated by EGR1. *Mol. Cell. Biol.*, **15** (11), 6100-6108.

Meister A. (1989). Metabolism and function of glutathione. In: *Glutathione :Chemical, Biochemical and Medical aspects*, Dolphin D., Poulson R., and Avramovic O., John Wiley Eds, New York, 367-374.

Meister A. (1995). Glutathione metabolism.. *Methods Enzymol.*, **251**, 3-7.

Melki J.R., Vincent P.C., Clark S.J. (1999). Concurrent DNA hypermethylation of multiple genes in acute myeloid leukemia. *Cancer Res.*, **59**, 3730-3740.

Melki J.R., Vincent P.C., Ross B.D., Clark S.J. (2000). Hypermethylation of E-cadherin in leukemia. *Blood*, **95 (10)**, 3208-3213.

Merika M., Orkin S.H. (1995). Functional synergy and physical interactions of the erythroid transcription factor GATA-1 with the Krüppel family proteins Sp1 and EKLf. *Mol. Cell. Biol.*, **15 (5)**, 2437-2447.

Mignotte V., Navarro S., Eleouet J.F., Zon L.I., Romeo P.H. (1990). The extinction of erythroid genes after tetradecanoylphorbol acetate treatment of erythroleukemic cells correlates with down-regulation of the tissue-specific factors NF-E1 and NF-E2. *J. Biol. Chem.*, **265 (36)**, 22090-22092.

Millar D.S., Ow K.K., Paul C.L., Russel P.J., Molloy P.L., Clark S.J. (1999). Detailed methylation analysis of the glutathione S-transferase pi (GSTP1) gene in prostate cancer. *Oncogene*, **18 (6)**, 1313-1324.

Millar D.S., Paul C., Molloy P., Clark S.J. (2000). A distinct sequence (ATAAA)_n separates methylated and unmethylated domains at the 5' end of the GSTP1 CpG island. *J. Biol. Chem.*, in press.

Moffat G.J., MacLaren A.W., Wolf C.R. (1994). Involvement of Jun and Fos proteins in regulating transcriptional activation of the human pi class glutathione S-transferase gene in multidrug-resistant MCF-7 breast cancer cells. *J. Biol. Chem.*, **269 (23)**, 16397-16402.

Moffat G.J., McLaren A.W., Wolf C.R. (1996-1). Sp1-mediated transcriptional activation of the human Pi-class glutathione S-transferase promoter. *J. Biol. Chem.*, **271 (2)**, 1054-1060.

Moffat G.J., McLaren A.W., Wolf C.R. (1996-2). Functional characterization of the transcription silencer element located within the human pi class glutathione S-transferase promoter. *J. Biol. Chem.*, **271 (34)**, 20740-20747.

Morceau F., Chenais B., Gillet R., Jardillier J-C., Jeannesson P., Trentesaux C. (1996). Transcriptional and posttranscriptional regulation of erythroid gene expression in anthracycline-induced differentiation of human erythroleukemic cells. *Cell Growth Differ.*, **7 (8)**, 1023-1029.

Morel Y., Barouki R. (1998). Influence du stress oxydant sur la régulation des gènes. *M/S*, **14**, 713-721.

Morgan A. S., Ciaccio P. J., Tew K. D., Kauvar L. M. (1996). Isoenzyme-specific glutathione S-transferase inhibitors potentiate drug sensitivity in cultured human tumor cell lines. *Cancer Chemoter. Pharmacol.*, **37**, 363-370.

Morrow C.S., Chiu J., Cowan K.H. (1992). Posttranscriptional control of glutathione S-transferase pi gene expression in human breast cancer cells. *J. Biol. Chem.*, **267** (15), 10544-10550.

Morrow C.S., Cowan K.H., Goldsmith M.E. (1989). Structure of the human genomic glutathione S-transferase pi gene. *Gene*, **75**, 3-11.

Morrow C.S., Goldsmith M.E., Cowan K.H. (1990). Regulation of human glutathione S-transferase pi gene transcription : influence of 5' flanking sequences and transactivating factors which recognize AP-1 binding sites. *Gene*, **88** (2), 215-225.

Moscow J.A., Townsend A.J., Goldsmith M.E., Whang-Peng J., Vickers P.J., Poisson R., Legault-Poisson S., Myers C.E., Cowan K.H. (1988). Isolation of the human anionic glutathione S-transferase cDNA and the relation of its gene expression to estrogen-receptor content in primary breast cancer. *Proc. Natl. Acad.Sci.*, **85**, 6518-6522.

Mostoslavsky R., Bergman Y. (1997). DNA methylation: regulation of gene expression and role in the immune system. *Biochim. Biophys. Acta*, **1333**, F29-F50.

Mulcahy R.T., Bailey H.H., Gipp J.J. (1994). Up-regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase activity in melphalan-resistant human multiple myeloma cells expressing increased glutathione levels. *Cancer Chemoter. Pharmacol.*, **34**, 67-71.

Myöhänen S.K., Baylin S.B., Herman J.G. (1998). Hypermethylation can selectively silence individual p16^{ink4A} alleles in neoplasia. *Cancer Res.*, **58**, 591-593.

Nakamura Y., Ohigashi H., Masuda S., Murakami A., Morimitsu Y., Kawamoto Y., Osawa T., Imagawa M., Uchida K. (2000). Redox regulation of Glutathione S-transferase induction by benzyl isothiocyanate: correlation of enzyme induction with the formation of reactive oxygen intermediates. *Cancer Res.*, **60**, 219-225.

Nan X., Campoy F.J., Bird A. (1997). MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin. *Cell*, **88**, 471-481.

Nebreda A.R., Porras A. (2000). p38 MAP kinases: beyond the stress response. *TIBS*, **25**, 257-260.

Nguyen T., Huang H.C., Pickett C.B. (2000). Transcriptional regulation of the antioxidant response element. *J. Biol. Chem.*, **275** (20), 15466-15473.

No D., Yao T-P., Evans R.M. (1996). Ecdysone-inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 3346-3351.

Novotny V., Prieschl E.E, Csonga R., Fabjani G., Baumruker T. (1998). Nrf1 in a complex with fosB, c-jun, junD and ATF2 forms the AP1 component at the TNF α promoter in stimulated mast cells. *Nucl. Acid. Res.*, **26** (23), 5480-5485.

Nunoshiba T., deRojas-Walker T., Wishnok J.S., Tannebaum S.R., Demple B. (1993). Activation by nitric oxide of an oxidative-stress response that defends *Escherichia coli* against activated macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90** (21), 9993-9997.

O'Brien M.L., Tew K.D. (1996). Glutathione and related enzymes in multidrug resistance. *Eur. J. Cancer*, **32**, 967-978.

O'Dwyer P.J., La Creta F., Nash S. (1991). Phase I study of thiotepa in combination with the glutathione transferase inhibitor ethacrynic acid. *Cancer Res.*, **51**, 6059-6065.

Osborn M.T., Berry A., Ruberu M.S., Ning B., Bell L.M., Chambers T.C. (1999). Phorbol ester induced MDR1 expression in K562 cells occurs independently of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Oncogene*, **18**, 5756-5764.

Pando M.P., Verma I.M. (2000). Signal-dependent and -independent degradation of free and NF- κ B-bound I κ B α . *J. Biol. Chem.*, **275**, 21278-21286.

Pawlak A., Lahuna O., Bulle F., Suzuki A., Ferry N., Suegrist S., Chikhi N., Chobert M.N., Guellaen G., Laperche Y. (1988). Gamma-glutamyl transpeptidase: a single copy gene in the rat and a multigene family in the human genome. *J. Biol. Chem.*, **263** (20), 9913-9916.

Perkins ND., Edwards NL., Duckett CS., Agranoff AB., Schmid RM., Nabel GJ. (1993). A cooperative interaction between NF- κ B and Sp1 is required for HIV-1 enhancer activation. *EMBO J.*, **12** (9), 3551-3558.

Pinkus R., Weiner L.M., Daniel V. (1995). Role of quinone-mediated generation of hydroxyl radicals in the induction of glutathione *S*-transferase gene expression. *Biochem.*, **34** (1), 81-88.

Pinkus R., Weiner L.M., Daniel V. (1996). Role of oxydants and antioxydants in the induction of AP-1, NF- κ B, and glutathione *S*-transferase gene expression. *J. Biol. Chem.*, **271** (23), 13422-13429.

Prestera T., Talalay P. (1995). Electrophile and antioxidant regulation of enzymes that detoxify carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **92** (19), 8965-9.

Prezioso J.A., Shields D., Wang N., Rosenstein M. (1994). Role of gamma-glutamyltranspeptidase-mediated glutathione transport on the radiosensitivity of B16 melanoma variant cell lines. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **30**, 373-381.

Puchalski R.B., Fahl W. E. (1990). Expression of recombinant glutathione *S*-transferase π , γ or γ_1 confers resistance to alkylating agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 2443-2447.

Puga A., Nebert D.W., Carrier F. (1992). Dioxin induces expression of *c-fos* and *c-jun* proto-oncogenes and a large increase in transcription factor AP-1. *DNA Cell Biol.*, **11** (4), 269-281.

Racke F.K., Lewandowska K., Goueli S., Goldfarb A.N. (1997). Sustained activation of the Extracellular signal-regulated kinase/Mitogen-activated protein kinase pathway is required for megakaryocytic differentiation of K562 cells. *J. Biol. Chem.*, **272** (37), 23366-23370.

Raingeaud J., Gupta S., Rogers J.S., Dickens M., Han J., Ulevitch R.J., Davis R.J. (1995). Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J. Biol. Chem.*, **270** (13), 7420-7426.

Rivera V.M., Clackson T., Natesan S., Pollock R., Amara J.F., Keenan T., Magari S.R., Phillips T., Courage N.L., Cerasoli F. Jr, Holt D.A., Gilman M. (1996). A humanized system for pharmacologic control of gene expression. *Nature Med.*, **2** (9), 1028-1032.

Rosson D., O'Brien T.G. (1995). Constitutive *c-myb* expression in K562 cells inhibits induced erythroid differentiation but not tetradecanoyl phorbol acetate-induced megakaryocytic differentiation. *Mol. Cell. Biol.*, **15** (2), 772-779.

Rosson D., O'Brien T.G. (1998). AP-1 activity affects the levels of induced erythroid and megakaryocytic differentiation of K562 cells. *Arch. Biochem. Biophys.*, **352** (2), 298-305.

Rushmore T.H., Morton M.R., Pickett C.B. (1991). The antioxidant responsive element. *J. Biol. Chem.*, **266** (18), 11632-11639.

Sakai T., Togushida J., Ohtani N., Yandell D.W., Rapaport J.M., Dryja T.P.(1991). Allele-specific hypermethylation of the retinoblastoma tumor-suppressor gene. *Am. J. Hum. Genet.*, **48**, 880-888.

Sauerbrey A., Zintl F., Volm M. (1994). P-glycoprotein and glutathione *S*-transferase π in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br. J. Cancer*, **70**, 1144-1149.

Schipper D.L., Wagenmans M.J.H., Wagener D.J.T., Peters W.H.M. (1997). Glutathione *S*-Transferases and cancer. *Int. J. Oncol.*, **10**, 1261-1264.

Schisselbauer J.C., Silber R., Papadopoulos E., Abrams K., LaCreta F.P., Tew K.D. (1990). Characterization of glutathione *S*-transferase expression in lymphocytes from chronic lymphoblastic leukemia patients. *Cancer Res.*, **50**, 3562-3568.

Schreiber E., Matthias P., Müller M.M., Schaffner W. (1989). Rapid detection of octamer binding proteins with mini-extracts, prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res.*, **17** (15), 6419.

Schreiber M., Baumann B., Cotten M., Angel P., Wagner E.F. (1995). Fos is an essential component of the mammalian UV response. *EMBO J.*, **14** (21), 5338-5349.

Schröder C.P., Godwin A.K., O'Dwyer P.J., Tew K.D., Hamilton T.C., Ozols R.F. (1996). Glutathione and drug resistance. *Cancer Invest.*, **14** (2), 158-168.

Schröder K.R., Hallier E., Peter E., Bolt H.M. (1992). Dissociation of a new glutathione *S*-transferase activity in human erythrocytes. *Biochem. Pharmacol.*, **43**, 1671-1674.

Semenza G.L. (1998). Somatic cell Genetic disease: Cancer. In: *Transcription factors and human disease*, Oxford University Press, Oxford, 310-346.

Sen C.K., Packer L. (1996). Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *FASEB J.*, **10**, 709-720.

Shacter E., Williams J.A., Hinson R.M., Sentürker S., Lee Y.-J. (2000). Oxidative stress interferes with cancer chemotherapy: inhibition of lymphoma cell apoptosis and phagocytosis. *Blood*, **96** (1), 307-313.

Shea T.C., Kelley S.L., Henner W.D. (1988). Identification of an anionic form of glutathione transferase present in many human tumors and human tumor cell lines. *Cancer Res.*, **48**, 527-533.

