



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

2003

B 29399

ECOLE DOCTORALE "BIOLOGIE SANTE ENVIRONNEMENT"

THESE

Présentée et soutenue publiquement
Le 12 novembre 2003

Pour obtenir le titre de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE
HENRI POINCARÉ – NANCY 1**

Mention Sciences du Médicament

Par Annelise Duvoix
Née le 14 octobre 1975

Titulaire du Diplôme d'Etude Approfondies
"Microbiologie-Enzymologie-Nutrition"

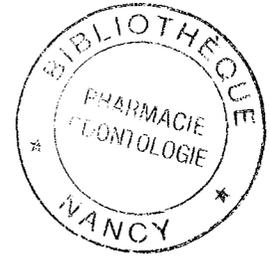
Sujet :

**Régulation transcriptionnelle de la
glutathion S-transférase P1-1 *via* AP-1 et NF- κ B dans les
cellules leucémiques humaines**
Effet inhibiteur des agents chimiopréventifs d'origine naturelle

MEMBRES DU JURY

Juges : Mario Dicato, Professeur (Luxembourg)
Marc Diederich, Docteur (Luxembourg)
Marie-Madeleine Galteau, Professeur (Nancy)
Athanasios Visvikis, Professeur (Nancy)

Rapporteurs : Vincent Bours, Professeur (Liège)
Norbert Latruffe, Professeur (Dijon)



Savoir que l'on sait ce que l'on sait, et savoir que l'on ne sait pas ce que l'on ne sait pas : voilà la véritable science. Confucius

Une civilisation sans la Science, ce serait aussi absurde qu'un poisson sans bicyclette. Pierre Desproges

Remerciements

*Ce travail a été réalisé au laboratoire RCMS
(Recherche contre le Cancer et les Maladies du Sang)
au Centre Universitaire du Luxembourg*

Je remercie

*le Ministère de la Culture, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Luxembourgeois
(bourse de formation-recherche BFR 00/030)
la Fondation "Recherche Cancer et Maladies du Sang"
et l'Association Recherches Scientifiques Luxembourg (RSL)
pour leur soutien financier*

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 remercie particulièrement Mr le Docteur Marc Diederich qui m'a accepté dans son équipe et qui m'a encadré tout au long de mes recherches avec 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 très sincèrement Mme le Professeur Marie-Madeleine Galteau de m'avoir accueillie dans l'Ecole Doctorale Biologie et Santé et de m'avoir guidée tout au long de ma thèse.

Je remercie vivement Mrs les Professeurs Vincent Bours et Norbert Latruffe 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.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à Mr le Professeur Athanase Visvikis qui m'a permis d'entrer en contact avec le laboratoire RCMS et de commencer cette thèse. Ses conseils et encouragements ont toujours été les bienvenus.

J'adresse aussi mes remerciements à Mr le Docteur Craig Tomlinson et à son équipe pour m'avoir accueillie à Cincinnati et m'avoir dévoilé les secrets des microarrays.

Je remercie sincèrement tous mes collègues du Laboratoire RCMS: Francky, pour sa bonne humeur sans faille, Sylvie, pour ses remarques pleines de bon sens et Michaël, pour m'avoir fait découvrir le monde merveilleux de la pêche. Je les remercie aussi, bien sûr, pour leur soutien technique et leur amitié. Je tiens aussi à remercier les collègues de la 2^{ème} équipe: Brigitte, Valérie et Marc Pauly, ainsi que Martine, ex-RCMS. Les éléments de passage ont eux aussi contribué au bon déroulement de cette thèse: merci à Stéphane et à Marc Teusch pour ses barbecues.

Je tiens à remercier mes nombreux parents pour l'attention et le soutien qu'ils m'ont apporté et pour avoir cherché à comprendre ce que pouvait bien être cette "GSTP1-1".

Je veux aussi remercier mes amis qui ont su rester mes amis malgré les avatars rencontrés: Sandrine (Merci pour toutes ces soirées passées à rire de tout), Nick (Maybe you'll stay in a place long enough for me to come and see you?), Sébastien (Tu me dois toujours un resto!), Clotilde (Toujours prête pour un squash!), Anne (Toujours prête pour n'importe quoi!) et aussi bien sûr John qui supporte toutes mes humeurs.



Abréviations

ADNc.....	ADN complémentaire
AMPc.....	adénosine monophosphate cyclique
AP-1.....	activator protein 1
ARE.....	élément de réponse aux antioxydants
ARNm.....	ARN messenger
ARNt.....	ARN de transfert
BaP.....	benzo (a) pyrène
BSA.....	albumine de sérum bovin
CBP.....	CREB Binding protein
C/EBP.....	CAAT enhancer binding protein
CRE.....	élément de réponse à l'AMPc
CREB.....	cAMP response element binding protein
CYP450.....	Cytochrome P450
DEPC.....	diethyl pyrocarbonate
DMSO.....	diméthyl sulfoxyde
dNTP.....	déoxynucléotide triphosphate
DO.....	densité optique
DTT.....	Dithiothréitol
EDTA.....	acide éthylènediamine tétracétique
EGTA.....	acide éthylèneglycol tétracétique
ERK.....	extracellular regulating kinase
ERO.....	espèce réactive de l'oxygène
FRK.....	kinase régulant Fos
GAPDH.....	glyceraldéhyde 3-phosphate deshydrogénase
GCS.....	gamma-glutamylcystéine synthétase
GGT.....	gamma-glutamyltransférase
GPEI.....	GSTP EnhancerI
GSH.....	glutathion
GSSG.....	forme oxydée du glutathion
GST.....	glutathion S-transférase
GSTP1.....	glutathion S-transférase P1 (gène ou ARNm)
GSTP1-1.....	glutathion S-transférase P1-1 (protéine)
Hsp.....	Heat shock protein
IKK.....	IkB kinase
JNK.....	Jun N-terminal kinase
kb.....	kilobase
LAL.....	leucémie aiguë lymphoblastique
LAM.....	leucémie aiguë myéloblastique
LLC.....	leucémie lymphoïde chronique
LMC.....	leucémie myéloïde chronique
MAPK.....	mitogen activated protein kinase
MDR.....	résistance multidrogue
MKK.....	MAP kinase kinase
MOPS.....	acide 4-morpholino propane sulfonique
NAD.....	nicotinamide adénine dinucléotide
NF-κB.....	nuclear factor kappa B
NQO1.....	NAD(P)H:quinone oxidoreductase I
NIK.....	NF-κB inducing kinase
pb.....	paire de bases
PBS.....	phosphate buffered saline
PKA.....	protéine kinase A
PKC.....	protéine kinase C
QR.....	quinone réductase
SDS.....	dodecyl sulfate de sodium
SIE.....	Sis Inducible Enhancer

SRE.....	élément de réponse au sérum
SRF.....	facteur répondant au sérum
SSC.....	sodium chloride/sodium citrate
SVF.....	sérum de veau fœtal
tBHQ.....	<i>tert</i> -Butylhydroquinone
TE.....	tris-EDTA
TNF.....	tumor necrosis factor
TNFR.....	TNF receptor
TPA.....	12- <i>O</i> -tetradecanoyl
.....	phorbol-13-acetate
TSA.....	trichostatine A
TRAF.....	TNFR associated factor
TRE.....	élément de réponse au TPA
XRE.....	élément de réponse aux xénobiotiques





Table des illustrations

1-Figures

Figure 1: Représentation schématique des étapes de la cancérogenèse. Selon Surh (1999).....	3
Figure 2: Capacités acquises par les cellules cancéreuses. Selon Hanahan et Weinberg (2000).....	4
Figure 3: Représentation schématique du système glutathion.	8
Figure 4: Représentation schématique du promoteur du gène de la <i>GSTP1-1</i>	16
Figure 5: Régulation de l'expression des facteurs de transcription c-Jun et c-Fos.	24
Figure 6: Activation de gènes contrôlés par un ARE. Selon Ishii et al (2000).....	29
Figure 7: Voies de transduction activant un ARE.	30
Figure 8: Régulation de NF- κ B. Selon Haefner (2002)	31
Figure 9: Modèle de transcription de la <i>GSTP1-1</i> . Selon Moffat et al. (1996a).....	35
Figure 10: Implication des GST dans l'induction de l'apoptose.	43
Figure 11: Mécanisme d'action de la curcumine. Selon Li et Lin-Shia (2001).	51
Figure 12: La curcumine.	52
Figure 13: Le resvératrol.	54
Figure 14: Le β -lapachone.	56
Figure 15: Le trans-anéthole.	58
Figure 16: L'émodine.	60
Figure 17: La capsaïcine.	62
Figure 18: La sanguinarine.	64
Figure 19: La silymarine.	66
Figure 20: Représentation schématique des différentes étapes de construction des plasmides d'expression transfectés.....	85
Figure 21: Représentation schématique des plasmides utilisés.	86
Figure 22: Test de cytotoxicité. Cellules des lignées K562, Jurkat, U937 et Raji traitées au TPA 100 nM pendant 24 h.	102
Figure 23: Etude de l'ARNm par Northern blot. Cellules de la lignée K562 traitées au TPA (Cinétique et gamme de concentration).	104
Figure 24: Etude de l'ARNm par Northern blot. Cellules des lignées Jurkat, U937 et Raji traitées au TPA 100 nM pendant 0, 2, 4, 8 et 24h.	105
Figure 25: Etude des protéines par Western blot. Cellules des lignées K562, Jurkat, U937 et Raji traitées au TPA 100 nM pendant 0, 2, 4, 8 et 24h.	107
Figure 26: Etude de l'ARNm par Northern blot. Cellules des lignées K562, Jurkat et Raji traitées au chlorure de cadmium 5 μ M pendant 0, 4, 8 et 24h.	109
Figure 27: Etude de l'ARNm par Northern blot. Cellules de la lignée K562 traitées au plomb 10 nM pendant 0, 4, 8 et 24h.	111
Figure 28: Etude de l'ARNm par Northern blot. Cellules de la lignée K562 traitées à l'arsénite de sodium 10 μ M pendant 0, 4, 8 et 24h.	112
Figure 29: Cancer Cell Line profiling array hybridée avec l'ADNc de la <i>GSTP1-1</i>	115

Figure 30: Représentation numérique de l'array Cancer Cell Line profiling array.....	116
Figure 31: Etude du rôle des voies de signalisation par co-transfections. Cellules de la lignée K562 transfectées avec les vecteurs d'expression de la voie de signalisation mitogénique.	118
Figure 32: Etude de l'ARNm par Northern blot. Cellules de la lignée K562 traitées au SP600125 0, 30, 50 et 100 μ M pendant 24 h.	120
Figure 33: Etude du rôle de c-Jun et c-Fos par transfection. Cellules de la lignée K562 transfectées avec un vecteurs d'expression c-Jun ou c-Fos.....	121
Figure 34: Etude de l'ARNm par Northern blot. Cellules des lignées K562 et Jurkat traitées au TNF α pendant 8h	124
Figure 35: Caractérisation du site NF- κ B-like par gel retard. Cellules de la lignée K562 traitées au TNF α 20 ng/ml pendant 1h incubés en présence de sonde NF- κ B-like.	125
Figure 36: Logiciel de recherche d'éléments de fixation des facteurs de transcription.	127
Figure 37: Caractérisation du site NF- κ B distal par gel retard. Cellules des lignées K562 et U937 traitées au TNF α 20 ng/ml pendant 1h incubés en présence de sonde NF- κ B distale.....	128
Figure 38: Etude du rôle de NF- κ B par transfections. Cellules de la lignée K562 transfectées avec un plasmide rapporteur sous le contrôle de sites NF- κ B puis traitées avec du TNF α	130
Figure 39: Etude des voies de signalisation par co-transfections. Cellules de la lignée K562 transfectées avec les vecteurs d'expression de la voie de signalisation inflammatoire.....	132
Figure 40: Etude du rôle de NF- κ B par co-transfections. Cellules de la lignée K562 transfectées avec un plasmide rapporteur sous le contrôle du promoteur de la <i>GSTP1-1</i> contenant le site NF- κ B muté (pGST-Mut-NF κ B) ou non (p-396), co-transfecté ou non avec la sous-unité p65.....	133
Figure 41: Test de cytotoxicité. Cellules des lignées K562 et Jurkat traitées à la curcumine pendant 24h.	136
Figure 42: Etude de l'ARNm par Northern blot. Cellules de la lignée K562 traitées à la curcumine 0, 1, 5 et 10 μ M pendant 24 h.	138
Figure 43: Etude de l'ARNm par Northern blot. Cellules de la lignée Jurkat traitées à la curcumine 0, 0,5, 1 et 5 μ M pendant 24 h.	139
Figure 44: Etude des protéines par Western blot. Cellules des lignées K562 et Jurkat traitées à la curcumine pendant 24 h.	140
Figure 45: Etude de l'ARNm par Northern blot. Cellules des lignées K562 et Jurkat traitées au TNF α 0,5, 5, 10 et 20 ng/ml pendant 8h avec ou sans un prétraitement de 2h avec 10 μ M de curcumine.	141
Figure 46: Etude de l'effet de la curcumine par gel retard. Cellules de la lignée K562 traitées au TPA 100 nM pendant 2h avec ou sans prétraitement de 2h avec 0,5, 1, 5, 10 μ M de curcumine.	143
Figure 47: Etude de l'effet de la curcumine par gel retard. Cellules de la lignée K562 traitées au TNF α 0,5 ng/ml pendant 4h avec ou sans prétraitement de 2h avec 1, 5 ou 10 μ M de curcumine.....	144
Figure 48: Etude de l'effet de la curcumine par gel retard. Cellules de la lignée K562 traitées au TNF α 0,5 ng/ml pendant 4h avec ou sans prétraitement de 2h avec 5, 10 ou 20 μ M de curcumine.	145
Figure 49: Etude de l'effet de la curcumine par gel retard. Cellules de la lignée Jurkat traitées au TPA 100 nM ou au TNF α 20 ng/ml pendant 2h avec ou sans prétraitement de 2h avec 0,5, 1, 5, 10 μ M de curcumine.....	146
Figure 50: Mise en évidence de l'apoptose par Western blot. Cellules de la lignée K562 traitées à la curcumine 20 μ M.	148

Figure 51: Etude de l'effet de la curcumine par transfection. Cellules de la lignée K562 transfectées et traitées au TNF α 0,5 ng/ml, curcumine 10 μ M ou TNF α + Curcumine.....	149
Figure 52: Etude de l'effet du resvératrol par transfections. Cellules de la lignée K562 transfectées et pré-traitées avec 20, 50 ou 100 μ M de resvératrol, puis traitées ou non au TNF α 20 ng/ml.....	151
Figure 53: Etude de l'effet du resvératrol par gel retard. Cellules de la lignée K562 traitées au TPA 100 nM ou au TNF α 20 ng/ml pendant 2h avec ou sans prétraitement de 2h avec 5, 10, 20 μ M de resvératrol.....	152
Figure 54: Etude de l'effet d'agents chimiopréventifs par gel retard. Cellules de la lignée K562 traitées au TNF α 20 ng/ml pendant 1h avec ou sans prétraitement de 2h avec des substances chimiopréventives.....	154
Figure 55: Etude de l'effet d'agents chimiopréventifs par gel retard. Cellules de la lignée K562 traitées au TNF α 20 ng/ml pendant 1h avec ou sans prétraitement de 2h avec des substances chimiopréventives.....	155
Figure 56: Etude de l'effet d'agents chimiopréventifs par transfections. Cellules de la lignée K562 transfectées et traitées au TNF α 20 ng/ml pendant 1h avec ou sans prétraitement de 2h avec des substances chimiopréventives.....	156
Figure 57: Hybridation de microarray. Cellules de la lignée K562 traitées au TNF α avec ou sans pré-traitement à la curcumine.....	158
Figure 58: Hybridation de microarray. 25 premiers résultats significatifs.....	159
Figure 59: Comparaison de la structure des promoteurs des <i>GSTP1-1</i> humaine, de GSTP de rat et de GST Ya de rat.....	167

2- Tableaux

Tableau I : Classification des GST.....	10
Tableau II: Séquences de différents TRE et YRE.....	19
Tableau III: Séquences de différents ARE.....	19
Tableau IV: Lignées cellulaires utilisées pour l'étude de l'expression de la GSTP1-1 humaine.....	72
Tableau V: Dilutions des anticorps utilisés.....	80
Tableau VI: Séquence des oligonucléotides utilisés pour les expériences de retard sur gel.....	92
Tableau VII: Anticorps utilisés en supershifts (Santa Cruz Biotechnology).....	94
Tableau VIII: Activations de promoteurs par différents métaux lourds. Selon Tully et al. 2000.....	100
Tableau IX: Effet toxique du plomb sur les cellules de la lignée K562.....	110
Tableau X: Demi-vie de la <i>GSTP1-1</i>	114
Tableau XI: Effet des différents agents chimiopréventifs.....	153
Tableau XII: Effet du TPA sur la stabilité de différents ARNm.....	165

Sommaire



Introduction bibliographique	1
Partie I : Présentation et rôle de la glutathion S-transférase P1-1	7
1 - LE GLUTATHION	7
2 - LA GLUTATHION S-TRANSFÉRASE P1-1	9
2.1 - Classification.....	9
2.2 - Rôle de la GSTP1-1 dans la cancérogenèse.....	11
Partie II : Régulation et expression de la Glutathion S-transférase P1-1	15
1 - PROMOTEURS.....	15
1.1 - Promoteur de la GSTP1-1 humaine	15
1.2 - Promoteur de la GSTP de rat.....	20
1.3 - Promoteur de la GSTP de souris	21
2 - FACTEURS DE TRANSCRIPTION IMPLIQUÉS DANS LA RÉGULATION DE LA <i>GSTP1-1</i> HUMAINE	21
2.1 - Sp1.....	21
2.2 - AP-1	22
2.3 - NF- κ B.....	28
3 - VOIES DE TRANSDUCTION IMPLIQUÉES DANS LA RÉGULATION DE LA GSTP1-1.....	39
3.1 - Voies du stress impliquées dans la régulation de la GSTP1-1.....	39
3.2 - Implication de la GSTP1-1 dans l'apoptose	41
Partie III : Rôle des agents chimiopréventifs.....	44
1 - LA CURCUMINE.....	45
1.1 - Effet de la curcumine sur la cancérogenèse.....	45
1.2 - Effet de la curcumine sur l'apoptose.....	46
1.3 - Effet de la curcumine sur l'inflammation et l'oxydation	47
1.4 - Effet de la curcumine sur les facteurs de transcription NF- κ B et AP-1 et la transduction du signal.....	47
1.5 - Effet de la curcumine sur les mécanismes de détoxification cellulaire.....	49
2 - LE RESVÉRATROL	53
3 - LE BETA-LAPACHONE.....	55
4 - LE TRANS-ANÉTHOLE	57
5 - L'ÉMODINE	59
6 - LA CAPSAÏCINE	61
7 - LA SANGUINARINE.....	63
8 - LA SILYMARINE	65
Objectifs.....	67
Matériel et Méthodes.....	70
1 - Lignées cellulaires.....	71
1.1 - MATÉRIEL.....	71
1.2 - MÉTHODE	73
2 - Northern blot.....	73
2.1 - MATÉRIEL.....	73
2.1.1 - Hybridation	74
2.1.2 - Préparation des sondes	75
2.2 - MÉTHODE	75
2.2.1 - Préparation du gel.....	75
2.2.2 - Traitement des échantillons.....	75
2.2.3 - Transfert des ARN.....	76
2.2.4 - Hybridation	76

2.2.5 - Préparation des sondes	77
2.2.6 - Hybridation de macroarrays	77
3 - Stabilité des ARN.....	78
4 - Western blot.....	79
4.1 - MATÉRIEL.....	79
4.2 - MÉTHODE.....	81
5 - Cytotoxicité.....	82
5.1 - MATÉRIEL.....	82
5.2 - MÉTHODE.....	82
6 - Transfection des cellules	83
6.1 - MATÉRIEL.....	83
6.2 - MÉTHODE.....	85
6.2.1 - Construction des vecteurs d'expression.....	87
6.2.2 - Transfections.....	87
7 - Retard de migration sur gel	89
7.1 - MATÉRIEL.....	89
7.1.1 - Extraction des facteurs nucléaires.....	89
7.1.2 - Marquage des sondes.....	90
7.1.3 - Retard de migration sur gel	90
7.2 - MÉTHODE.....	91
7.2.1 - Extraction des facteurs nucléaires.....	91
7.2.2 - Marquage des sondes.....	91
7.2.3 - Retard de migration sur gel	93
8 - Microarray	95
8.1 - MATÉRIEL.....	95
8.2 - MÉTHODE.....	95
8.2.1 - Préparation des microarrays	95
8.2.2 - Préparation des échantillons.....	96
8.2.3 - Préhybridation.....	97
8.2.4 - Hybridation	97
8.2.5 - Lavages	97
8.2.6 - Lecture.....	97
9 - Statistiques	98
Résultats.....	99
Partie 1 : Voie de transduction du signal du stress et de la prolifération.....	100
1 - ÉTUDE DE L'EFFET DU TPA SUR L'EXPRESSION DE LA GSTP1-1.....	101
1.1 - Etude de la cytotoxicité du TPA	101
1.2 - Etude de l'effet du TPA sur l'expression de l'ARNm de la GSTP1-1	101
1.3 - Etude de l'effet du TPA sur l'expression de la protéine GSTP1-1	106
2 - ÉTUDE DE L'EFFET DES MÉTAUX LOURDS SUR L'EXPRESSION DE L'ARNM DE LA <i>GSTP1-1</i>	108
2.1 - Etude de l'effet du chlorure de cadmium sur l'expression de la <i>GSTP1-1</i>	108
2.2 - Etude de l'effet du plomb sur l'expression de la GSTP1-1	108
2.3 - Etude de l'effet de l'arsénite de sodium sur l'expression de la GSTP1-1.....	110
3 - ÉTUDE DE LA DEMI-VIE DE L'ARNM DE LA <i>GSTP1-1</i> DANS LES LIGNÉES K562 ET JURKAT.....	113
4 - ÉTUDE DE L'EFFET DE DIFFÉRENTS AGENTS CHIMIOTHÉRAPEUTIQUES SUR L'EXPRESSION DE LA GSTP1-1	114
5 - ÉTUDE DES VOIES DE TRANSDUCTION DU SIGNAL.....	117
Partie 2: Etude de la voie inflammatoire	123

1 - ETUDE DE L'EFFET DU TNF α SUR L'EXPRESSION DE L'ARNM DE LA <i>GSTP1-1</i>	123
2 - CARACTÉRISATION DU SITE NF- κ B SITUÉ EN -93 DU PROMOTEUR.....	123
3 - RECHERCHE DE NOUVEAUX SITES NF- κ B.....	126
4 - CARACTÉRISATION DU SITE NF- κ B DISTAL.....	126
5 - ETUDE DE LA TRANSACTIVATION DES SITES NF- κ B.....	129
6 - ETUDE DE LA VOIE DE TRANSDUCTION DU SIGNAL DE L'INFLAMMATION.....	131

Partie 3 : Etude de l'effet d'agents chimiopréventifs sur l'expression de la
 GSTP1-1 135

1 - EFFET DE LA CURCUMINE.....	135
1.1 - Effet cytotoxique de la curcumine.....	135
1.2 - Effet de la curcumine sur l'expression de l'ARNm de la <i>GSTP1-1</i>	137
1.3 - Effet de la curcumine sur l'expression de la protéine GSTP1-1.....	137
1.4 - Effet de la curcumine sur l'activation de l'expression de l'ARNm de la <i>GSTP1-1</i> par le TNF α	137
1.5 - Effet de la curcumine sur la fixation de AP-1 sur son site.....	142
1.6 - Effet de la curcumine sur la fixation de AP-1 induite par le TNF α	142
1.7 - Effet de la curcumine sur la fixation de NF- κ B induite par le TNF α	142
1.8 - Effet de la curcumine sur les marqueurs de l'apoptose.....	147
1.9 - Effet de la curcumine sur la transactivation d'un gène rapporteur.....	147
2 - EFFETS D'AUTRES AGENTS CHIMIOPRÉVENTIFS.....	150
2.1 - Effet du resvératrol.....	150
2.2 - Effet des autres agents chimiopréventifs.....	153
2.3 - Effet de la curcumine sur l'induction de cellules K562 par le TNF α	157

Discussion 161

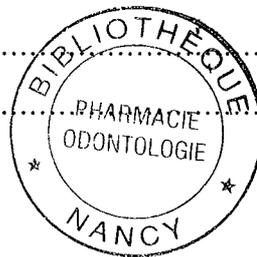
Conclusions et perspectives 180

 1. Conclusions 181

 2. Perspectives 183

Références bibliographiques..... 185

Publications issues de ce travail..... 216



INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

La cancérogenèse – la transformation de cellules saines en cellules cancéreuses – est généralement composée de 3 étapes majeures (Surh, Y., 1999) (figure 1):

- L'initiation, étape irréversible, pendant laquelle les cellules sont mises en contact avec un agent carcinogène qui endommage l'ADN de façon irréparable.

- La promotion, étape de prolifération cellulaire pendant laquelle les cellules endommagées vont se multiplier, formant ainsi une tumeur pré-maligne multi-cellulaire.

- La progression, étape irréversible pendant laquelle un nouveau clone cellulaire avec une capacité de prolifération et d'invasion augmentée ainsi qu'un potentiel métastatique se développe.

Une fois la tumeur établie, les cellules cancéreuses ont la possibilité d'envahir le système sanguin, ce qui leur permet d'atteindre d'autres organes et d'y établir des métastases, qui sont des tumeurs secondaires.

Les cancers présentent 6 caractéristiques communes essentielles (Hanahan et Weinberg, 2000) (figure 2):

- Autonomie de croissance : Contrairement aux cellules normales, les cellules transformées ne nécessitent pas de signal de croissance dû aux facteurs de croissance, à des éléments de la matrice extracellulaire ou aux interactions/adhésions cellule-cellule.

- Insensibilité aux signaux d'arrêt de prolifération : Les tissus cancéreux ne répondent pas aux signaux d'arrêt de la croissance nécessaires, dans les tissus sains, au maintien de l'homéostasie et de la quiescence cellulaire. Ces signaux peuvent provenir d'inhibiteurs de croissance solubles ou présents à la surface de cellules voisines.

- Évasion de l'apoptose : Le phénomène de mort cellulaire programmée – ou apoptose – est latent dans toutes les types cellulaires et les cellules cancéreuses présentent des mutations de gènes importants ou indispensables au bon déroulement de l'apoptose, favorisant la prolifération des cellules.

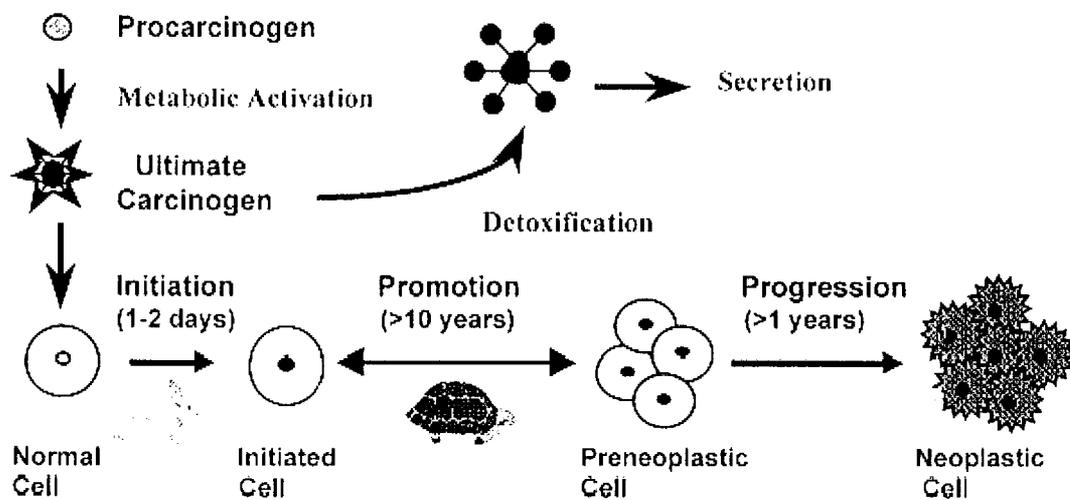


Figure 1: Représentation schématique des étapes de la cancerogénèse. Selon Surh (1999).

Un procarcinogène pénétrant dans la cellule est activé en carcinogène par les enzymes de phase I (cytochrome P450). Ainsi activé il endommage l'ADN de façon irréversible: c'est l'étape d'initiation. Les cellules endommagées se multiplient formant une tumeur pré-maligne: c'est l'étape de promotion. Un nouveau clone cellulaire malin apparaît et se développe: c'est l'étape de progression (Surh, Y., 1999).

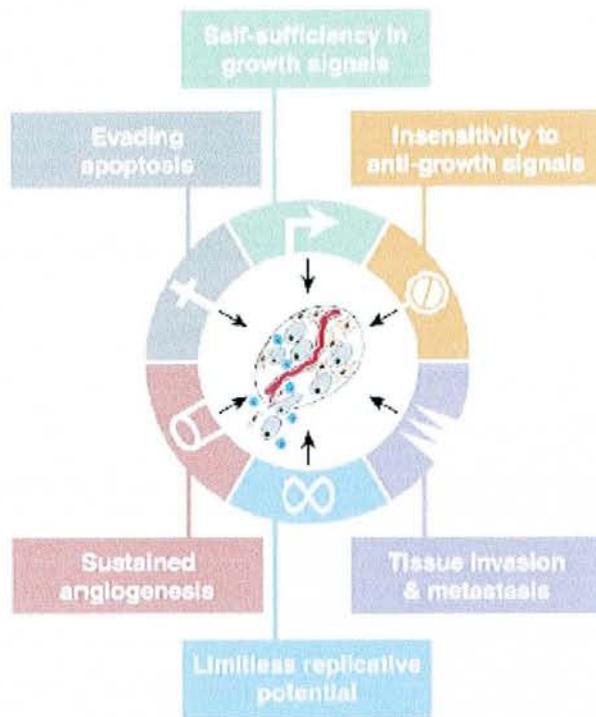


Figure 2: Capacités acquises par les cellules cancéreuses. Selon Hanahan et Weinberg (2000).

Les cellules transformées présentent 6 caractéristiques communes essentielles: l'autonomie de croissance, l'insensibilité aux signaux de croissance, l'évasion de l'apoptose, un potentiel répliatif illimité, un potentiel d'angiogénèse et un potentiel d'invasivité et de métastases (Hanahan et Weinberg, 2000).

- Potentiel répliatif illimité : Les 3 premières caractéristiques montrent que la croissance des cellules cancéreuses est indépendante des signaux de l'environnement et cela pourrait être suffisant pour conduire au développement de tumeurs macroscopiques s'il n'existait un phénomène de limitation de la croissance intrinsèque à la cellule et indépendant des relations cellule-cellule : la sénescence. Les cellules cancéreuses acquièrent l'immortalité au cours de leur transformation et perdent la capacité d'entrer en sénescence, permettant encore une fois la prolifération cellulaire.

- Potentiel d'angiogenèse : Pour permettre leur approvisionnement en oxygène et en nutriment, les cellules doivent se situer à environ 100 μm d'un capillaire. L'angiogenèse est donc un point essentiel du développement d'un organe et est finement régulée. Les cellules saines ne possèdent pas de potentiel angiogénique et les cellules tumorales acquièrent ce potentiel au cours du développement tumoral.