Silber R., Farber C.M., Papadopoulos E., Nevrla D., Liebes L., Bruck M., Brown R., Canellakis Z.N. (1992). Glutathione depletion in chronic lymphocytic leukemia B lymphocytes. *Blood*, **80** (8), 2038-2043.

Singal R., Ferris R., Little J.A., Wang S.Z., Ginder G.D. (1997). Methylation of the minimal promoter of an embryonic globin gene silences transcription in primary erythroid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94** (25), 13724- 13729.

Singal R., Ginder G.D. (1999). DNA methylation. *Blood*, **93** (12), 4059-4070.

Solomon W.B., Lin C.H., Palma J., Gao X.Y., Wu S. (1993). Suppression of a cellular differentiation program by phorbol esters coincides with inhibition of binding of a cell-specific transcription factor (NF-E2) to an enhancer element required for expression of an erythroid-specific gene. *J. Biol. Chem.*, **268** (7), 5089-5096.

Spruck C., Rideout W., Jones P.A. (1993). ADN methylation and cancer, In: *ADN Methylation: Molecular Biology and Biological Significance*, Birkhauser Verlag, Basel,; 489-709.

Stanulla M., Schrappe M., Müller Brechlin A., Zimmermann M., Welte K. (2000). Polymorphisms within glutathione *S*-transferase genes (*GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*) and risk of relapse in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: a case-control study. *Blood*, **95**, 1222-1228.

Swantek J.L., Cobb M.H., Geppert T.D. (1997). Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase (JNK/SAPK) is required for lipopolysaccharide stimulation of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) translation: glucocorticoids inhibit TNF-alpha translation by blocking JNK/SAPK. *Mol. Cell. Biol.*, **17** (11), 6274-6282.

Sweiry J.H., Sastre J., Vina J., Elsässer H.P., Mann G.E. (1995). A role for γ -glutamyl transpeptidase and the amino acid transport system Xc⁻ in cystine transport by human pancreatic duct cell line. *J. Physiol.*, **485**, 167-177.

Szatrowski T.P., Nathan C.F. (1991). Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res.*, **51** (3), 794-798.

Tchou J.C., Lin X., Freije D., Isaacs W.B., Brooks J.D., Rashid A., De Marzo A.M., Kanai Y., Hirohashi S., Nelson W.G. (2000). GSTP1 CpG island DNA hypermethylation in hepatocellular carcinomas. *Int. J. Oncol.*, **16** (4), 663-676.

Tew K.D. (1994). Glutathione-associated enzymes in anticancer drug resistance. *Cancer Res.*, **54**, 4313-4320.

Tidefelt U., Elmhorn-Rosenborg A., Paul C., Hao X-Y., Mannervik B., Eriksson C.L. (1992). Expression of glutathione transferase π as a predictor for treatment result at different stages of acute nonlymphoblastic leukemia. *Cancer Res.*, **52**, 3281-3285.

Toyokuni S., Okamoto K., Yodoi J., Hiai H. (1995). Persistent oxidative stress in cancer. *FEBS Lett.*, **358**, 1-3.

Tulchinsky E.M., Georgiev G.P., Lukanidin E.M. (1996). Novel AP-1 binding site created by DNA methylation. *Oncogene*, **12**, 1737-1745.

Venugopal R., Jaiswal A.K. (1996). Nrf1 and Nrf2 positively and c-Fos and Fra1 negatively regulate the human antioxidant response element-mediated expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**(25), 14960-14965.

Volm M., Mattern J., Samsel B. (1992). Relationship of inherent resistance to doxorubicin, proliferative activity and expression of P-glycoprotein 170 and glutathione *S*-transferase π in human lung tumors. *Cancer*, **70**, 764-769.

Wahlen A.M., Galasinski S.C., Shapiro P.S., Stines Nahreini T., Ahn N.G. (1997). Megacaryocytic differentiation induced by constitutive activation of mitogen-activated protein kinase kinase. *Mol. Cell. Biol.*, **17** (4), 1947-1958.

Wang B., Williamson G. (1994). Detection of a nuclear protein which binds specifically to the antioxidant responsive element (ARE) of the human NAD(P)H :quinone oxidoreductase gene. *Biochim. Biophys. Acta*, **1219**, 645-652.

Wang J.J., Chervinsky D.S., Rosen J.M. (1972). Comparative biochemical studies of adriamycin and daunomycin in leukemic cells. *Cancer Res.*, **32**, 511-515.

Wang Z.Y., Madden S.L., Deuel T.F., Rauscher F.III (1992). The Wilm's tumorigene product, WT1, represses transcription of the platelet-derived growth factor A-chain gene. *J. Biol. Chem.*, **267**, 21999-22002.

Warnecke P.M., Clark S.J. (1999). DNA methylation profile of the mouse skeletal alpha-actin promoter during development and differentiation. *Mol. Cell. Biol.*, **19** (1), 164-172.

Wasserman W.W., Fahl W.E. (1997). Comprehensive analysis of proteins which interact with the antioxidant responsive element: correlation of ARE-BP-1 with the chemoprotective induction response. *Arch. Biochem. Biophys.*, **344** (2), 387-396.

Whitmarsh A.J., Davis R.J. (1996). Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J. Mol. Med.*, **74**, 589-607.

Wild A.C., Moinova H.R., Mulcahy R.T. (1999). Regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase subunit gene expression by the transcription factor Nrf2. *J. Biol. Chem.*, **274** (47), 33627-33636.

Wilhem D., Bender K., Knebel A., Angel P. (1997). The level of intracellular glutathione is a key regulator for the induction of stress-activated signal transduction pathways including Jun N-terminal protein kinases and p38 kinase by alkylating agents. *Mol. Cell. Biol.*, **17** (8), 4797-4800.

Williams B.O., Remington L., Albert D.M., Mukai S., Bronson R.T., Jacks T. (1994). Cooperative tumorigenic effects of germline mutations in Rb and p53. *Nat. Genet.*, **7**, 480-484.

Wilson G.G., Murray N.E. (1991). Restriction and modification systems. *Annu. Rev. Genet.*, **25**, 585-627.

Wisdon R., Verma I.M. (1993). Transformation by Fos proteins requires a C-terminal transactivation domain. *Mol. Cell. Biol.*, **13** (12), 7429-7438.

Wong C., Rougier-Chapman E.M., Frederick J.P., Datto M.B., Liberati N.T., Li J-M., Wang X-F. (1999). Smad3-Smad4 and AP-1 complexes synergize in transcriptional activation of the c-jun promoter by Transforming Growth Factor β . *Mol. Cell. Biol.*, **19** (3), 1821-1830.

Xia C., Hu J., Ketterer B., Taylor J.B. (1996). The organization of the human GSTP1-1 gene promoter and its response to retinoic acid and cellular redox status. *Biochem. J.*, **313**, 155-161.

Xia L., Cowell I.G., Dixon K.H., Pemble S.E., Ketterer S.E. and Taylor J.B. (1991). Glutathione transferase pi: its minimal promoter and downstream *cis*-acting element. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **176**, 233-240.

Xie T., Belinsky M., Xu Y., Jaiswal A.K. (1995). ARE- and TRE-mediated regulation of gene expression. *J. Biol. Chem.*, **270** (12), 6894-6900.

Yoshioka K., Deng T., Cavigelli M., Karin M. (1995). Antitumor promotion by phenolic antioxidants: inhibition of AP-1 activity through induction of Fra expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 4972-4976.

Younes M., Strubelt O. (1990). Protection by exogenous glutathione against hypoxic and cyanide-induced damage to isolated perfused rat livers. *Toxicol. Lett.*, **50**, 229-236.

Yu R., Lei W., Mandlekar S., Weber M.J., Der C.J., Wu J., Kong A-n.T. (1999). Role of a mitogen-activated protein kinase pathway in the induction of phase II detoxifying enzymes by chemicals. *J. Biol. Chem.*, **274** (39), 27545-27552.

Zhang K., Mack P., Wong K.P. (1998). Glutathione-related mechanisms in cellular resistance to anticancer drugs. *Int. J. Oncol.*, **12**, 871-882.

Zhou G., Bao Z.Q., Dixon J.E. (1995). Components of a new human protein kinase signal transduction pathway. *J. Biol. Chem.*, **270** (21), 12665-12669.

Zingg J.M., Jones P.A. (1997). Genetics and epigenetic aspects of ADN methylation on genome expression, evolution, mutation and carcinogenesis. *Carcinogenesis*, **18**, 869-882.

9. PUBLICATIONS ISSUES DE CE TRAVAIL



PERGAMON

Leukemia Research 000 (2000) 000–000

**Leukemia
Research**

www.elsevier.com/locate/leukres

Phorbol ester responsiveness of the glutathione *S*-transferase P1 gene promoter involves an inducible c-jun binding in human K562 leukemia cells

Patricia Borde-Chiché^a, Marc Diederich^{a,*}, Franck Morceau^a, Maria Wellman^b,
Mario Dicato^a

^a *Laboratoire de Recherche sur le Cancer et les Maladies du Sang (RCMS), Centre Universitaire de Luxembourg, 162A, avenue de la Faïencerie L-1511 Luxembourg, Luxembourg*

^b *Centre du Médicament, UPRES EA 3117, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université Henri Poincaré Nancy I, 30, rue Lionnois F-54000 Nancy, France*

Received 25 May 2000; accepted 2 September 2000

Abstract

Overexpression of the glutathione *S*-transferase P1 (GSTP1) gene is related to drug resistance in human cancer cells. However, the mechanisms of the transcriptional activation of this gene remain unclear. In this study, we examined the molecular mechanisms underlying phorbol ester mediated gene regulation using human K562 leukemia cells as a model. Promoter deletion analyses revealed that the activator protein-1 (AP-1) transcription factor site was crucial for 12-*O*-tetradecanoyl phorbol 13-acetate (TPA)-mediated GSTP1 gene transcription. Electrophoretic mobility shift assays and transient transfection analysis demonstrated that both DNA binding and transactivation activities of AP-1 were induced by TPA. By supershift analysis, we identified transcription factors c-jun and fra-1 as well as NF-E2p45 as components of the induced binding complex. These results show for the first time that the phorbol ester TPA is involved in the molecular mechanism(s) mediating the activation of the GSTP1 promoter in a human leukemia model. © 2000 Elsevier Science Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Activating protein 1; Leukemia; Gene expression; Megacaryoblastic differentiation; K562 cells; TPA induction; Fra-1; NF-E2; Transcriptional regulation

1. Introduction

The glutathione *S*-transferases (GST) are a multigene superfamily of enzymes that catalyze the conjugation with glutathione of electrophilic compounds including xenobiotic drugs, toxins, carcinogens and endogenous cellular electrophiles [1]. GSTs are believed to play a key role in the protection of cells against the toxicity of xenobiotic compounds and lipid hydroperoxides generated by oxidative stress [2,3]. Increased levels of the

human pi class isoenzyme of GST, GSTP1-1, are associated with tumor development, carcinogenesis [4,5] and in the development of resistance to antineoplastic drugs and genotoxic carcinogens [6]. However, the molecular mechanisms responsible for changes in human GSTP1 expression are poorly understood. Studies of the GSTP1 promoter have identified regulatory elements necessary for constitutive expression of the gene: nucleotides between –80 and –8 are required for basal reporter gene activity in transient transfection experiments [7] and nucleotides –73 to +8 are required for retinoic acid dependent repression [3,8]. Other reports suggest that the activator protein-1 site (AP-1, nucleotides –69 to –63) is essential for promoter activity in a human breast carcinoma cell line [7,9]. Since the expression of various genes encoding drug metabolizing enzymes including the human NAD(P)H:quinone oxi-

Abbreviations: GST, Glutathione *S*-transferase; TPA, 12-*O*-tetradecanoyl phorbol 13-acetate; TRE, TPA responsive element; AP-1, Activator protein-1; EMSA, Electrophoretic mobility shift assay; FCS, Fetal calf serum; NQO1, NAD(P)H:Quinone oxidoreductase.

* Corresponding author. Tel.: +352-46-6644434; fax: +352-46-6644436.

E-mail address: diederic@cu.lu (M. Diederich).

doreductase1 (NQO₁) gene, the murine GST Ya and the rat GST-P genes are regulated through inducible AP-1 components, the present study was undertaken to explore the involvement and inducibility of the AP-1 response element in transcriptional regulation of the human GSTP1 gene. To our knowledge, inducibility by 12-*O*-tetradecanoyl phorbol 13-acetate (TPA) of this AP-1 site has never been demonstrated in the human cells derived from solid tumors and tested so far [7,10,11]. In this report we identified the region of the GSTP1 promoter responsive to TPA in K562 cells and we showed the importance of the AP-1 site. We chose the human K562 erythroleukemia cells as a model for the study of the megakaryoblastic differentiation by agents like TPA. Sustained activation of genes encoding transcription factors such as c-jun and c-fos has been demonstrated during megakaryoblastic differentiation in human K562 leukemia cells by TPA [12]. Our results suggest that the c-jun binding to the AP-1 site is TPA-inducible and involved in the regulated expression of the GSTP1 gene in this human leukemia model. We furthermore identified Fra-1 and NF-E2 p45 as other transcription factors constitutively bound to this AP-1 site in K562 cells.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture

K562 (human chronic myelogenous leukemia, American Type Culture Collection) were grown in RPMI 1640 medium containing 10% (v/v) fetal calf serum and 1% (v/v) antibiotic-antimitotic (Life Technologies, Belgium). Before TPA (Sigma-Aldrich, Belgium) treatment, cells were cultured in 0.1% fetal calf serum containing medium for 24 h. Thereafter, cells were treated for periods of time ranging from 15 min to 4 h with 50–200 nM TPA in DMSO. Untreated experimental controls are from cells treated with 0.01% DMSO.

2.2. Transfections

2.2.1. Construction of expression vectors

Human genomic DNA was extracted from human peripheral blood cells following standard procedures. Primers GST1A, GST1B, GST1C, GST1D and GST2 (Eurogentec, Belgium) were used to amplify four PCR products corresponding to promoter fragments of the human GSTP1 gene of 100, 136, 444 and 1223 bp, respectively, on the basis of sequences deposited in GenBank (Accession Number X08058) by Morrow et al. [7]. Primers correspond to the following regions: –61 to –42 5'-CACTGGGGCGGAGCGGGGCG-3' for GST1A, –97 to –79 5'-AAAAAGGATCGGACCCTCCAGAAGAGCGG-3' for GST1B, –

405 to –388 5'-GGTACCTTTCTTTCTCTAAGCG-3' for GST1C, –1184 to –1165 5'-GGTACCTCAACAGAAAGTAGGCAGCA-3' for GST1D and +21 to +39 5'-AAGCTTCGTACTCACTGGTGGC-GAAG-3' for GST2 relative to the transcriptional start site. PCR conditions were performed in 25 µl volumes for 95°C for 5 min, 30 cycles at 95°C for 1 min, 57.5°C for 1 min, 72°C for 90 s. The amplified products were subcloned into a *pCRII*-Topo plasmids (Invitrogen, The Netherlands), excised by *KpnI* and *HindIII*. The final constructs were termed *pGST-61*, *pGST-97*, *pGST-405* and *pGST-1184* (Fig. 1(B)). Primers GST1D and GST5'*BamHI* (5'-GGATCCCCGCGCCGGC-CGCTCTTCTG-3') respectively primers GST3'*BamHI* (5'-GGATCCACTGGGGCGGAGCGGGGCGG-3') and GST2 were used to amplify two fragments where the AP-1 site was replaced by an *BamHI* restriction site. PCR conditions were performed in 20 µl volumes for 95 °C for 5 min, 30 cycles at 95 °C for 1 min, 65 °C for 1 min, 72 °C for 1 min. The amplified fragments were purified, digested by *BamHI* and ligated. The fragment was then digested by *KpnI* and *HindIII* and religated into a *KpnI* and *HindIII* linearized and dephosphorylated pGL3-Enhancer plasmid (Promega, The Netherlands). The final construct was termed *pGST-AP1mut* (Fig. 1(B)). Relevant regions of the final constructs were confirmed by sequencing in both directions using a T7 sequencing kit (AP Biotech, The Netherlands).

2.2.2. Transient transfection assays

Transfections of K562 were performed by electroporation using a BioRad gene Pulser (Bio-Rad, Belgium). For each experiment, cells were cultured in 0.1% fetal calf serum medium for 24 h, then 5 × 10⁶ K562 cells at a concentration of 1.5 × 10⁷ cells/ml were electroporated with 20 µg of luciferase gene construct at 625 V/cm and 500 µF. Cells were harvested 48 hours after transfection and resuspended in 300 µl of reporter lysis buffer (Promega, The Netherlands). For the treatment of the transfected cells, 50–200 nM TPA in DMSO was added 32 h after transfection where indicated, 16 hours later cells were harvested and luciferase activity was measured. Untreated experimental controls are from cells treated with 0.01% DMSO. Light emission resulting from luciferase activity was measured in a Turner luminometer (Promega The Netherlands) by integration of peak light emission over 15 s at 25°C. Luciferase activity was measured in 1 x reporter lysis buffer (Promega, The Netherlands) using 5 µl of the cell lysate. In the transient expression experiments, the total protein content was used to normalize luciferase activity. A Bio-Rad protein assay was used to determine protein concentration. Each value is the average of results of at least five independent transfection experiments. Assays were repeated twice.

2.3. Preparation of nuclear extracts

Nuclear extracts from K562 cells were prepared using the method described by Schreiber et al. [13]. Briefly, cells were washed with PBS, and the cellular pellet was then resuspended in 10 mM Hepes (pH 7, 9), 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM DTT on ice. Igepal 10% (ICN, Belgium) was added to cells which were centrifuged 1 min at $10\,000\times$ at 4°C to collect nuclei. The nuclei were resuspended in 20 mM

Hepes (pH 7,9), 0.4 M NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 20% Glycerol, 1 mM DTT to allow elution of nuclear proteins by shaking at 4°C for 15 minutes. Nuclei were pelleted for 1 min at $10\,000\times$ and 4°C , and the supernatant was then aliquoted, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until use. All solutions contained the protease inhibitors leupeptin at $30\ \mu\text{g/ml}$, aprotinin at $1000\ \text{U/ml}$, PMSF (1 mM), pepstatin ($15\ \mu\text{g/ml}$) and *O*-phenanthroline (1 mM) (Roche-Prophac, Luxembourg).

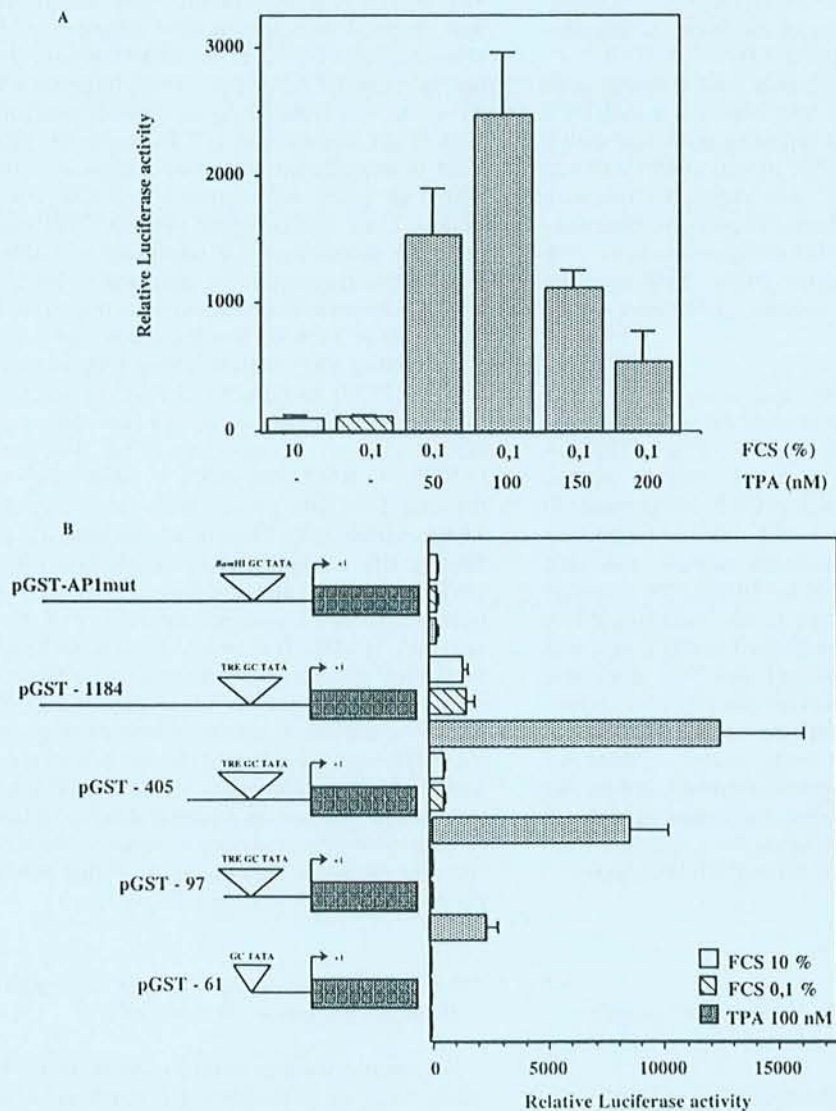


Fig. 1. Transcriptional activity of GSTP1 promoter constructs in response to TPA treatment: (A) K562 cells were grown in 0.1% FCS containing medium for 24 h and were then transiently transfected with pGST-97, 32 h after electroporation, cells were stimulated for 16 h with increasing concentrations of TPA before luciferase assays. (B) K562 cells grown in 0.1% FCS for 16 h were transiently transfected with different GSTP1 promoter-luciferase constructs. 32 h after electroporation, cells were stimulated for 16 h with 100 nM TPA before luciferase assays.

2.4. Electrophoretic mobility shift assay

2.4.1. Probe preparation and labeling

The following oligonucleotides and their complementary sequences (Eurogentec, Belgium) were used as probes or competitors: Probe –73, nucleotides –73 to –54, 5'-GCCGTGACTCAGCACTGGGG-3' and Col-TRE, the TRE binding site from the human collagenase promoter, 5'-GCCGTGACTCAGCACTGGGG-3'. Mutated competitors are called –73mut with a mutation in the AP-1 site, 5'-GCCGATGCTCAAGACTGGGG-3' and Col-TREmut with a mutation in the AP-1 binding site of the human collagenase promoter, 5'-CGCTTGATGACTTGGCCGGAA-3'.

The sense and antisense strands were annealed in 66 mM Tris-HCl pH 7.5, 13 mM MgCl₂, 6.6 mM DTT and 1.3 mM EDTA by the following procedure with a thermal cycler: 5 min at 90°C, 10 min at 65°C, 10 min at 37°C and 10 min at 20°C. The oligonucleotides were labeled by Polynucleotide kinase (Roche-Prophac, Luxembourg) following manufacturer's instructions with [γ -³²P]ATP, 7000 Ci/mmmol (ICN, Belgium) and purified on a spin column (Westburg, The Netherlands).

2.4.2. Electrophoretic mobility shift assay

Ten micro grams of cells nuclear extracts were incubated for 15 min at room temperature with [γ -³²P]ATP-labeled DNA fragment in 20 μ l reaction mixture containing 10 mM Tris-HCl, pH 8.5, 5% glycerol, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol and 2.5 mM poly(dI-dC). Each reaction mixture was then loaded onto a prerun (200 V for 30 min) 5% polyacrylamide gel (29:1 cross-linking ratio) containing 0.5 X TBE. Electrophoresis was performed at 200 V for 1 h at room temperature, and the gel was then dried and autoradiographed. In competition and supershift experiments, the reaction mixture was preincubated for 20 min at 4°C with 500-fold molar excess of unlabeled DNA, or 2 μ g of anti-human antibody, before the addition of radiolabeled probe. Antibodies against jun, fos and NF-E2 proteins families were obtained from Santa Cruz Biotechnologies (Sanvertech, Belgium).

3. Results and discussion

3.1. Transcriptional analysis of the GSTP1 promoter induction by TPA in K562 cells

For this study, we examined the effect of TPA stimulation on the transcriptional activity of the human GSTP1 promoter. To do this, a human genomic GSTP1 fragment ranging from nucleotide +39 to nucleotide –97 was ligated upstream of a luciferase reporter gene. A comparison of luciferase activities

between serum-starved unstimulated K562 leukemia cells and serum-starved cells treated with TPA at various concentrations ranging from 50 to 200 nM for 16 h (Fig. 1A), showed that the GSTP1 promoter activity was increased by an average of 18-fold following induction at 100 nM. These results show for the first time the existence of a TPA-inducible response element in the human GSTP1 promoter. To identify the main regions involved in the TPA mediated induction of GSTP1 transcriptional response, different GSTP1-promoter-deletion luciferase constructs were generated (Fig. 1B). The highest induction of luciferase activity (18-fold) was observed with the smallest fragment of GSTP1-promoter (pGST-97) but not with fragments devoid of the AP-1 site (pGST-61) or with a fragment where the AP-1 site was replaced by a *Bam*HI restriction site. With larger fragments of GSTP1 promoter, TPA treatment is less efficient to induce luciferase activity (13-fold with pGST-405 respectively 8-fold with pGST-1184). These results suggest that the GSTP1 upstream promoter elements contain regulatory sites able to partially inhibit transcriptional induction by TPA in K562 cells. Many genes are responsive to the transcriptional activation of TPA via the recognition of a consensus AP-1 binding site by *trans*-acting factors such as jun and fos [10,14]. In human cell lines derived from solid tumors, previous reports showed that the AP-1 site in GSTP1 promoter is unresponsive to TPA stimulation [7,10,11]. In K562 cells, unlike in other cells tested, the jun and fos transcription factors are induced during TPA treatment [12]. These results showed that the AP-1 binding site is essential for the basal activity of the GSTP1 promoter and the loss of this AP-1 element largely abolished transcriptional activity of the GSTP1 promoter [15,16]. The reason for the discrepancy between our and previous results may be related to the different cellular models used. Previously, TPA was shown to be effective on the expression of murine GST Ya [17] or rat GST P [18], whose promoters contain similar AP-1 binding sites. Moreover, TPA treatment was able to increase the binding of AP-1 factors to the promoters of erythroid-specific genes in the K562 cells [19] and to induce differentiation of this cells towards the megacaryocytic lineage [12].