- Invasivité et métastase : Pendant le développement de la tumeur certaines cellules se détachent : c'est l'invasion, et colonisent d'autres tissus en formant des tumeurs secondaires: ce sont les métastases. La colonisation n'est possible que si la cellule possède les 5 caractéristiques précédemment citées mais les phénomènes mis en cause ne sont pas encore complètement compris.

Ces 6 caractéristiques semblent être acquises par les cellules cancéreuses au cours de leur transformation à cause de modifications génomiques dues à une grande instabilité et à une mutabilité accrue.

La majorité des cancers sont des carcinomes originaires des poumons, du colon ou de l'utérus. Ces cancers sont pour la plupart dus à un risque environnemental tel que les produits chimiques, les radiations ou les virus (Surh, Y., 1999).

L'élimination ou la diminution des contacts avec ces carcinogènes environnementaux peut permettre une prévention basique des cancers. De plus, les avancées dans la compréhension des mécanismes moléculaires de la cancérogenèse ont permis de développer de nouvelles stratégies de prévention : la chimioprévention.

Les cellules cancéreuses sont des cellules ayant perdu la faculté de contrôler leur croissance et leur division. Pour les éliminer, on utilise des agents cytostatiques (qui bloquent la croissance cellulaire) ou cytotoxiques (qui provoquent la mort cellulaire), naturels ou synthétiques. Malheureusement certaines cellules développent des résistances à ces médicaments par différents mécanismes :

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 (CYP) conduisant à une modification de la clairance du médicament.

L'activation des systèmes de réparations des lésions provoquées par les agents alkylants sur l'ADN.

L'augmentation des processus de détoxication, en particulier celui du système glutathion (GSH) impliquant les enzymes γ -glutamyltransférase (GGT), glutathion *S*-transférase (GST) et γ -glutamylcystéinyl synthétase (GCS).

Il nous a donc paru intéressant d'étudier le mode de fonctionnement du système glutathion et en particulier de l'enzyme de détoxication : la GST.

Partie I : Présentation et rôle de la glutathion S-transférase P1-1

1 - Le glutathion

Le GSH est un tripeptide (γ -glutamyl-cystéinyl-glycine) qui constitue le groupement thiol le plus important dans la cellule (1 à 5 mM).

Il est synthétisé par la GCS et la glutathion synthétase. Sa conjugaison par les GST, suivie de son élimination grâce à la pompe GS-X, permettent la détoxification des cellules de substances électrophiles, telles que la doxorubicine, le cisplatine, le chlorambucil, le cyclophosphamide, les chloroéthylnitrosourées ou le melphalan, composés utilisés dans les chimiothérapies (Schroder, *et al.*, 1996) (figure 3). Il peut aussi réguler le taux d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) grâce à son cycle redox au cours duquel il est oxydé en GSSG (forme oxydée du glutathion), puis réduit rapidement par la glutathion réductase qui maintient ainsi le rapport GSH:GSSG à 99 :1 (Tew, 1994).

En détoxifiant la cellule et en facilitant l'élimination de ces médicaments, le système du glutathion pourrait être à l'origine de certaines résistances.

Les enzymes intervenant dans ce système (GGT, GCS et GST) pourraient aussi tenir une place importante dans ces phénomènes. Il a en effet été montré que certaines résistances au chlorambucil étaient liées à un taux plus élevé de ces enzymes ainsi que du GSH dans des cellules de carcinome ovarien de hamster chinois (CHO ChI') (Lewis, *et al.*, 1988).

Pendyala *et al.* ont eux découverts qu'une déplétion en GSH augmente la sensibilité au cisplatine et à l'ipropilatine dans des cellules SK-MEL-2 (cellules de mélanome humain) (Pendyala, *et al.*, 1997).

En fait, le GSH serait lié à des résistances très diverses : mitomycine C, moutarde azotée L-phénylalanine, cyclophosphamide, chlorambucil, daunorubicine et cisplatine (Zhang, K., *et al.*, 1998).

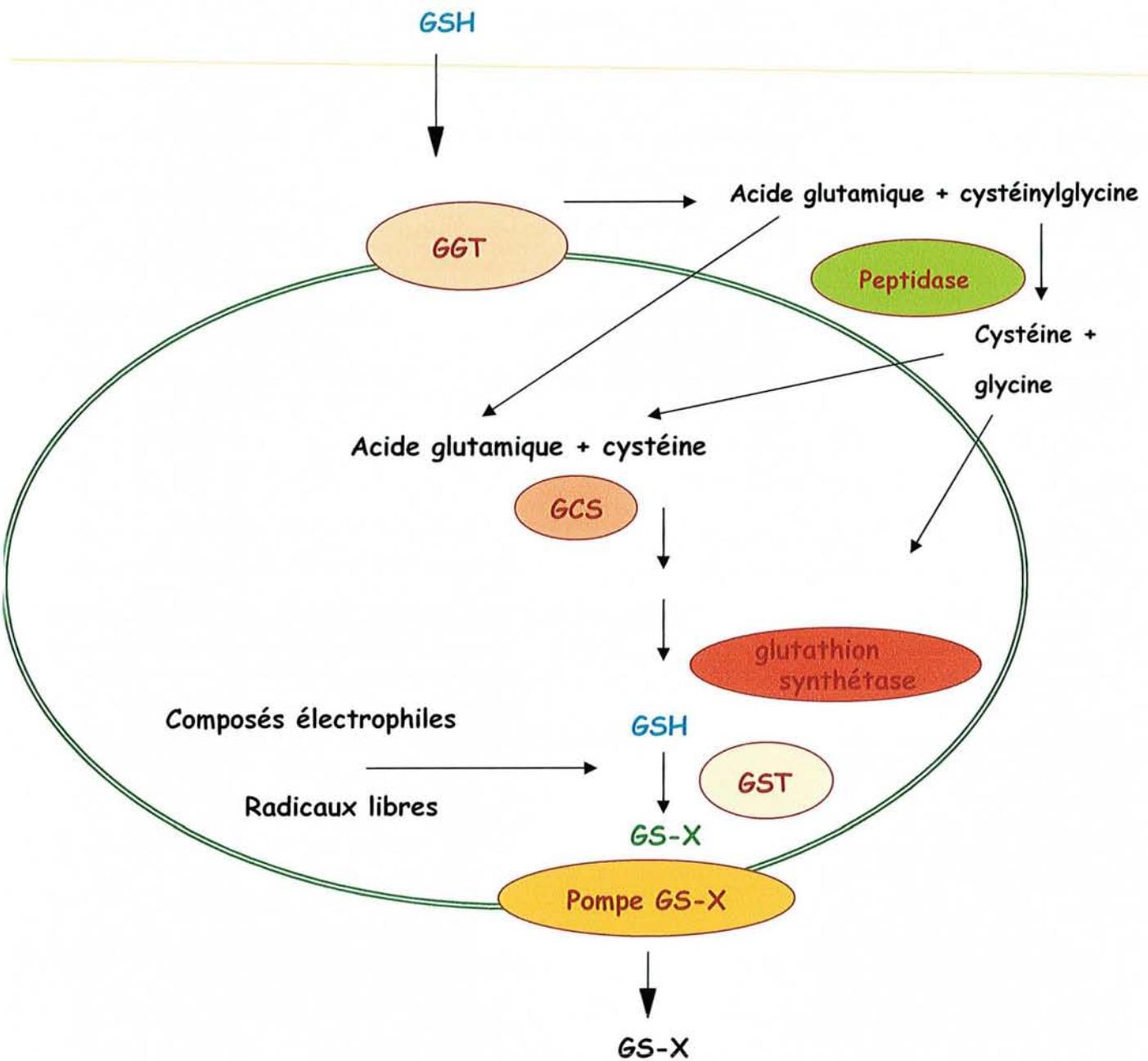


Figure 3: Représentation schématique du système glutathion.

Le glutathion (GSH) extracellulaire est dégradé en acide glutamique et cystéinylglycine par la g-glutamyl transférase (GGT). D'autres peptidases réduisent la cystéinylglycine en cystéine et glycine. Les différents acides aminés peuvent alors pénétrer dans la cellule. L'acide glutamique et la cystéine sont pris en charge par la glutathion glutamylcystéinyl synthétase (GCS). Le GSH sera produit grâce à la glutathion synthétase. Il sera conjugué à des composés électrophyles ou des radicaux libres par la glutathion S-transférase (GST) pour être ensuite expulsé de la cellule par la pompe GS-X.

2 - La glutathion S-transférase P1-1

2.1 - Classification

La glutathion S-transférase P1-1 (GSTP1-1, E.C. 2.5.1.18) est une protéine dimérique (homo ou hétérodimérique) avec des sous-unités de 23 à 28 kDa. Elle appartient à une grande famille d'isoenzymes fonctionnelles, les GST, qui conjuguent le GSH à des composés électrophiles ou radicaux libres. Ces composés ainsi conjugués seront alors expulsés de la cellule grâce à la pompe GS-X. Ces enzymes participent activement à la détoxification des cellules, les protégeant ainsi contre les agents mutagènes et toxiques.

La famille d'enzyme GST comprend plusieurs classes dont une classe microsomale. Ces différentes classes ont été déterminées selon leur structure et leur localisation (Tableau I). Les différentes classes découvertes jusqu'à maintenant sont : α , μ , π , θ , ω , ζ , e et microsomale. Elles sont aussi appelées, respectivement, classes A, M, P, T, O, Z, e et MGST. Il a aussi été découvert une classe mitochondriale : la classe κ .

Chaque classe est le produit d'un gène différent localisé sur un chromosome différent. Elles sont aussi exprimées de façon tissu spécifique. La GSTe n'est présente que dans les érythrocytes et ceux-ci n'expriment que cette GSTe. Les GST microsomales sont probablement des trimères et sont membranaires contrairement à toutes les autres classes qui sont des dimères cytoplasmiques. La GSTP1-1 (classe π), qui est présente sous forme de 3 variants A, B, C, est exprimée dans la plupart des tissus mais pas dans le foie adulte. Les GST ne présentent pas une grande spécificité de substrat et peuvent lier de nombreuses substances au glutathion. Elles sont abondantes et représentent jusqu'à 4 % des protéines solubles dans le foie (Eaton and Bammler, 1999).

Tableau I : Classification des GST.

ENZYME SOLUBLE, CYTOSOLIQUE, DIMERIQUE	LOCALISATION TISSULAIRE	CHROMOSOME	SUBSTRAT SPECIFIQUE	REFERENCE
Classe alpha				
GSTA1 (GST2), 25,6 kDa	Foie, rein, intestin grêle	6p12	Hydroperoxyde de 1-méthyl-1-phényléthyl	(Board et Webb, 1987)
GSTA2 (GST2), 26 kDa	Foie fœtal		Activité GSH peroxydase <i>Hydroperoxyde de cumène</i>	
GST A3	Placenta	?	?	
GST A4, 25,7 kDa	Intestin grêle, rate		<i>4-hydroxynonéal</i>	
Classe mu				
GSTM1 (GST1), 26,7 kDa	Foie, rein, estomac, faible dans squelette, muscle cardiaque	1p13.3	<i>Trans-stilbène oxyde</i>	(Campbell, et al., 1990, Gough, et al., 1994, Inskip, et al., 1995)
GSTM2 (GST4), 26 kDa	Muscles		Trans-4-phenyl-3-buten-2-one <i>Catécholamine quinones</i>	
GSTM3 Variants A, B (GST5), 26,3 kDa	Testicules, cortex cérébral		Bromosulfophthaléine, DCNB	
GSTM4, 26 kDa				
GSTM5, 26 kDa	Cerveau, poumons, testicules, faible dans cœur			(Pearson, et al., 1993, Takahashi, et al., 1993)
GSTMIL (mu-like)		3		(Islam, et al., 1989)
Classe pi				
GSTP1 Variants A, B, C GST3, 23 kDa	Système urinaire, digestif, respiratoire, sein, gros intestin, placenta, la plupart des tissus sauf foie adulte	11q13	Acide éthacrynique <i>Benzo(a)pyrène 7,8-dihydrodiol-9,10-époxyde</i>	(Ali-Osman, et al., 1997, Commandeur, et al., 1995, Laisney, et al., 1983, Terrier, et al., 1990)
Classe theta				
GSTT1, 27 kDa	Rein, foie, intestin grêle, cerveau, rate, prostate, pancréas, testicules, cœur, poumons	22q11.2	<i>Dichlorométhane 1,2-époxy-3-(p-nitrophenoxy)propane 1-menaphthyl sulfate</i>	(Pemble, S., et al., 1994)
GSTT2, 27 kDa	Foie			
Classe c				
GSTc	Érythrocytes			(Laisney, et al., 1984)
Classe omega				
GSTO1	Foie, muscles squelettiques, cœur, faible dans cerveau, placenta, poumon	10	Activité thiol transférase	(Board, et al., 2000)
Classe kappa				
GSTK1 (GST13-13)	Mitochondriale			(Pemble, S. E., et al., 1996)
Classe zeta				
GSTZ1, 24,2 kDa		14q24.3	Acide dichloroacétique	(Board, et al., 1997)
ENZYME MEMBRANAIRE, MICROSOMALE, TRIMERIQUE?				
MGST1	foie	12		
MGST2	≠ tissus, faible ou nul dans poumon, cerveau, placenta, moelle osseuse	4		

2.2 - Rôle de la GSTP1-1 dans la cancérogenèse

La GSTP1-1 a souvent été associée à la cancérogenèse et à la résistance à certains anti-cancéreux. En effet, l'expression de la GSTP1-1 est souvent augmentée au cours de la cancérogenèse dans les tumeurs solides comme dans les leucémies. De plus, la résistance des cellules transformées à certains agents anti-cancéreux semble être corrélée à une sur-expression de l'expression de la GSTP1-1.

2.2.1 - Expression de la Glutathion S-Transférase P1-1 dans les tumeurs solides

Dans certaines tumeurs solides, l'expression de la GSTP1-1 est augmentée, pouvant ainsi servir de marqueur. En effet, le taux de GSTP1-1 est plus élevé dans les tumeurs gastro-intestinales que dans les tissus environnants (Mohammadzadeh, *et al.*, 2003). Le taux de GST plasmatique des ces patients est aussi plus élevé que chez les personnes saines. De plus, il a été montré que le fait qu'une tumeur exprime ou non la GSTP1-1 pouvait influencer la survie et l'apparition de nouvelles tumeurs après la chimiothérapie (Huang, J., *et al.*, 2003). Nakajima *et al.* ont montré que la GSTP1-1 est sur-exprimée dans tous les cholangiocarcinomes soumis à des examens immunohistologiques (Nakajima, *et al.*, 2003). Dans le cas des cancers de la prostate, il est connu que la GSTP1-1 est exprimée abondamment alors que les cellules saines du même organe ne l'expriment que rarement (Jung, *et al.*, 1997). La sur-expression de la GSTP1-1 dans ces tumeurs apparaît lors de la progression du cancer vers un état indépendant des hormones (Li, M., *et al.*, 2003). On peut aussi corréliser l'expression de la GSTP1-1 et un taux de fer élevé avec une transformation des cellules naso-pharyngées. Ceci représente aussi un bon pronostic pour l'apparition de métastases lymphatiques (Jayasurya, *et al.*, 2002). Le polymorphisme de la GSTP1-1 (Ile(105)Val) est aussi important dans le pronostic de la survie : le génotype homozygote (105)Val/(105)Val est associé à une survie accrue des patients avec un cancer colorectal avancé traité par une association chimiothérapeutique 5-Fluorouracil (5-FU)/oxaliplatine (Stoehlmacher, *et al.*, 2002).

Nous notons aussi l'augmentation de son expression dans différents carcinomes (Cookson, *et al.*, 1997, Inoue, T., *et al.*, 1995). D'autres ont aussi découvert une relation potentielle entre l'expression de la GSTP1-1 et l'agressivité de certains sarcomes des tissus

mous (Toffoli, *et al.*, 1992), ou un lien avec le pronostic d'adénocarcinomes gastriques (Monden, *et al.*, 1997).

Cependant, les cellules œsophagiennes atteintes de la maladie de Barrett présentent une expression de GSTP1-1 diminuée par rapport aux cellules saines, et l'incidence de tumeurs est inversement proportionnelle à l'expression de l'ARNm de la *GSTP1-1* (Brabender, *et al.*, 2002). De plus, la GSTP1-1 est exprimée encore plus faiblement dans les adénocarcinomes associés à cette maladie. La disparition d'activité GSTP1-1 semble être un événement précoce dans le développement de l'adénocarcinome et peut ainsi servir de marqueur.

La sur-expression de la GSTP1-1 semble donc être un bon marqueur pour le diagnostic et le pronostic de la plupart des cancers même si les maladies comme Barrett semblent être des exceptions.

2.2.2 - Expression de la Glutathion S-Transférase P1-1 dans les leucémies

Dans certains cancers comme les lymphomes de cellules B, un mauvais pronostic est associé à une augmentation de l'expression de la GSTP1-1 (Ribrag, *et al.*, 2003). En effet, les patients dont les cellules transformées présentent une sur-expression de la GSTP1-1 ont moins de chance d'avoir une rémission complète, 5 ans sans progression de la maladie ou 5 ans sans rechute sans que cela soit corrélé à d'autres marqueurs de pronostic comme l'activité sérique de la lactate deshydrogénase ou l'âge. On peut aussi noter que l'expression de la GSTP1-1 est augmentée dans les leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) (Sauerbrey, *et al.*, 1994) et les leucémies lymphoïdes chroniques (LLC) (Schisselbauer, *et al.*, 1990).

Le polymorphisme des GSTP1-1 est aussi impliqué dans la susceptibilité des enfants aux LAL (Krajinovic, *et al.*, 2002). Ainsi, la présence du variant B accroît le risque de LAL alors que le variant C est sous-représenté dans les cas d'enfants malades. Ceci pourrait être dû aux différences de substrat des différents variants. La combinaison du variant GSTP1*B avec le génotype nul pour la GSTM1 accroît d'autant plus le risque de LAL. Au contraire, la présence de l'isoforme GSTM3 chez les enfants atteints de LAL est corrélée à un mauvais pronostic de la maladie (Kearns, *et al.*, 2003). Dans le cas des LLC, le polymorphisme des GST est lui aussi très important et un risque 3 fois plus élevé de LLC est associé à la présence des 3 génotypes de " haut risque " : Le génotype nul pour la GSTM1 ou GSTT1 ainsi que l'allèle 105(Ile) pour la GSTP1-1 (Yuille, *et al.*, 2002). Par contre, les génotypes nuls pour GSTM1 et GSTT1 n'accroissent pas le risque de leucémies aiguës myéloïdes (LAM) induites

par la chimiothérapie, alors que l'allèle 105(Val) de la GSTP1-1 est sur-représenté dans ces leucémies par rapport aux cas *de novo* (Allan, *et al.*, 2001). L'utilisation de substrats de la GSTP1-1 comme agents chimiothérapeutiques augmente encore la représentation de cet allèle qui accroît donc le risque des patients à avoir une leucémie induite par la chimiothérapie. Dans le cas des LAM *de novo*, le génotype GSTT1 nul est encore une fois signe de mauvais pronostic pour la survie des patients, ceci pouvant être dû à une toxicité accrue après chimiothérapie (Naoe, *et al.*, 2002).

Les GST, et particulièrement la GSTP1-1, sont donc de bons marqueurs de pronostics des différentes leucémies.

2.2.3 - Implication de la Glutathion S-Transférase P1-1 dans les mécanismes de résistance aux anti-cancéreux

La GSTP1-1 a surtout été associée à la résistance à certains anticancéreux. Nakajima *et al.* montrent que la transfection d'un vecteur exprimant un ARN antisens de la *GSTP1-1* ou l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de la GSTP1-1 C16C2 accroît la sensibilité des cellules à l'adriamycine, le cisplatine ou les agents alkylants (Nakajima *et al.*, 2003). L'utilisation du C16C2 en combinaison avec d'autres agents chimiothérapeutiques comme l'adriamycine ou le cyclophosphamide intensifie sensiblement leur effet anti-tumeur. Cet effet protecteur de la GSTP1-1 varie suivant le variant GSTP1-1 et l'agent anti-cancéreux même si tous les allèles possèdent un effet protecteur (Ishimoto and Ali-Osman, 2002).

Morrow *et al.* ont montré que l'augmentation de l'expression de la GSTP1-1 dans des cellules dérivées d'un carcinome de sein (MCF-7) est liée à une résistance à l'acide éthacrynique (Morrow, *et al.*, 1998). Masanek *et al.* ont montré que des lignées cellulaires présentant des résistances à la doxorubicine ou au taxol ont une activité GSTP1-1 augmentée (Masanek, *et al.*, 1997), alors que Puchalski et Fahl découvrent une résistance à la doxorubicine dans des cellules COS transfectées par un gène de *GSTP1-1* (Puchalski and Fahl, 1990). Par ailleurs, les cellules MCF-7 développent une résistance à l'acide éthacrynique, au benzopyrène et à la doxorubicine quand elles sont transfectées avec la *GSTP1-1* (Moscow, *et al.*, 1989). Enfin la transfection de plasmides portant le gène de la *GSTP1-1* dans des cellules CHO apporte une augmentation de la résistance au cisplatine et carboplatine (Miyazaki, *et al.*, 1990).

Si l'augmentation de l'expression de la GSTP1-1 permet de détoxifier plus efficacement les cellules et ainsi de les débarrasser des agents anti-cancéreux, la résistance des cellules semble mettre en jeu un autre mécanisme dans le cas d'une résistance à la doxorubicine: la translocation de la GSTP1-1 dans le noyau des cellules par un système de transport spécifique (Goto, *et al.*, 2001). La présence de l'enzyme dans le noyau permet de protéger l'ADN contre les dommages dus aux agents anti-cancéreux. Le même mécanisme est mis en jeu lors du traitement des cellules HCT8, A549 et T98G par les anti-cancéreux cisplatine, irinotecan hydrochloride, étoposide et 5-FU (Goto, *et al.*, 2002). L'utilisation d'un inhibiteur spécifique du transport nucléaire, une lectine extraite d'un champignon, augmente la sensibilité de ces cellules à la doxorubicine et au cisplatine et partiellement à l'hydrochloride de irinotecan. La sensibilité à l'étoposide et au 5-FU n'est pas modifiée.

La GSTP1-1 a aussi été associée à une résistance à l'apoptose (Huang, J., *et al.*, 2003). Les cellules de tumeurs de sein expriment en majorité la GSTP1-1 et présentent alors une apoptose diminuée. La GSTP1-1 est à nouveau retrouvée dans le noyau des cellules cancéreuses.

La GSTP1-1 est donc très impliquée dans le développement de la résistance et une chimiothérapie associée à un inhibiteur de cette enzyme serait peut-être une bonne stratégie de traitement.

Partie II : Régulation et expression de la Glutathion S-transférase P1-1

1 - Promoteurs

Le gène codant la GSTP1-1 est situé sur le chromosome 11 en q13. Il a une longueur de 2,8 kb et possède 7 exons et 6 introns.

1.1 - Promoteur de la GSTP1-1 humaine

1.1.1 - Éléments de régulation présents sur le promoteur de la GSTP1-1

Plusieurs éléments potentiellement régulateurs ont été identifiés dans le promoteur de *GSTP1-1* (figure 4) (Morrow, *et al.*, 1992) : Une TATA box située 29 pb en amont du point de départ de la transcription ; deux sites Sp1, un site AP-1, un site NF- κ B-like en amont du site AP-1 ainsi qu'une répétition du motifs ATAAA en 5' du promoteur basal.

Morrow *et al.* exposent que la séquence située entre -80 et -8, contenant les sites Sp-1 et AP-1, est absolument nécessaire à la transcription de ce gène. De plus la région située entre -73 et +8 semble être indispensable à sa répression par l'acide rétinoïque (Xia, C., *et al.*, 1996). En fait le site AP-1 est essentiel à l'activité promotrice (Moffat, *et al.*, 1994). Le site Sp-1 proximal est lui aussi essentiel, alors que le site distal n'est pas nécessaire à la transcription (Jhaveri and Morrow, 1998).

Le promoteur de la *GSTP1-1* a été décrit comme contenant de multiples copies du site ARE (Antioxidant Response Element) sans que des inducteurs typiques d'ARE puissent induire l'expression de la GSTP1-1 dans les kératinocytes HaCat (Zhang, Y., *et al.*, 2002). De même, le site NF- κ B proximal a été décrit comme un élément potentiellement supresseur de l'ARE (Moffat, *et al.*, 1996a, Xia, C., *et al.*, 1996) sans que cela puisse être confirmé dans ces cellules.

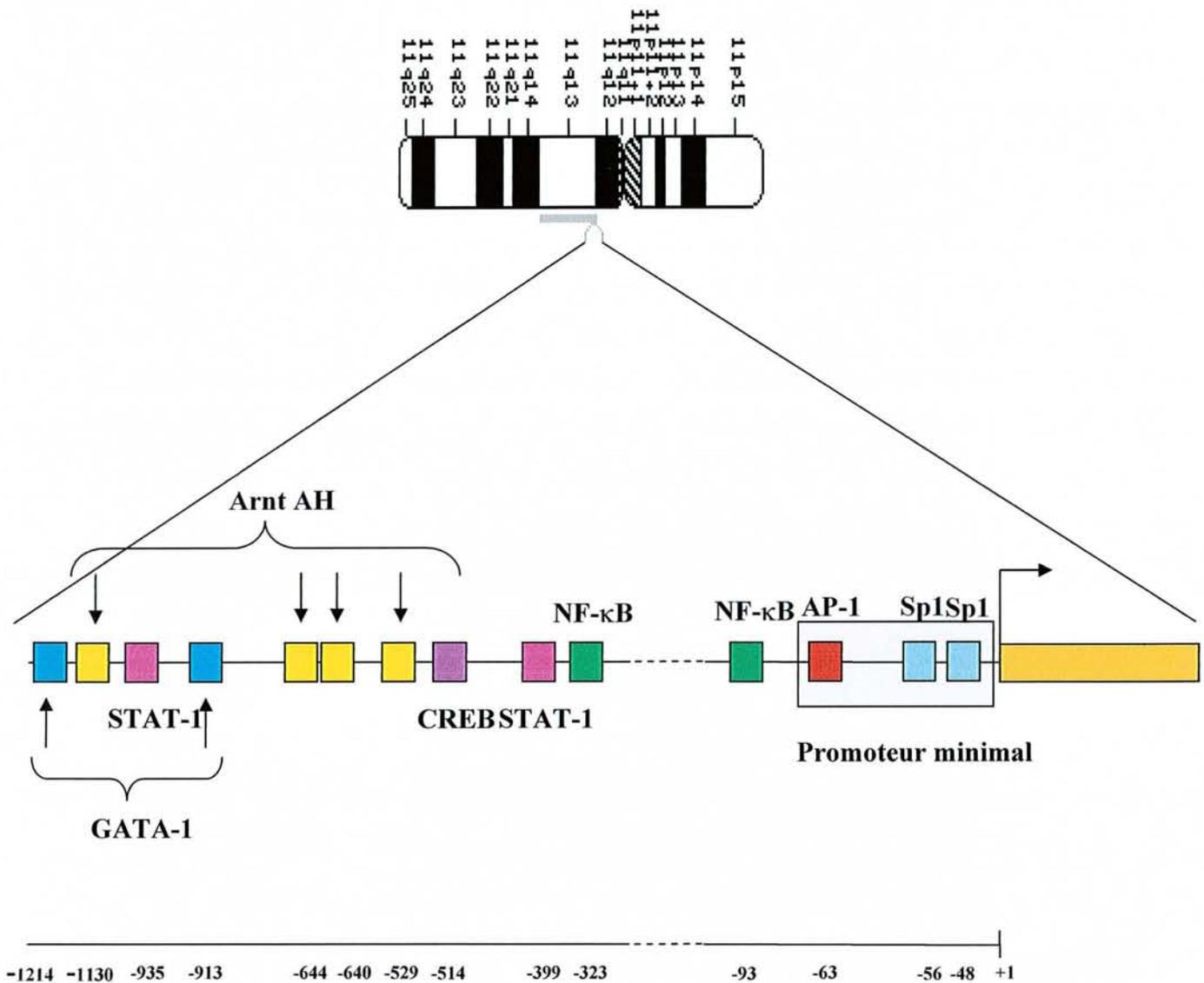


Figure 4: Représentation schématique du promoteur du gène de la *GSTP1-1*.

Le gène est situé sur la partie q13 du chromosome 11. Il présente un promoteur minimal contenant 2 sites Sp1 et un site AP-1. Un site NF-κB potentiel est situé en amont. D'autres sites potentiels ont pu être découverts grâce au logiciel MatInspector (Heinemeyer, *et al.*, 1998).

Un ARE est, par définition, un site répondant à un traitement aux antioxydants et aux xénobiotiques tels que le TPA, la β -naphthoflavone ou le tBHQ. Par contre sa séquence n'a jamais été clairement définie (tableau III).

Plusieurs groupes (Huang, H. C., *et al.*, 2000, Nguyen, *et al.*, 2000, Yu, *et al.*, 2000a) décrivent l'ARE comme une séquence TRE-like ou contenant un site TRE-like. D'un autre côté, Wang et Williamson, considèrent l'ARE comme une séquence non consensus contenant une séquence principale (Wang, B. et Williamson, 1994). Sur le même modèle, Wasserman et Fahl ajoutent que l'ARE contient aussi des nucléotides adjacents conservés essentiels (Wasserman et Fahl, 1997). Une autre hypothèse, utilisée par Dhakshinamoorthy *et al.* et Xie *et al.* considère l'ARE comme constitué de plusieurs TRE ou TRE-like en répétitions inverses ou directes (Dhakshinamoorthy et Jaiswal, 2000, Xie, *et al.*, 1995).

Enfin Favreau et Pickett ont décrit l'ARE comme étant composé de 2 demi-sites inverses séparés par un "spacer" (Favreau et Pickett, 1997). Ces définitions décrivent donc de façon différente chacun des ARE. Ainsi on peut trouver un même promoteur contenant un ARE décrit différemment et ayant des séquences importantes et nécessaires différentes.

Un TRE (élément de réponse au TPA) est un site répondant au TPA (2-O-Tetradecanoylphorbol 13-acetate). Ce site correspond à une séquence consensus : **TGAG/CTCA**, fixant les facteurs de transcription de la famille AP-1 (tableau II). Chez les levures, un site similaire a été découvert, c'est le site YRE. Il a une séquence consensus (**TT/GAC/GTAA**) reconnue par le facteur YAP-1p, découvert par sa capacité à se fixer sur un TRE humain. La séquence constituant le site forme le plus souvent 2 demi-sites palindromiques permettant ainsi au facteur de transcription de se fixer sur les 2 brins. La fixation du facteur YAP-1p sur le TRE est due à la ressemblance des 2 sites (Nguyên, *et al.*, 2000).

La séquence ATAAA répétée entre 19 et 24 fois est située entre -410 et -507 du promoteur de la *GSTP1-1*. Le polymorphisme de cette séquence n'entre pas en jeu dans l'incidence des cancers de la prostate (Platz, *et al.*, 2002) bien qu'elle puisse servir de "barrière" à la méthylation (Millar, *et al.*, 2000). En effet, les cellules normales de prostate présentent un promoteur de la *GSTP1-1* hyperméthylé en amont de cette séquence alors qu'il est hypométhylé en aval de la séquence. Lors de la transformation des cellules prostatiques,

elles perdent leur capacité à exprimer la GSTP1-1 et le promoteur du gène codant pour cette enzyme est entièrement hyperméthylé.