3.2. Identification of an inducible AP-1 complex bound to the GSTP1 promoter in K562 cells

We investigated interactions between the GSTP1 promoter AP-1 site and nuclear proteins from induced and uninduced K562 nuclear extracts by EMSA. For these studies, a double stranded DNA probe was prepared, spanning the promoter region from –73 to –54 (Probe –73, containing the AP-1 binding site). EMSA analysis showed that the K562 nuclear extracts formed

three distinct complexes (C1, C2 and C3) with this DNA probe (Fig. 2(A), lane 2). Upon induction by 100 nM TPA, the intensity of the C1 complex strongly increased with a maximum of binding observed at 2 h of treatment (Fig. 2(B), lane 2). A 500-fold molar excess of the same unlabeled oligonucleotide or of a canonical heptameric AP-1 site from the human collagenase promoter (Col-TRE) efficiently competed for the protein complexes C1 and C2 in serum-starved cells (Fig. 2A, lanes 3 and 5) as well as in cells treated with 100 nM TPA (Fig. 2B, lanes 3 and 5). In contrast, the same oligonucleotides containing mutations inside the AP-1 site which destroyed the consensus TRE were unable to compete for the binding of constitutive or induced nuclear factors (Fig. 2A, lanes 4 and 6 and Fig. 2B, lanes 4 and 6). These results indicated that C1 and C2 complexes are composed of AP-1 related proteins. The C3 complex could not be competed by cold Probe -73 nor Col-TRE and should not be related to the AP-1 components.

3.3. *c-jun* and *NF-E2 p45* binding activities in TPA treated and control K562 cells

In order to identify the AP-1 protein components in the EMSA complexes, several specific antibodies were included into the binding reaction mixture for supershift assays. Previously published results showed the binding of *c-jun* and *c-fos* onto the AP-1 site of the human GSTP1 promoter [9]. In our hands, after induction by 100 nM TPA, the strongly increased C1 complex-binding activities were partially shifted by the anti-*c-jun* and the anti-Fra-1 antibodies (Fig. 3, lanes 4 and 9). Moreover, we showed that the C2 complex of induced cells could also be competed with the anti-NF-E2 p45 antibody (Fig. 3, lane 13). Other antibodies directed against JunD, JunB, Fra-2, *c-fos*, FosB, NF-E2p18, Nrf1 and Nrf2 (Fig. 3, lanes 5–8, 10–12, 14 and 15) did not supershift the previously observed complexes C1 and C2 in extracts from TPA treated K562. It has been shown before [20] that heterodimers of many bZip proteins, including Maf and NF-E2 p45 and their related molecules, can recognize sequences related to an AP-1 site (NF-E2 recognition sequence GCTGA(G/C)TCA, AP-1 motif underlined) and that NF-E2 p45 forms heterodimers with small Maf bZip family proteins to form a major transcriptional activator of erythroid cell-specific genes, NF-E2. By using an antibody directed against NF-E2 p45, we observed a specific disruption of the binding of the C2 complex in K562 cells, although the low mobility complex C1 was not affected by this antibody. In conclusion, two different types of specific binding complexes could be observed in treated K562 cells. Whereas *c-jun* binding shows a strong inducibility (C1), the observed NF-E2 p45 binding is not inducible in our hands (C2).

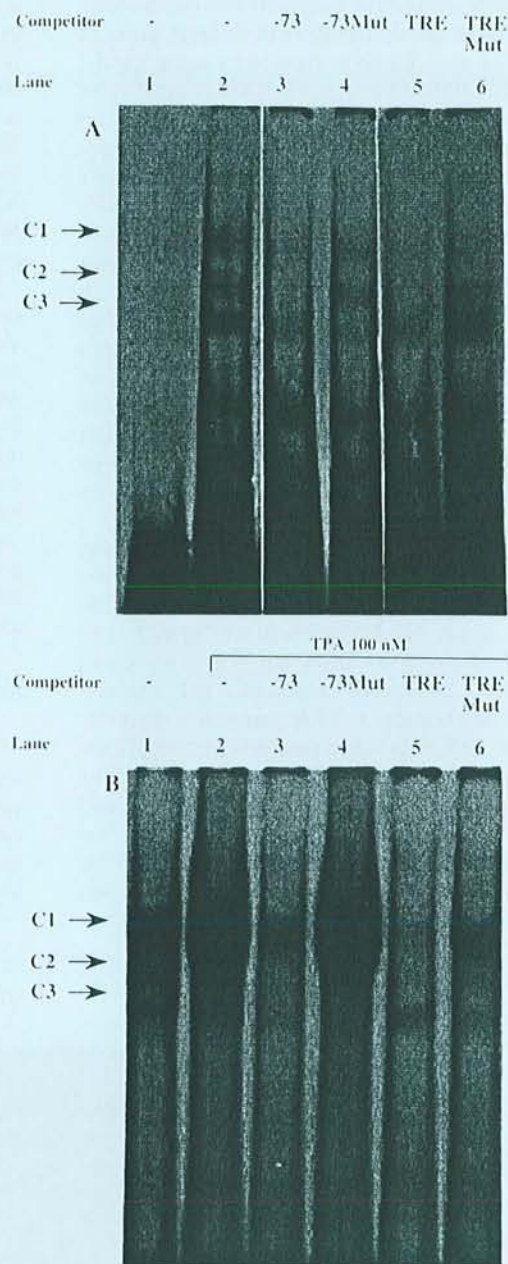


Fig. 2. EMSA of K562 nuclear extracts: A 32 P-labeled -73 probe was incubated in the absence (lane 1) or presence (lane 2) of 10 μ g of K562 nuclear extracts. The arrowheads (C1–C3) indicate retarded complexes. (A) K562 nuclear extracts were preincubated without (lane 2) or with a 500-fold molar excess of unlabeled competitors: -73 (lane 3), -73mut (lane 4), Col-TRE (lane 5) or Col TREmut (lane 6). (B) K562 cells were grown in 0.1% FCS for 24 h (lane 2,6) before preparation of nuclear extractions. TPA treated K562 nuclear extracts were preincubated with a 500-fold molar excess of unlabeled competitors -73 (lane 3), -73 mut (lane 4), Col-TRE (lane 5) Col-TREmut (lane 6).

Several investigators have suggested possible involvement of AP-1/Jun family members in the regulation of GSTP1. Moffat et al. [9] demonstrated by using specific antibodies, that Jun and Fos proteins are integral components of the VCREMS nuclear complex bound on the AP-1 site; however these specific effects of antibodies were not observed with MCF7 cells in which GSTP1 mRNA is not expressed. The observed binding activities did not show any inducibility upon TPA treatment in these studies [7,10]. In view of our results, we suggest that the TPA-induced C1 complex is composed of c-jun homodimer, and that Fra-1 may play a role in basal expression of GSTP1. The Fra-containing AP-1 complexes have low transcriptional activity in regulating phase II detoxification enzymes genes [21] or even can have inhibitory effects on the elastin gene transcription [22]. Moreover, Fra-1 could be induced by phenolic antioxidants and could repress AP-1 activity induced by TPA by complexing with Jun proteins [21].

Several studies indicate that the major AP-1-binding proteins that mediate the induction of detoxifying enzymes may not be proteins of the AP-1 family [23,24]. Transcription factor NF-E2 was originally identified as an erythroid cell-restricted DNA binding factor which recognizes the consensus sequence TGCTGA(C/G)TCA(T/C) containing a TPA responsive element. Both positive and negative transcriptional regulation can be mediated through NF-E2 sites, depending of the relative amounts of p45, the small Maf proteins and AP-1-like factors [25,26]. Nrf1 and Nrf2 mediate the expression of the NQO₁ gene and its induction by xenobiotics and antioxidants while the basal expression

is repressed by overexpression of c-Fos and Fra-1 [27]. In mice, the heterodimer Nrf2/small Maf activates NQO₁ gene expression directly through the TRE, and Nrf2 was shown to be essential for the transcriptional induction of phase II detoxifying enzyme genes [28]. The second component of the NF-E2 transcription factor (C2) remains to be identified in our cell model. NF-E2p18 is only one of several Maf proteins like MafG which may heterodimerize with p45 to regulate gene expression through NF-E2 sites [29].

In conclusion, we report here the study of *cis*- and *trans*-acting elements involved in constitutive and TPA-induced expression of the GSTP1 promoter. The TPA responsiveness is localized in a region containing an AP-1 interacting constitutively with c-jun but also with Fra-1 and NF-E2p45. Upon induction, the c-jun binding is considerably increased paralleled by a strong transcriptional induction. Based upon our data, it is tempting to speculate that the mechanisms leading to the inducibility of the GSTP1 promoter by TPA may give first insights into the mechanisms leading to increased GSTP1 expression by other xenobiotic compounds in human leukemia cells.

Acknowledgements

This work was supported by the Fondation de Recherche 'Cancer et Sang'. P.B.-C. and F.M. were supported by fellowships from the Government of Luxembourg [BFR97/25 and BFR96/35]. The authors also thank 'Les Amis de la Fondation José Carreras-Luxembourg' for additional support.

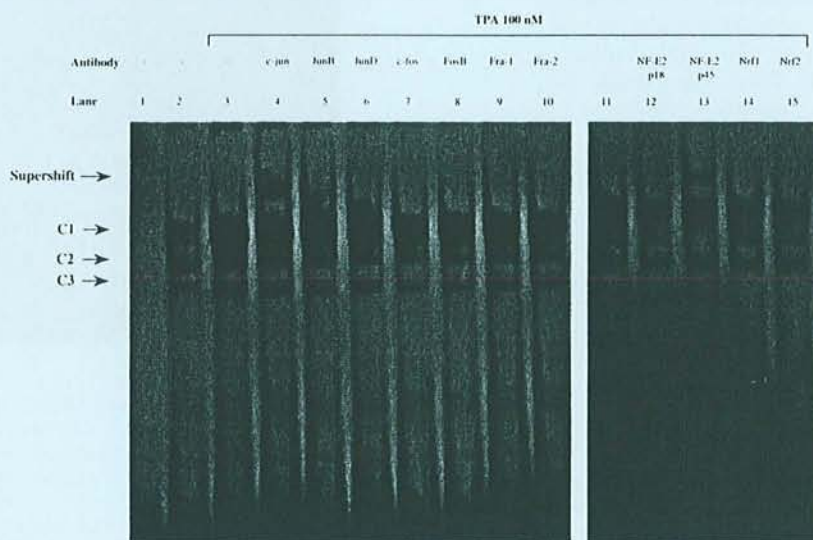


Fig. 3. Supershifts of proteins bound on GSTP1 promoter. A ³²P-labeled -73 probe was incubated in the absence (lane 1) or presence (lanes 2–15) of 10 μg of nuclear extracts. K562 cells were grown in 0.1% FBS for 24 h and then treated with DMSO (0.01%, lane 2) or stimulated by 100 nM TPA for 2 h (lanes 3–15). For supershifts, binding assays were preincubated with 2 μg of antibodies as indicated.

References

- [1] Hayes JD, Pulford DJ. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1995;30:445–600.
- [2] Ishikawa T. The ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump. *Trends Biochem Sci* 1992;17:463–8.
- [3] Xia C, Hu J, Ketterer B, Taylor JB. The organization of the human GSTP1-1 gene promoter and its response to retinoic acid and cellular redox status. *Biochem J* 1996;313:155–61.
- [4] Henderson CJ, Smith AG, Ure J, Brown K, Bacon EJ, Wolf CR. Increased skin tumorigenesis in mice lacking pi class glutathione S-transferases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:5275–80.
- [5] Cookson MS, Reuter VE, Linkov I, Fair WR. Glutathione S-transferase PI (GST-pi) class expression by immunohistochemistry in benign and malignant prostate tissue. *J Urol* 1997;157:673–6.
- [6] Tew KD. Glutathione-associated enzymes in anticancer drug resistance. *Cancer Res* 1994;54:4313–20.
- [7] Morrow CS, Goldsmith ME, Cowan KH. Regulation of human glutathione S-transferase pi gene transcription: influence of 5' flanking sequences and trans-activating factors which recognize AP-1-binding sites. *Gene* 1990;88(2):215–25.
- [8] Bernardini S, Melino G, Cortese C, Ballerini S, Annicchiarico-Petruzzelli M, Bernassola F, et al. Modulation of glutathione transferase P1-1 activity by retinoic acid in neuroblastoma cells. *J Cell Biochem* 1999;75:375–81.
- [9] Moffat GJ, McLaren AW, Wolf R. Involvement of Jun and Fos proteins in regulating transcriptional activation of the human pi class glutathione S-transferase gene in multidrug-resistant MCF7 breast cancer cells. *J Biol Chem* 1994;269:16397–402.
- [10] Xia CL, Cowell IG, Dixon KH, Pemble SE, Ketterer B, Taylor JB. Glutathione transferase pi its minimal promoter and downstream cis-acting element. *Biochem Biophys Res Comm* 1991;176:233–40.
- [11] Dixon KH, Cowell IG, Xia CL, Pemble SE, Ketterer B, Taylor JB. Control of expression of the human glutathione S-transferase pi gene differs from its rat orthologue. *Biochem Biophys Res Comm* 1989;163:815–22.
- [12] Alitalo R, Partanen J, Pertovaara L, Holta E, Sistonen L, Andersson L, et al. Increased erythroid potentiating activity/tissue inhibitor of metalloproteinases and jun/fos transcription factor complex characterize tumor promoter-induced megakaryoblastic differentiation of K562 leukemia cells. *Blood* 1990;75:1974–82.
- [13] Schreiber E, Matthias P, Müller MM, Schaffner W. Rapid test for in vivo stability and DNA binding of mutated octamer binding proteins with 'mini-extracts' prepared from transfected cells. *Nucleic Acids Res* 1989;17:6419.
- [14] Cirillo G, Casalino L, Vallone D, Caracciolo A, De Cesare D, Verde P. Role of distinct mitogen-activated protein kinase pathways and cooperation between Ets-2, ATF-2 and Jun family members in human urokinase-type plasminogen activator gene induction by interleukin-1 and tetradecanoyl phorbol acetate. *Mol Cell Biol* 1999;19:6240–52.
- [15] Moffat GJ, McLaren AW, Wolf RC. Functional characterization of the transcription silencer element located within the human Pi class glutathione S-transferase promoter. *J Biol Chem* 1996;271:1054–60.
- [16] Jhaveri MS, Morrow CS. Contribution of proximal promoter elements to the regulation of basal and differential glutathione S-transferase P1 gene expression in human breast cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 1998;1396:179–90.
- [17] Pinkus R, Weiner LM, Daniel V. Role of oxidants and antioxidants in the induction of AP-1, NF-kappaB, and glutathione S-transferase gene expression. *J Biol Chem* 1996;271:13422–9.
- [18] Sakai M, Okuda A, Muramatsu M. Multiple regulatory elements and phorbol 12-O-tetradecanoate 13-acetate responsiveness of the rat placental glutathione transferase gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:9456–60.
- [19] Solomon WB, Lin CH, Palma J, Gao XY, Wu S. Suppression of a cellular differentiation program by phorbol esters coincides with inhibition of binding of a cell-specific transcription factor (NF-E2) to an enhancer element required for expression of an erythroid-specific gene. *J Biol Chem* 1993;268:5089–96.
- [20] Kataoka K, Igarashi K, Itoh K, Fujiwara KT, Noda M, Yamamoto M. Small Maf proteins heterodimerize with Fos and may act as competitive repressors of the NF-E2 transcription factor. *Mol Cell Biol* 1995;15:2180–90.
- [21] Yoshioka K, Deng T, Cavigelli M, Karin M. Antitumor promotion by phenolic antioxidants: inhibition of AP-1 activity through induction of Fra expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:4972–6.
- [22] Rich CB, Fontanilla MR, Nugent M, Foster JA. Basic fibroblast growth factor decreases elastin gene transcription through an API/cAMP-response element hybrid site in the distal promoter. *J Biol Chem* 1999;274:33433–9.
- [23] Nguyen T, Rushmore TH, Pickett CB. Transcriptional regulation of a rat liver glutathione S-transferase Ya subunit gene: analysis of the antioxidant response element and its activation by the phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *J Biol Chem* 1994;269:13656–62.
- [24] Wang B, Williamson G. Detection of a nuclear protein which binds specifically to the antioxidant responsive element (ARE) of the human NAD(P) H:quinone oxidoreductase gene. *Biochim Biophys Acta* 1994;1219:645–52.
- [25] Itoh K, Igarashi K, Hayashi N, Nishizawa M, Yamamoto M. Cloning and characterization of a novel erythroid cell-derived CNC family transcription factor heterodimerizing with the small Maf family proteins. *Mol Cell Biol* 1995;15:4184–93.
- [26] Kobayashi A, Ito E, Toki T, Kogame K, Takahashi S, Igarashi K, et al. Molecular cloning and functional characterization of a new Cap'n' collar family transcription factor Nrf3. *J Biol Chem* 1999;274:6443–52.
- [27] Venugopal R, Jaiswal AK. Nrf1 and Nrf2 positively and c-Fos and Fra1 negatively regulate the human antioxidant response element-mediated expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:14960–5.
- [28] Itoh K, Chiba T, Takahashi S, Ishii T, Igarashi K, Katoh Y, et al. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem Biophys Res Comm* 1997;236:313–22.
- [29] Blank V, Kim MJ, Andrews NC. Human MafG is a functional partner for p45 NF-E2 in activating globin gene expression. *Blood* 1997;89:3925–35.

Category : (5) Gene expression and development

Regulation of transcription of the glutathione S-transferase P1 gene by methylation of the minimal promoter in human leukemia cells

Patricia Borde,* Marc Diederich,*⁺ Franck Morceau,* Alvaro Puga,[‡] Maria Wellman[§] and Mario Dicato*

*Laboratoire de Recherche sur le Cancer et les Maladies du Sang (RCMS), Centre Universitaire de Luxembourg, L-1511 Luxembourg.

[‡]Department of Environmental Health, University of Cincinnati, Ohio 45267-0056, USA.

[§]Centre du Médicament, UPRES, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université Henri Poincaré Nancy I, F-54000 Nancy, France

⁺Corresponding author: Dr. M. Diederich, Laboratoire de Recherche sur le Cancer et les Maladies du Sang (RCMS), Centre Universitaire de Luxembourg, 162A, avenue de la Faïencerie, L-1511 Luxembourg, Luxembourg. Tel. (352) 46 66 44 434; Fax (352) 46 66 44 436; E-mail: diederich@cu.lu

Running title : Glutathione S-transferase P1 gene methylation

Abstract

To study the relationship between methylation and the transcriptional activity of the minimal promoter of the glutathione *S*-transferase *GST P1* gene, encoding glutathione *S*-transferase P1-1, *GSTP1* mRNA levels as well as the basal promoter activity were compared in human leukaemia cell lines. The K562 erythroleukaemia cell line presents a strong *GSTP1* promoter activity, as measured in transient transfection assays using a luciferase reporter plasmid and correlates with a high mRNA whereas in Raji cells no mRNA is expressed. In order to establish a relationship between the expression and the methylation status, we used *in vitro* bisulfite sequencing indicating that both methylated and unmethylated *GSTP1* promoter alleles coexisted in K562 cells whereas Raji lymphoma cells show a nearly uniform hypermethylation of the promoter region. In order to determine the impact of methylation, *in vitro* *SssI* methylation of the minimal *GSTP1* promoter leads to the silencing of the promoter activity in transient transfection assays in expressing K562 as well as in non-expressing Raji cells. These data are in good agreement with previously obtained results and indicate that methylation of CpG sites of the basal promoter is an essential mechanism in the control of *GSTP1* gene expression in human leukaemia.

Key words : gene expression, glutathione *S*-transferase P1, DNA methylation, transcription regulation, promoter

INTRODUCTION

Methylation of cytosine residues in CpG dinucleotides affects the expression of many genes and is associated with reduced levels of transcription [1, 2]. Over the last decade, numerous studies have demonstrated a close correlation between hypermethylated 5' CpG islands and the inactivation of the corresponding downstream genes, including those coding for p16^{INKA} [3], E-cadherin [4], von Hippel Lindau protein [5] and estrogen- α receptor [6], suggesting that hypermethylation of CpG islands could be a general mechanism of transcriptional regulation.

GSTs[†] are dimeric proteins encoded by a family of distinct genes. Humans express four classes of cytosolic GSTs and two membrane bound GST enzymes with distinct but overlapping substrate specificity's [7 - 9]. GSTs catalyze the conjugation of glutathione with a wide variety of hydrophobic compounds bearing an electrophilic center, including chemical carcinogens, mutagens and anticancer agents [10]. GSTs also protect cells by preventing oxidative damage through intrinsic organic peroxidase activity [11]. The distribution of GST isoenzymes is tissue-specific. GSTA is mainly expressed in the liver and the kidney while GSTP1-1 is expressed as a major form in organs such as lung, breast or bladder [10, 12]. In many human tumors and pre-neoplastic lesions GSTP1-1 is overexpressed, even though in the corresponding normal tissues the protein is either absent or expressed at very low levels [13]. GSTP1-1 appears to be involved in the development of anticancer drug resistance, and elevated levels of *GSTP1* mRNA are found in cell lines resistant to a range of anticancer drugs [14, 15].

Promoter methylation is believed to be one the factors implicated in the regulation of *GSTP1* gene expression in a wide range of human tissues, as shown by Millar et al [16]. In prostate cancer cells, DNA methylation is extensive throughout the CpG island of the *GSTP1* gene and leads to the loss of *GSTP1* expression [17, 18].

[†] GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GST, glutathione S-transferase; PCR, polymerase chain reaction

Hepatic carcinoma cells also display abnormal *GSTP1* CpG island hypermethylation correlated to a loss of *GSTP1* expression [19]. The methylation of the *GSTP1* gene has been suggested to play an important role in the silencing of this gene in renal and breast carcinoma cells [20, 21]. To test the hypothesis that CpG methylation modulates the regulatory activity of the *GSTP1* gene promoter in leukemia we have used bisulfite genomic sequencing to determine the methylation state of 15 CpG sites in the human *GSTP1* promoter in an expressing and a non expressing leukemia cell line and determined the impact of methylation by *in vitro* *SssI* methylation of the minimal *GSTP1* promoter in expressing K562 as well as in non-expressing Raji cells.

MATERIALS AND METHODS

Cells and Medium

K562 (chronic myelogenous leukemia), U937 (histiocytic lymphoma), Jurkat (acute T cell leukemia), Raji (Burkitt's lymphoma) and Molt-3 (acute lymphoblastic leukemia) cells, (all from the American Type Culture Collection) were cultured in RPMI medium containing 10 % (v/v) fetal calf serum and 1 % (v/v) antibiotic-antimycotic (all from Life Technologies).

Northern Blot Analysis

Total RNA was isolated from approximately 5×10^6 human leukemia cells using the Trizol Reagent (Life Technologies). Ten micrograms of total RNA were loaded per lane and separated on a 1 % denaturing formaldehyde agarose gel. After electrophoresis, the RNA were transferred by capillary action to a Hybond N+ nylon membrane (Amersham/Pharmacia Biotech). Northern blots were hybridized to a 0.72 kb genomic [^{32}P] labeled genomic DNA fragment coding for human GSTP1-1 (American Type Culture Collection). A human glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GADPH) probe (Clontech) was used as a control for equal sample loading. Probes were [^{32}P]-labeled by random priming using the RTS Radprime DNA Labeling System (Life Technologies). Prehybridization and hybridization were carried out at 42°C. Northern blots were washed for 5 min with 2x SSC (sodium chloride/sodium citrate) and 0,5% SDS, then washed twice with 2x SSC and 0,1% SDS for 5 min and at least 30 min in a 1 x SSC buffer containing 0.1 % SDS at 65°C. Autoradiography was performed using X-OMAT AR film (Eastman Kodak Co.) and two intensifying screens at -70 °C. Quantifications were performed by scanning of the autoradiograms and the Image 1.62b7 software (NIH).

Construction of Expression Vectors

Human genomic DNA was extracted from human peripheral blood cells following standard procedures. Primers GST1 and GST2 (Eurogentec) were used to amplify a 136 bp product corresponding to the minimal promoter of the human *GSTP1* gene on the basis of sequences deposited in GenBank (Accession Number X08058) by Morrow *et al.* [22]. Primers correspond to the following regions : -97 to -79 5'-AAAAAGGATCCGGACCCTCCAGAAGAGCGG-3' for GST1 and +21 to +39 5'-AAGCTTCGTACTCACTGGTGGCGAAG-3' for GST2 relative to the transcriptional start site. PCR conditions were performed in 25 μ l volumes at 95 °C for 5 min, 30 cycles at 95 °C for 1 min, 57.5 °C for 1 min, 72 °C for 90 s. The amplified product was subcloned into a pCRII-Topo plasmid (pCRII-GST1128) (Invitrogen), excised by *Kpn*I and *Hind*III and religated into a *Kpn*I and *Hind*III linearized and dephosphorylated pGL3-Enhancer plasmid (Promega). The final construct was termed pGST1128. Relevant regions of the final constructs were confirmed by sequencing in both directions using a T7 sequencing kit (Amersham/Pharmacia Biotech).