1.1.2 - Mécanismes épigénétiques impliqués dans la régulation de l'expression de la Glutathion S-transférase P1-1

La conformation de la chromatine entre en jeu dans la régulation de l'expression des gènes. En particulier, la méthylation que nous venons de citer et l'acétylation du promoteur peuvent influencer sur l'induction ou l'inhibition de certains gènes.

Lors de la transformation des cellules hépatiques, on observe une perte de l'expression de la GSTP1-1, due au moins en partie à une méthylation du promoteur du gène de la *GSTP1-1* (Singal, *et al.*, 2001). Cet effet est aussi observé dans les cellules de cancer de la prostate MDA Pca 2a et 2b et un traitement avec un inhibiteur des méthyltransférases, le 5-azacytidine, restaure l'activité GSTP1-1 (Vidanes, *et al.*, 2002). Par contre l'utilisation d'un inhibiteur d'histone déacétylase, la trichostatine A (TSA), n'a pas d'effet sur l'expression de la GSTP1-1. Les cellules Hep3B, un carcinome hépatique, ne possèdent pas non plus d'activité GSTP1-1. Cette déplétion est causée par l'hyperméthylation du promoteur de ce gène et son expression est rétablie par le 5-azadeoxycytidine et pas par la TSA (Bakker, *et al.*, 2002). Les cellules exprimant la GSTP1-1 présentent au moins un allèle largement déméthylé et Sp-1 est détecté sur le promoteur. Par contre, dans les cellules n'exprimant pas la GSTP1-1, Sp-1 n'est pas fixé sur le promoteur et MBD2 (Methyl-CpG binding domain) est présent. MBD2 semble être impliqué dans l'hyperméthylation du promoteur de la *GSTP1-1* lors de la transformation des cellules. Ce phénomène n'est pas associé à une expression augmentée des méthyl transférases, une disparition des sites Sp-1 ou de la région "barrière" à la méthylation ou une inhibition antérieure de l'expression du gène (Song, *et al.*, 2002). En fait, il s'agit d'une combinaison entre une inhibition antérieure de l'expression du gène et une méthylation au hasard de régions du promoteur, ce qui permet de déclencher l'hyperméthylation. La procaïnamide, un inhibiteur non-nucléotidique des méthyl transférases, permet d'obtenir une restauration de l'activité GSTP1-1 dans les cellules de cancer de prostate sans pour autant avoir les effets secondaires du 5-azacytidine (Lin, X., *et al.*, 2001). Dans le cas des leucémies, il a été montré que les cellules Raji, qui n'expriment pas la GSTP1-1, affichent un promoteur hyperméthylé alors que les allèles existent sous la forme méthylée et non-méthylée dans les cellules de la lignée leucémique K562, qui expriment fortement la GSTP1-1 (Borde-Chiche, *et al.*, 2001b).

Tableau II: Séquences de différents TRE et YRE

Gène	Espèce	Séquence 5' - 3'	Référence
Séquence consensus, collagénase		CGCTTGATGAGTCAGCCGGAA	Promega
PAI-1		TGAGTTCA	(Olman, <i>et al.</i> , 1999)
IL-8		GTGATGACTCAGGTT	(Mori, <i>et al.</i> , 2000)
Métallothionéine	Humain	GTGACTCAGCGCG	
NQO1	Humain	GATGAGTCAGCC	(Xie, <i>et al.</i> , 1995)
Smad 7	Souris	GGCCACGTGACGAGG	(Brodin, <i>et al.</i> , 2000)
FLR1 -consensus		TT/GAC/GTAA	
FLR1-YRE1	Levure	TTAGTCA	(Nguyên, <i>et al.</i> , 2000)
FLR1-YRE2		TGACTAA	
FLR1-YRE3		TTACTAA	

Tableau III: Séquences de différents ARE

Gène	Espèce	Séquence 5' - 3'	Structure	Référence
NQO1	Humain	CAGTCACAGTGAAGTACAGCAGAATCT	TRE/TRE like (rép. inverses ou directes)	(Dhakshinamoorthy and Jaiswal, 2000)
NQO1	Humain	AAATCGCAGTACAGTGAAGTACAGCAGAATCTG AGCCTAGGGCACC	1 ou plusieurs TRE/TRE like (directs et inverses) et 1 GC box.	(Xie, <i>et al.</i> , 1995)
NQO1	Humain	TCACAGTGAAGTACAGCAGAATC	Séquence principale	(Wang, B. and Williamson, 1994)
GST Ya		TAGCTTGGAAATGACATTGCTAATGGTGACAAA GCAACTTT	Séquence principale et nucléotides essentiels	(Wasserman and Fahl, 1997)
QR		TCAGAGATTTTCACTAGAGTACAGTGAAGTGG GCAAAATC		
Ferritine L		GAGCTCAGCGTGAAGTACAGCAGAATC		
GSTP1-1		TCGATAGTCACTACTATGATTCAGCAATAAA		
GST Mu		CAGCTTCGGTGACATAGCCTCCAT		
γ-GCS		AATATGTGTTGACAGCAATGACCTGTC		
Consensus		T MANNRTGA YNNNG CR WWWW (M=A/C, R=A/G, Y=C/T, W=A/T)		
GST Ya	Rat	GAGCTTGGAAATGGCATTGCTAATGGTGACAAA GCAACTTTG	TRE/TRE like (rép. inverses ou directes)	(Dhakshinamoorthy and Jaiswal, 2000)
QR	Rat	TCTAGAGTCACTAGAGTGAAGTGGCAAAATCTGA	Séquence TRE like	(Huang, H. C., <i>et al.</i> , 2000)
NQO1	Rat	AGTCTAGAGTCACTAGAGTGAAGTGGCAAAATCTG AGCCGGTCCCTCA	1 ou plusieurs TRE/TRE like (directs et inverses) et 1 GC box.	(Xie, <i>et al.</i> , 1995)
GSTP	Rat	CAAAAAGTAGTCACTACTATGATTCAGCAACA AACCC		
GST Ya	Rat	GAGCTTGGAAATGGCATTGCTAATGGTGACAAA AGCAACTTT		
QR	Rat	GATTTCACTAGAGTCACTAGAGTGAAGTGGCAAA ATCTGAGCCG	Séquence TRE like	(Nguyen, <i>et al.</i> , 2000)
QR	Rat	TCTAGAGTCACTAGAGTGAAGTGGCA	2 demi sites (rép. inverse) + spacer	(Favreau and Pickett, 1997)
GST Ya	Rat	GAGCTTGGAAATGGCATTGCTAATGGTGACAAA GCAACTTT	Séquence TRE like	(Nguyen, <i>et al.</i> , 2000)
GST Ya	Souris	TAGCTTGGAAATGACATTGCTAATGGTGACAAA AGCAACTTT	1 ou plusieurs TRE/TRE like (directs et inverses) et 1 GC box.	(Xie, <i>et al.</i> , 1995)

1.2 - Promoteur de la GSTP de rat

Plusieurs éléments régulateurs du gène codant la GSTP de rat (rGSTP) ont été décrits. Sa régulation diffère de celle de la *GSTP1-1* humaine. En effet, si les 2 enzymes ne sont pas exprimées dans le foie, l'expression de la rGSTP sera augmentée lors de l'hépatocarcinogénèse (Kitahara, *et al.*, 1984). Le promoteur de la *rGSTP* présente 2 activateurs, GPEI et GPEII, un répresseur, GPS1, une boîte G/C et un site TRE (Sakai, *et al.*, 1988).

GPEI est un activateur fort composé de 2 sites TRE non-consensus qui dirigent l'expression de la GSTP. Chaque site seul est inactif, mais active de façon synergique l'expression de la rGSTP. Leur activité est dépendante de leur orientation (Okuda, *et al.*, 1990) et les 19 nucléotides situées en amont sont essentiels pour l'activité maximale de cet activateur (Okuda, *et al.*, 1989). L'activité basale de ce promoteur n'est pas due à la fixation de AP-1 même s'il est possible que ce facteur puisse se fixer sur le site TRE proximal (Diccianni, *et al.*, 1992, Sakai, *et al.*, 1992). D'autres facteurs encore inconnus peuvent se fixer sur le GPEI. Certains de ces facteurs sont présents dans le foie normal mais absents des hépatocarcinomes, ce qui pourrait expliquer l'expression différentielle de la GSTP (Liu, D., *et al.*, 2002). Le facteur de transcription ANT (adénine nucléotide translocator) peut se fixer sur l'activateur GPEI et pourrait jouer un rôle important dans l'induction de l'expression de la GSTP (Liao, *et al.*, 2002).

GPEII est un activateur faible composé de 2 activateurs de SV40 et un de polyoma. Il est divisé en 2 fragments plus petits GPEII-I et GPEII-2. Un activateur faible a été découvert dans la région de GPEII-I. GPEII peut être activé par H₂O₂ sans que NF-κB, qui peut se fixer à cet activateur, ne soit impliqué (Liu, D., *et al.*, 2001).

Le site TRE, situé près du site d'initiation de la transcription, pourrait faire partie du système de régulation et sa délétion diminue fortement l'expression de la rGSTP (Suzuki, *et al.*, 1995).

Le répresseur GPS1 est dépendant de son orientation et de sa position (Imagawa, *et al.*, 1991). Il peut fixer plusieurs facteurs répresseurs SF-A, -B, -C. SF-B fait partie de la famille des CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP). Dans les cellules de foie normales, C/EBPα se fixe au répresseur alors que dans les carcinomes, le ratio C/EBPα / C/EBPβ diminue et C/EBPβ se fixe au répresseur, induisant ainsi l'expression de la rGSTP (Osada, *et al.*, 1995). SF-A fait partie de la famille des Facteurs Nucléaires NF-1 et participe à la répression de la GSTP de rat (Osada, *et al.*, 1997).

Une autre GST de rat, la GSTA2, présente une régulation différente de la *GSTP*. Elle est induite par les glucocorticoïdes à haute concentration et les prégnanes qui fonctionnent grâce à des récepteurs intra-nucléaires. Le récepteur des prégnanes interagit avec des facteurs se fixant à l'ARE, situé entre -700 et -683, pour induire l'expression de la GSTA2 (Falkner, *et al.*, 2001). L'expression de cette enzyme est inhibée par l'interleukine 6 et la dexaméthasone qui activent des facteurs de transcription se fixant sur un site Hepatocyte Nuclear Factor 1 (HNF1) et plus principalement une séquence core TGATT (Voss, *et al.*, 2002). Le promoteur de ce gène contient aussi un site de réponse aux xénobiotiques (XRE) (Lamb et Franklin, 2002) et un site C/EBP sur lequel se fixe C/EBP β (Kang, *et al.*, 2003).

1.3 - Promoteur de la GSTP de souris

La GSTP de souris est majoritaire dans le foie d'animaux mâles et est régulée par les androgènes.

Le promoteur de la *GSTP* de souris présente 3 sites Nrf2 situés en -59, -915 et -937. Le cinquième intron du gène codant la GSTP de souris comporte une région répondant aux androgènes et de multiples sites du récepteur aux androgènes sont situés en cluster à 500 pb de cette région. Il y a au moins 7 sites qui constituent un activateur fort sans que de petits fragments contenant 2 ou 3 de ces sites ne soient des activateurs forts. Il existe une synergie entre ces sites multiples et la fixation de Nrf2 et du récepteur aux androgènes dans l'induction de l'expression de la GSTP de souris (Ikeda, *et al.*, 2002).

2 - Facteurs de transcription impliqués dans la régulation de la *GSTP1-1* humaine

2.1 - Sp1

Sp1 est un facteur de transcription ubiquitaire qui se lie à la séquence consensus 5'-(G/A)(G/A)GGCC(G/T)(G/A)(G/A)(G/T)-3' (ici 5'-GGGGCGGGG-3'). C'est un motif en triple doigt de zinc qui reconnaît cette séquence de 9 pb (chaque triplet reconnu par un doigt de zinc) (Kadonaga, *et al.*, 1987, Kadonaga et Tjian, 1986). Sp1 est activé par la PKA et donc

par la voie AMPc (Rohlf, *et al.*, 1997). Sa fixation sur son site peut avoir des effets activateurs ou inhibiteurs de la transcription et, dans le cas de la *GSTP1-1*, on observe un effet activateur. Le promoteur de la *GSTP1-1* contient deux sites Sp1 proches de la TATA box appelés distal et proximal. Moffat et al. ont montré que la présence de l'un site et/ou de l'autre est absolument nécessaire mais pas suffisante à la transcription basale du gène, bien que le site distal lie préférentiellement le facteur de transcription (Moffat, *et al.*, 1996b). Par ailleurs le stress oxydant, comme un traitement au peroxyde d'hydrogène, inhibe la liaison de ce facteur à son site (Ammendola, *et al.*, 1994).

2.2 - AP-1

Le site TGACTCAGC situé entre -69 et -61 dans le promoteur de la *GSTP1-1* est considéré comme étant un TRE. Aucun effet biologique du TPA sur cet élément n'a été montré chez l'homme, contrairement au rat. Cependant le promoteur de la *GSTP1-1* de rat contient en fait 2 sites TRE-like et une GC box, ce qui peut décrire un ARE. On peut donc se demander si le site de la *GSTP1-1* humaine fonctionne vraiment comme un TRE, ou plutôt comme un ARE. Le rôle physiologique de cet élément peut être déterminé par la séquence même du site mais surtout par les facteurs de transcription se fixant ou par les voies de transduction impliquées. Les facteurs de transcription AP-1 sont les facteurs spécifiques de ces éléments.

2.2.1 - Activation d'un gène par AP-1

Les facteurs de transcription AP-1 sont des protéines régulatrices à motif bZIP qui se fixent sur leur site sous forme de dimère. Ces dimères (homo ou hétérodimères) sont composés de facteurs de la famille Jun, de facteurs de la famille Fos et, dans certains cas, de facteurs activant la transcription ATF/CREB ou d'autres protéines bZIP : les protéines Maf et les protéines NF-E2 :

Famille Jun : c-Jun, v-Jun, Jun B, Jun D ;

Famille Fos : c-Fos, v-Fos, Fos B, Fra1, Fra2 ;

Famille ATF/CREB : ATF1, ATF2, ATF3, ATF4, B-ATF, CREB1, CREB2

Famille Maf : v-Maf, c-Maf, MafB, MafG, MafF, MafK.

Les éléments Jun peuvent former des hétérodimères avec Fos, ATF ou des protéines à motif bZIP mais peuvent aussi former des homodimères. Par contre, Fos ne peut former que des hétérodimères (Karin, *et al.*, 1997). Les facteurs ATF/CREB se fixent sous forme d'homodimères mais peuvent aussi former des hétérodimères entre eux ou avec Fos ou Jun.

Les facteurs AP-1 se fixent sur des séquences appelées TRE car ils ont été découverts pour leur capacité à être activés par le TPA. Leur séquence consensus, 5'-TGA(C/G)TCA-3', présente des homologies avec les séquences ARE. Les facteurs de transcription ATF/CREB se fixent à des séquences appelées CRE (cAMP Responsive Element) dont la séquence est 5'-TGACGTCA-3'. Les dimères formés avec des protéines Maf ou NF-E2 se fixent sur des sites CRE ou TRE.

Le facteur AP-1 le plus connu et étudié se compose de c-Jun et c-Fos (Figure 5).

Les gènes des facteurs Jun et Fos contiennent dans leur promoteur des sites régulateurs *cis*. Le promoteur du gène *c-fos* contient un site SRE (Serum Responsive Element) sur lequel se fixent un dimère de SRF (Serum Responsive Factor) et les facteurs ternaires Elk1 ou SAP-1, pouvant ainsi activer le gène. Ce mécanisme est une réponse au sérum, aux facteurs de croissance, aux cytokines et au stress cellulaire.

Ce promoteur contient aussi un site CRE répondant aux neurotransmetteurs et aux hormones, qui utilisent l'AMPc ou le Ca²⁺ comme second messenger.

Il possède enfin un site SIE (Sis Inducible Enhancer) qui 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 active 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).

Le promoteur du gène *c-jun* contient un site TRE sur lequel se fixe un hétérodimère : c-Jun-ATF2, pour activer le gène, ATF2 étant constitutif. Chez l'homme, le promoteur de *c-jun* contient 2 sites TRE appelés *jun1* et *jun2*. Ces 2 éléments peuvent répondre à différents stimuli dont les ERO.

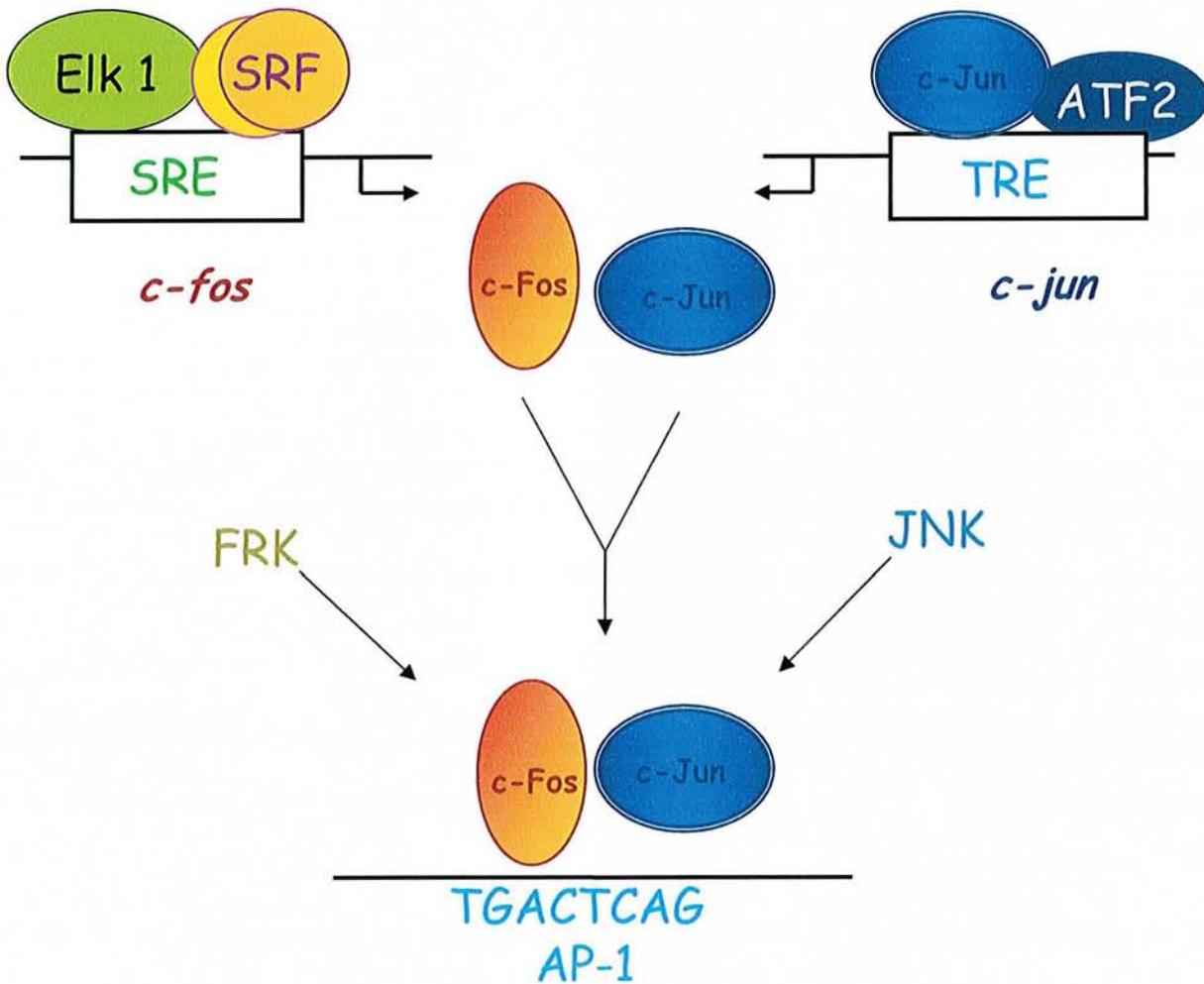


Figure 5: Régulation de l'expression des facteurs de transcription c-Jun et c-Fos.

Le gène de c-Fos est transcrit grâce à la fixation de Elk et SRF (Serum response factor) sur le SRE (Serum response element) situé sur le promoteur. Le gène de c-Jun est transcrit grâce à la fixation de c-Jun et ATF sur le TRE (TPA response element) situé sur le promoteur. Les kinases FRK (Fos regulating kinase) et JNK (Jun N-terminal kinase) phosphorylent c-Fos et c-Jun, respectivement. Le dimère ainsi activé ira se fixer sur un site AP-1.

Il faut ensuite que ces 2 facteurs soient phosphorylés par une kinase spécifique pour pouvoir se fixer sur un site cible situé dans le promoteur de certains gènes comme la *GSTP1-1*: c-Jun est phosphorylé par JNK (Jun N-terminal Kinase) et c-Fos par FRK (Fos Regulating Kinase). Le gène sur lequel le facteur AP-1 se fixe est alors activé ou inhibé. Une fois les facteurs AP-1 libérés, ils seront dégradés. c-fos qui peut être ubiquitinylé subit une dégradation dépendante du protéasome, mais son adressage au protéasome peut varier d'une lignée à une autre (Acquaviva, *et al.*, 2002).

2.2.2 - Rôle de AP-1

Il a été montré de nombreux rôles pour AP-1 et Wagner rappelle que chaque facteur AP-1 peut avoir une fonction différente (Wagner, 2002). Ainsi, c-Fos est un régulateur clef de la différenciation de cellules osseuses alors que c-Jun, JunB et Fra1 sont impliqués dans le développement osseux embryonnaire et post-natal. De la même manière, c-Jun et JunB jouent un rôle important dans les interactions épithélium-mésenchyme des cellules de peau et sont nécessaires au maintien de la balance prolifération/différenciation pour conserver une structure normale de l'épiderme (Ángel et Szabowski, 2002). c-Jun peut induire la croissance cellulaire par l'inhibition de supresseurs de tumeurs et l'activation d'activateurs du cycle cellulaire alors que JunB peut conduire à l'effet inverse (Shaulian et Karin, 2002). En fait, AP-1 contrôle la mort et la survie cellulaire en modulant les régulateurs du cycle cellulaire comme la cycline D1, p53, p21, p19 et p16 (Shaulian et Karin, 2001). Cependant, seul c-Jun est capable de réprimer un supresseur de tumeur et d'induire la cycline D1, fonctions que JunB antagonise.

Jun peut aussi former des dimères avec Fra et ATF et a alors d'autres rôles distincts dans la cancérogenèse (van Dam et Castellazzi, 2001). En effet, dans des embryons de poulet, le dimère Jun-Fra2 va induire l'indépendance à l'ancrage alors que Jun-ATF2 est impliqué dans l'indépendance aux facteurs de croissance et le développement de fibrosarcome primaire dans l'aile de poulet.

De plus, AP-1 peut s'associer à d'autres facteurs de transcription pour activer des gènes lors de stress. Ainsi l'expression de VEGF est augmentée lors d'une hypoxie, grâce à sa coopération avec HIF-1 (Michiels, *et al.*, 2001). De même, si les sites NFAT et AP-1 sont adjacents, ces 2 facteurs de transcription vont agir en synergie en formant un complexe

ternaire stable sur l'ADN (Macian, *et al.*, 2001). Ce phénomène est nécessaire pour les réponses immunitaires.

2.2.3.- Implication de AP-1 dans la cancérogenèse

Il a été montré que, dans certaines leucémies sensibles aux glucocorticoïdes, les facteurs AP-1 sont sur-exprimés par rapport à des leucémies résistantes à ces mêmes corticoïdes (Bailey, *et al.*, 1999). La propriété anti-cancérogène de l'acide 4,5-dihydroxyanthraquinone-2-carboxylique implique l'inhibition du facteur de transcription AP-1 et de sa voie de signalisation passant par la JNK sans toutefois modifier l'activité de ERK ou de p38 (Lin, S., *et al.*, 2003). En général, AP-1 est identifié comme étant impliqué dans la cancérogenèse et son inhibition comme étant une bonne thérapie anti-cancéreuse (Young, *et al.*, 2003). L'induction de la cancérogenèse par l'arsenic a été reliée à l'induction de l'expression de AP-1 et NF- κ B ainsi que la voie de signalisation menant à leur activation (Yang, C. et Frenkel, 2002). De la même manière, la transformation des cellules d'épiderme de souris JB6 par le TPA, l'EGF ou le TNF α est liée à l'expression de AP-1 et NF- κ B et leur inhibition permet de bloquer ce phénomène (Dhar, *et al.*, 2002). De plus des souris déficientes en TNF α sont résistantes à la promotion de tumeurs et cela semble être dû à la non-induction de AP-1 et de sa voie de signalisation (Arnott, *et al.*, 2002). Bamberger et al. prouvent, eux, que AP-1 est impliqué dans le cycle cellulaire de cellules cancéreuses et que la présence de c-fos peut être un élément négatif supplémentaire de pronostic dans la progression de la tumeur (Bamberger, *et al.*, 2001). Ce phénomène est confirmé par Hennigan et Stambrook qui montrent qu'un dominant-négatif de c-jun bloque les cellules en phase G1 en régulant l'expression de p21 (Hennigan et Stambrook, 2001). Enfin, la délétion de JNK2 de souris inhibe la formation de tumeurs, suggérant le rôle de AP-1 dans la promotion de cancers (Chen, N., *et al.*, 2001b). Ceci est confirmé par le fait que la transfection par JunB de kératinocytes cancéreux non-différenciés (dans lesquels l'expression de JunB est diminuée par rapport à des kératinocytes bien différenciés) induise c-Jun et Fra1, et que ces cellules ont une croissance plus rapide et sont plus invasives sans toutefois modifier leur état de différenciation (Robinson, *et al.*, 2001).

2.2.4.- Implication de AP-1 dans l'apoptose

Liebermann et al. ont découvert des rôles à la fois positif et négatif des facteurs de transcription AP-1 sur l'apoptose : le dimère Fos/Jun serait impliqué dans l'induction de

l'apoptose dans des cellules hématopoïétiques, ainsi que dans l'induction de la mort programmée de nombreuses lignées cellulaires (Liebermann, *et al.*, 1998). Par ailleurs AP-1 pourrait être impliqué dans la protection contre l'apoptose induite par des agents endommageant l'ADN. La fonction de AP-1 dépendrait en fait de l'environnement, des stimuli et de la lignée cellulaire. Ces informations ont confirmé les résultats déjà obtenus par Karin *et al.* qui montrent le rôle ambigu de AP-1 dans l'apoptose et la prolifération cellulaire (Karin, *et al.*, 1997). Récemment le rôle de l'activation par le 2-méthoxyestradiol de la voie de signalisation JNK et donc de AP-1 dans l'induction de l'apoptose p53-dépendante a été mis en évidence (Shimada, *et al.*, 2003). L'activation de AP-1 serait indispensable à l'induction de p53 et la JNK jouerait un rôle dans la phosphorylation de Bcl2.

AP-1 est aussi fortement lié à la différenciation des cellules K562 en mégacaryocytes. La différenciation de ces cellules en cellules érythroïdes est inhibée par AP-1, ayant ainsi le même effet que le TPA (Rosson et O'Brien, 1998).

La séquence qui fixe AP-1 dans le gène de la *GSTP1-1* est une séquence TRE consensus. Pourtant personne n'a jamais pu montrer une induction de l'expression de la *GSTP1-1* par ajout de TPA dans le milieu. Cependant Borde-Chiché *et al.* ont montré que la fixation d'éléments AP-1 sur ce site était augmentée par le TPA, et que le TPA augmente l'expression d'un gène rapporteur contrôlé par le promoteur de la *GSTP1-1* (Borde-Chiché, *et al.*, 2001a).

2.2.5 – Fixation de AP-1 sur le site TRE

Les sites TRE sont des sites spécifiques des facteurs de transcription AP-1. Ils sont d'ailleurs souvent appelés sites AP-1. Les facteurs se fixant sur le TRE sont généralement c-jun et c-fos mais Borde-Chiché *et al.* ont montré que le site TRE de la *GSTP1-1* humaine fixe non seulement c-Jun mais aussi Fra 1 et NFE2 p45 (Borde-Chiché, *et al.*, 2001a). Moffat *et al.* montrent, eux, que les protéines Jun et Fos se fixent sur le site TRE mais seulement dans la lignée VCREMS et non dans la lignée MCF-7 qui n'exprime pas la *GSTP1-1* (Moffat, *et al.*, 1994).

2.2.6 – Fixation de AP-1 sur le site ARE

Certains ARE ont été décrits comme fixant Jun/Fos (h-NQO1 et mouse-GSTY_a) alors que d'autres ne fixent pas ces facteurs de transcription (rat-GSTY_a et rat-QR). Ces différences

peuvent être expliquées par les sites TRE consensus et/ou TRE-like parfois contenus dans les ARE et montrent qu'un TRE n'est pas un ARE. Il a été montré, pour confirmer cette hypothèse, que, dans certains cas, le TRE consensus de la collagenase ne compète pas la fixation des complexes protéiques sur les ARE (rat-GSTY_a) (Favreau et Pickett, 1997).

La plupart des ARE contenant un site TRE ou TRE-like, fixent les protéines AP-1, mais ils peuvent aussi fixer des complexes protéiques spécifiques des ARE. Wang et Williamson découvrent qu'un complexe protéique de 160 kD (ARE-BP1), ne contenant pas les protéines Fos et Jun, se fixe sur un ARE (Wang, B. et Williamson, 1994). Wasserman et Fahl proposent que le complexe ARE-BP1 s'associe avec les protéines bZip pour se fixer (Wasserman et Fahl, 1997). Xie et al. indiquent que NF-E2 et les protéines Maf pourraient se fixer (Xie, *et al.*, 1995). Par ailleurs, certains définissent aussi les ARE comme des éléments fixant Nrf2 en association avec d'autres facteurs de transcription de la famille des leucine zipper comme Maf-G et Maf-K (Yu, *et al.*, 2000a). Huang et al. confirment cette hypothèse et ajoutent que la phosphorylation et donc l'activation de Nrf2 se ferait par une voie passant par la PKC (Huang, H. C., *et al.*, 2000). Nguyen et al. montrent aussi que Nrf2/MafK se fixent sur les ARE (Figure 6 et 7) (Nguyen, *et al.*, 2000).

Cependant ils découvrent que, alors que la fixation de Nrf2 a une action activatrice, la fixation de MafK a une action inhibitrice. Dhakshinamoorthy et al. confirment cela et montrent que Nrf1 et Nrf2 ont un effet positif sur la transcription du gène alors que MafG et MafK ont un effet négatif (Dhakshinamoorthy et Jaiswal, 2000). Venugopal et al. avaient déjà établi que Nrf1 et Nrf2 régulent positivement un ARE humain, alors que les facteurs c-Fos et Fra1 le régulent négativement (Venugopal et Jaiswal, 1996).

2.3 - NF- κ B

2.3.1 - Voie d'induction de NF- κ B

Le facteur NF- κ B est un membre de la famille des protéines activatrices Rel et répond au stress oxydant et au stress inflammatoire (Figure 8).

Il est formé d'homo- ou d'hétéro-dimères des protéines p50, p52, p65, Rel B et c-Rel. Rel B ne se dimérise qu'avec p50 et p52. La formation du dimère permet à chaque sous-unité de se lier à un demi-site (Dobrzanski, *et al.*, 1993, Ryseck, *et al.*, 1992).