Bisulfite Modification of Genomic DNA

DNA was obtained from the different cells and bisulfite modification was carried out as described by Frommer *et al.*. [23] with modifications described by Feil *et al.*. [24]. Briefly, 5 micrograms of genomic DNA from K562 cells were treated with 5 M sodium bisulfite and 100 mM hydroquinone pH 5.0 at 50°C for 16 h. After modification, the sense strand of the *GSTP1* promoter was amplified by PCR using the following primers, designed after taking into account the bisulfite conversion reaction : -98 to -82 5'-GGGATTTTTTAGAAGAG-3' for GST1' and +19 to +37

5'-TACTCACTAATAACRAAAA-3' (with R = A or G) for GST2' relative to the transcriptional start site (see Fig. 3A). PCRs were performed in 25 μ l volumes at 95 °C for 5 min, 30 cycles at 94 °C for 30 s, 51 °C for 1 min, 72 °C for 90 s.

Amplified PCR fragments were subcloned into a pCRII-Topo plasmid (Invitrogen). Positive clones from at least three independent PCRs were sequenced to determine the methylation pattern of individual DNA molecules using a T7 sequencing kit (Amersham/Pharmacia Biotech). After modification, C's derived from unmethylated C's appear as T's while methylated C's appear as C's.

Methylation of Plasmid Constructs

Whole plasmids were methylated using *SssI* methylase (*M.SssI*), which methylates all cytosine residues within the double-stranded dinucleotide recognition sequence 5'-CG-3' (New England Biolabs). Ten micrograms of pGST1128 plasmid were incubated with 30 units of *M.SssI* and in a parallel control reaction 10 μg of the same plasmid were mock-methylated in the absence of *S*-adenosylmethionine. Methylated and mock-methylated plasmids were digested with *KpnI/HindIII* and religated.

Region-specific methylation was carried out by a *KpnI/HindIII* digestion of methylated and mock-methylated pGST1128 constructs. After digestion, promoter DNA fragments were separated by agarose gel electrophoresis, purified and ligated to either mock-methylated or methylated plasmid DNA in order to produce partially methylated constructs.

Transient Transfection Assays

Transfections of K562, U937, Jurkat and Raji cells were done by electroporation using a BioRad Gene Pulser (BioRad Laboratories). For each experiment 5×10^6 cells at a concentration of 1.8×10^7 cells/ml were electroporated at the following settings : 625 V/cm and 500 μF (K562 and U937), 800 V/cm and 500 μF (Jurkat), 775 V/cm and 960 μF (Raji) in a final volume of 300 μl . Twenty micrograms of the reporter gene construct and 8 μg of a p cytomegalovirus (CMV) β plasmid (Clontech) were used for each pulse. Results from all transfections were normalized to the

β -galactosidase activity expressed by the co-transfected control plasmid pCMV β . For methylation cassette assays, K562 cells were grown to early log phase, harvested and resuspended in RPMI medium at 1×10^6 cells/ml. 2×10^5 cells were transfected by transferrin mediated endocytosis according to the instructions of the manufacturer (Bender Medsystems). Briefly, cells were transfected with $2 \mu\text{g}$ of each luciferase construct and $8 \mu\text{g}$ of an *XhoI/HindIII* digested and religated β -galactosidase expressing control plasmid. After transfection, cells were cultured in 1.5 ml preheated medium. After 48 hours, the cells were harvested and resuspended in $300 \mu\text{l}$ of reporter lysis buffer (Promega). The light emission resulting from luciferase activity was measured in a Turner luminometer by integration of the peak light emission over 15 s at 25°C . β -galactosidase activities were measured in an assay buffer containing 100 mM sodium phosphate (pH 7.3), 1 mM MgCl_2 , 50 mM 2-mercaptoethanol, 0.665 mg/ml *o*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside and $50 \mu\text{l}$ of cell lysate.

The ratio between arbitrary luciferase light units and β -galactosidase activity was normalized for each cell line separately relative to the cells transfected with pGL3-Control (Promega). All results are expressed relative to the luciferase activity of the pGL3-Control, arbitrarily set to 100 %. Each value represents the average \pm S.D. of three independent transfection experiments. Assays were repeated twice.

RESULTS

Differential expression of *GSTP1* mRNA in human leukaemia cell lines

To characterise the expression of the *GSTP1* gene in human leukaemia cells, we used Northern blot hybridisation with a 0.72 kb genomic fragment of human *GSTP1*. K562, Jurkat and U937 cells showed significantly higher mRNA levels than Molt-3, whereas no significant amount of *GSTP1* mRNA was detected in Raji cells [Fig. 1]. Hybridisation with a GAPDH specific probe showed no difference in GAPDH mRNA contents for these cell lines.

To measure basal *GSTP1* promoter activity in these cells, we constructed an expression plasmid containing a 136-bp fragment of the *GSTP1* promoter fused to a luciferase reporter gene. Transfection of this construct into K562 chronic myelogenous leukaemia cells resulted in a 10-fold increase of luciferase activity relative to cells transfected with a simian virus (SV) 40 promoter-driven pGL3-Control plasmid [Fig 2]. Transfection of the same construct into Jurkat acute T-cell leukaemia cells and into U937 histiocytic lymphoma cells, yielded 7-fold and 3.5-fold increases, respectively. In contrast, transfection of this reporter construct into Raji, a Burkitt's lymphoma cell line, produced no significant increase above pGL3 luciferase activity [Fig. 2]. These results are in good agreement with our observations by Northern blot analysis as K562 cells expressed the highest *GSTP1* mRNA levels. These data suggest that expression of *GSTP1*-1 is cell-line specific.

Methylation status of CpG sites in the *GSTP1* promoter

The central tenet of our hypothesis is that, if a relationship exists between CpG methylation and transcriptional activity of the *GSTP1* gene promoter in leukaemia cell lines, we would expect *GSTP1* promoter methylation to result in lower levels of *GSTP1* gene expression. To analyse the precise methylation pattern of the *GSTP1* promoter we chose the chronic myelogenous leukaemia cell line, K562, which, as

shown above, expresses high levels of *GSTP1* mRNA. Fifteen CpG dinucleotides can be recognised in the 136-bp fragment that we studied, spanning from position -98 to +37 relative to the transcriptional start site + 1 [Fig. 3A]. This region contains numerous canonical binding sites for transcription factors including two Sp1 sites and one AP1 site. PCR fragments resulting from amplification of bisulfite-modified K562 DNA were subcloned into pCRII-Topo plasmid vectors. After modification and PCR, unmethylated cytosines appear as thymines whereas methyl-cytosines appear as cytosines on the sequencing gel. Fig. 3B shows the tracks of a typical bisulfite sequencing autoradiograph. To ensure an accurate methylation profile, we sequenced a total of 18 to 27 clones from 3 independent PCR reactions. For each of the sequenced clones, the presence or absence of a methylated cytosine at the 15 CpG sites within the PCR fragment was scored. Table I shows the methylation patterns recorded for the different clones of the K562 and Raji cell lines. In K562 cells, which express *GSTP1*, 37 % of the clones are almost completely demethylated [Table I]. Raji cells, which do not express *GSTP1*, showed a very high level of methylation (90-95 %), suggesting that promoter inactivation in these cells might result from methylation [Table I].

Inhibition of the transcriptional activity by methylation of the minimal *GSTP1* promoter

To study the possible cause and effect relationships between CpG methylation and transcriptional activity, we compared the ability of *in vitro* methylated and mock-methylated *GSTP1* minimal promoters to direct the reporter gene expression in transiently transfected leukaemia cells expressing *GSTP1*-1 (K562, U937 and Jurkat) and the non-expressing Raji lymphoma cells. To accomplish complete methylation, we used *SssI* methylase, which methylates all CpG dinucleotides in the methylation reactions. The comparison of results with methylated and unmethylated reporter plasmids indicates in all tested cell lines that methylation resulted in an only residual

reporter gene activity as referred to the control cells transfected with unmethylated pGST1128 : 3.6% for K562, 0.8% for U937, 0.2% for Jurkat and 0.7% for RAJI [Fig. 4].

To assess the role that methylation of the promoter relative to methylation of the plasmid backbone may have on the gene expression results, we measured the reporter activity after exchanging the different plasmid components. The methylated *GSTP1* promoter fragment was religated into a mock-methylated plasmid backbone and the methylated plasmid backbone was ligated to a mock-methylated promoter fragment. Transfection of the chimeric plasmids into K562 cells resulted in 96.3% reduction of luciferase activity when only the promoter was methylated and 66% reduction when only the plasmid backbone was methylated [Fig. 4]. These results confirm that methylation significantly reduces the promoter activity of the *GSTP1* fragment but that in addition, other effects take place at CpG islands that may affect the expression of nearby genes.

DISCUSSION

In this report we show that transcription of the *GSTP1* gene is cell-line specific even among human leukemia cells in culture. We also find that in cell lines that express *GSTP1* mRNA, such as K562, a 136-bp fragment of the *GSTP1* minimal promoter is sufficient to direct the strong induction of a luciferase reporter gene. *In vitro* methylation of the promoter reduces its ability to direct the expression of the reporter gene. In Raji lymphoma cells, low levels of *GSTP1* mRNA can be correlated to a lower transcriptional activity and a stronger methylation of the promoter region. Those results correlate with those of Shea et al. [25] who measured a very low anionic GST activity related or identical to *GSTP1-1* (< 1.0 milliunits/mg protein) in Raji cells.

Several proximal promoter elements have been shown to influence *GSTP1-1* expression. A region spanning from position -80 to -8 is absolutely required for

reporter gene activity in transient transfection experiments [26] and for retinoic acid dependent repression [27]. Of two GC boxes located in this promoter region, the distal G/C box, but not the proximal, is essential for promoter activity, as shown by site directed mutagenesis [16]. Other reports suggest that the activator protein-1 site (AP-1, nucleotides -69 to -63) is essential for promoter activity in a human breast carcinoma cell line [26, 28]. Since the expression of various genes encoding drug metabolizing enzymes including the human NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 (NQO₁) gene, the murine GST Ya and the rat GST-P genes are regulated through inducible AP-1 components, the involvement of the AP-1 response element in the transcriptional regulation of the human *GSTP1* gene might also be of importance. Recent studies have suggested that NF-E2-related factor 2 (Nrf2) is involved in regulating the basal expression of the rat GSTA2 and NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 genes [29]. Cell-line specific expression of those and related transcription factors might also regulate the expression of the *GSTP1* gene in human leukemia.

In K562, a chronic myelogenous leukemia, methylation of the ABL1 promoter is limited to the allele nested within the Philadelphia fusion gene whereas the allele on the normal chromosome 9 remains unmethylated [30]. The same authors previously showed that in chronic myelogenous leukemia, methylation is likely to be an allele-specific process. Moreover, for the ABL1 promoter, methylation appears to be closely correlated to chronic myelogenous leukaemia (CML) progression and methylation correlates to a disease progression to a more aggressive form of the disease. As K562 cells form a homogenous culture and were established from a patient in the blastic phase of CML, further experiments will be needed to show whether or not every cell contains a methylated and an unmethylated promoter allele. *GSTP1* mRNA expression would then derive from the unmethylated allele whereas the methylated allele remains silent.

To assess the relationship between the promoter methylation status and transcriptional activity, we analyzed the effect of *in vitro* methylation on the induction of the luciferase reporter gene transiently transfected in both expressing (K562) and non-expressing (Raji) cells. In both cell lines *in vitro* methylation considerably reduces the expression level. Those results are in good agreement with a number of previous studies that correlate CpG methylation to transcriptional silencing of the minimal promoters of the p16^{INKA} [3] and embryonic globin genes [31].

Hypermethylation of regulatory sequences at the *GSTP1* gene has been observed in human prostatic tissue specimens [32], where it was accompanied by a striking decrease in GSTP1-1 protein expression. Overexpression of *GSTP1* was observed during the development of multidrug resistance mechanisms in acute non-lymphoblastic leukemia and in acute myeloid leukemia [33], which led to the suggestion that expression of GSTP1 might be a useful marker of clinical resistance to cytostatic drugs. This close association with multidrug resistance in human leukemia and in breast cancer, makes the study of the molecular mechanisms regulating *GSTP1* expression of particular importance for the design of anticancer treatments. Conversely, we might expect that demethylation of otherwise CpG rich promoter regions at that specific site will have an important role in relieving repression of *GSTP1* expression and play a key role in the switch from drug-sensitive cancer cells to the development of drug resistance in human leukemia cells.