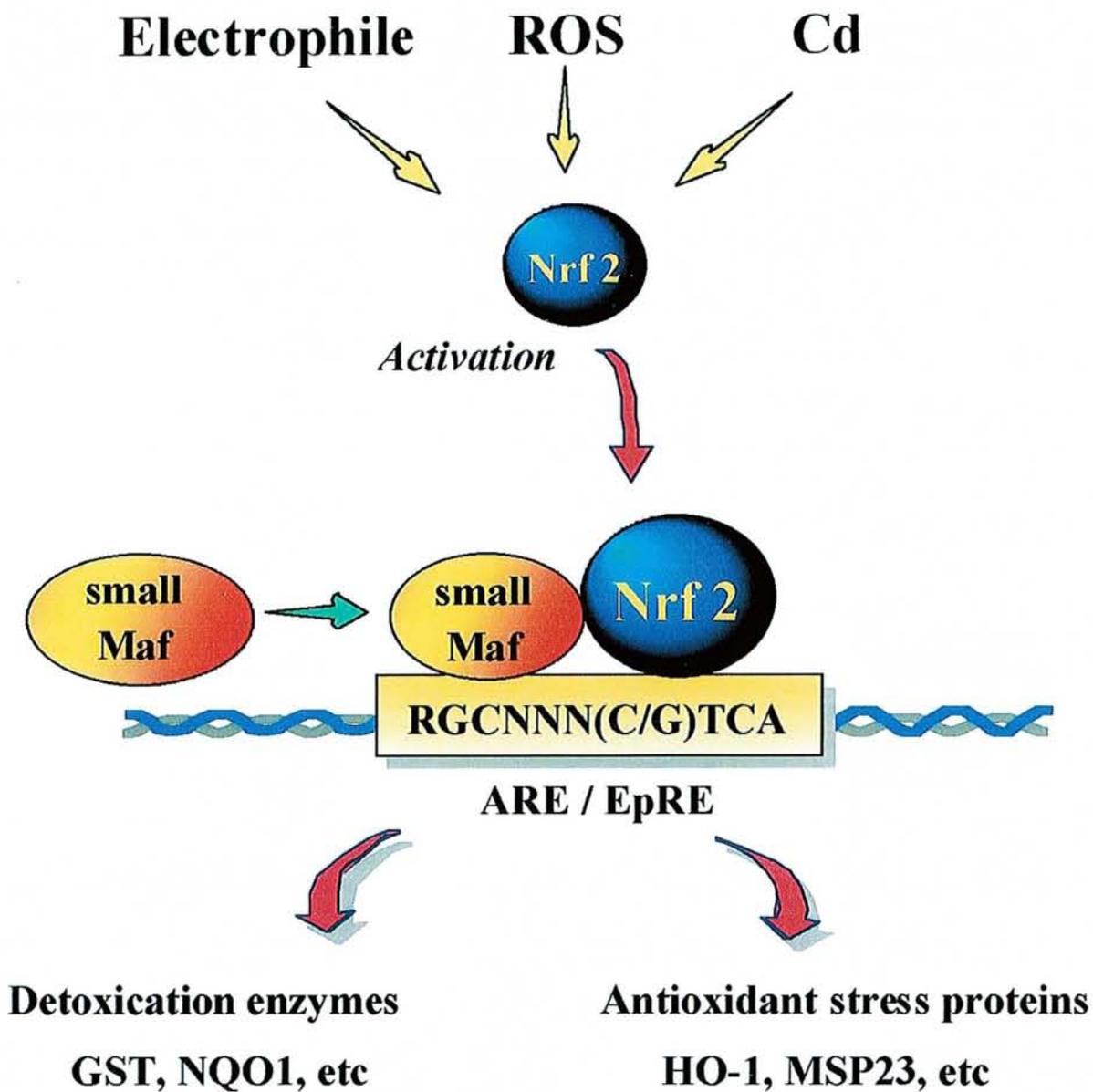


Figure 6: Activation de gènes contrôlés par un ARE. Selon Ishii et al (2000)

Un stress tel que la présence d'électrophiles, d'ERO ou de métaux lourds (ROS = ERO, Cd = cadmium) va induire l'activation de Nrf2 qui pourra aller se fixer sur un site ARE en formant des dimères avec les petites protéines Maf. Ceci va induire l'expression des enzymes de détoxification et de réponse au stress oxydant(Ishii, *et al.*, 2000).

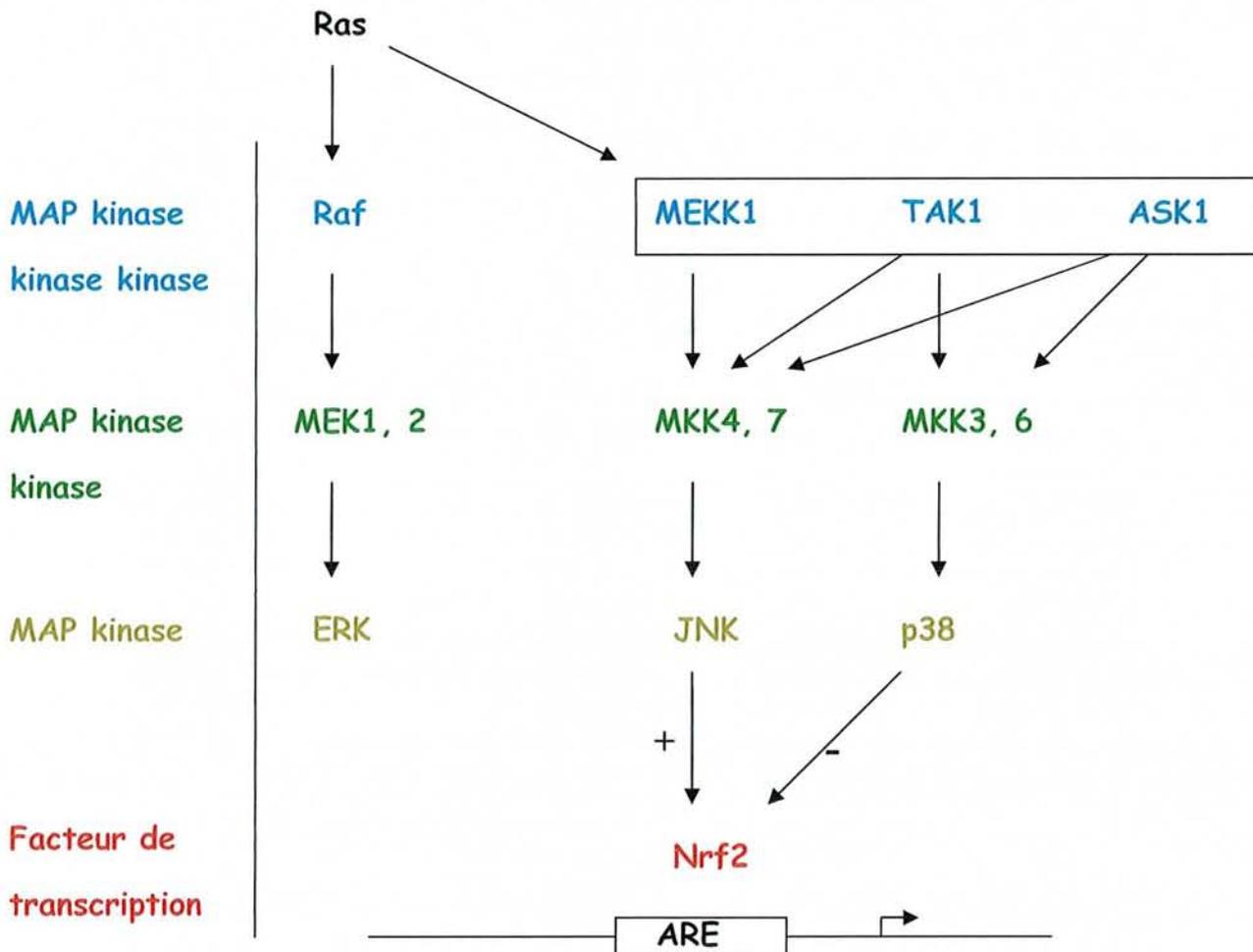
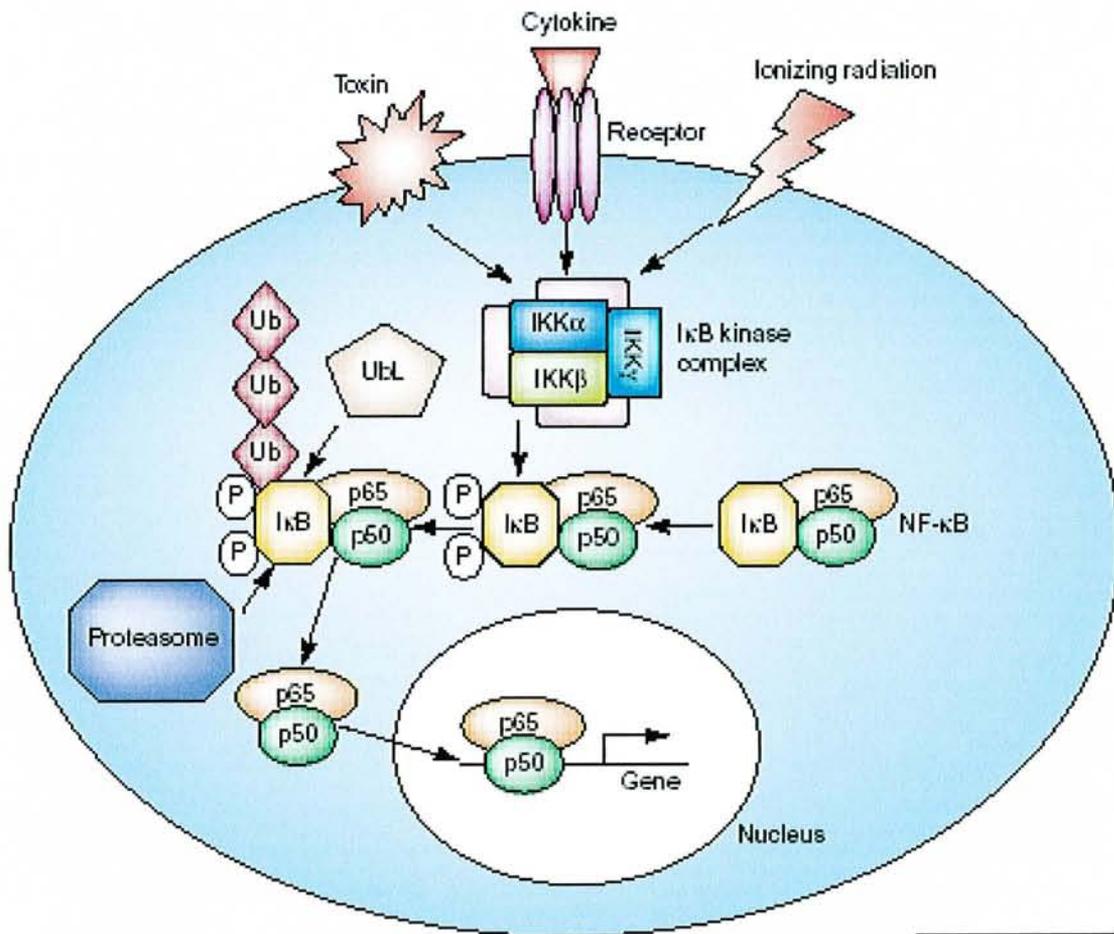


Figure 7: Voies de transduction activant un ARE.

Plusieurs voies de transduction du signal des MAP kinases peuvent moduler l'activité transactivatrice d'un ARE. La voie aboutissant à JNK active la fixation de Nrf2 alors que la voie menant à p38 l'inhibe.



Drug Discovery Today

Figure 8: Régulation de NF-κB. Selon Haefner (2002)

Différents inducteurs tels que des toxines, des cytokines ou des radiations ionisantes permettent d'activer NF-κB. Une cascade de signalisation active le complexe IKK qui comprend les 3 kinases IKK α, β et γ. Ce complexe phosphoryle IκB, qui inhibe NF-κB en le séquestrant dans le cytoplasme. IκB phosphorylé va libérer NF-κB, avant d'être ubiquitinylé et dégradé par le protéasome (Haefner, 2002).

NF-κB : nuclear factor κB, IKK : IκB kinase, IκB: Inhibiteur de κB, Ub : ubiquitine.

Il est lié à un inhibiteur de la famille IκB qui le séquestre dans le cytoplasme lorsqu'il est dans un état non-activé. La famille IκB contient 8 membres identifiés : IκBα (Beg, *et al.*, 1992), IκBβ (Thompson, *et al.*, 1995), IκBγ (Inoue, J., *et al.*, 1992), IκBε (Li, Z. et Nabel, 1997, Simeonidis, *et al.*, 1997, Whiteside, *et al.*, 1997), IκBζ (Yamazaki, *et al.*, 2001), Bcl-3 (Ohno, *et al.*, 1990), p100 et p105. Ils se lient aux domaines Rel des facteurs de transcription NF-κB grâce à une répétition de 6 ou 7 domaines ankyrines (Blank, *et al.*, 1992, Verma, *et al.*, 1995).

L'activation de NF-κB va passer par la phosphorylation de son inhibiteur qui sera alors ubiquitinylé et dirigé vers le protéasome qui va le dégrader, permettant alors à NF-κB de passer dans le noyau pour aller se fixer sur ses sites de liaison :

5'-GGG(A/G)(C/A/T)CT(C/T)(C/T)CCC-3' (dans la *GSTP1-1* :5'- GGGAATTTCC-3'). Il a été montré que la fixation de IκBα à la sous-unité p65 de NF-κB est spécifique, saturable et dépendante du niveau de phosphorylation de IκBα (Yang, L., *et al.*, 2003). Elle est aussi fonction de la concentration de NF-κB.

De nombreux stimuli activent NF-κB comme les cytokines pro-inflammatoires (TNFα, IL-1β...), certaines bactéries et produits bactériens (LPS, exotoxine B...), des virus (HIV-1, CMV...), des stress chimiques (stress oxydant, agents thérapeutiques...) ou physiques (UV, rayons γ) (Pahl, 1999). Les voies de signalisation de ces différents stimuli peuvent différer, mais il existe des points communs. Tous ces voies mènent à la libération de NF-κB grâce à la phosphorylation, l'ubiquitination et la dégradation de l'inhibiteur. Le complexe IKK a été identifié comme ayant l'activité kinase sur IκB. En particulier, il est composé de plusieurs protéines de la famille IKK dont IKKα et IKKβ qui sont associées à l'activité kinase (DiDonato, *et al.*, 1997, Mercurio, *et al.*, 1997, Zandi, *et al.*, 1997).

Une troisième protéine, IKKγ a été identifiée comme étant une protéine régulatrice (Li, Y., *et al.*, 1999, Mercurio, *et al.*, 1999, Rothwarf, *et al.*, 1998, Yamaoka, *et al.*, 1998). Certaines équipes suggèrent que le complexe est composé d'un hétérodimère IKKα /IKKβ et d'un homodimère IKKγ/IKKγ (Miller et Zandi, 2001, Rothwarf et Karin, 1999).

D'autres protéines pourraient aussi faire partie du complexe comme MEKK1 (Mercurio, *et al.*, 1997), NIK (Regnier, *et al.*, 1997), IKAP (Cohen, L., *et al.*, 1998) ou des protéines de la famille IκB et Rel (Heilker, *et al.*, 1999). Poyet et al. ont montré que RIP permet une oligomérisation du complexe IKK par sa fixation à IKKγ (Poyet, *et al.*, 2000). Les protéines cdc37 et Hsp 90 pourraient, elles aussi, s'associer au complexe (Chen, G., *et al.*,

2002a). Il a récemment été mis en évidence que l'association de Hsp27 au complexe IKK permet une régulation négative de l'induction de NF- κ B par le TNF α (Park, K. J., *et al.*, 2003).

Le complexe IKK est activé par les cytokines IL-1 ou TNF α grâce à la phosphorylation de IKK β et la mutation de IKK α n'a pas d'effet sur l'activation du complexe IKK par le TNF α ou l'IL-1. Cependant Yamamoto a découvert l'association de IKK α avec CREB-binding protein dans le noyau. Ce complexe est recruté au niveau des promoteurs sous l'influence de NF- κ B et participe aussi à la phosphorylation et à l'acétylation de la protéine histone H3 (Yamamoto, *et al.*, 2003). De nombreuses kinases comme les PKC (Lallena, *et al.*, 1999, Sanz, *et al.*, 1999), NIK (Regnier, *et al.*, 1997), AKT/PKB (Ozes, *et al.*, 1999, Romashkova et Makarov, 1999), MEKK1 (Lee, F. S., *et al.*, 1998, Nemoto, *et al.*, 1998), MEKK2 et MEKK3 (Zhao, *et al.*, 1999), COT/TPL2 (Lin, X., *et al.*, 1999b) et TAK1 (Ninomiya-Tsuji, *et al.*, 1999, Sakurai, *et al.*, 1999) peuvent phosphoryler IKK. En particulier, NIK a été identifié par son association avec TNFR associated factor 2 (TRAF2) et interagirait plus spécifiquement avec IKK α . D'ailleurs, des souris knock-out pour NIK présentent une activation normale de NF- κ B par le TNF α (Shinkura, *et al.*, 1999). L'activation de NF- κ B causée par NIK nécessite la translocation nucléaire de IKK α ainsi que le domaine transactivateur de p65 (Jiang, X., *et al.*, 2003). De plus, il a été montré que NIK est essentiel pour l'activation de RelB par le déclenchement des récepteurs de surface des Natural Killer T (NKT) (Elewaut, *et al.*, 2003). L'activation de NF- κ B par l'H₂O₂ implique l'activité kinase de IKK α . Takada et al. découvrent que la kinase Syk participe à la phosphorylation de IKK α dans le cas d'un traitement des cellules myéloïdes KBM-5 à l'H₂O₂ (Takada, *et al.*, 2003). Par ailleurs, une autre équipe rapporte que Vav-1 se lie constitutivement à IKK α et l'activité kinase du complexe ainsi formé est augmentée lors d'une stimulation de cellules de la lignée Jurkat par le CD28 (Piccolella, *et al.*, 2003).

La kinase MEKK1 est aussi un bon candidat pour l'activation de IKK car il y a une bonne corrélation entre la régulation de JNK, qui est sous le contrôle de MEKK1, et NF- κ B. De plus, un dominant négatif MEKK1 inhibe l'activation de NF- κ B (Lee, F. S., *et al.*, 1997, Romashkova et Makarov, 1999, Xia, Y., *et al.*, 1998). Il semble que MEKK1 active plus spécifiquement IKK β .

L'activation du complexe IKK est transitoire et son inactivation semble être due à une autophosphorylation (Delhase, *et al.*, 1999).

Un activateur typique de NF- κ B est le TNF α et la signalisation par laquelle NF- κ B est activé est bien caractérisée. Le TNF α peut se lier à 2 récepteurs membranaires : TNFR1 et TNFR2. Le signal peut alors se propager par 2 voies : les TRAF et les récepteurs à death domain (DD). La fixation de TNF α sur TNFR1 entraîne la trimérisation du récepteur et la dissociation de SODD (silencer of DD) du DD de TNFR1. Le TNFR1 est alors transloqué vers des radeaux lipidiques, où il s'associe à d'autres protéines à DD RIP, TRADD et TRAF2 (Legler, *et al.*, 2003). Dans ces radeaux, TNFR1 et RIP seront ubiquitinylés et dirigés vers le protéasome. La kinase FAK (Focal Adhesion Kinase) est elle aussi impliquée dans l'interaction entre RIP, TRAF2 et le complexe IKK, et l'activation de NF- κ B par le TNF α est abolie dans des fibroblastes déficients en FAK (Funakoshi-Tago, *et al.*, 2003). De même, la kinase TAK1 est recrutée par TRAF2 lors de l'activation de NF- κ B par le TNF α (Takaesu, *et al.*, 2003).

La fixation du TNF α au TNFR2 entraîne le recrutement de TRAF2 qui recrute à son tour TRAF1 (Rothe, *et al.*, 1995, Rothe, *et al.*, 1994). TNFR1 recrute alors le complexe IKK grâce au domaine RING de TRAF2 et son activation nécessite RIP (Devin, *et al.*, 2001). IKK β peut alors phosphoryler I κ B, libérant alors NF- κ B qui sera transloqué dans le noyau pour aller se fixer sur son site cible.

Il existe une autre voie d'activation de NF- κ B passant par sa phosphorylation par une kinase GMP-dépendante (PKG), sans que sa distribution cellulaire soit modifiée (He et Weber, 2003). Ce phénomène augmente l'activité trans-activatrice de p65 sur un site NF- κ B consensus.

La gastrine a aussi été associée à l'activation de NF- κ B et Ogasa et al. montrent qu'elle dépend de la voie de signalisation des PKC (Ogasa, *et al.*, 2003). Les dommages à l'ADN induits par des agents comme l'adriamycine, la camptothécine ou les radiations ionisantes sont d'autres activateurs de NF- κ B. Cependant, les voies autocrines ou du TNFR1 ne sont pas mises en jeu même si RIP semble essentiel (Hur, *et al.*, 2003).

Il existe un site NF- κ B (NF- κ B-like ou proximal) situé à -93 sur le promoteur de la GSTP1-1. Il a été montré que ce site fonctionne comme suppresseur dans la GSTP1-1 (Moffat, *et al.*, 1996a). De plus, le site NF- κ B-like est à 20 pb du site AP-1, ce qui pourrait permettre des interactions entre les protéines se fixant sur chacun des sites (Figure 9).

Il existe aussi un autre site NF- κ B (NF- κ B distal) situé entre -323 et -314 qui n'a pas été étudié, mais qui pourrait intervenir dans la régulation de ce gène.

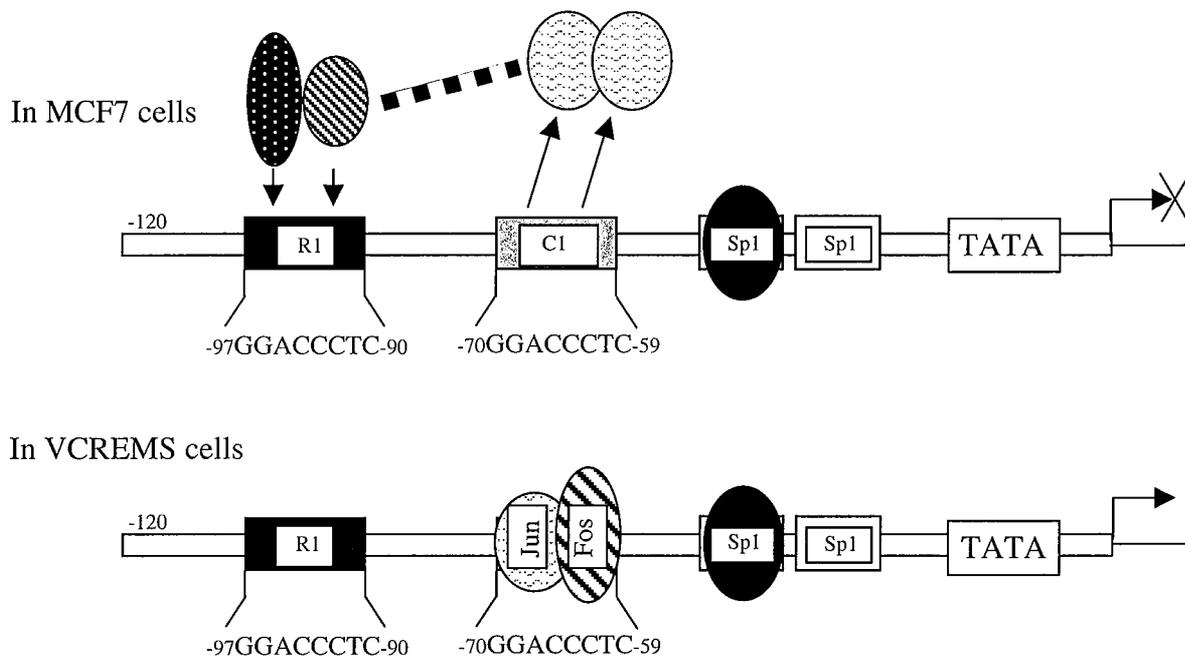


Figure 9: Modèle de transcription de la *GSTP1-1*. Selon Moffat et al. (1996a)

Dans les cellules n'exprimant pas la *GSTP1-1* comme les cellules MCF-7, un complexe protéique se fixant sur le site NF-κB-like empêche la fixation de facteurs de transcription sur le site TRE. Dans les cellules exprimant la *GSTP1-1* comme les cellules VCREMS, le dimère c-Jun/c-Fos se fixe normalement sur le site TRE. R1: NF-κB-like, C1: TRE. (Moffat, *et al.*, 1996a)

2.3.2 - NF- κ B et stress oxydant

La protéine Hsp27 est activée en réponse aux chocs thermiques, au stress oxydant et aux traitements par des cytokines. Park et al. ont découvert que cette protéine s'associe au complexe IKK sous l'influence d'un traitement au TNF α (Park, K. J., *et al.*, 2003). Cette association est favorisée par la phosphorylation de Hsp27 par la kinase MK2, substrat de p38, et décroît l'activité IKK.

La voie de transduction du signal menant à l'activation de NF- κ B est activée par les ERO. L'antioxydant N-acétyl-cytéine (NAC) permet d'inhiber l'induction de NF- κ B et ainsi de bloquer certains événements dont il est le régulateur clef, comme le métabolisme des phospholipides, la libération de cytokines pro-inflammatoires et l'activité protéase dans les membranes fœtales humaines (Lappas, *et al.*, 2003). De plus, l'albumine glyquée induit le stress oxydant et NF- κ B dans les macrophages RAW (Cohen, M. P., *et al.*, 2003). Dans ce cas, la kinase ERK est activée et la production de TGF β dépendante de ERK est augmentée. Crowley-Weber et al. confirment ces résultats en montrant que la nicotine augmente le stress oxydant, permet l'activation de NF- κ B, induit l'apoptose et favorise la capacité du déoxycholate de sodium (un sel biliaire dont la concentration augmente après un repas riche en graisses) à activer l'élément de réponse aux xénobiotiques (Crowley-Weber, *et al.*, 2003). La nicotine est un facteur de risque dans le développement des cancers gastro-intestinaux ainsi que dans les acides biliaires dont elle augmente les effets néfastes. Par ailleurs, un autre antioxydant, l'ergothinéine, inhibe l'induction de NF- κ B par H₂O₂ ou par le TNF α dans les cellules A549 (Rahman, *et al.*, 2003).

Cependant, dans les cellules HeLa, le stress oxydant peut avoir un effet différentiel sur l'expression basale ou induite de NF- κ B (Byun, *et al.*, 2002). En effet, le traitement de cellules par H₂O₂ ou par le diamine inhibe l'induction de NF- κ B par le TNF α , tout en induisant la dégradation de I κ B et en inhibant l'activité IKK. Par ailleurs, ces mêmes traitements activent l'expression basale de NF- κ B sans que I κ B soit dégradé ni que IKK soit activée.

2.3.3 - NF- κ B et cancérogenèse

NF- κ B joue un grand rôle dans la réponse immunitaire et les réactions inflammatoires (Baeuerle et Henkel, 1994). De plus, plusieurs faits pourraient l'impliquer dans le développement et la progression des cancers. Tout d'abord, le gène *v-Rel* est un oncogène puissant responsable de lymphomes agressifs et de leucémies, et capable de transformer des cellules spléniques et médullaires (Carrasco, *et al.*, 1996). Ensuite, la majorité des gènes codant les protéines NF- κ B et I κ B sont situés sur des locus génomiques subissant des réarrangements chromosomiques dans des cancers humains, particulièrement au sein de tumeurs lymphoïdes (Luque et Gelinas, 1997). Ces réarrangements montrent qu'une modification de l'activité de NF- κ B favorise la transformation cancéreuse ou la progression tumorale. D'autre part, on sait que plusieurs virus oncogéniques, tels que HTLV-I, le virus d'Epstein Barr ou le virus de l'hépatite B, activent NF- κ B grâce à des protéines dont le rôle dans la transformation cellulaire est connu (Gilmore, *et al.*, 1996). En fait, dans la plupart des cas, il est établi que la liaison de NF- κ B à l'ADN est liée à son potentiel oncogénique.

Il a été montré que l'inactivation de I κ B (et donc l'activation de NF- κ B) entraîne la transformation de cellules 3T3 (Beauparlant, *et al.*, 1994). Plusieurs autres éléments montrent que NF- κ B favoriserait la progression cancéreuse : la production de protéines du CMH est dépendante de NF- κ B (Dejardin, *et al.*, 1998), et une réduction de ces protéines, comme dans la transformation cellulaire par l'adénovirus 12, l'oncogène RAS ou l'oncogène T, protégerait les cellules cancéreuses du système immunitaire (Cadoret, *et al.*, 1997). Par ailleurs, certains inhibiteurs de NF- κ B sont abondamment exprimés dans certains adénocarcinomes mammaires (Dejardin, *et al.*, 1995). Dans les carcinomes de reins, un phénotype agressif est souvent associé à un syndrome paranéoplasique inflammatoire. Oya et al. découvrent que le développement de ces cancers est lié à une augmentation de l'expression de NF- κ B (Oya, *et al.*, 2003). De plus, le resvératrol, un polyphénol extrait du vin, diminue fortement l'incidence et la multiplicité des tumeurs mammaires chez le rat (Banerjee, S., *et al.*, 2002). Cet effet serait dû à l'inhibition de l'expression de NF- κ B, de la COX-2 et de la métalloprotéase 9 (MMP9). Dans les cellules U937, les condensés de fumée de cigarette induisent l'expression de NF- κ B, la phosphorylation et la dégradation de I κ B α et l'activation de IKK, montrant l'implication de NF- κ B dans la cancérogenèse (Anto, *et al.*, 2002). Dans les cellules JB6 d'épiderme de souris, l'inhibition de NF- κ B élimine leur transformation (Dhar, *et al.*, 2002). Un effet similaire est observé lors de l'utilisation d'un anti-oxydant. Farrow et Evers

rappellent que l'inflammation du pancréas, causée par les cytokines, les ERO et les voies de transduction du signal pro-inflammatoires, peut jouer un rôle important dans le développement de cancers du pancréas (Farrow et Evers, 2002). On a aussi montré que les agents chimiothérapeutiques doxorubicine, 5-FU, cisplatine et paclitaxel induisent la liaison de NF- κ B sur l'ADN (Chuang, *et al.*, 2002). Ce phénomène pourrait prendre part dans la mise en place d'une résistance et l'utilisation d'inhibiteurs pourrait remédier à ce problème.

2.3.4 - NF- κ B et apoptose

NF- κ B est aussi lié à l'apoptose. Son activation protégerait des cellules lymphoïdes ou fibroblastiques de l'apoptose induite par le TNF- α ou la daunomycine. Il a aussi été montré que l'activation de NF- κ B est liée à une survie ou au moins à un retard de la mort cellulaire dans les cellules soumises à des radiations ionisantes ou à la daunorubicine. En outre, son inactivation entraîne une apoptose massive des cellules hépatiques. Ceci serait dû à des gènes régulés par NF- κ B, impliqué dans l'inhibition de l'apoptose (Wang, C. Y., *et al.*, 1996, Wu, M., *et al.*, 1996).

Cependant, on a pu aussi montrer que NF- κ B était nécessaire à l'induction de l'apoptose, comme dans des cellules de carcinome infectées par le virus Sindbis (Lin, K. I., *et al.*, 1995).