In the present study, we have examined the relationship between methylation and the promoter activity of a 136-bp minimal *GSTP1* promoter in the human leukemia cell line K562. We find that *in vitro* methylation of this promoter with SssI has a transcriptional inhibitory effect and that the methylation state of this *GSTP1* promoter fragment in expressing and non-expressing leukemia cell lines correlates with the degree of *GSTP1* RNA expression and transcriptional activity.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank R. Singal and K. Robertson for technical advice and M. Medvedovic for statistical analyses. This work was supported by the Fondation de Recherche "Cancer et Sang". P.B-C. and F.M. were supported by fellowships from the Government of Luxembourg [BFR97/25 and BFR96/35]. The authors also thank the Action Lions "Vaincre le Cancer", "Les Amis de la Fondation José Carreras - Luxembourg" and the "CNFPC / Esch-sur-Alzette" for additional support. A.P. was supported by NIEHS R01 ES06273 and NIEHS P30 ES06096.

Legends of figures

Figure 1. [A] Northern blot analysis. The upper panel shows *GSTP1* RNA from five different human leukemia cell lines. As a control for sample loading, the blot was stripped and rehybridized with a GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) specific probe, shown in the lower panel. [B] Quantitation of northern blot data. Three different northern blots were quantitated using the NIH Image 1.62b7 software. The ordinate represents the *GSTP1* mRNA/GAPDH mRNA ratio for each cell line tested. Each bar represents the average \pm S.D. of three independent northern blots.

Figure 2. Transcriptional activity of the minimal *GSTP1* promoter in human leukemia cells. Summary of luciferase assay results. Each cell line was transfected with a pGL3-Control plasmid (white bars), with pGST1128 construct (shaded bars) and co-transfected with a β -galactosidase expressing pCMVB plasmid. The cells were harvested 48 h later, standardized luciferase activity was determined as described in Material and Methods. Results were compared between cell lines taking into account the correction for the pGL3-Control activity levels. Each bar represents the average \pm S.D. of three independent transfection experiments. Assays were repeated twice.

Figure 3. [A] Alignment of the human *GSTP1* promoter sequences. CpG dinucleotides are numbered and underlined. Sequence is numbered relative to the transcriptional start site as indicated (+1); binding sites for SP1 and AP1 are in italic. [B] Typical bisulfite sequence autoradiograph of two clones of the amplified region (complementary strand). All cytosines have been converted to thymines while 5-methylcytosines appear in the C track. Clones shown are methylated at all CpG sites (Raji cells, left) or unmethylated (K562 cells, right).

Figure 4. Relative luciferase expression following *in vitro* *SssI* methylation of plasmid construct pGST1128 containing the *GSTP1* promoter region upstream of a luciferase reporter gene and transfection into leukemia cells. Complete methylation of all CpG dinucleotides in a particular region of a given construct is represented by an attached M. Each bar represents the average \pm S.D. of three independent transfection experiments. Assays were repeated twice. U, unmethylated; M, methylated.

REFERENCES

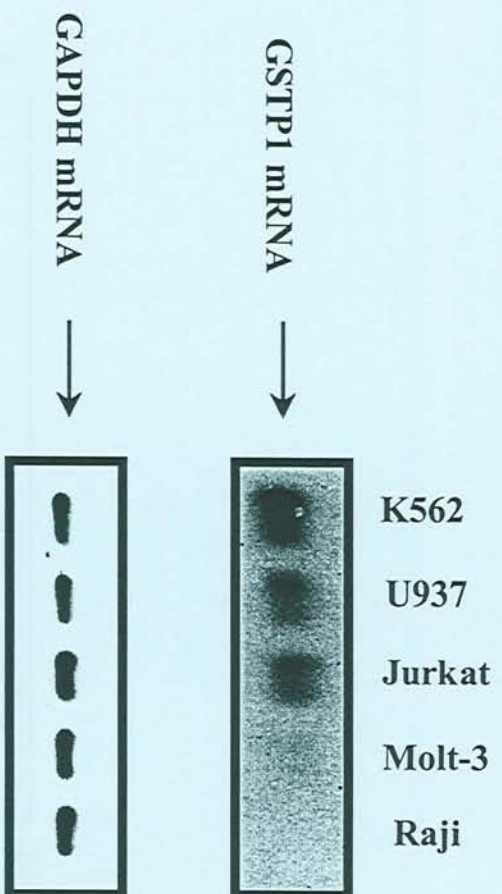
- 1 Bird A, The essentials of DNA methylation. *Cell* **70**: 5-8, 1992.
- 2 Kass SU, Landsberger N and Wolffe AP, DNA methylation directs a time-dependent repression of transcription initiation. *Curr Biol* **7**: 157-165, 1997.
- 3 Martinez-Delgado B, Fernandez-Piqueras J, Garcia MJ, Arranz E, Gallego J, Rivas C, Robledo M and Benitez J, Hypermethylation of a 5' CpG island of p16 is a frequent event in non-Hodgkin's lymphoma. *Leukemia* **11**: 425-428, 1997.
- 4 Kanai Y, Ushijima S, Hui A-M, Ochiai A, Tsuda H, Sakamoto M and Hirohashi S, The E-cadherin gene is silenced by CpG methylation in human hepatocellular carcinomas. *Int J Cancer* **71**: 355-359, 1997.
- 5 Prowse AH, Webster AR, Richards FM, Richard S, Olschwang S, Resche F, Affara NA and Maher ER, Somatic inactivation of the VHL gene in Von Hippel-Lindau disease tumors. *Am J Hum Genet* **60**: 765-771, 1997.
- 6 Issa JP, Baylin SB and Belinsky A, The estrogen receptor CpG island is methylated in most hematopoietic neoplasms. *Cancer Res* **56**: 3655-3658, 1996.
- 7 Mannervik B, Alin P, Guthenberg C, Jensson H, Tahir MK, Warholm M and Jörnvall H, Identification of three classes of cytosolic glutathione transferase common to several mammalian species: correlation between structural data and enzymatic properties. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 7202-7206, 1985.
- 8 Meyer DJ, Coles B, Pemble SE, Gilmore KS, Fraser GM and Ketterer B, Theta, a new class of glutathione transferases purified from rat and man. *Biochem J* **274**: 409-414, 1991.
- 9 Moscow JA, Townsend AJ, Goldsmith ME, Whang-Peng J, Vickers PJ, Poisson R, Legault-Poisson S, Myers CE and Cowan KH, Isolation of the human anionic glutathione S-transferase cDNA and the relation of its gene

- expression to estrogen-receptor content in primary breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 6518-6522, 1988.
- 10 Commandeur JN, Stijntjes GJ and Vermeulen NP, Enzymes and transport systems involved in the formation and disposition of glutathione S-conjugates. Role in bioactivation and detoxication mechanisms of xenobiotics. *Pharmacol Rev* **47**: 271-330, 1995.
 - 11 Schipper DL, Wagenmans MJ, Wagener DJ and Peters WH, Glutathione S-transferases and cancer. *Int J Oncol* **10**: 1261-1264, 1997.
 - 12 Morel F, Schulz WA and Sies H, Gene structure and regulation of expression of human glutathione S-transferases alpha. *Biol Chem Hoppe-Seyler* **375**: 641-649, 1994.
 - 13 O'Brien ML and Tew KD, Glutathione and related enzymes in multidrug resistance. *Eur J Cancer* **32**: 967-978, 1996.
 - 14 Schultz M, Dutta S and Tew KD, Inhibitors of glutathione S-transferases as therapeutic targets. *Adv Drug Del Rev* **26**: 91-104, 1997.
 - 15 Tew KD, Glutathione-associated enzymes in anticancer drug resistance. *Cancer Res* **54**: 4313-4320, 1994.
 - 16 Millar DS, Paul C, Molloy P and Clark SJ.. A distinct sequence (ATAAA)_n separates methylated and unmethylated domains at the 5' end of the GSTP1 CpG island. *J Biol Chem* 2000 in press
 - 17 Lee WH, Morton RA, Epstein JI, Brooks JD, Campbell PA, Bova GS, Hsieh WS, Issaacs WB and Nelson WG, Cytidine methylation of regulatory sequences near the pi-class glutathione S-transferase gene accompanies human prostatic carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 11733-11737, 1994.
 - 18 Millar DS, Ow KK, Paul CL, Russell PJ, Molloy PL and Clark SJ.. Detailed methylation analysis of the glutathione S-transferase pi (GSTP1) gene in prostate cancer. *Oncogene* 1999 **18**: 1313-24, 1999.

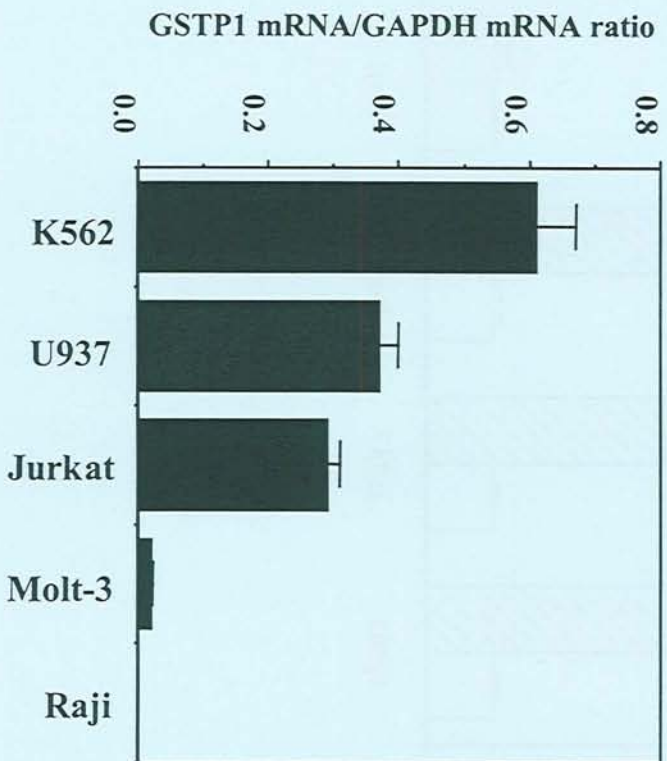
- 19 Tchou JC, Lin X, Freije D, Isaacs WB, Brooks JD, Rashid A, De Marzo AM, Kanai Y, Hirohashi S and Nelson WG. GSTP1 CpG island DNA hypermethylation in hepatocellular carcinomas. *Int J Oncol* **16**: 663-76, 2000.
- 20 Jhaveri MS and Morrow CS, Methylation-mediated regulation of the glutathione S-transferase P1 gene in human breast cancer cells. *Gene* **210**: 1-7, 1998.
- 21 Esteller M, Corn PG, Urena JM, Gabrielson E, Baylin SB and Herman JG, Inactivation of Glutathione S-transferase P1 gene by promoter hypermethylation in human neoplasia. *Cancer Res* **58**: 4515-4518, 1998.
- 22 Morrow CS, Cowan KH and Goldsmith ME, Structure of the human genomic glutathione S-transferase-pi gene. *Gene* **75**: 3-11, 1989.
- 23 Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, Molloy PL and Paul CL, A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 1827-1831, 1992.
- 24 Feil R, Charlton J, Bird AP, Walter J and Reik W, Methylation analysis on individual chromosomes: improved protocol for bisulphite genomic sequencing. *Nucleic Acids Res* **22**: 695-696, 1994.
- 25 Shea TC, Kelley SL, Henner WD, Identification of an anionic form of glutathione transferase present in many human tumor cell lines. *Cancer Res* **48**: 527-533, 1988.
- 26 Morrow CS, Goldsmith ME and Cowan KH, Regulation of human glutathione S-transferase pi gene transcription: influence of 5'-flanking sequences and *trans*-activating factors which recognize AP-1-binding sites. *Gene* **88**: 215-225, 1990.
- 27 Xia C, Hu J, Ketterer B and Taylor JB, The organization of the human GSTP1-1 gene promoter and its response to retinoic acid and cellular redox status. *Biochem J* **313**: 155-161, 1996.