Ces résultats contradictoires pourraient être dus au fait que NF- κ B contrôle non seulement des gènes impliqués dans l'inhibition de l'apoptose, tels que la molécule A20, mais aussi des gènes impliqués dans l'apoptose, tels que p53 ou c-myc. La fonction de NF- κ B serait donc différente suivant les lignées cellulaires et les signaux reçus (Bours, *et al.*, 1998).

L'infection de cellules endothéliales par *Rickettsia rickettsii* induit l'apoptose de ces cellules, ainsi que l'inhibition de NF- κ B (Joshi, *et al.*, 2003). L'expression de NF- κ B est nécessaire à la conservation de l'intégrité mitochondriale. L'apoptose est principalement initiée au travers des récepteurs de mort. Dans les cellules T Do-11.10, l'activation du récepteur des cellules T (TCR) résulte en l'activation de l'apoptose par la voie Fas. L'inhibition de NF- κ B conduit à une plus grande sensibilité des cellules à l'apoptose induite par les TCR (Malewicz, *et al.*, 2003). Dans les mêmes cellules déficientes en NF- κ B, l'activation des TCR induit une apoptose dépendante du TNFR2. La transfection stable de A20, une protéine à doigt de zinc, rétablit l'induction de l'apoptose par Fas. De plus, l'activation de NF- κ B en aval de TNFR est nécessaire à l'activation de Fas grâce au TNF

endogène induit par le TCR activé. En fait, NF- κ B joue un rôle de balance entre les signaux apoptotiques Fas et TNF. Plusieurs équipes ont montré que NF- κ B a un rôle anti-apoptotique dans les cellules pancréatiques (Arlt, *et al.*, 2003, Liptay, *et al.*, 2003), les neutrophiles polymorphonucléaires (Choi, *et al.*, 2003) ou des cellules Hodgkin-/Reed-Sternberg (Mathas, *et al.*, 2003). Cependant, d'autres équipes ont montré que le TNF α peut induire une apoptose qui est inhibée par des inhibiteurs de NF- κ B (Neu, *et al.*, 2003). En fait, le TNF α induit iNOS sans stimuler l'activité de la caspase 3.

3 - Voies de transduction impliquées dans la régulation de la GSTP1-1.

La transduction d'un signal à l'intérieur de la cellule passe par des voies de phosphorylation. Les MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) sont les éléments essentiels de ces voies. Ce sont des kinases à sérine/thréonine activées par des phosphorylations sur des résidus thréonine et tyrosine. Il existe 3 familles différentes de MAPK : la famille des ERK (Extracellular signal Regulated Kinase), la famille des JNK/SAPK (Jun N-terminal Kinase/Stress Activated Protein Kinase) et la famille de p38.

3.1 - Voies du stress impliquées dans la régulation de la GSTP1-1

3.1.1 - Voies de transduction impliquant un TRE

Le site TRE est trans-activé par la voie de signalisation induite par le TPA. Il a été démontré que la voie répondant au TPA est la voie PKC - Raf-1 - MEK - ERK. Vuong et al. ont découvert qu'une activation du gène *SPRR1B*, marqueur de la différenciation des cellules pulmonaires, par le TPA passe par une voie PKC δ - Ras - MEKK1 - MKK1 indépendamment de ERK, dans les cellules trachéobronchiales (Vuong, *et al.*, 2000).

Par contre, Osborn et al. n'ont pas réussi à mettre en évidence une voie de transduction complète pour l'activation du gène *MDR1* par le TPA, dans une lignée de cellules K562 (Osborn, *et al.*, 1999). Ils ont montré que le signal passe par l'activation par la PKC α , mais les inhibiteurs des différentes voies n'affectent pas l'effet du TPA.

Ces deux résultats confirment les conclusions de Shelly et al. qui montrent que les changements observés dans les cellules K562 après traitement au TPA sont dus en partie à une voie MEK/MAPK et sont en partie indépendants de ces voies (Shelly, *et al.*, 1998).

Par ailleurs, Qiao et al. ont montré que l'activation par la bile du site AP-1 du gène GADD153 nécessite l'activation de PKC et de la voie ERK qui fonctionneraient indépendamment (Qiao, *et al.*, 2000). Racke et al. ont, eux, mis en évidence la nécessité de l'activation de la voie ERK dans la différenciation de cellules K562 par le TPA (Racke, *et al.*, 1997).

On voit donc que la transduction du signal dépend en grande partie de la lignée cellulaire et du gène étudié.

3.1.2 - Voies de transduction impliquant un ARE

Les ARE sont trans-activés par les voies de signalisation activées par les anti-oxydants. Les ARE et les TRE sont généralement très proches en séquence comme du point de vue des facteurs de transcription pouvant s'y fixer. Les voies de signalisation utilisées peuvent parfois différer.

On a ainsi découvert que l'activation des ARE par le tBHQ dans une lignée de cellules HepG2 passait par l'activation d'une kinase ERK2. Cette voie débute par l'activation directe de Raf1 par l'inducteur sans passer par Ras (Yu, *et al.*, 1999). Les mêmes auteurs montrent plus tard l'importance de voies passant par les kinases MEKK1, TAK1 et ASK1. Ces kinases pourraient alors phosphoryler MKK4 et 6. Cette voie de phosphorylation aboutirait à l'activation de JNK permettant à Nrf2 mais pas à c-jun de se fixer sur l'ARE (Yu, *et al.*, 2000a). Par contre une activation de la kinase p38 aurait un effet négatif sur l'expression d'un gène régulé par un ARE (Yu, *et al.*, 2000b) (figure 6).

3.1.3 - Voies de transduction impliquées dans l'expression de la GSTP1-1

Dans les cellules de carcinome et d'adénome colorectaux et d'ACF, on observe une corrélation entre la sur-expression de la GSTP1-1 et la mutation de K-ras (Miyanishi, *et al.*, 2001). Cette sur-expression de la GSTP1-1 pourrait donc être causée par la mutation de K-ras via la fixation de AP-1 sur le promoteur du gène de la *GSTP1-1*. Par ailleurs, l'expression de la GSTP1-1 est activée par le butyrate dans des cellules de colon humain et cette activation semble passer par la phosphorylation des kinases ERK1/2 (Ebert, *et al.*, 2001). Ce phénomène

permet aux cellules une protection augmentée contre la génotoxicité induite par le 4-hydroxy-2-nonéol. En rendant une lignée leucémique HL60 résistante à un inhibiteur peptidomimétique de la GSTP1-1, le TLK199, Gate et al. découvrent que l'activité kinase de ERK est augmentée sans que son expression basale ne soit modifiée (Gate, *et al.*, 2003). L'induction de ERK par le TPA est aussi modifiée mais de façon transitoire.

Il est connu que les GST sont actives sous forme dimérique. La GSTP1-1 peut se lier à la JNK lorsqu'elle est monomérique, inhibant alors la kinase (Adler, *et al.*, 1999). La sur-expression de la GSTP1-1 diminue l'activité MKK4 et JNK et la transcription due à c-jun qui est ubiquitinylé. Par contre, la transfection de MEKK1 et de *GSTP1-1* restaure la phosphorylation de MKK4 sans toutefois altérer l'inhibition de la JNK montrant qu'elle est indépendante de la voie MEKK1-MKK4. Une autre équipe découvre que la GSTP1-1 se fixe à la partie C terminale de la JNK (Wang, T., *et al.*, 2001). Quant à la GSTM1, elle se lie à la kinase ASK1 et se dissocie après un choc thermique (Dorion, *et al.*, 2002).

Chez la souris, la GSTP se lie aussi à JNK et les cellules n'exprimant pas les enzymes GSTP1/P2 présentent une activité JNK augmentée (Elsby, *et al.*, 2003). Le taux de facteur AP-1 est lui aussi augmenté montrant ainsi le rôle de la GSTP1 dans la régulation de l'expression constitutive des gènes en aval de la JNK. La délétion de la *GSTP* ne modifie pas le taux des autres GST, mais d'autres enzymes de la famille des antioxydants thiol spécifiques sont exprimées à un niveau plus haut (Kitteringham, *et al.*, 2003).

Dans des cellules de testicule de porc, la GSTA est inhibée par un traitement par le TNF α (Benbrahim-Tallaa, *et al.*, 2002). La stimulation de l'expression de la GSTA et la stabilisation de son ARNm par l'hormone FSH est bloquée par le TNF α altérant les processus de détoxification des substances génotoxiques durant la spermatogenèse.

Angel et al. ont découvert que les gènes dont le promoteur contient une séquence consensus de 9 pb sont inductibles par le TPA (Angel, *et al.*, 1987). Ce sont les séquences TRE. Ils prouvent aussi que les facteurs de transcription AP-1 se fixent spécifiquement sur ces séquences. Le promoteur de la *GSTP1-1* humaine contient un site TRE consensus et est donc un bon candidat pour l'activation de son expression par le TPA.

3.2 - Implication de la GSTP1-1 dans l'apoptose

Adler et al. et Yin et al. ont développé un modèle intéressant de régulation de JNK par la GSTP1-1 (Adler, *et al.*, 1999, Yin, *et al.*, 2000). Ils montrent qu'un stress oxydant

augmente l'expression de kinases telles que p38, ERK ou IKK par le biais de la GSTP1-1. Par contre cette enzyme a été décrite comme étant un inhibiteur de la JNK. Cette inhibition est due à la fixation de la GSTP1-1 sur sa partie C-terminale (Wang, T., *et al.*, 2001). Un stress aurait aussi pour effet de libérer la GSTP1-1, alors liée à la JNK de façon monomérique, pour lui permettre de se dimériser. La GSTP1-1 dimérisée aurait un effet positif sur la JNK. On a donc ici une boucle de régulation assez complexe permettant de garder une activité finement régulée. En effet, il a été montré que chez des souris n'exprimant pas les GSTP, l'expression de JNK est augmentée ainsi que celles des gènes sous son contrôle, démontrant le rôle de la GSTP dans la régulation de l'expression constitutive de gènes en aval de JNK (Elsby, *et al.*, 2003).

Le même phénomène intervenant entre GSTM1-1 et ASK1 a été décrit par Dorion *et al.* qui montrent qu'un choc thermique peut provoquer la séparation de GSTM1-1 et ASK1 (Dorion, *et al.*, 2002). La partie C-terminale de GSTM1-1 se lie à la partie N-terminale de ASK1 bloquant ainsi son activité, son oligomérisation et sa capacité à induire l'apoptose (Cho, *et al.*, 2001).

L'importance de ces 2 kinases dans l'induction de l'apoptose a été décrite de nombreuses fois. En effet, Hatai *et al.* montrent que l'activation de ASK entraîne la libération du cytochrome c et l'activation des caspases 9 et 3 (Hatai, *et al.*, 2000). La caspase 8 ne semble pas impliquée, et seule la voie mitochondriale est activée. De plus, une fois activée, ASK1 va induire les kinases JNK et p38 qui sont nécessaires au déclenchement de l'apoptose (Tobiame, *et al.*, 2001).

Une autre équipe démontre que la GSTP1-1 protège les cellules NIH3T3 contre la mort cellulaire induite par l'H₂O₂ (Yin, *et al.*, 2000). Cette protection serait due à la suppression de l'activité JNK ainsi qu'à l'activation des kinases p38 et ERK et du facteur de transcription NF-κB. En fait, Gilot *et al.* découvrent que le blocage de l'apoptose par les GST nécessite la fixation de la GSTP1-1 et de la GSTM1 sur JNK et ASK1, respectivement (Gilot, *et al.*, 2002). Lors de l'induction de l'apoptose, le taux de GSTM1/2 et GSTA1/2 diminue fortement et la sur-expression de GSTM1, A1 et P1 abolit l'activité caspase 3 et protège les cellules contre l'apoptose (Figure 10).

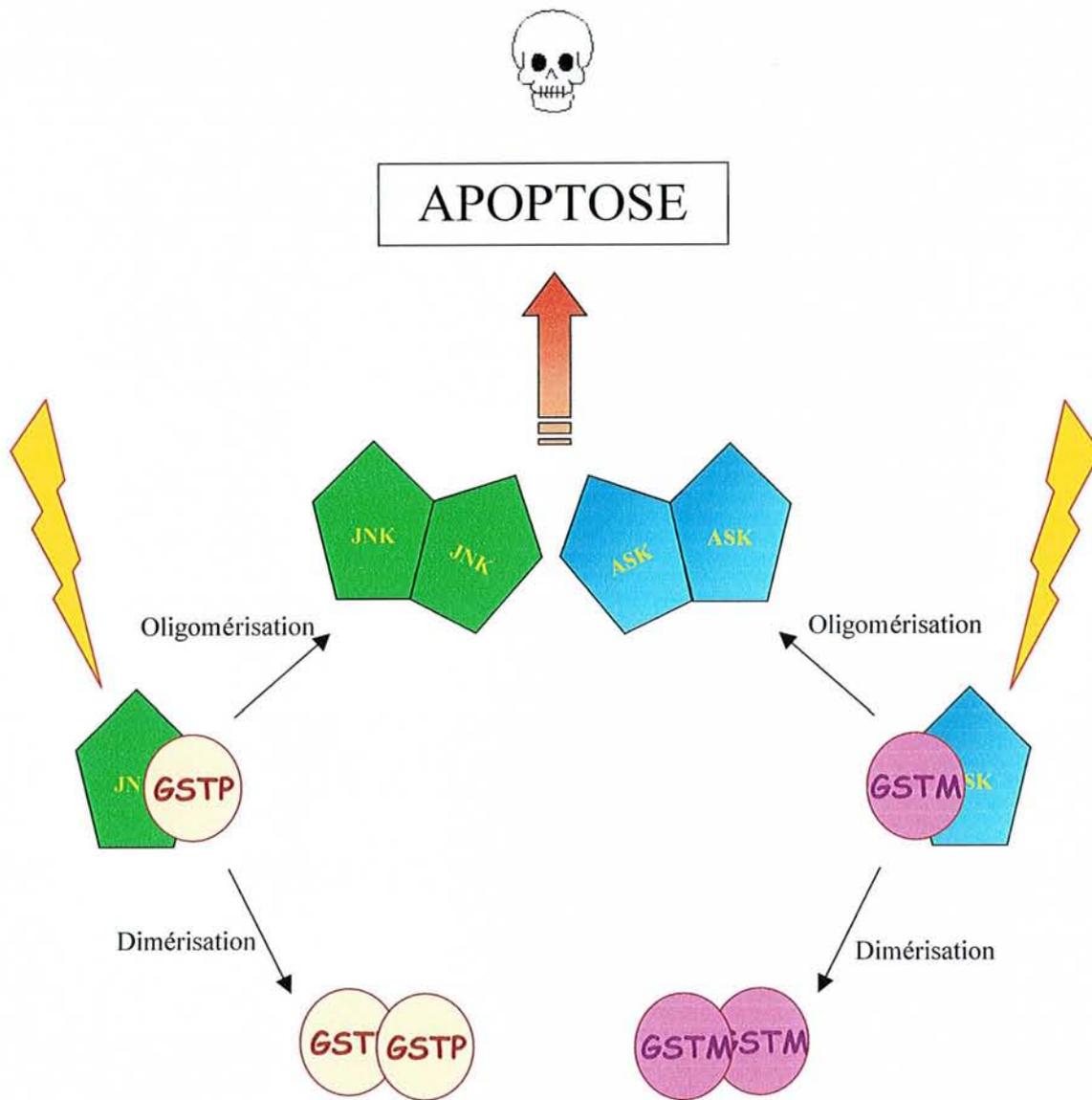


Figure 10: Implication des GST dans l'induction de l'apoptose.

Dans les cellules non stressées, la GSTP1-1 et la GSTM1 sont liées à la JNK et à ASK, respectivement. Lors d'un stress, les GST libèrent les kinases pour se dimériser et détoxifier la cellule. JNK et ASK s'oligomérisent et peuvent ainsi induire l'apoptose.

Partie III : Rôle des agents chimiopréventifs

Kelloff et al. décrivent la chimioprévention comme l'utilisation de produits chimiques naturels ou synthétiques permettant la suppression, le retard ou l'inversion de la cancérogenèse (Kelloff, *et al.*, 1994). Les produits chimiothérapeutiques doivent être sans effets secondaires et non-toxiques. Cette alternative à la chimiothérapie permet de neutraliser les carcinogènes ou leurs effets sur les cellules. La première étape de cette nouvelle stratégie est d'identifier les agents potentiellement actifs. Pour cela, Gerhäuser et al. ont mis au point un système d'identification basé sur des marqueurs cellulaires et enzymatiques (Gerhäuser, *et al.*, 2003). Ce système inclut la modulation du métabolisme des médicaments, la détermination de l'inactivation des radicaux et de l'effet anti-oxydant, les mécanismes inflammatoires et l'activité anti-tumorale.

Les agents chimiopréventifs sont divisés en 2 classes :

Les agents bloquants qui inhibent l'étape d'initiation en empêchant l'activation du carcinogène ou en bloquant l'action même du carcinogène sur sa molécule cible comme l'ADN, l'ARN ou les protéines.

Les agents de suppression qui inhibent l'expression des cellules malignes dans les étapes de promotion ou de progression.

Certains agents chimiopréventifs, comme la curcumine ou le resvératrol, peuvent faire partie des 2 classes car ils présentent plusieurs mécanismes d'action. La plupart des agents chimiopréventifs sont issus des plantes et sont présents naturellement dans notre alimentation. Les substances extraites de *Cassia siamea*, émodine et cassiame B, montrent un fort pouvoir anti-tumoral sur les tumeurs de peau de souris induite par le TPA (Koyama, *et al.*, 2002). Le lycopène supprime l'induction de carcinome par le DMBA chez le hamster (Bhuvanewari, *et al.*, 2001). Pour trouver de nouveaux agents chimiopréventifs, Takasaki et al. cherchent des substances qui inhibent l'induction de l'antigène précoce du virus EBV par le TPA (Takasaki, *et al.*, 2001). Ils isolent 2 esters phénylpropanoïdes de saccharose, la vanicoside B et la lapathoside A, qui présentent de plus un potentiel anti-tumoral significatif. D'autres agents comme le kahweol et le cafestol, 2 diterpènes présents dans le café, ont aussi un fort pouvoir chimiopréventif et protègent les cellules contre la mutagenèse et la cancérogenèse dans des modèles animaux (Huber, *et al.*, 2003). Ils possèdent aussi la propriété d'induire l'activité GSTP1-1 dans le foie de rat montrant un effet inverse à celui obtenu chez l'homme. Le même

effet est observé avec un agent extrait de l'ail : le diallyl disulfure, qui bloque la cancérogenèse chez la souris, grâce aux 2 groupements allyls essentiels et à la chaîne disulfure centrale, et induit l'expression de la GSTP (Bose, *et al.*, 2002). Thimmulappa et al. suggèrent que l'augmentation de l'expression des enzymes de phase II par les agents chimiopréventifs, en particulier le sulforaphane, passe par l'activation de Nrf2 (Thimmulappa, *et al.*, 2002).

1 - La curcumine

La curcumine est la poudre jaune extraite de la racine de *Curcuma longa L* utilisée dans le curry. Elle présente de fortes propriétés anti-oxydantes, anti-inflammatoires et antivirales (Hergenbahn, *et al.*, 2002) et est largement utilisée dans la médecine traditionnelle indienne.

1.1 - Effet de la curcumine sur la cancérogenèse

La curcumine joue un rôle important dans l'inhibition de la formation et de la promotion de tumeurs. En effet, de nombreuses équipes ont montré que l'initiation, la promotion ou la progression de tumeurs est réduite ou bloquée par la curcumine. Azuine et Bhide décrivent l'inhibition de la formation et la promotion de tumeurs induites par le benz(a)pyrène, le 7,12-diméthylbenz(a)anthracène ou les esters de phorbol (Azuine et Bhide, 1992a, 1992b), tandis que Ikezaki et al. montrent que la curcumine peut inhiber le développement de cancer stomacaux après la phase d'initiation par du N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanisine chez le rat (Ikezaki, *et al.*, 2001). De même, le BDMC-A, un analogue de la curcumine, bloque la formation d'adénocarcinome du colon chez le rat (Devasena, *et al.*, 2003). Si la curcumine ne diminue pas l'incidence de tumeur du foie ou du rein induite par le cuivre chez le rat, elle réduit la formation cancéreuse à d'autres sites, ainsi que les métastases (Frank, *et al.*, 2003). De plus, la curcumine a été décrite comme un bon agent anti-angiogénèse (Arbiser, *et al.*, 1998), ce qui pourrait en partie expliquer son effet chimiopréventif au niveau de la promotion cancéreuse. Ce phénomène pourrait être expliqué par l'inhibition de VEGF et de l'angiopoïétine 1 et 2 dans les cellules EAT, par l'inhibition de VEGF et de l'angiopoïétine 1 dans les cellules NIH3T3 et par l'inhibition de KDR dans les cellules HUVEC (Gururaj, *et al.*, 2002). En ce qui concerne les essais cliniques, la curcumine a déjà été testée jusqu'à 12 mg par jour chez des patients atteints de différentes maladies et cancer (Cheng, *et al.*, 2001). Ce traitement ne présente pas de cytotoxicité jusqu'à 8 mg/jour

et les résultats suggèrent un effet biologique de la curcumine dans la chimioprévention du cancer. Les effets anti-cancéreux de la curcumine semblent être plus prononcés en présence d'estrogènes dans les cellules de cancer de sein et elle inhibe les gènes sous l'influence des récepteurs aux estrogènes (Shao, *et al.*, 2002). La curcumine a aussi un effet inhibiteur sur l'expression de hTERT, inhibant l'activité télomérase dans les cellules MCF-7 (Ramachandran, *et al.*, 2002). Elle permet de plus de sensibiliser les cellules de cancer ovarien au cisplatine, facilitant les traitements chimiothérapeutiques (Chan, *et al.*, 2003).

1.2 - Effet de la curcumine sur l'apoptose

Une autre explication de l'activité anti-cancéreuse de la curcumine peut être sa capacité à induire l'apoptose dans les cellules cancéreuses sans être toxique pour les cellules saines. En effet, la curcumine induit l'apoptose dans certaines lignées cellulaires cancéreuses telles que les HL-60, K562, MCF-7 et HeLa (Roy, *et al.*, 2002). Woo et al. suggèrent que la mort cellulaire programmée induite dans des cellules humaines de reins Caki est activée grâce à la déphosphorylation de la kinase Akt, l'inhibition des facteurs anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-XL et les protéines inhibitrices de l'apoptose (IAP), la libération du cytochrome c et l'activation de la caspase 3 (Woo, *et al.*, 2003). Ceci est en accord avec les résultats de Bush et al., Anto et al. et Pan et al. qui montrent l'activation de la caspase 3 dans des cellules de mélanome et les cellules HL-60 (Anto, *et al.*, 2002, Bush, *et al.*, 2001, Pan, *et al.*, 2001). Bush et al. ajoutent que la curcumine induit les caspase 8 et 9, alors que p53 n'est pas modifié (Bush, *et al.*, 2001). Par contre, la voie des récepteurs de mort est activée au travers de Fas de façon FasL indépendante. Anto et al. confirment le rôle de l'inhibition de Bcl-2 et Bcl-XL en supprimant l'apoptose par la sur-expression de ces 2 protéines (Anto, *et al.*, 2002). Le même phénomène est observé dans les cellules U937 pour lesquelles il a été décrit une inhibition de la protéine Bcl-XL et des protéines IAP, la libération du cytochrome c et l'activation de la caspase 3 (Bae, *et al.*, 2003). Au contraire, l'apoptose induite dans les cellules Jurkat est indépendante de la caspase 3 dont l'activation serait bloquée par l'augmentation du taux de GSH (Piwocka, *et al.*, 2002, Piwocka, *et al.*, 2001, Piwocka, *et al.*, 1999, Sikora, *et al.*, 1997). L'activation des caspases par la curcumine peut être bloquée par les protéines Hsp, sans que celles-ci influent sur la libération du cytochrome c (Rashmi, *et al.*, 2003).

Cependant, la curcumine peut inhiber l'effet d'autres agents chimio-thérapeutiques en bloquant l'apoptose induite par ces agents tels que la camptothécine, le mechlorethamine et la doxorubicine dans des lignées de cancer du sein (Somasundaram, *et al.*, 2002). L'activité de

la JNK, la libération du cytochrome c et la formation de ERO sont réduites. L'association de la curcumine avec d'autres agents anti-cancéreux devrait donc être évitée dans le cas de cancer du sein.

1.3 - Effet de la curcumine sur l'inflammation et l'oxydation

Il a été montré que la curcumine inhibe la cyclooxygénase 2 (COX-2) ainsi que la lipoxygénase (LOX), 2 enzymes impliquées dans l'inflammation (Huang, M. T., *et al.*, 1991).

En effet, la COX-2, induite par les cytokines, transforme l'acide arachidonique en prostaglandines durant les épisodes inflammatoires aigus. Elle est aussi la forme prédominante lors des inflammations chroniques. La production de petites molécules médiatrices telles que l'histamine, la sérotonine, la bradykinine et les prostaglandines est à la base des phénomènes d'inflammation et elles participent à la vasodilatation et à la formation d'œdèmes. En particulier, les prostaglandines se fixent sur des récepteurs extracellulaires créant ainsi l'activation de certaines voies de transduction du signal. Bien que l'effet des différentes prostaglandines soit varié (effet vasoconstricteur ou dilatateur), leur importance dans l'inflammation aiguë ou chronique a été démontrée (Mitchell, *et al.*, 1995).

La LOX transforme l'acide arachidonique en leukotriènes qui participent au recrutement des leucocytes et contribuent aux phénomènes d'inflammation (Fiorucci, *et al.*, 2001). En inhibant ces 2 enzymes essentielles au développement de l'inflammation, la curcumine montre un fort effet anti-inflammatoire. D'autre part, la curcumine protège les kératinocytes et les fibroblastes contre les dommages induits par l'H₂O₂ (Phan, *et al.*, 2001) et permet de réduire le stress oxydant et inflammatoire chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Lim, *et al.*, 2001). Les pancréatites peuvent être améliorées par un traitement à la curcumine qui bloque les signaux clefs de l'inflammation (Gukovsky, *et al.*, 2003). En vérifiant l'effet de la curcumine sur la cataracte induite par le galactose, Suryanarayana *et al.* découvrent que la curcumine peut accroître le stress oxydant dans des conditions d'hyperglycémie chez le rat. Seuls les taux faibles (0,01 %) de curcumine pourraient induire un effet bénéfique contre la cataracte (Suryanarayana, *et al.*, 2003).

1.4 - Effet de la curcumine sur les facteurs de transcription NF-κB et AP-1 et la transduction du signal

Il a été montré que la curcumine inhibe l'activation des 2 facteurs de transcription NF-κB et AP-1. Bharti *et al.* ont découvert que l'inhibition de NF-κB passe par l'inhibition de

l'activité du complexe IKK et bloque donc la phosphorylation de I κ B α ainsi que la translocation de p65 (Bharti, *et al.*, 2003). De nombreuses équipes confirment ces résultats et montrent que l'induction de NF- κ B par l'IL1 α , le TNF- α , le TPA, le LPS, et la thrombine (Bierhaus, *et al.*, 1997, Han, *et al.*, 2002, Pendurthi, *et al.*, 1997, Surh, Y. J., *et al.*, 2000, Xu, *et al.*, 1997), est inhibée par la curcumine. Chuang et al. ajoutent que cet effet inhibiteur est à considérer pour améliorer l'efficacité des traitements chimiothérapeutiques, car la plupart des médicaments anti-cancéreux (comme la doxorubicine) activent NF- κ B qui participe à la cancérogenèse et le développement de résistances (Chuang, *et al.*, 2002). La fumée de cigarette, qui contient de nombreux agents cancérogènes comme des radicaux superoxyde et hydroxyl, de l'H₂O₂ et du benz(a)pyrène, active NF- κ B et bloque ainsi l'apoptose, induit la prolifération et la cancérogenèse. La curcumine abolit l'induction de la liaison de NF- κ B sur l'ADN, bloque l'activation de IKK, la phosphorylation et la dégradation de I κ B α et la translocation de p65 (Shishodia, *et al.*, 2003). L'inhibition de NF- κ B par la curcumine apporte une nouvelle stratégie de thérapie pour des maladies comme la pathologie du foie alcoolique dans laquelle NF- κ B est activé (Nanji, *et al.*, 2003). Le pré-traitement d'animaux hémorragiques par la curcumine permet d'éviter le choc hémorragique dû à l'activation des facteurs de transcription NF- κ B et AP-1 (Gaddipati, *et al.*, 2003).

Quant à AP-1, Chen et Tan démontrent que la curcumine inhibe la voie de transduction du signal de JNK au niveau des MAPKKK ou en amont (Chen, Y. R. et Tan, 1998). De plus, le signal passant par p38 est atténué par la curcumine dans les cellules de maladies inflammatoires gastro-intestinales (Salh, *et al.*, 2003), et la kinase Akt est complètement inhibée dans les cellules de cancer de la prostate (Chaudhary et Hruska, 2003). La curcumine peut aussi inhiber l'activation de c-fos en bloquant ERK et JNK tout en induisant l'apoptose (Squires, *et al.*, 2003).

La protéine kinase C (PKC) est impliquée dans les modulations redox de la cellule : les oxydants réagissent avec la partie régulatrice de la PKC et ainsi l'activent, envoyant alors un signal vers la croissance cellulaire et la promotion de tumeurs, alors que les antioxydants réagissent avec la partie catalytique de la PKC et l'inhibe (Gopalakrishna et Jaken, 2000). Il a été montré que la curcumine inhibe l'activation de c-jun et c-fos par le TPA en agissant au niveau de la PKC (Lin, J. K., *et al.*, 1997) de façon non-compétitive (Reddy, S. et Aggarwal, 1994), confirmant les résultats de Liu et al. qui montrent que l'activation de la PKC par le TPA est éliminée par la curcumine (Liu, J. Y., *et al.*, 1993). Cependant Dickinson et al. montrent que la curcumine modifie la composition des dimères AP-1 (Dickinson, *et al.*,

2003). En effet, JunD et c-Jun ont un rôle accru lors d'un traitement à la curcumine, ce qui modifie l'expression du gène codant la glutamate-cytéine ligase et d'autres enzymes de la phase II dans les cellules HBE1.

Il a aussi été montré que la curcumine peut agir sur la voie de transduction Janus kinase/STAT et qu'elle inhibe l'activation de l'IL-12 en bloquant la Janus kinase 2, la tyrosine kinase 2, STAT3 et STAT4, particulièrement dans des cellules d'encéphalomyélite allergique (EAE) qui sont un modèle de sclérose multiple chez l'animal (Natarajan et Bright, 2002). Par contre, la curcumine est un activateur de l'hème oxygénase-1 (HO-1) et Balogun et al. montrent qu'elle peut agir sur l'expression de cette enzyme en activant la voie Nrf2/ARE dans des cellules épithéliales de rein (Balogun, *et al.*, 2003). Dans des cellules rénales, la voie de signalisation NF- κ B pourrait elle aussi être impliquée car l'utilisation d'un inhibiteur de la phosphorylation de I κ B α atténue l'induction de HO-1 par la curcumine (Hill-Kapturczak, *et al.*, 2001).

La curcumine peut aussi agir directement sur la formation de radicaux libres en diminuant le taux de radicaux superoxydes (Bonte, *et al.*, 1997).