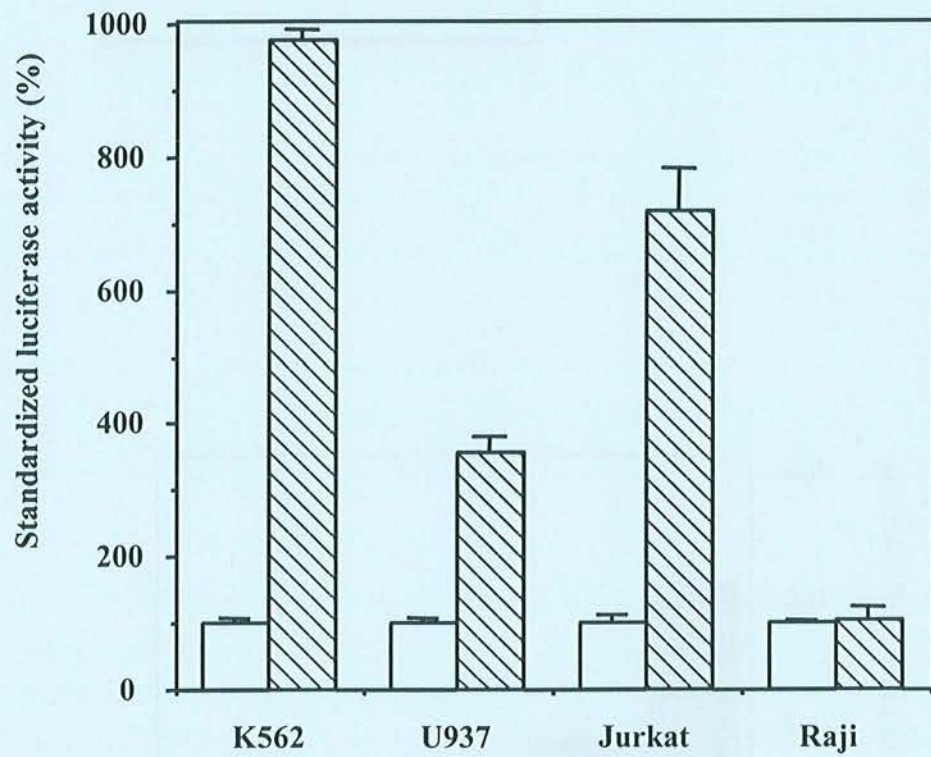
- 28 Moffat GJ, McLaren AW and Wolf CR, Sp1-mediated transcriptional activation of the human Pi class glutathione S-transferase promoter. *J Biol Chem* **271**: 1054-1060, 1996.
- 29 Nguyen T, Huang HC, Picket CB, Transcriptional regulation of the antioxidant response element. *J Biol Chem* **275**:15466-15473, 2000.
- 30 Asimakopoulos FA, Shteper PJ, Krichevsky S, Fibach E, Polliack A, Rachmilewitz E, Ben-Neriah Y and Ben-Yehuda D. ABL1 methylation is a distinct molecular event associated with clonal evolution of chronic myeloid leukemia. *Blood* **94**:2452-2460, 1999.
- 31 Singal R, Ferris R, Little A, Wang SZ and Ginder GD, Methylation of the minimal promoter of an embryonic globin gene silences transcription in primary erythroid cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 13724-13729, 1997.
- 32 Tidefelt U, Elmhorn-Rosenborg A, Paul C, Hao X-Y, Mannervik B and Eriksson LC, Expression of glutathione transferase pi as a predictor for treatment results at different stages of acute nonlymphoblastic leukemia. *Cancer Res* **52**: 3281-3285, 1992.
- 33 Zhou DC, Hoang-Ngoc L, Delmer A, Faussat AM, Russo D, Zittoun R and Marie JP, Expression of resistance genes in acute leukemia. *Leuk Lymphoma* **13**: 27-30, 1994.

A.



B.





1 2 3 4
GGGACCCTC CAGAAGAGCG GCCGGCGCCG -69

5 6 7
TGACTCAGCA CTGGGGCGGA GCGGGGCGGG -39
AP-1 SP1 SP1

8 9 10
ACCACCCTTA TAAGGCTCGG AGGCCGCGAG -9

11 ⁺¹
GCCTTCGCTG GAGTTCGCC GCCGCAGTCT +22

15
TCGCCACCAG TGAGTA +37

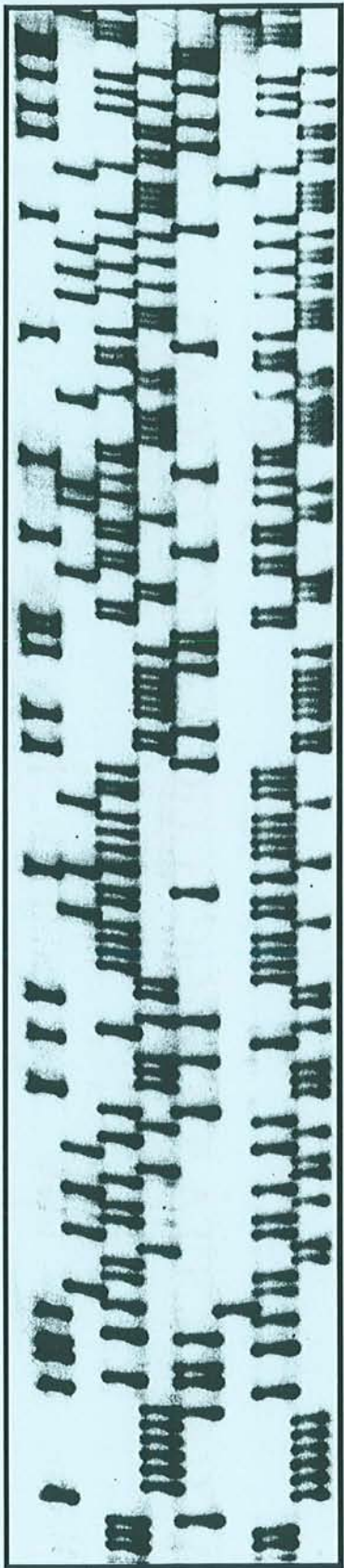
A C G T A C G T

CpG 15 →
CpG 14 →
CpG 13 →
CpG 12 →

CpG 11 →
CpG 10 →
CpG 9 →
CpG 8 →

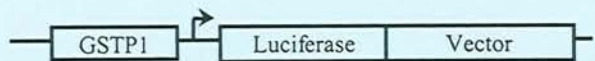
CpG 7 →
CpG 6 →
CpG 5 →

CpG 4 →
CpG 3 →
CpG 2 →
CpG 1 →



3'

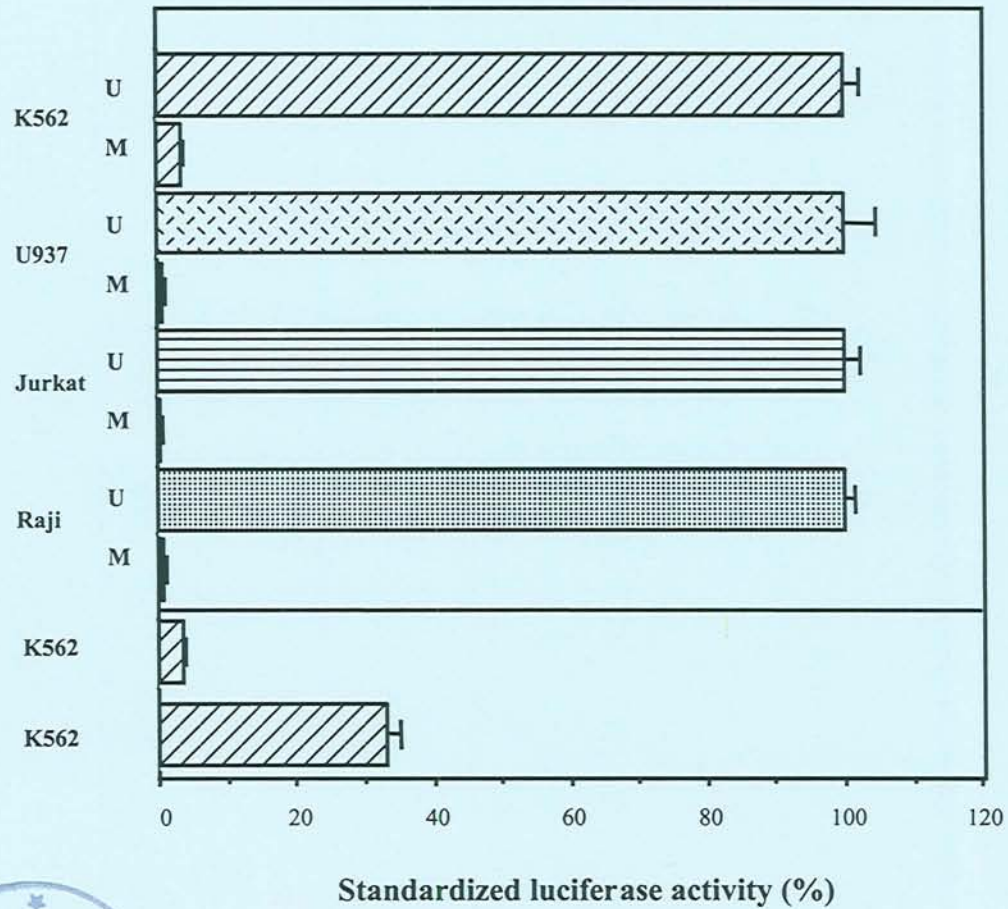
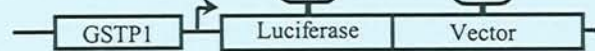
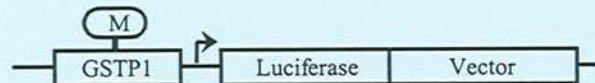
5'



unmethylated pGST1128 (U)



methylated pGST1128 (M)



Nom, prénom : **BORDE-CHICHÉ Patricia**

Nature de la thèse :

**Doctorat de l'Université Henri Poincaré, Nancy I
en Biologie - Santé - Environnement**

VU, APPROUVE et PERMIS D'IMPRIMER

Nancy, le *4 décembre 2000* n°451

Le Président de l'Université Henri Poincaré, Nancy I



RESUME

La Glutathion S-Transférase P1-1 (GSTP1-1), impliquée dans la conjugaison de composés électrophiles au glutathion, la cancérogénèse et le développement de résistances aux anticancéreux, reste peu étudiée dans le cas des leucémies humaines. Dans un premier temps, nous avons montré que l'expression de l'ARNm ou de la protéine dépend du type de leucémie et que le promoteur basal n'est actif que dans les cellules qui expriment la GSTP1-1 (K562, U937, Jurkat) contrairement à celles qui n'expriment pas la GSTP1-1 (Raji, Molt-3). Une approche par délétions successives du promoteur *GSTP1* nous a permis de localiser un site AP-1 nécessaire à l'expression basale. Par la suite, l'étude du statut de méthylation du promoteur basal par la technique de modification au bisulfite a permis de corrèler le taux d'expression de GSTP1-1 à la partielle déméthylation du promoteur dans les K562, et à l'hyperméthylation de ce promoteur dans les Raji et Molt-3. Toutefois l'hyperméthylation du promoteur dans des lignées qui expriment la GSTP1-1 (U937, Jurkat) suggère que d'autres mécanismes sont impliqués. Ainsi, la technique de retard de migration sur gel a permis de mettre en évidence un complexe spécifique lié au site AP-1 et caractéristique des lignées qui expriment la GSTP1-1. Les anticorps spécifiques ont identifié la présence des facteurs de transcription c-jun, Fra-1 et NF-E2 p45 dans ce complexe. Nous avons terminé nos travaux par la démonstration d'une forte inductibilité de ces interactions par un traitement des K562 par un ester de phorbol (TPA) ou par des agents produisant un stress oxydant (Doxorubicine, peroxyde d'hydrogène et *tert*-butylhydroquinone). Le TPA augmente aussi l'expression de la protéine et l'activité du promoteur basal. L'ensemble de ces résultats nous a permis de préciser le mode de régulation de la GSTP1-1 dans le cas des leucémies humaines et démontre pour la première fois une inductibilité du site AP-1 du gène de la GSTP1-1 humaine par un ester de phorbol.

MOTS-CLÉ

Leucémie, transcription, glutathion S-transférase, AP-1, stress oxydant, ester de phorbol, méthylation de l'ADN

ABSTRACT

Glutathione S-transferase P1-1 (GSTP1-1) catalyzes the conjugation of electrophilic compounds to glutathione and is implicated in carcinogenesis and resistance to antineoplastic drugs. Transcriptional mechanisms responsible for GSTP1-1 expression remain still unclear, specifically in human leukemia. Here we demonstrate that GSTP1-1 mRNA levels correlate with GSTP1-1 promoter activity : K562, Jurkat and U937 cells express high mRNA level and present strong promoter activity, whereas Raji and Molt-3 cells show no mRNA expression and also a weak promoter activity. Serial promoter deletions reveal that a consensus AP-1 site is essential for constitutive promoter activity in expressing leukemia cells. Furthermore, we used *in vitro* bisulfite sequencing to show that hypermethylation in Raji cells on one hand and coexistence of methylated and unmethylated alleles in K562 cells on the other hand correlate with GSTP1-1 expression. Nevertheless, the same promoter fragment is hypermethylated in GSTP1 expressing Jurkat and U937 cells, indicating that other regulatory mechanisms are probably active. Gel shift assays revealed a specific binding of an AP-1 complex in GSTP1-1 expressing cells. Supershift assays identified c-jun, Fra-1 and NF-E2 p45 as transcription factors constitutively bound to the AP-1 site in these cells. We also showed that this DNA binding was induced by the phorbol ester TPA and by oxidative stress inducing compounds (Doxorubicin, H₂O₂ and *tert*-butylhydroquinone). Moreover, TPA induced GSTP1 mRNA expression and promoter activity in K562. Our results show new insights into the regulation of GSTP1-1 expression and demonstrate for the first time that TPA is involved in the molecular mechanisms mediating the activation of the *GSTP1* promoter in a human leukemia cell line model.

KEY-WORDS

Leukemia, transcription, glutathione S-transferase, AP-1, oxidative stress, phorbol ester, DNA methylation