1.5 - Effet de la curcumine sur les mécanismes de détoxification cellulaire

• Enzymes de la phase I du métabolisme des médicaments

Les cytochrome P450 (CYP) sont des enzymes de phase I impliquées dans l'activation des carcinogènes, et leur inhibition ajoute un degré de protection à la cellule contre le cancer. Il a été montré que la curcumine peut inhiber les réactions d'alkylation de l'éthoxyrésorufine, la méthoxyrésorufine et le pentoxyrésorufine catalysées par le CYP 1A1, 1A2 et 2B1 dans le foie de rats (Thapliyal et Maru, 2001). De la même manière, la formation d'adduits aflatoxine-ADN catalysée par le système CYP est inhibée par la curcumine (Firozi, *et al.*, 1996). De même dans les cellules MCF-7 traitées par le diméthylbenzanthrène, l'activité du CYP est complètement inhibée par la curcumine qui se lie directement au récepteur AhR et empêche ainsi sa fixation au site de réponse aux xenobiotiques présent sur le gène de CYP (Ciolino, *et al.*, 1998). L'activation du diméthylbenzanthrène est ainsi bloquée. Rinaldi et al. montrent que la curcumine peut activer AhR tout en inhibant l'activation des carcinogènes induite par CYP1A1 (Rinaldi, *et al.*, 2002).

• Enzymes de la phase II du métabolisme des médicaments

Les GST étant des enzymes de détoxification, elles participent activement à l'élimination des carcinogènes et des mutagènes. L'utilisation d'activateur de GST est donc une bonne stratégie de prévention du cancer, bien que la GSTP1-1 puisse la conjuguer au GSH, grâce à ses 2 groupements électrophiles, et ainsi permettre son expulsion de la cellule (Awasthi, *et al.*, 2000). Par contre, les GST sont souvent sur-exprimées dans les cellules cancéreuses, ce qui favorise le développement de résistance aux agents anti-cancéreux, rendant les activateurs de GST dangereux en chimiothérapie.

Il a été montré que la curcumine induit l'activité des enzymes de phase II du système GSH chez la souris mâle, et particulièrement les GST et la quinone réductase dans le foie et les reins (Iqbal, *et al.*, 2003). La curcumine induit le même effet chez la souris (Susan et Rao, 1992). Par contre, cet effet semble être concentration-dépendant et, si la curcumine active l'activité GST à faible dose, de plus hautes concentrations inhibent l'activité des GST envers le 1-chloro-2,4-dinitrobenzène chez le rat (Piper, *et al.*, 1998). De la même manière, van Iersel et al. montrent que la curcumine est un puissant inhibiteur de la GST dans des cellules de mélanomes humains dont l'isozyme majoritairement exprimée est la GSTP1-1 (Iersel, *et al.*, 1996). Parallèlement, la curcumine peut inhiber l'activité GST et le CYP 1A1/1A2 de cellules traitées par différents agents tels que le phénobarbital, la β -naphtoflavone et le pyrasole (Oetari, *et al.*, 1996).

Chez le rat, la curcumine permet de restaurer un taux normal de GSTP dans les cellules hépatiques (Shukla et Arora, 2003).

A notre connaissance, aucune publication ne décrivait jusqu'à présent l'effet direct de la curcumine sur les mécanismes moléculaires de l'expression du gène codant la GSTP1-1 (Figure 11 et 12).

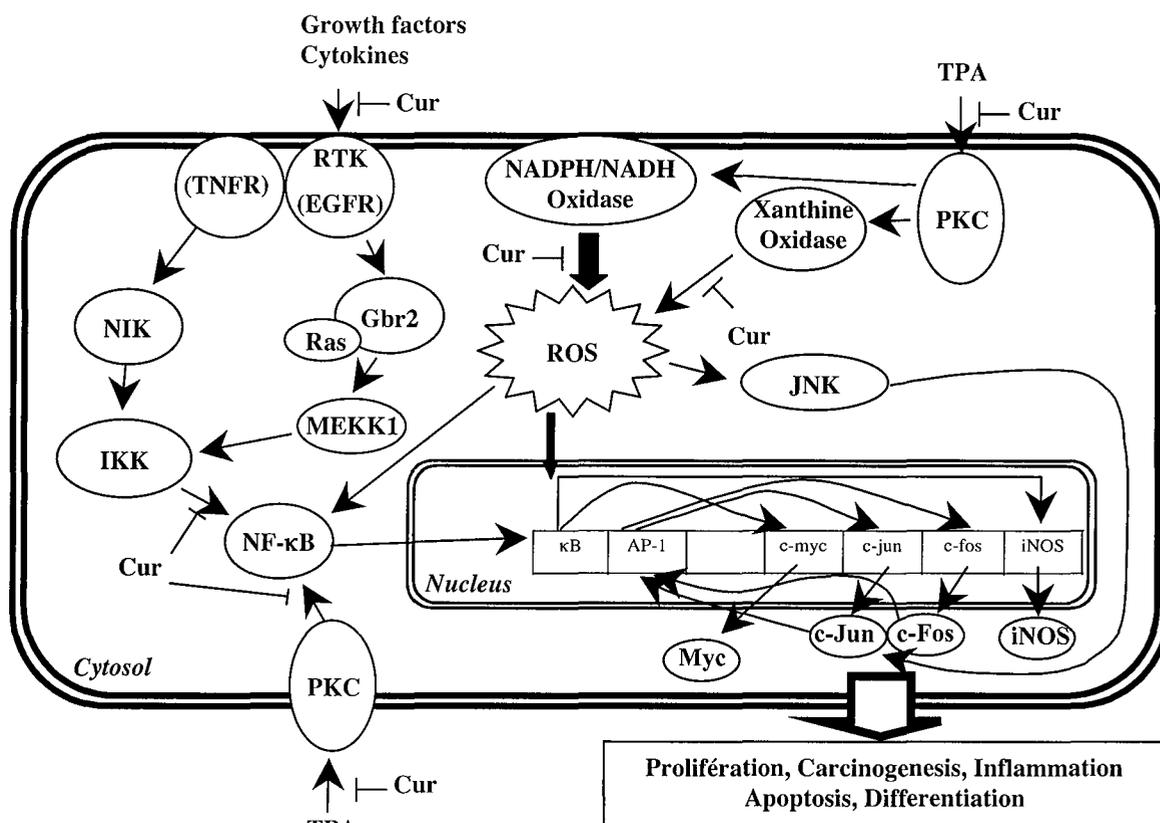
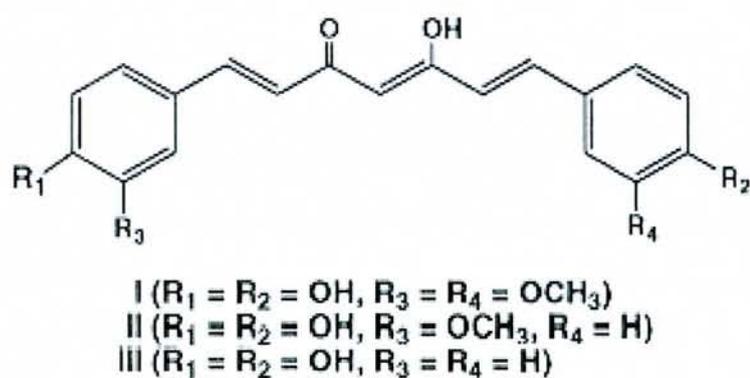


Figure 11: Mécanisme d'action de la curcumine. Selon Li et Lin-Shia (2001).

Des facteurs extracellulaires tels que le TPA se lient à des récepteurs membranaires et activent ainsi des kinases intracellulaires. Les facteurs c-Jun et c-Fos sont activés ainsi que le facteur NF-κB. Ces facteurs jouent un rôle dans l'expression de c-Myc, iNOS et d'autres gènes de prolifération. La curcumine peut bloquer plusieurs des mécanismes menant à l'activation de AP-1, NF-κB, c-Myc et iNOS (Li, J. K. et Lin-Shia, 2001).

(A)



(B)



(C)

Potentiel antioxydant	Potentiel anti-inflammatoire	Potentiel anti-cancérogène	Inhibition de NF-κB et AP-1	Caractéristique spécifique	Apoptose
+	+	+	+/+	Inhibe CYP450 et GSTP1-1 chez l'homme. Active la GSTP1 chez le rat	Induit l'apoptose. Inhibe l'apoptose induite par des agents chimiothérapeutiques

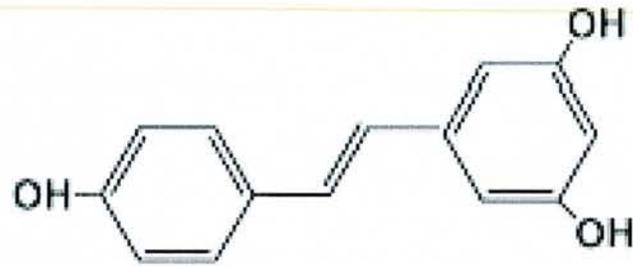
Figure 12: La curcumine.

(A) Structure: 1,7-bis[4-hydroxy-3-méthoxyphényl]-1,6-heptadiène-3,5-dione, (B) Origine: *Curcuma longa*. (C) Principales caractéristiques.

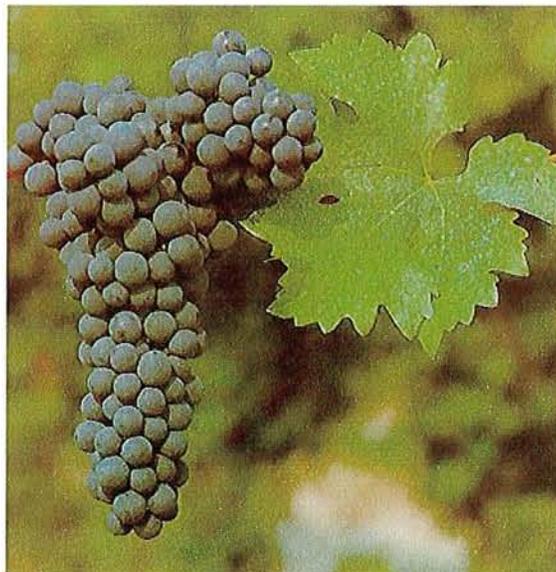
2 - Le resvératrol

Le resvératrol est une substance naturelle extraite du raisin et que l'on retrouve ainsi dans le vin rouge participant activement au phénomène appelé " paradoxe français ". En effet, il présente de fortes propriétés anti-inflammatoires, anti-oxydantes et anticancéreuses (Cal, *et al.*, 2003). Cet agent chimiopréventif permet d'inhiber la prolifération cellulaire de tumeurs colorectales et bloque les cellules en phase G2/M (Delmas, *et al.*, 2002). Il a aussi été montré que le resvératrol inhibe la lipoxigénase et la cyclooxygénase, protégeant les cellules leucémiques K562 de l'apoptose induite par l'eau oxygénée (MacCarrone, *et al.*, 1999). Le resvératrol exerce un effet inhibiteur au niveau de la voie de signalisation de AP-1 en inhibant l'activité des kinases ERK2 et JNK dans les cellules HeLa (Yu, *et al.*, 2001). On observe un effet identique dans les cellules U937 (Manna, *et al.*, 2000) et les propriétés anti-inflammatoires de ce composé sont mises en évidence par l'inhibition de la voie de signalisation de NF- κ B activée par le TNF α . Ce phénomène semble passer par l'inhibition de la dégradation de I κ B (Murakami, *et al.*, 2003). Le resvératrol montre aussi un effet protecteur en inhibant l'apoptose induite par le TNF α , bien qu'il puisse induire l'apoptose dans des cellules de cancer de la prostate (LNCaP et DU 145) indépendamment du contexte hormonal (Morris, *et al.*, 2002). L'apoptose induite par le resvératrol dans les cellules JB6 est dépendante de l'induction de p53 pour laquelle ERK, JNK et p38 semblent impliqués (Dong, 2003). De par sa structure, le resvératrol a été considéré comme un phyto-estrogène de type I (Gehm, *et al.*, 1997), et Levenson *et al.* et Schmitt *et al.* montrent qu'il agit comme un agoniste des récepteurs aux estrogènes même s'il peut aussi activer d'autres voies (Levenson, *et al.*, 2003, Schmitt, *et al.*, 2002). Cependant, en présence d'estrogène, le resvératrol a un effet antagoniste et bloque la prolifération cellulaire induite par le 17-beta-estradiol dans les cellules MCF-7 (Figure 13) (Lu et Serrero, 1999).

(A)



(B)



(C)

Potentiel antioxydant	Potentiel anti-inflammatoire	Potentiel anti-cancérogène	Inhibition de NF-κB et AP-1	Caractéristique spécifique	Apoptose
+	+	+	+/+	Structure estrogène-like	Induit l'apoptose. Inhibe l'apoptose induite le TNFα

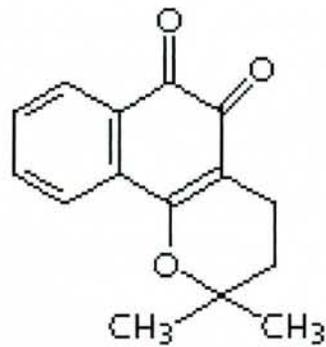
Figure 13: Le resvératrol.

(A) Structure: 3,4,5-trihydroxy-trans-stilbène, (B) Origine: raisin (*Vitis vinifera*) (C) Principales caractéristiques.

3 - Le beta-lapachone

Le β -lapachone est un dérivé naturel de la substance extraite de l'arbre Lapacho : le lapachol. Il présente des propriétés antifongiques et antibactériennes. Il a été montré que le β -lapachone est un inhibiteur de l'ADN topoisomérase I dont le mécanisme d'action diffère de celui des inhibiteurs communs tels que la camptothécine : en effet le β -lapachone agirait en interaction directe avec l'enzyme sans inhiber sa fixation sur l'ADN (Li, C. J., *et al.*, 1993). Le β -lapachone présente aussi des propriétés anti-inflammatoires comme le montrent Manna *et al.* en inhibant l'activation de la voie de transduction du signal aboutissant à l'activation de NF- κ B par le TNF- α dans des cellules leucémiques U937 (Manna, *et al.*, 1999). Dans les mêmes conditions, cet agent chimiopréventif inhibe la fixation des facteurs de transcription AP-1 ainsi que les activités des kinases MEK et JNK. Il montre aussi un rôle protecteur en inhibant l'apoptose induite dans ces cellules par le TNF α . Cependant il est capable d'initier l'apoptose de certaines cellules comme les cellules HL-60 (Li, C. J., *et al.*, 1995, Planchon, *et al.*, 1995), MCF-7, T47D (Pink, *et al.*, 2000), dans plusieurs lignées de cancer de colon (SW480, SW620, DLD1) (Huang, L. et Pardee, 1999) et de la prostate (Li, C. J., *et al.*, 1995). Ce phénomène est indépendant de p53 (Li, C. J., *et al.*, 1995, Planchon, *et al.*, 1995), mais impliquerait la NQO1 (Planchon, *et al.*, 2001) et l'augmentation de la concentration cytoplasmique en calcium (Tagliarino, *et al.*, 2001). (Figure 14)

(A)



(B)



(C)

Potentiel antibactérien	Potentiel anti-viral	Potentiel anti-cancérogène	Inhibition de NF- κ B et AP-1	Caractéristique spécifique	Apoptose
+	+	+	+/+	Inhibiteur de la DNA topoisomérase I	Induit l'apoptose. Inhibe l'apoptose induite par le TNF α

Figure 14: Le β -lapachone.

(A) Structure (B) Origine: Lapacho tree (*Tabebuia avellanedae*) (C) Principales caractéristiques.

4 - Le trans-anéthole

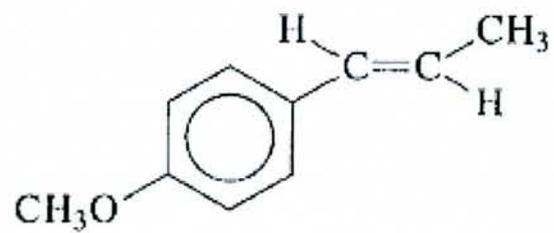
Le trans-anéthole est une substance naturelle présente dans l'anis, le fenouil et le camphre, qui présente les caractéristiques d'un agent chimiopréventif : en effet, il peut bloquer la prolifération d'une tumeur chez la souris (al-Harbi, *et al.*, 1995) et chez l'homme particulièrement pour les cancers du colon (Reddy, B. S., 1996, 1997, Reddy, B. S., *et al.*, 1993).

Le trans-anéthole est aussi un anti-inflammatoire et un antioxydant comme le montrent Chainy *et al.* en inhibant l'induction de NF- κ B et de AP-1 par le TNF α dans les cellules ML1a (Chainy, *et al.*, 2000). De même, l'anétholdithioéthione inhibe l'activation de NF- κ B par différents stimuli comme l'eau oxygénée, le TPA ou le TNF α dans les cellules T Jurkat (Sen, C. K., *et al.*, 1996).

Ses propriétés anti-microbiennes et antifongiques ont été décrites (De, *et al.*, 2002, Kubo, *et al.*, 2001) et on sait que le trans-anéthole peut inhiber l'effet génotoxique de certaines substances (Abraham, 2001). De plus, le fenouil et l'anis sont depuis longtemps utilisés comme agents estrogéniques pour accroître la production de lait, faciliter les naissances et augmenter la libido. Le trans-anéthole a été considéré comme l'élément essentiel responsable de ces effets, mais les polymères tels que le dianéthole et le photoanéthole semblent être plus actifs (Albert-Puleo, 1980).

Parallèlement, Rompelberg *et al.* ont montré que le trans-anéthole peut activer l'activité GST cytosolique ainsi que d'autres enzymes de phase II dans le foie de rat (Rompelberg, *et al.*, 1993). L'anétholdithioéthione quant à lui peut induire l'augmentation du niveau de GSH intracellulaire dans les cellules T Jurkat, créant ainsi une protection contre des agents cytotoxiques comme l'eau oxygénée et le 4-hydroxynonanal (Khanna, *et al.*, 1998). Le même phénomène est observé chez le rat (Bouthillier, *et al.*, 1996). (Figure 15)

(A)



(B)



(C)

Potentiel antioxydant - inflammatoire	Potentiel anti-fongique-bactérien	Potentiel anti-cancérogène	Inhibition de NF-κB et AP-1	Caractéristique spécifique	Apoptose
+	+	+	+/+	Caractère œstrogénique. Inhibe les GST	?

Figure 15: Le trans-anéthole.

(A) Structure: trans-1-méthoxy-4-(1-propenyl)benzène, (B) Origine: Fenouil (*Anethum foeniculum*) (C) Principales caractéristiques.

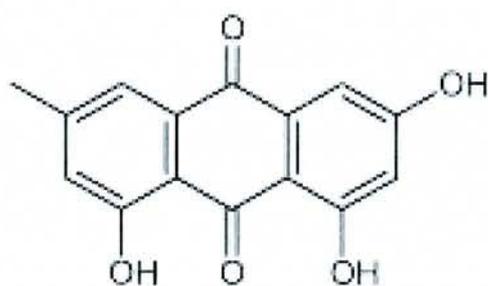
5 – L'émودية

L'émودية est une toxine extraite de différentes plantes et racines telles que *Rumex hymenosepalus* (Buchalter, 1969), le marron infesté par les charançons (Wells, *et al.*, 1975), *Rheum palmatum* (Chen, Y. C., *et al.*, 2002b) ou *Cassia siamea* (Koyama, *et al.*, 2002). C'est un agent chimiopréventif qui présente des propriétés antifongiques, antibactériennes, anti-inflammatoires et anticancéreuses. En effet, l'émودية est capable de bloquer la progression de tumeurs chez la souris (Koyama, *et al.*, 2002), ainsi que d'un carcinome de poumon humain (Lee, H. Z., 2001) et de la prolifération de la lignée cellulaire HL-60 (Chen, Y. C., *et al.*, 2002b) en induisant l'apoptose de ces cellules indépendamment d'une production de ERO.

Par ailleurs, l'émودية induit la différenciation de cellules de cancer de sein sur-exprimant HER-2/neu (Zhang, L., *et al.*, 1995), un proto-oncogène qui code le récepteur tyrosine kinase p185neu. La sur-expression de cet oncogène est courante dans les cancers de sein et est associée à un mauvais pronostic. L'émودية est un inhibiteur de tyrosine kinase qui permet de supprimer les activités auto- et trans-phosphorylante du récepteur. En parallèle, elle ne permet pas l'inhibition de l'activation de NF- κ B dans ces lignées cellulaires (Bhat-Nakshatri, *et al.*, 2002).

Cependant, l'émودية inhibe fortement l'activation de NF- κ B par le TNF α dans une lignée de cellules endothéliales de veine ombilicale (EC) (Kumar, *et al.*, 1998) ainsi que l'expression de protéines impliquées dans l'adhésion cellulaire. Cet agent chimiopréventif serait donc un bon candidat pour combattre l'inflammation. (Figure 16).

(A)



(B)



(C)

Potentiel antioxydant - inflammatoire	Potentiel anti-fongique-bactérien	Potentiel anti-cancérogène	Inhibition de NF-κB et AP-1	Caractéristique spécifique	Apoptose
+	+	+	+ (sauf HER-2/neu+/+)	Différencie les cellules cancéreuses HER-2/neu+	?

Figure 16: L'émrodine.

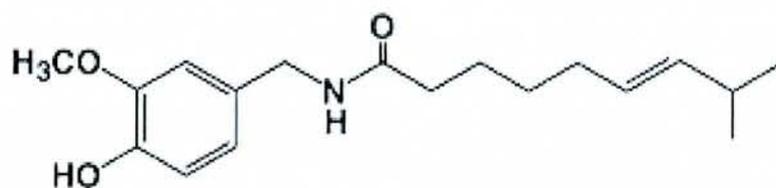
(A) Structure 1,3,8-trihydroxy-6-méthyl-anthraquinone (B) Origine: *Rhamnus frangula L.* (C) Principales caractéristiques.

6 – La capsaïcine

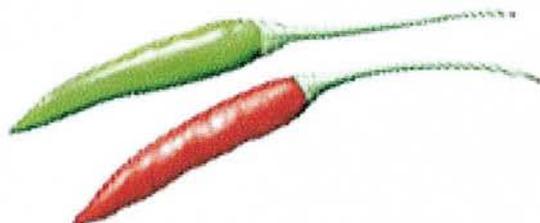
La capsaïcine, un dérivé de la vanilline, est extraite des piments et a été utilisée comme anti-viral et anti-inflammatoire. Elle induit l'apoptose des cellules transformées et présente les caractéristiques des chimiopréventifs. Elle inhibe l'initiation des tumeurs du poumon chez la souris induite par le benzo(a)pyrène ou le 9, 10-déméthyl-1, 2-benzanthracène (Jang, *et al.*, 1989). Néanmoins, Agrawal et al. ont montré que des extraits de piments peuvent initier la formation de tumeurs stomacales chez la souris BALB/c (Agrawal, R. C., *et al.*, 1986). Cependant, son effet chimiopréventif est confirmé par le fait que la capsaïcine inhibe les monooxygénases microsomales qui sont impliquées dans l'activation des carcinogènes. De plus, elle atténue la capacité mutagène de certaines substances (Surh, Y. J., *et al.*, 1995). En fait, la capsaïcine a des effets contradictoires (Surh, Y. J., *et al.*, 1998, Surh, Y. J. et Lee, 1995): elle interagit avec les enzymes du métabolisme des xénobiotiques, qui sont impliquées dans l'activation ainsi que dans la détoxification d'agents carcinogènes. De plus, le cytochrome P450 2E1 peut activer la capsaïcine en un intermédiaire capable de se lier de façon covalente à certaines enzymes et macromolécules, ce qui peut conduire à une toxicité menant à la nécrose, la mutagenèse ou la cancérogenèse. D'un autre côté, l'inhibition du cytochrome P450 par la capsaïcine permet d'éviter son activation ainsi que celle d'autres xénobiotiques. Park et Surh ont montré que la capsaïcine n'a pas d'effet tumorigène chez la souris (Park, K. K. et Surh, 1997) et qu'elle peut inhiber la progression de tumeurs du colon chez le rat tout en activant les GST (Yoshitani, *et al.*, 2001). Cependant Archer et Jones, dans une étude des populations utilisant de grandes quantités de piments ou de poivre, montrent une plus grande incidence de cancers gastriques et donc un effet cancérigène de la capsaïcine et du safrole (Archer and Jones, 2002).

Malgré ces contradictions, la capsaïcine présente une activité anti-inflammatoire. En effet, la capsaïcine inhibe l'activation de NF- κ B et AP-1 par le TPA chez la souris et dans les cellules HL60 (Han, *et al.*, 2002, Han, *et al.*, 2001, Surh, Y. J., *et al.*, 2000) ainsi que dans certaines lignées cancéreuses humaines (ML1a, U937, HeLa) (Singh, *et al.*, 1996). (Figure 17)

(A)



(B)



(C)

Potentiel antioxydant - inflammatoire	Potentiel anti-fongique-bactérien	Potentiel anti-cancérogène	Inhibition de NF-κB et AP-1	Caractéristique spécifique	Apoptose
+	+	+/-	+/+	Inhibe CYP450 qui l'active	Induit l'apoptose.

Figure 17: La capsaïcine.

(A) Structure: 8-méthyl-N-vanillyl-6-nonenamide (B) Origine: Piments (*Capsicum annuum*)

(C) Principales caractéristiques.

7 – La sanguinarine

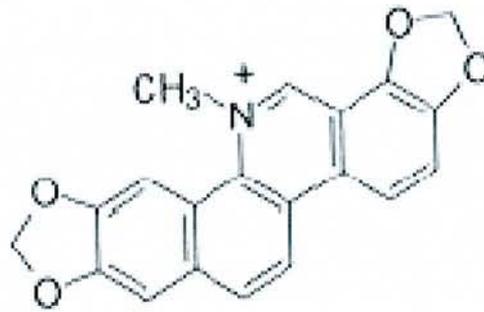
La sanguinarine est une substance naturelle extraite de *Sanguinaria canadensis* L. Elle possède des propriétés anti-microbiennes et anti-inflammatoires et est utilisée dans les dentifrices et solutions anti-plaque pour combattre la formation de la plaque dentaire en inhibant la capacité d'adhésion des bactéries sans modifier la flore buccale (Cullinan, *et al.*, 1997, Godowski, 1989).

La sanguinarine inhibe l'induction de NF- κ B par différents activateurs tels que le TNF α , le TPA, l'IL1 β ou l'acide okadaïque (Chaturvedi, *et al.*, 1997). Cet effet inhibiteur serait dû à une fonction thiol très réactive qui agit sur un intermédiaire de la voie de transduction du signal menant à l'activation de NF- κ B.

La sanguinarine peut aussi induire la mort cellulaire dans des cellules leucémiques exprimant un faible taux de Bcl-2 telles que les K562 (Weerasinghe, *et al.*, 2001a, Weerasinghe, *et al.*, 2001b, 2001c). Cette mort cellulaire est concentration dépendante : une faible concentration conduit à l'apoptose alors qu'une forte concentration conduit à la pycnose, une forme de mort cellulaire pour laquelle les cellules présentent des corps apoptotiques sans dégradation de l'ADN en échelle. Par ailleurs, une sur-expression de Bcl-2, comme dans les cellules JM1, bloque l'induction de la mort cellulaire par la sanguinarine.

De plus, elle permet l'induction de l'apoptose dans des cellules d'adénocarcinome humain de prostate PC3 ainsi que dans des cellules non-transformées (Debiton, *et al.*, 2003) ou dans des cellules d'épiderme, cancéreuses (A431) ou non (NHEK) (Ahmad, *et al.*, 2000). Cet effet toxique, indépendant de la transformation cellulaire, limite grandement son utilisation éventuelle en chimiothérapie. (Figure 18)

(A)



(B)



(C)

Potentiel antioxydant - inflammatoire	Potentiel anti-fongique-bactérien	Potentiel anti-cancérogène	Inhibition de NF-κB et AP-1	Caratéristique spécifique	Apoptose
+	+	+	+/?	Est utilisée dans les dentifrices	Induit l'apoptose dans les cellules à faible taux de Bcl2 et dans certaines cellules saines.

Figure 18: La sanguinarine.

(A) Structure (B) Origine: *Sanguinaria canadensis* (C) Principales caractéristiques.

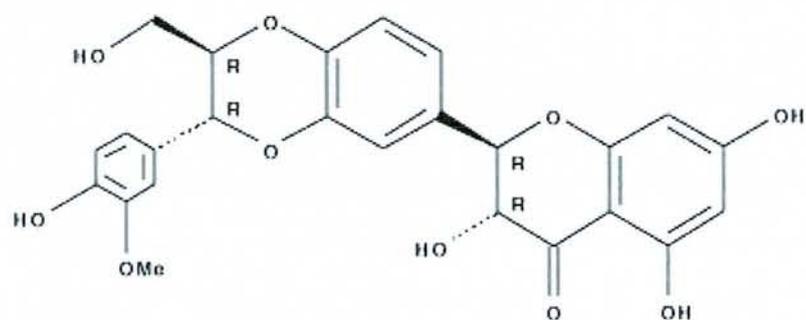
8 – La silymarine

La silymarine est une substance naturelle présente dans les fruits et les graines du chardon (*Silybum marianum L. Gaertn.*). Cet extrait est un mélange de différentes substances actives dont la silybine, l'isosilybine, la sylimarine et la silychristine. Ce mélange est un agent chimiopréventif montrant des propriétés anti-inflammatoires et anti-oxydantes. Il apporte une protection du foie en cas de cirrhose, grâce à un effet antioxydant et une protection des membranes contre la peroxydation (Rui, 1991, Wellington et Jarvis, 2001) et pourrait avoir un effet sur le métabolisme du cholestérol en inhibant sa synthèse (Skottova et Krecman, 1998).

Il a été montré que la silymarine peut bloquer le stress oxydant et la cancérogenèse induits chez la souris par les UV (Katiyar, 2002) ou le TPA (Lahiri-Chatterjee, *et al.*, 1999), ainsi que la cancérogenèse induite par l'azoxyméthane dans le colon de rat, tout en accroissant l'activité des enzymes de détoxification dont la GST (Kohno, *et al.*, 2002). Cette inhibition pourrait être due à l'inhibition d'une tyrosine kinase : l'epidermal growth factor receptor qui est impliquée dans la prolifération et la croissance cellulaire (Ahmad, *et al.*, 1998). La silymarine peut en effet induire l'apoptose et inhiber la croissance cellulaire de cellules transformées de rat PCA (Tyagi, *et al.*, 2002).

De plus la silybine est un inhibiteur naturel de la GST de rat (Bartholomaeus, *et al.*, 1994), de la prostaglandine synthétase (Fiebrich et Koch, 1979b) et de la lipoxigénase (Fiebrich et Koch, 1979a), enzymes impliquées dans la cancérogenèse, suggérant un potentiel anticancéreux élevé en chimiothérapie. (Figure 19)

(A)



(B)



(C)

Potentiel antioxydant - inflammatoire	Potentiel anti-cholesterol	Potentiel anti-cancérogène	Inhibition de NF-κB et AP-1	Caractéristique spécifique	Apoptose
+	+	+	+/?	Inhibe la GST de rat	?

Figure 19: La silymarine.

(A) Structure de la silybine 2,3-dihydro-3-[4-hydroxy-3-méthoxyphényl]-2-[hydroxyméthyl]-6-[3,5,7-trihydroxy-4-oxobenzopyran-2-yl]benzodioxine (B) Origine: Chardon (*Carduus nutans*) (C) Principales caractéristiques.

OBJECTIFS

Le but général de notre travail est de mieux comprendre la régulation de l'expression du gène humain codant 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 aux changements qui interviennent, lors d'un traitement, au niveau des facteurs de transcription, des voies de transduction du signal, de la transcription et de l'expression de la GSTP1-1.

Notre hypothèse générale de travail est la suivante :

Dans les différents modèles cellulaires de leucémies humaines, l'expression de la GSTP1-1 est-elle régulable/inductible :

- **par la voie de transduction du stress et de la prolifération ?**
- **par la voie des médiateurs de l'inflammation ?**
- **par des inhibiteurs de ces voies de transduction du signal ?**

Afin de répondre à notre hypothèse générale, nous nous sommes fixé comme objectifs spécifiques de répondre aux questions suivantes :

- La *GSTP1-1* est-elle inductible par l'ester de phorbol TPA, par les métaux lourds ou par les médicaments anticancéreux ?

Nous étudierons dans un premier temps l'effet des agents inducteurs de AP-1 tel que l'ester de phorbol TPA ainsi que des métaux lourds sur l'expression de l'ARN et de la protéine de la GSTP1-1 par les techniques de Northern et de Western blot. Nous pourrions ainsi déterminer si le site TRE présent sur le promoteur minimal du gène de la *GSTP1-1* est inductible et quelle est son importance dans la régulation de l'expression du gène humain comparé au gène de rongeur.

Afin de compléter cette étude, nous réaliserons en parallèle l'hybridation de macroarray, représentant les ARN messagers de différentes lignées cellulaires traitées par des agents chimiothérapeutiques différents, avec l'ADNc de la *GSTP1-1*.

- Les voies de transduction du stress, de la prolifération ou de l'inflammation interviennent-elles dans la régulation de l'expression de la GSTP1-1 éventuellement par l'intermédiaire de sites régulateurs nouveaux ?

Pour la deuxième partie de cette thèse, nous étudierons les voies de transduction du signal menant potentiellement à l'expression de la GSTP1-1 en relation avec le stress et l'inflammation. Les deux voies principales, AP-1 qui comprend les kinases ras – raf – ERK – MAPK, et NF-κB, qui passe par TNFR1, TRAFF, NIK, IKK et IκB, seront étudiées grâce à des transfections transitoires ou à l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques.

Ensuite, nous déterminerons s'il existe ou non d'autres sites présents sur le promoteur du gène de la *GSTP1-1* qui pourraient potentiellement être impliqués dans sa régulation en utilisant d'abord un outil informatique, puis, la technique du gel retard pour étudier et caractériser le ou les site(s) NF-κB présent(s) sur le promoteur du gène de la *GSTP1-1*. Nous utiliserons pour cela un activateur typique de NF-κB : le TNFα.

- Comment inhiber les mécanismes préalablement observés afin d'appliquer les connaissances acquises en vue d'une diminution potentielle des mécanismes de chimiorésistance ?

Afin de répondre à ce dernier objectif, nous essayerons d'inhiber l'expression de la GSTP1-1 grâce à différents agents chimiopréventifs tels que la curcumine, le resvératrol et d'autres substances naturelles connues pour avoir un effet anti-inflammatoire. A cette fin, nous utiliserons les techniques de transfection transitoire et de gel retard. Nous utiliserons la technique du microarray afin de mettre en évidence les variations au niveau du génome entier suite au traitement par un des agents chimiopréventifs, la curcumine.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1 - Lignées cellulaires

1.1 - Matériel

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

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 Lozzio, 1975). Il s'agit de cellules indifférenciées, capables de s'orienter vers l'une des trois lignées circulantes : érythroïde, granulocytaire ou monocytaire. 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 monocytaire.

Jurkat, lignée établie à partir des cellules périphériques d'un jeune garçon de 14 ans atteint d'une leucémie aiguë T.

Raji, lignée continue issue de cellules provenant du maxillaire d'un garçon de 11 ans atteint d'un lymphome de Burkitt. Ces cellules n'expriment pas la GSTP1-1.

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

Lignée	Type de leucémie	Marqueur de surface	Type cellulaire
JURKAT	Leucémie à cellules T aiguë	CD2+, CD3+, CD4+, CD5+, CD6+, CD7+, CD8-, CD13-, CD19-, CD34+, TCRalpha/beta+, TCRgamma/delta-	Cellules souches lymphoïdes
K562	Leucémie myéloïde chronique	CD3-, CD13+, CD19-, CD34-, CD41(+), CD42+, CD45+, CD71+, GlyA(+)	Erythroblastes
U937	Lymphome histiocytique	CD3-, CD13(+), CD14-, CD15+, CD19-, CD33+, CD34-, CD68+	Monoblastes
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 (Glutamine stabilisée) et supplémenté en sérum de veau fœtal 10 % (v/v) (Biowhittaker)

Antibiotiques et antimycotique : 1 % (v/v) (Biowhittaker)

1.2 - Méthode

Toutes les cellules sont cultivées dans un milieu liquide RPMI 1640 contenant 2 mg/ml de D-Glucose et du Glutamax, 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 fœtal (SVF) 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 200 000 cellules/ml. Pour le repiquage, tous les deux jours, les cellules non-adhérentes sont centrifugées puis réensemencées à la concentration initiale.

Avant traitement, les cellules sont cultivées 24 h dans du milieu contenant 0,1 % de SVF. Puis les cellules sont soumises au traitement.

2 - Northern blot

2.1 - Matériel

- Les ARN totaux sont extraits en utilisant le kit Nucleospin (Macherey-Nagel).
- Toutes les solutions sont préparées avec de l'eau traitée par le DEPC (diéthyl-pyrocabonate, ICN, Belgique), puis autoclavées.

Tampon MOPS 10 X (pH 7)

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

Tampon de migration :

Tampon MOPS	1 X
-------------	-----

Tampon échantillon :

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

SSC 20 X : pH ajusté à 7,0

NaCl	3 M
Citrate de Sodium	0,3 M

SDS 10 %

2.1.1 - Hybridation

Tampon Denhart's 50 X :

Ficoll	0,5 g/l
Polyvinylpyrrolidone	0,5 g/l
Albumine sérique bovine	0,5 g/l

Tampon de préhybridation/hybridation pour sonde ADN

Formamide	50 %
SSC	6 X
EDTA	5 mM
SDS (dodécyl sulfate de sodium)	0,1 %

A ajouter extemporanément après dénaturation 5 minutes à 100 °C :

ADN de sperme de hareng	200 $\mu\text{g/ml}$ (GIBCO-BRL, Belgique)
ARNt de levure	100 $\mu\text{g/ml}$ (GIBCO-BRL, Belgique)
Denhart's	5 X

2.1.2 - Préparation des sondes

Fragment d'ADN génomique codant pour la *GSTP1-1* humaine de 0,72 kb (American Type Culture Collection, Rockville, MD).

Rediprime™ II (AP Biotech) : ce kit de marquage requiert l'utilisation de [$\gamma^{32}\text{P}$]-dCTP.

[$\gamma^{32}\text{P}$]-dCTP (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$) activité spécifique : 3000 Ci/mmol (AP Biotech).

QIAquick Nucleotides Removal Kit (Qiagen).

2.2 - Méthode

2.2.1 - Préparation du gel

Agarose	1 % dans de l'eau DEPC
Tampon MOPS	1 X
Formaldéhyde	2 %
Bromure d'éthidium	7 $\mu\text{g/ml}$

2.2.2 - Traitement des échantillons

La concentration en ARN des échantillons est mesurée au spectrophotomètre à 260 nm (une unité d'absorbance correspond à 40 $\mu\text{g/ml}$ d'ARN).

10 μg d'ARN totaux sont additionnés de :

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

Le mélange est incubé à 65 °C pendant 15 minutes, puis additionné de 2 μ l de tampon échantillon. 22 μ l sont déposés dans chaque puits.

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

2.2.3 - Transfert des ARN

Après électrophorèse, les ARN sont transférés sur une membrane de nylon Hybond-XL (Amersham,) grâce à un "vacuum-blotter" pendant 1 h à 50 mbar.

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

2.2.4 - Hybridation

La membrane est mise à préhybrider avec 10 ml de tampon de préhybridation pour 100 cm² à 42 °C, sous agitation pendant 2 à 4 h dans un four à hybrider (Appligène, Strasbourg). La solution de préhybridation est ensuite remplacée par 10 ml de tampon de préhybridation contenant 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 2 X, SDS 0,5 %, sous agitation.

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

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

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

2.2.5 - Préparation des sondes

Le kit de marquage RediPrime (Amersham) utilisé permet un marquage rapide des sondes d'ADN par la méthode du "random priming". Il contient à l'état lyophilisé le fragment de Klenow de l'ADN polymérase I, les déoxyribonucléotides sauf le dCTP et les amorces composées d'octamères qui vont s'apparier de façon aléatoire au fragment d'ADNc de la sonde.

25 ng d'ADNc, dans un volume de 45 μ l de tampon TE, 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 [γ ³²P]dCTP à 3000 Ci/mmol (10 μ Ci/ μ l). Le marquage de la sonde se fait pendant une heure 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.

2.2.6 – Hybridation de macroarrays

Les macroarrays (Cancer Cell Line Profiling Array, BD Clontech) utilisées sont des membranes de nylon sur lesquelles sont fixés des ADNc amplifiés grâce à la technologie BD SMART™ à partir des ARNm de tissus. Ces ADNc représentent la totalité des ARNm exprimés dans les tissus utilisés et conserve l'abondance relative de l'ARNm original.

Elles sont hybridés selon la même technique que les northern blot. Les membranes sont préincubées 30 min à 68 °C avec une solution d'hybridation ExpressHyb™ Hybridization Solution (BD Clontech) additionnée d'ADN de sperme de hareng. La sonde GSTP1-1 est marquée comme indiqué précédemment et incubée avec la membrane dans un four à hybridation à 68 °C pendant la nuit dans la même solution d'hybridation. Les membranes sont alors lavées 4 fois dans une solution de SSC 2X, SDS 0,5 % à 68 °C pendant 30 min et une fois dans une solution de SSC 0,2X, SDS 0,5 % à 68 °C pendant 30 min. Un lavage final de 5 min à température ambiante dans du SSC 2X est réalisé avant d'exposer la membrane sur un

PhosphorImager. Les membranes sont déshybridées aussitôt après la révélation dans du SDS 0,5 % bouillant pendant 5 à 10 min et sont conservées à -20°C dans un film plastique.

3 - Stabilité des ARN.

L'actinomycine D est un inhibiteur de l'ARN polymérase qui permet de bloquer la transcription et d'observer ainsi la dégradation des ARNm et d'en déterminer la stabilité.

Les cellules sont traitées avec $5\ \mu\text{g/ml}$ d'actinomycine D pendant des temps différents. Les ARNm extraits sont alors étudiés en Northern blots. La demi-vie est donnée par le temps de traitement à l'actinomycine nécessaire pour que 50 % des ARNm soient dégradés, par rapport à un témoin de cellules non traitées.

4 - Western blot

4.1 - Matériel

Tampon de lyse des cellules

Tampon MPer (Pierce, USA) additionné d'anti-protéases (Mini Complete, EDTA free, Roche, Allemagne).

PBS-T qsp 1000 ml :

PBS 10 X	100 ml
Tween 20	1 ml

Tampon d'électrophorèse 10 X qsp 1000 ml :

Tris	30 g
Glycine	144 g
SDS	10 g

Tampon de transfert 1 X qsp 1000 ml :

Tris	3 g
Glycine	14,4 g
Méthanol	50 ml

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

Tris-HCl, pH 6,8	0,125 M
Glycérol	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 0,5 M, pH 6,8	0,125 M
SDS	0,1 %
Persulfate d'ammonium	0,1 %
TEMED	0,05 %

Gel de polyacrylamide de séparation à 12 %

Polyacrylamide (mono/bis 37,5 :1)	12 %
Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8	0,375 M
SDS	0,1 %
Persulfate d'ammonium	0,1 %
TEMED	0,05 %

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

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

Lait écrémé en poudre Gloria.

Tableau V: Dilutions des anticorps utilisés

Anticorps primaire	Anticorps secondaire (Santa Cruz Technology)
Anticorps anti-GSTP1-1 (Transduction laboratories, USA) polyclonal de souris, dilué au 1:20 000 dans du PBS-T	Anticorps de chèvre anti-souris conjugué à la peroxydase de raifort, dilué au 1:5000 dans du PBS-T
Anticorps anti-procaspase 8 (PharMingen) polyclonal de lapin, dilué au 1:500 avec 5% de lait écrémé dans du PBS-T	Anticorps d'âne anti-lapin conjugué à la peroxydase de raifort, dilué au 1:20 000 avec 5% de lait écrémé dans du PBS-T
Anticorps anti-procaspase 9 (PharMingen) polyclonal de lapin, dilué au 1:1000 avec 5% de lait écrémé dans du PBS-T	Anticorps d'âne anti-lapin conjugué à la peroxydase de raifort, dilué au 1:20 000 avec 5% de lait écrémé dans du PBS-T
Anticorps anti-BID (Cell Signaling Technology) polyclonal de lapin, dilué au 1:1000 avec 5% de lait écrémé dans du PBS-T	Anticorps d'âne anti-lapin conjugué à la peroxydase de raifort, dilué au 1:20 000 avec 5% de lait écrémé dans du PBS-T
Anticorps anti-PARP (PharMingen) monoclonal de souris, dilué au 1:2000 avec 5% de lait écrémé dans du PBS-T	Anticorps de chèvre anti-souris conjugué à la peroxydase de raifort, dilué au 1:5000 avec 5% de lait écrémé dans du PBS-T
Anticorps anti-β actine (Sigma) monoclonal de souris, dilué au 1:5000 avec 5% de lait écrémé dans du PBS-T	Anticorps de chèvre anti-souris conjugué à la peroxydase de raifort, dilué au 1:10 000 avec 5% de lait écrémé dans du PBS-T

4.2 - Méthode

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

10⁶ cellules sont lysées directement dans du tampon de lyse des cellules (1 ml pour 100 mg de cellules) ou dans du tampon SDS 0,1 % (pour les Western blot PARP). Après 10 minutes à température ambiante, le lysat est centrifugé 15 minutes à 27000 g à 4°C. La concentration protéique des échantillons est déterminée par dosage colorimétrique selon la méthode de Bradford, (1976). 5 µg de protéines totales sont additionnés du même volume de tampon échantillon dénaturant 2 X, puis portés à 100 °C au bain-marie pendant 5 minutes. Les échantillons sont déposés puis mis à migrer à 70 V. Lorsque les échantillons passent dans le gel de séparation, la migration se fait à 100 V. Les protéines sont alors transférées pendant 1 heure sur une membrane de PVDF dans le tampon de transfert 1 X, à 100 mA, à 4 °C. Le blocage de la membrane est effectué dans un tampon PBS-T additionné de 5 % de lait écrémé sous agitation pendant 1 h à température ambiante. La membrane est ensuite incubée pendant 1 h à température ambiante avec l'anticorps primaire. La membrane est alors lavée dans du PBS-T, 3 fois cinq minutes puis 2 fois 10 minutes. La membrane est incubée pendant 1 h à température ambiante avec un anticorps secondaire, 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.

5 - Cytotoxicité

5.1 - Matériel

Kit CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay, (Promega) contenant:

Substrat: diaphorase lyophilisée, lactate, NAD⁺

Tampon: sels de tétrazolium tamponné au Tris (INT), Triton X-100

Solution de lyse 10 X

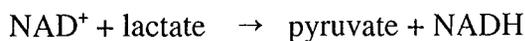
Solution stop

5.2 - Méthode

Cette méthode de mesure de la cytotoxicité d'un produit est basée sur le fait que les cellules libèrent de la LDH (lactate déshydrogénase) lors de la lyse cellulaire. Il suffit de mesurer l'activité LDH pour connaître la quantité de cellules lysées et donc l'effet cytotoxique d'un produit.

L'ajout de 50 µl de substrat (lactate, NAD⁺ et diaphorase) à 50 µl de surnageant de cellules, traitées par le produit étudié, et l'incubation 30 minutes à température ambiante à l'abri de la lumière permettent les réactions:

LDH



diaphorase



La réaction est arrêtée par ajout de 50 µl de solution stop. L'intensité de la couleur rouge est mesurée à 490 nm.

Un témoin de lyse maximum est nécessaire pour les calculs de pourcentage de cytotoxicité. Pour cela 100 µl de cellules sont lysées par 10 µl de tampon de lyse pendant 45 minutes à 37 °C, 5 % de CO₂. L'activité de LDH est alors mesurée de la même manière que précédemment.

Toutes les cellules sont alors lysées et la quantité de LDH mesurée est maximale et correspond à 100 %.

Le pourcentage de cytotoxicité est calculé par la formule : (mesure de LDH libérée / mesure de LDH totale) x 100

6 - Transfection des cellules

6.1 - 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.

pCRII Topo (InVitrogen, Pays-Bas): ce plasmide sert pour le sous-clonage du produit de la PCR permettant d'obtenir le promoteur *GSTPI* 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 *GSTPI* humain.

PhRG-TK vector (Promega, Pays-Bas): ce plasmide exprime la luciférase Renilla servant de contrôle de transfection.

pNF-κB-hrGFP (Stratagene): plasmide contenant 5 répétitions d'un site NF-κB consensus.

PAP-1-hrGFP (Stratagene) plasmide contenant 5 répétitions d'un site AP-1 consensus

Plasmides d'expression (Manna, *et al.*, 2000):

- TNFR1 : plasmide exprimant le récepteur au TNFα.
- Traf2 : plasmide exprimant la protéine Traf 2 (TNFR1 associated protein).
- NIK : plasmide exprimant la protéine NIK (NF-κB inducing kinase).
- p65 : plasmide exprimant la sous-unité protéique p65.
- IKKβ : plasmide exprimant la protéine IKKβ (IκB kinase).
- IκBα DN : plasmide exprimant une protéine mutée IκBα.

Plasmides d'expression (Weg-Remers *et al.*, 2001):

- Ras: plasmide exprimant la protéine Ras.
- RhoA: plasmide exprimant la protéine RhoA.

- Raf: plasmide exprimant la protéine Raf.
- MEK1: plasmide exprimant la protéine MEK1.
- MEKK1: plasmide exprimant la protéine MEKK1.
- ERK1DN: plasmide exprimant la protéine mutée ERK1.

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).

Dual-Glo™ Luciferase Assay system: Kit de détection de la lumière émise par les plasmides Luciférase et renilla luciférase.

6.2 - 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.

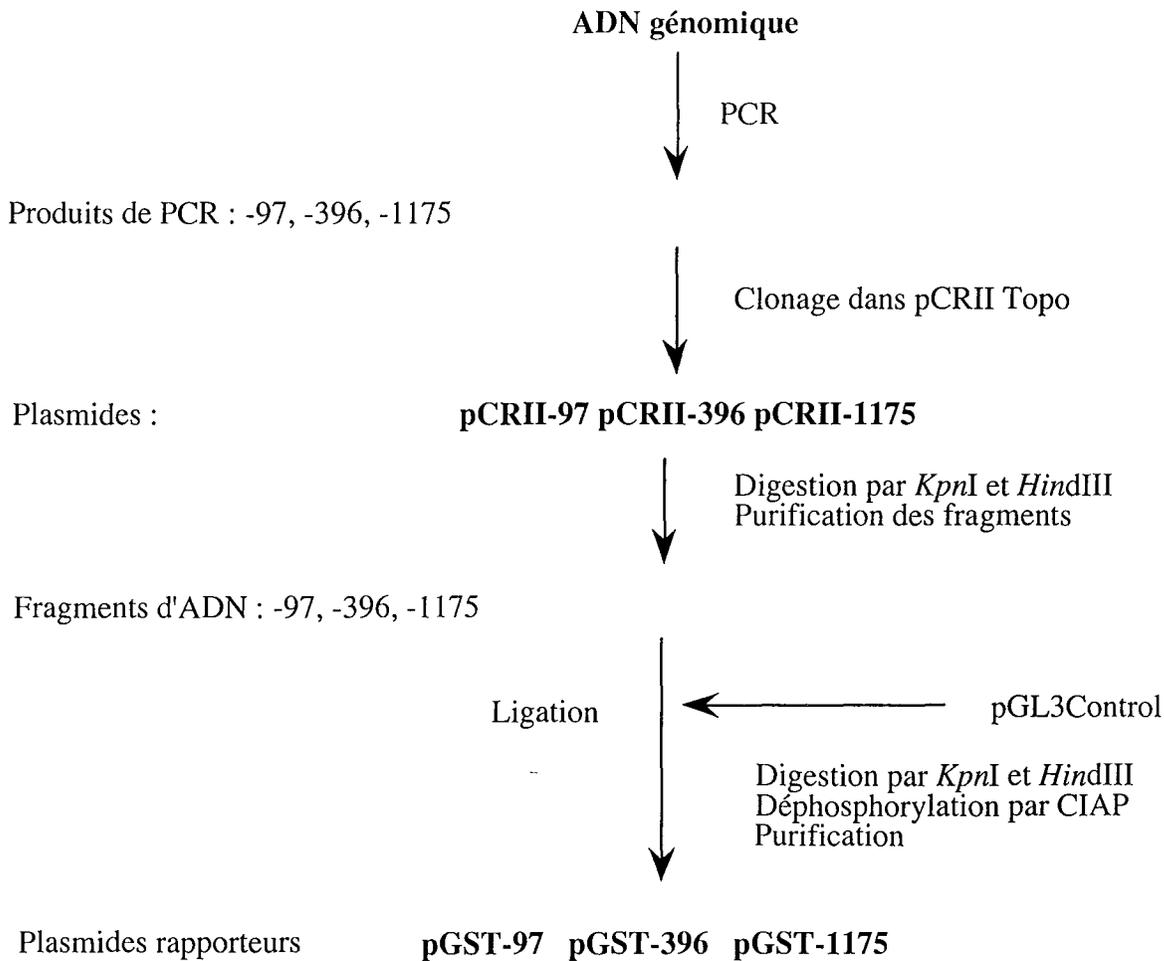


Figure 20: Représentation schématique des différentes étapes de construction des plasmides d'expression transfectés

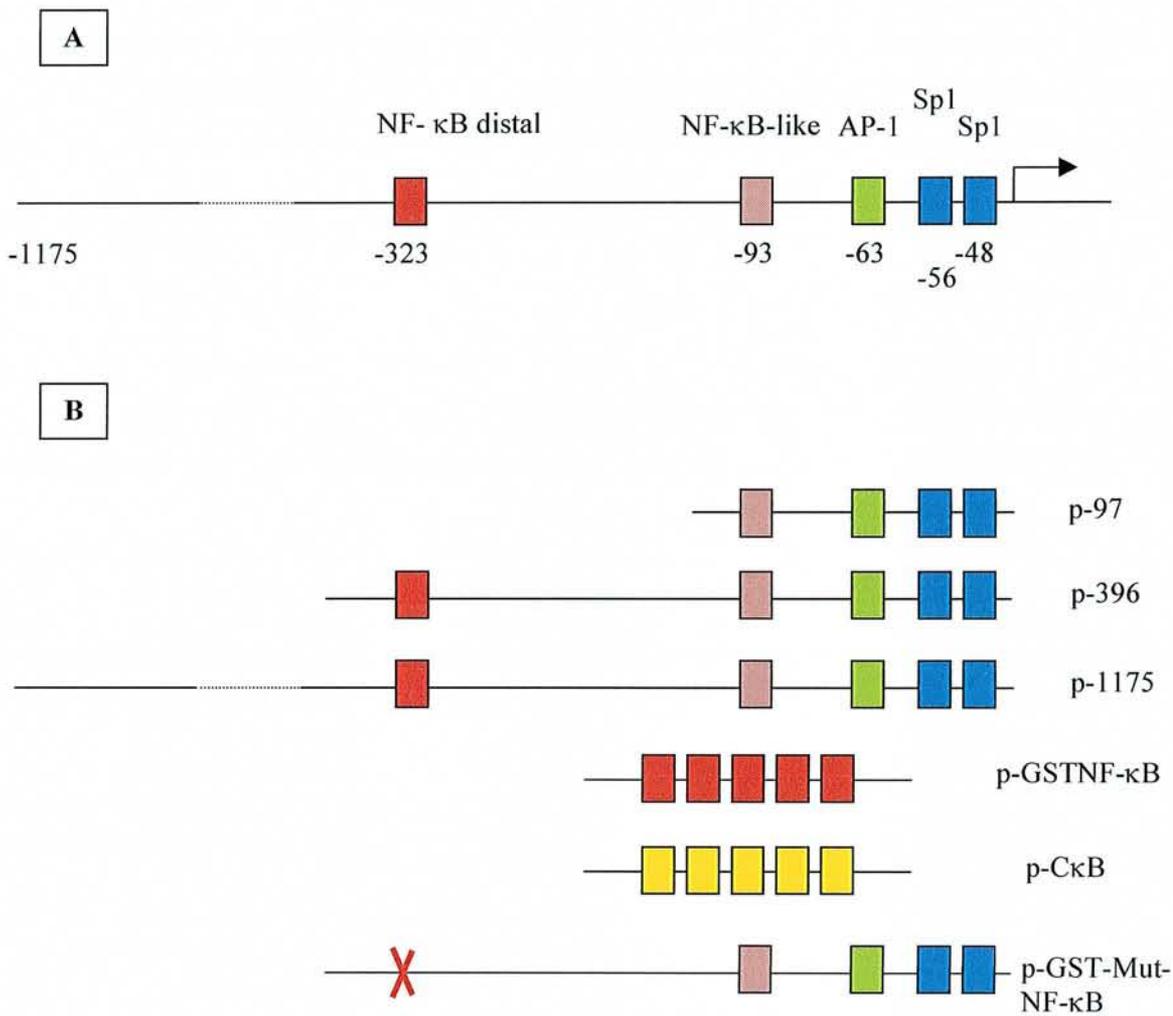


Figure 21: Représentation schématique des plasmides utilisés.

A) Promoteur du gène de la *GSTP1-1* humaine. B) Constructions utilisées en transfection: p-97, p-396, p-1175: constructions du promoteur de la *GSTP1-1*, numérotation à partir du site d'initiation de la transcription. p-GSTNF-κB: 5 répétitions du site NF-κB distal, p-CκB: 5 répétitions du site NF-κB consensus.

6.2.1 - Construction des vecteurs d'expression

De l'ADN génomique humain a été extrait de cellules sanguines circulantes 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 le tampon de lyse du fabricant qui conserve 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. (Morrow, *et al.*, 1990). La PCR a été réalisée sous un volume de 25 μ l selon le schéma suivant: 95°C pendant 5 min, puis 30 cycles avec dénaturation à 95°C pendant 1 min, hybridation 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).

Les mutagenèses ont été réalisées par PCR grâce au kit GeneTaylor (Invitrogen), selon les instructions du fabricant. Le taux de G-C du promoteur étant élevé, nous avons ajouté le PCRx Enhancer System (Invitrogen) dans la solution réactionnelle permettant l'amplification. Les séquences des amorces sont: sens, 5'-ATCGCAGCGGTCTTACCCCGCGATGT-3'; antisens, 5'-TAAGACCGCTGCGATCCCGGAGCTT-3'. La synthèse des amorces et le séquençage des plasmides mutés a été réalisé par Eurogentec.

6.2.2 - 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 (Diederich, *et al.*, 1995, Diederich, *et al.*, 1994). Les transfections des cellules ont été réalisées grâce au BioRad Gene Pulser (Biorad Laboratories, Nazareth, Belgium).

Pour chaque expérience, $3,75 \times 10^6$ cellules de la lignée K562 à une concentration de $1,5 \times 10^7$ cellules/ml sont électroporées avec 5 μg de plasmide luciférase et de 5 μg de plasmide Renilla dans les conditions suivantes : 625 V/cm, 500 μF et 20 msec dans un volume final de 250 μl qui sont ajoutés aux cellules dans la cuvette d'électroporation. Pour les co-transfections, 5 μg de plasmide d'expression sont ajoutés avant l'électroporation. Les cellules sont ensuite transférées dans du milieu complété en SVF (10 %). Après 18-24h de culture, $0,75 \times 10^5$ cellules sont resuspendues à 1×10^5 cellules/ml dans du milieu avec 10 % de SVF dans des puits de plaques de microtitration. Après les traitements, 75 μl de Dual-Glo™ Luciferase Reagent sont ajoutés à chaque puits et après 10 min de temps d'incubation à 22 °C, l'activité luciférase est mesurée. 75 μl de Dual-Glo™ Stop & Glo® Reagent sont ensuite ajoutés et après 10 min de temps d'incubation à 22 °C, l'activité Renilla est mesurée. Les émissions de lumière résultant de l'activité luciférase et Renilla sont mesurées dans un luminomètre Berthold par intégration du pic d'émission de lumière en 10 s.

Tous les résultats sont exprimés en unités de lumière arbitraire correspondant au rapport de l'activité luciférase / l'activité Renilla. Chaque résultat représente la moyenne \pm écart-type de trois expériences indépendantes de transfection. Les essais sont répétés huit fois.

7 - Retard de migration sur gel

7.1 - Matériel

Tous les produits chimiques proviennent de la firme ICN (Belgique), sauf indication complémentaire. Les inhibiteurs de protéases proviennent de la société Roche (Allemagne).

7.1.1 - Extraction des facteurs nucléaires

Tampon A (à préparer extemporanément à 4°C)

Hepes pH 7,9	10 mM
KCl	10 mM
EDTA (acide éthylènediamine tétracétique)	0,1 mM
EGTA (acide éthylèneglycol tétracétique)	0,1 mM
DTT (Dithiotréitol)	1 mM
PMSF (Phényl méthyl sulfonyl fluoride)	0,5 mM
Aprotinine	2 µg/ml
Leupeptine	30 µg/ml
Pepstatine	15 µg/ml
O-phénanthroline	1 mM
H ₂ O mQ	qsp 10 ml

Tampon C (à préparer extemporanément à 4°C)

Hepes pH 7,9	20 mM
NaCl	0,4 M
EDTA	1 mM
EGTA	1 mM
DTT	1 mM
Glycérol	20% (v/v)
PMSF	1 mM
Aprotinine	2 µg/ml
Leupeptine	30 µg/ml
O-phénanthroline	1 mM
Pepstatine	15 µg/ml

H ₂ O mQ	qsp 10 ml
---------------------	-----------

7.1.2 - Marquage des sondes

Solution d'hybridation 5X

Tris pH 8	330 mM
MgCl ₂	65 mM
DTT	33 mM
EDTA	6,5 mM
H ₂ O mQ	qsp 1 ml

Marquage par la Polynucléotide 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.

7.1.3 - Retard de migration sur gel

Solution d'inhibiteurs de protéases (Roche, Allemagne)

DTT	0,5 mM
PMSF	0,5 mM
Aprotinine	1 μ g/ml
o-phénanthroline	1 mM
H ₂ O mQ	qsp 20 ml

Des aliquotes sont conservées à -20°C

Solution de liaison pH final 8,0

Tris-HCl pH 8,5	50 mM
NaCl	250 mM
EDTA pH 8,0	2,5 mM
Glycérol	20%
DTT	2,5 mM

Gel de polyacrylamide 5%

Polyacrylamide 30% (29 :1)	5 %
TBE 10X	0,5 X

Persulfate d'ammonium (PAS)10%	0,2 %
TEMED	0,1 %

7.2 - Méthode

7.2.1 - Extraction des facteurs nucléaires

L'extraction se fait selon la méthode décrite par Schreiber et al. (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. 10×10^6 cellules sont centrifugées puis lavées avec du PBS 1X ; le culot est repris doucement 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 s, 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, puis centrifugée 5 min à 10 000g à 4°C. Le surnageant qui contient les extraits nucléaires est aliquoté en chambre froide et stocké à -80°C. Les protéines contenues dans l'extrait sont mesurées selon la méthode de Bradford (Bradford, 1976), en utilisant la BSA comme protéine étalon.

7.2.2 - 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. (Moffat, *et al.*, 1996a). 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 VI.

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

Nom des Oligonucléotides	Séquences	Positions dans le gène <i>GSTP1</i>	Taille (pb)
Prom-73	S GCCGTGACTCAGCACTGGGG AS CCCCAGTGCTGAGTCACGGC	-73 à -54	20
TRE gène humain de la collagénase	S CGCTTGATGACTCAGCCGGAA AS TTCCGGCTGAGTCATCAAGCG		21

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

4°C jusqu'à la précipitation des oligonucléotides

Pour précipiter les sondes, 3 volumes d'éthanol 100 % et 0,1 volume d'acétate de sodium 3 M sont ajoutés et le mélange est incubé à -20°C pendant au moins 1h. Les sondes sont ensuite centrifugées à 10000g 5 min à 4°C. Le culot est lavé par 300 µl d'éthanol à 75 % et centrifugé 5 min à 4°C. Le culot est séché au "speedvac" puis repris avec 15 µl d'eau milliQ.

Les sondes double-brins sont alors marquées au ³²P par transfert de phosphate du γ³² P-ATP sur l'extrémité 5'-OH de l'oligonucléotide par la Polynucléotide Kinase.

400 ng (2µl) de l'oligonucléotide double-brin sont mélangés à

2 µl de tampon kinase 10X

1 µl de Polynucléotide Kinase

2 µl de γ ³²P-ATP (7000 Ci/mmol)

H₂O qsp 20 µl

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

7.2.3 - 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 de polyacrylamide en fonction de leur poids moléculaire.

Environ 2 µl de sonde sont incubés avec:

4 µl de solution de liaison

2,5 µl de poly[d(I-C)] à 2 µg/ml

5 µg d'extrait nucléaire

solution aqueuse anti-protéase qsp 20 µl

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

L'incubation se fait pendant 30 min à 4°C. On ajoute 6 µl de tampon de dépôt avant la migration en gel de polyacrylamide dans du TBE 0,5X pendant 2h à 16mA/gel. 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.

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 6 µl de tampon échantillon termine la réaction et les échantillons sont déposés sur le gel de polyacrylamide. Les conditions de migration sont les mêmes que précédemment.

Tableau VII: Anticorps utilisés en supershifts (Santa Cruz Biotechnology)

Anticorps	Spécificité
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
Jun B (sc-8051)	anticorps monoclonal de souris dirigé contre le domaine carboxy-terminal de la protéine JunB de souris.
Jun D (sc-74)	anticorps polyclonal de lapin dirigé contre le domaine carboxy-terminal de la protéine JunD.
c-Fos (sc-8047)	anticorps monoclonal de souris dirigé contre les acides aminés 210 à 335 de la protéine recombinante c-Fos humaine.
Fra-1 (sc-605)	anticorps polyclonal de lapin dirigé contre le domaine amino-terminal de la protéine Fra-1 de rat.
Fra-2 (sc-171)	anticorps polyclonal de lapin dirigé contre le domaine carboxy-terminal de la protéine Fra-2 humaine
Fos B (sc-8013)	anticorps monoclonal de souris dirigé contre les acides aminés 75 à 150 de la protéine FosB d'origine humaine.
Nrf1 (sc-721)	anticorps polyclonal de lapin dirigé contre un domaine carboxy-terminal de la protéine Nrf1 humaine.
Nrf2 (sc-722)	anticorps polyclonal de lapin dirigé contre un domaine carboxy-terminal de la protéine Nrf2 humaine.
NF-E2 (sc-291)	anticorps polyclonal de lapin dirigé contre un domaine carboxy-terminal de la protéine NF-E2 p45 de souris.
NF-E2 p18 (sc-477)	anticorps polyclonal de lapin dirigé contre un domaine carboxy-terminal de la protéine NF-E2 p18 de souris.
p50 (sc-7178)	anticorps polyclonal de lapin dirigé contre les acides aminés 120 à 239 de la protéine NF-κB p50 humaine.
p52 (sc-298)	anticorps polyclonal de lapin dirigé contre un épitope conservé de la protéine NF-κB p52 humaine.
p65 (sc-109)	anticorps polyclonal de lapin dirigé contre un domaine amino-terminal de la protéine NF-κB p65.
RelB (sc-226)	anticorps polyclonal de lapin dirigé contre un domaine carboxy-terminal de la protéine NF-κB RelB.
c-Rel (sc-70)	anticorps polyclonal de lapin dirigé contre un domaine amino-terminal de la protéine NF-κB c-Rel.
Bcl-3 (sc-185)	anticorps polyclonal de lapin dirigé contre un domaine carboxy-terminal de la protéine Bcl-3.

8 - Microarray

8.1 - Matériel

L'hybridation des microarrays a été réalisée au service des microarrays de l'université de Cincinnati, USA et les protocoles sont repris sur le site internet <http://microarray.uc.edu>.

Agilent 2100 Bioanalyser utilisant la technique du LabChip® à ARN

Microarrayer Omnigrid™

Scanner de microarrays GenPix® 4000B

8.2 - Méthode

La technique des microarrays consiste à fixer des ADNc ou des oligonucléotides sur une lame de verre grâce à un microarrayer, afin de les hybrider avec des échantillons marqués à la fluorescence.

8.2.1 - Préparation des microarrays

22 000 ADNc provenant de gènes humains sont fixés sur des lames de verres par le microarrayer Omnigrid™. Parmi ces 22 000 gènes certains sont dupliqués pour servir de témoins:

β-actine: 16 fois

N-myc humain: 3 fois

Echantillon inconnu: 4 fois

Transcription factor 3: 12 fois

Protéine ribosomale S9: 16 fois

Cytochrome c-1: 15 fois

Facteur d'initiation de la traduction 4A, isoforme 2: 12 fois

Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase: 17 fois

Histone H2B: 11 fois
Protéine de choc thermique 70 kD, 1A: 17 fois
Lactate déshydrogénase A: 17 fois
 α tubuline: 17 fois
Nucléopore 62kD: 17 fois
Protéine ribosomale L5: 12 fois

8.2.2 - Préparation des échantillons

Les ARN totaux sont extraits des cellules traitées grâce à des colonnes Nucleospin (Macherey-Nagel) ou par la méthode au Trizol. Leur qualité est vérifiée par la technique du Labchip® grâce au Bioanalyzer de Agilent qui permet aussi de mesurer leur concentration. 20 μ g d'ARN à 2 μ g/ μ l sont ensuite soumis à une transcription inverse pendant 1 h à 50 °C avec:

5X RT Buffer	6.0 μ l
50X dNTP Stock Solution	0.6 μ l
DTT 0.1M	3.0 μ l
Superscript III RT (Invitrogen; Cat#18080-044) 200U/ μ l	1.5 μ l
RNAsin (Fisher; Cat#FP2221) 40U/ μ l	0.5 μ l
TOTAL	11.6 μ l

Les ARN sont ensuite hydrolysés par 15 μ l de NaOH 0,1 N pendant 10 min à 70 °C. après refroidissement à température ambiante, la réaction est neutralisée par 15 μ l de HCL 0,1N. Les ADNc sont alors précipités avec 6 μ l d'acétate de sodium 3M pH 5.2, 150 μ l d'éthanol absolu pendant la nuit à -20 °C. Les échantillons sont alors centrifugés pendant 15 min à 13 000 rpm à 4 °C. Les culots obtenus sont lavés par 750 μ l d'éthanol à 80 % et centrifugés à nouveau pendant 10 min à 13 000 rpm à 4 °C. Après avoir été séchés, les échantillons sont marqués par ajout de 5 μ l de tampon de couplage (bicarbonate de sodium 0.1 M pH 9.0) et 5 μ l d'eau. Après agitation, les échantillons sont incubés 10 min à 42 °C. 2 μ l de colorants fluorescent Cy3 ou Cy5 (Amersham; Cat#RPN5661) sont ajoutés à la réaction qui est incubée 1 h à température à l'abri de la lumière, et est agitée toutes les 15 min. La réaction est stoppée par addition de 4,5 μ l d'hydroxylamine 4 M et incubation 15 min à température ambiante à l'abri de la lumière. Les échantillons qui seront hybridés sur la même

microarray sont combinés, purifiés par le kit Qia-Quick PCR purification (Qiagen) et séchés.

8.2.3 - Préhybridation

Les lames à hybrider sont placées dans un bac à hybridation et recouvertes de tampon de préhybridation (SSC 5X, SDS 0.1%, BSA 1%) à 48 °C pour 45 à 60 min. Les lames sont ensuite lavées par une dizaine d'immersions dans 2 bacs d'eau distillée. L'eau est ensuite égoutée et les lames sont immergées une dizaine de fois dans un bac d'isopropanol. Elles sont ensuite séchées et utilisées immédiatement.

8.2.4 - Hybridation

Les échantillons marqués sont repris dans 9 μ l d'eau et chauffés à 95 °C pendant 3 min pour les dénaturer. Ils sont ensuite centrifugés à 13000 g pendant 1 min. Pour bloquer une hybridation non-spécifique, 8 μ l d'ADN de COT1 (1mg/ml) (Roche Diagnostics; Cat# 1581074), 2 μ l d'ADN Poly(A) (10 mg/ml) (Sigma; Cat# P 9403) et 2 μ l d'ARNt de levure (4 mg/ml) (Sigma; Cat# R 8759) sont ajoutés aux échantillons. 21 μ l de tampon d'hybridation (formamide 50%, SSC 10X, SDS 0.2%) préchauffé à 48 °C sont ensuite additionnés. Ce mélange est appliqué sur les lames qui sont alors recouvertes d'une lamelle et placées dans une chambre d'hybridation dont les réservoirs sont remplis de 12 μ l d'eau. Les lames sont incubées dans un bain marie à 48 °C pendant 40 à 60 h.

8.2.5 - Lavages

Les lames sont lavées dans un bac contenant SSC 1X, SDS 0.2% à 48 °C. La lamelle est délicatement retirée et la solution est agitée pendant 4 min. Les lames sont ensuite transférées dans un bac contenant SSC 0.1X, SDS 0.2% et incubées pendant 4 min à température ambiante. Enfin les lames sont lavées 2 fois 4 min à température ambiante dans du SSC 0,1X et sont ensuite séchées.

8.2.6 - Lecture

Les lames hybridées sont scannées par le GenPix® 4000B et analysées. Les résultats ainsi obtenus sont alors analysés par le statisticien grâce à un logiciel prévu à cet effet.

9 - Statistiques

Une analyse statistique des résultats est effectuée selon le test t de Student en situation bilatérale avec un risque de 1^{ère} espèce consenti de 10 %. Ce test permet de comparer la moyenne de chaque traitement avec la moyenne du contrôle.

RÉSULTATS

Partie 1 : Voie de transduction du signal du stress et de la prolifération

La GSTP1-1 a été associée à la cancérogenèse et à la résistance aux anti-cancéreux. En effet elle est surexprimée dans la plupart des cellules cancéreuses et elle participe à la détoxification des cellules en conjuguant les composés électrophiles au GSH leur permettant d'être expulsés de la cellule. Cette enzyme est donc une bonne cible pour une thérapie anti-cancéreuse. L'étude des régulations de son expression est donc une base essentielle pour pouvoir mener au mieux une stratégie anti-cancéreuse.

Dans une étude précédente de la régulation de la *GSTP1-1*, notre équipe a montré que le site TRE situé sur le promoteur du gène de la *GSTP1-1* est essentiel à l'expression de cette protéine. Pour confirmer le rôle de ce site *in vivo*, nous avons utilisé un activateur typique des facteurs de transcription de la famille AP-1 : le TPA.

Nous avons aussi testé des métaux lourds, qui sont des inducteurs typiques de AP-1. De plus Tully et al. montrent que les métaux tels que arsenic, plomb et cadmium induisent l'expression de la GSTY α de rat (Tableau VIII) (Tully, *et al.*, 2000).

Tableau VIII: Activations de promoteurs par différents métaux lourds. Selon Tully et al. 2000

Métaux	Concentration	Induction des promoteurs
Arsenic (As(V))	50 - 250 μ M	HMTIIA, GST Y α , HSP 70, Fos, XRE, NFkB-RE, GADD 153, p53 - RE, CRE
Plomb (Pb(II))	12 - 100 μ M	HMTIIA, GST Y α , XRE, GRP 78, Cyp IA1
Cadmium (Cd(II))	1,25 - 15 μ M	HMTIIA, XRE, Cyp IA1, GST Y α , HSP 70, NFkB-RE, Fos
Chrome (Cr(III))	750 μ M	CRE, Fos, GADD 153, XRE
Chrome (Cr(VI))	5 - 10 μ M	Fos, p53-RE, NFkB-RE, XRE, GADD 45, HSP 70, CRE
Mélange Cd(II), Cr(III), Pb(II)	Respectivement : 7,5 - 750 - 100 μ M	HMTIIA, pas de synergie des métaux

1 - Etude de l'effet du TPA sur l'expression de la GSTP1-1

1.1 - Etude de la cytotoxicité du TPA

Pour éviter que la cytotoxicité d'un produit utilisé pour traiter les différentes lignées cellulaires ne vienne fausser les résultats, nous avons étudié l'effet des traitements sur les cellules. Afin d'obtenir ces résultats, les cellules leucémiques ont été traitées par le TPA pendant 24 h. Puis le taux de LDH libéré par les cellules mortes a été mesuré dans le milieu. Les résultats sont exprimés en fonction d'un témoin dans lequel les cellules sont lysées et qui correspond à 100 % de mort cellulaire.

Cette étude nous montre que le passage des cellules d'un milieu à 10 % de SVF à un milieu avec 0,1 % de SVF a déjà un effet cytotoxique. Les cellules de la lignée U937 sont celles qui résistent le moins avec 55,1 % de mort cellulaire alors que les lignées Jurkat, Raji et K562 se situent à 37,8, 32,3 et 26,9, respectivement (figure 22). L'ajout de 100 nM de TPA après 24 h sans SVF ne change pas l'état des cellules des lignées K562 et Jurkat. Par contre, les cellules des lignées U937 et Raji présentent une augmentation de la mort cellulaire (de 55,1 à 91 % pour la lignée U937 et de 32,3 à 45 % pour la lignée Raji) après ajout de TPA 100 nM pendant 24 h.

En conclusion, nous retenons que les cellules leucémiques Jurkat, Raji et K562 ne sont pas sensibles au TPA alors que les cellules de la lignée U937 sont très sensibles au passage en milieu avec 0,1 % de SVF et au TPA.

1.2 - Etude de l'effet du TPA sur l'expression de l'ARNm de la GSTP1-1

Le TPA est un activateur connu du facteur de transcription AP-1. Comme notre équipe l'a démontré auparavant, le site TRE présent sur le promoteur de la *GSTP1-1* répond au TPA. En effet la fixation de AP-1, en particulier c-Jun et Fra1, sur l'élément de réponse de la *GSTP1-1* ainsi que sur un site consensus est augmentée par le TPA comme le montrent des expériences de gels retard (Borde-Chiche, *et al.*, 2001a).

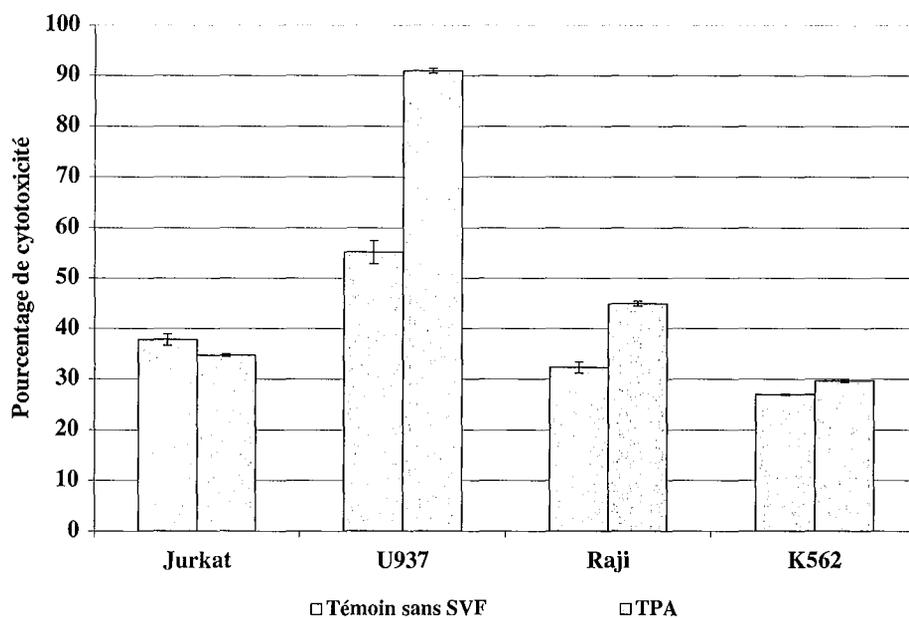


Figure 22: Test de cytotoxicité. Cellules des lignées K562, Jurkat, U937 et Raji traitées au TPA 100 nM pendant 24 h.

La cytotoxicité du passage des cellules des lignées K562, Jurkat, Raji et U937 en milieu avec 0,1 % de SVF, et du traitement au TPA 100 nM après 24 h avec 0,1 % de SVF a été mesurée par la technique de mesure de LDH relâchée dans le milieu. Le pourcentage de cytotoxicité est calculé avec le rapport de la mesure de la cytotoxicité relâchée sur la mesure de la cytotoxicité maximum.

De plus, des expériences de transfection transitoire avec un plasmide combinant le promoteur de la *GSTP1-1* au gène rapporteur de la luciférase nous apprennent que le promoteur minimal de la *GSTP1-1*, contenant le site AP-1, répond au TPA et que la transcription est augmentée. Il nous a donc paru intéressant d'étudier l'effet du TPA au niveau de l'ARNm de la *GSTP1-1* grâce à des expériences de Northern blot.

Afin d'atteindre cet objectif, nous avons extrait l'ARN total des cellules avant de l'hybrider avec une sonde correspondant à l'ADNc de la *GSTP1-1*.

Nous avons décidé de comparer l'évolution de l'intensité de la bande correspondant à la *GSTP1-1* avec l'intensité de la sous-unité 18S colorée au bromure d'éthidium. Pour la lignée K562 (figure 23), les résultats nous montrent une diminution de l'expression de la *GSTP1-1* dès 2 h (- 10 %). La diminution se précise à 4 h (- 30 %) et se stabilise après 8 et 24 h à 38 et 30 %, respectivement. Cette baisse de l'expression est significative à 8 et 24 h ($p < 0,01$ et $p < 0,05$). Entre 0 et 60 minutes, on n'observe qu'une très légère baisse de l'expression de l'ARNm qui reste en accord avec les résultats obtenus pour des traitements plus longs.

Pour des concentrations plus élevées en TPA (jusqu'à 1, 5 mM), on obtient une forte baisse de l'expression à 24 h et cela de façon significative.

Nous avons ensuite regardé l'évolution du taux d'ARNm de la *GSTP1-1* après le même traitement au TPA dans différentes lignées leucémiques: Jurkat, U937 et Raji. Afin d'obtenir ce résultat, les mêmes expériences de Northern blots ont été réalisées et l'intensité de la bande correspondant à la *GSTP1-1* est comparée avec la sous-unité 18S (figure 24).

Dans les lignées Jurkat et U937, les traitements au TPA n'ont pas d'effet significatif entre 2 et 24 h dans les conditions utilisées, bien qu'on observe une légère augmentation de l'expression de la *GSTP1-1* dans les cellules de la lignée Jurkat à 8 h; au contraire des cellules de la lignée U937, pour lesquelles on observe une légère diminution à 24 h. Cependant, la coloration au bromure d'éthidium des sous-unités ribosomales montre que à 24 h les ARNm de la lignée U937 sont dégradés.

La lignée Raji, bien que possédant le gène, n'exprime pas la *GSTP1-1* et les traitements au TPA n'ont aucun effet sur cette expression.

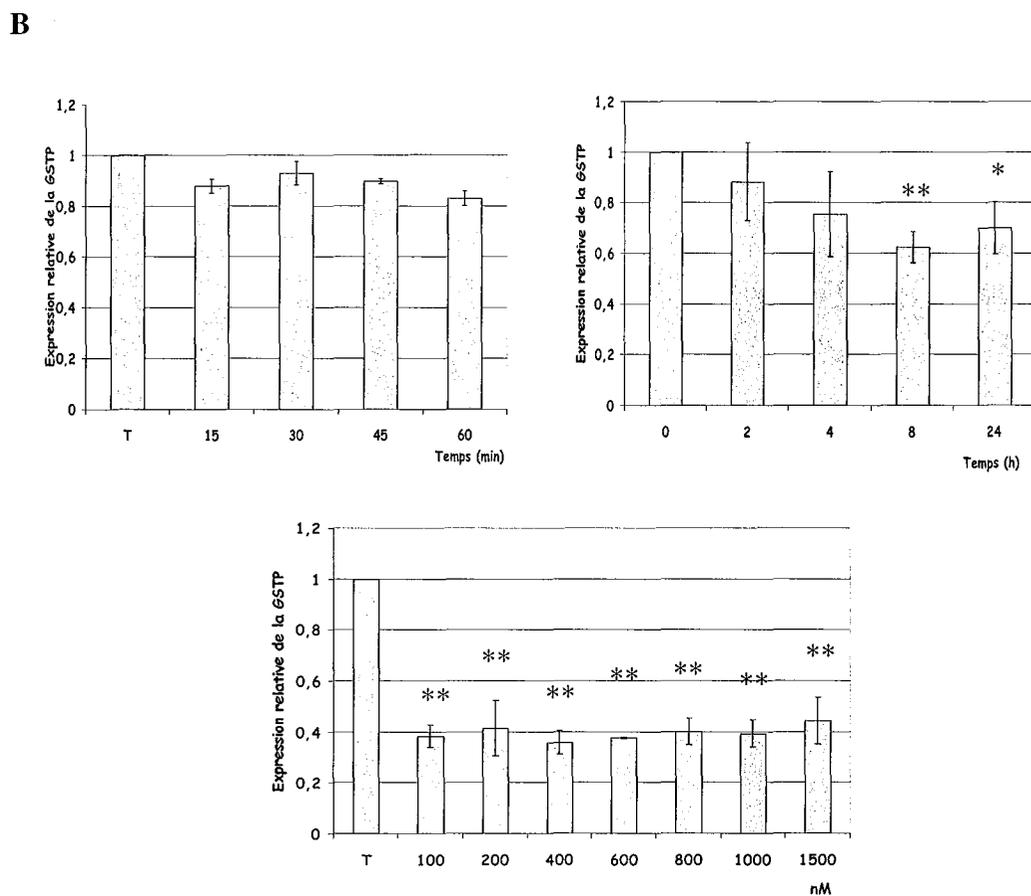
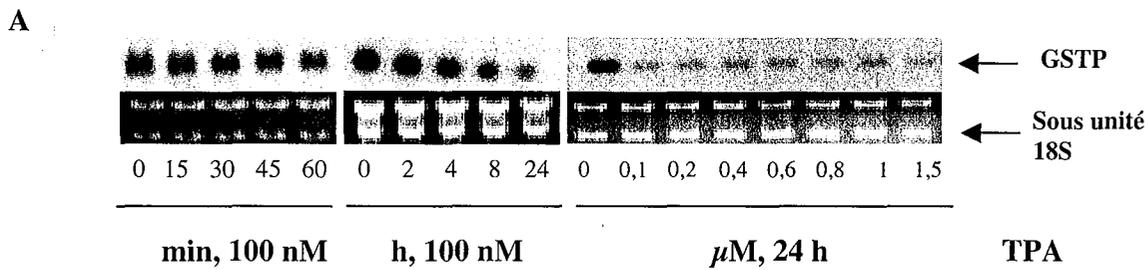
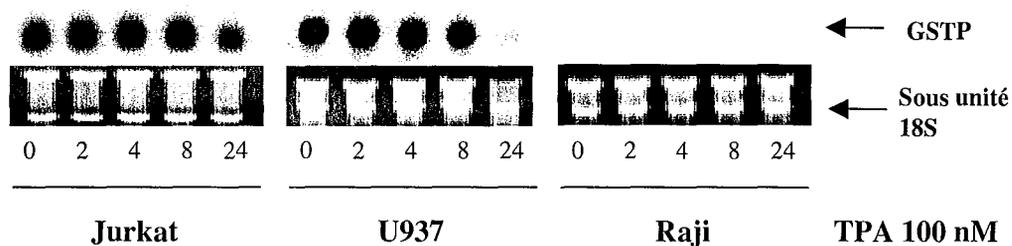


Figure 23: Etude de l'ARNm par Northern blot. Cellules de la lignée K562 traitées au TPA (Cinétique et gamme de concentration).

Des cellules non traitées, avec 0,1 % de SVF pendant 60h, sont témoins. (A) hybridation de la sonde *GSTP1-1* et coloration des sous-unités ribosomales au bromure d'éthidium. (B) représentation graphique de 3 expériences indépendantes. * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$, par rapport au témoin.

A



B

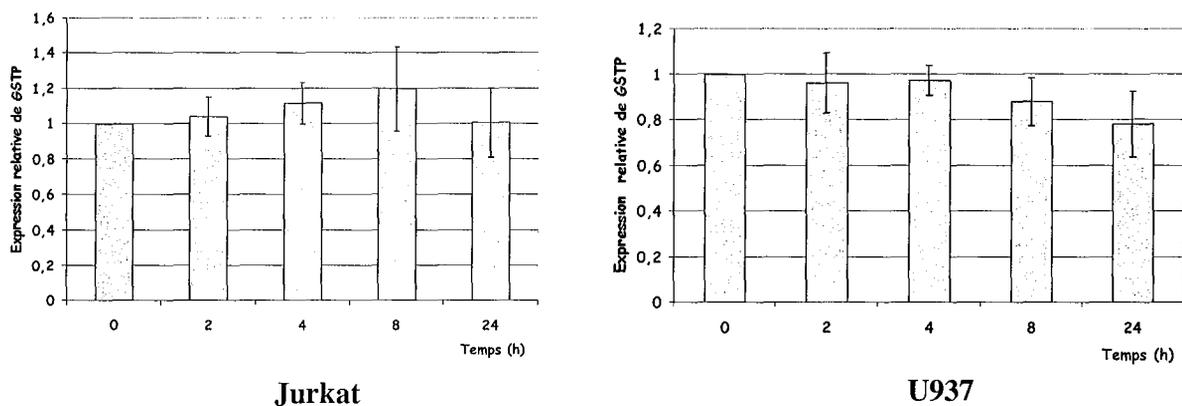


Figure 24: Etude de l'ARNm par Northern blot. Cellules des lignées Jurkat, U937 et Raji traitées au TPA 100 nM pendant 0, 2, 4, 8 et 24h.

Des cellules non traitées, avec 0,1 % de SVF pendant 60h, sont témoins. (A) hybridation de la sonde *GSTP1-1* et coloration des sous-unités ribosomales au bromure d'éthidium. (B) représentation graphique de 3 expériences indépendantes (pour les lignées Jurkat et U937).

1.3 - Etude de l'effet du TPA sur l'expression de la protéine GSTP1-1

Pour confirmer nos résultats et pour vérifier que le TPA n'a pas un effet post-transcriptionnel, nous avons déterminé l'effet du TPA sur l'expression de la protéine GSTP1-1 par Western blot sur des extraits protéiques totaux en utilisant un anticorps anti-GSTP1-1.

Nous avons traité des cellules des lignées K562, Jurkat, U937 et Raji au TPA 100 nM pendant 0, 2, 4, 8 et 24 heures.

Deux microgrammes de protéines ont été analysés en Western blot avec l'anticorps anti-GSTP1-1 (figure 25). Les mêmes protéines ont été hybridées avec un anticorps anti- β -actine qui servira de témoin invariant.

- Ces expériences nous montrent que l'expression de la GSTP1-1 ne varie pas de façon significative entre 2 et 24 h pour la lignée K562.
- Pour les cellules de la lignée Jurkat, nous observons une intensification significative du signal à 8 et 24 h.
- Pour les cellules de la lignée Raji, qui n'expriment pas la GSTP1-1, le traitement n'a pas d'effet sur l'expression de la protéine entre 2 et 24 h.
- Pour les cellules de la lignée U937, nous observons une augmentation du signal à 4 h. Cette diminution n'est pas retrouvée à 8 et 24 h. Cependant, le phénomène de dispersion des valeurs rend difficilement utilisables ces résultats.

Contrairement aux résultats obtenus précédemment (Borde-Chiche, *et al.*, 2001a), nous observons que le TPA n'induit pas l'expression de la GSTP1-1 que ce soit au niveau de l'ARNm ou de la protéine dans les lignées cellulaires K562, U937 ou Raji. Dans la lignée leucémique Jurkat, on observe une augmentation de l'expression de la protéine de la GSTP1-1 sans que le taux de son ARNm ne soit modifié.

Un mécanisme cellulaire encore inconnu bloque l'induction de l'expression de la GSTP1-1 par le TPA.

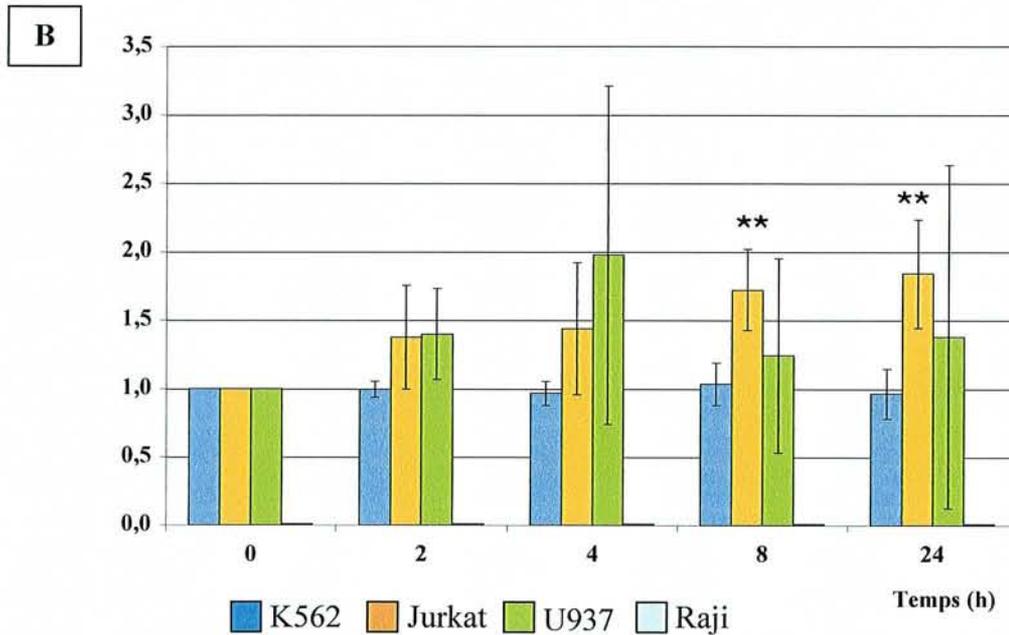
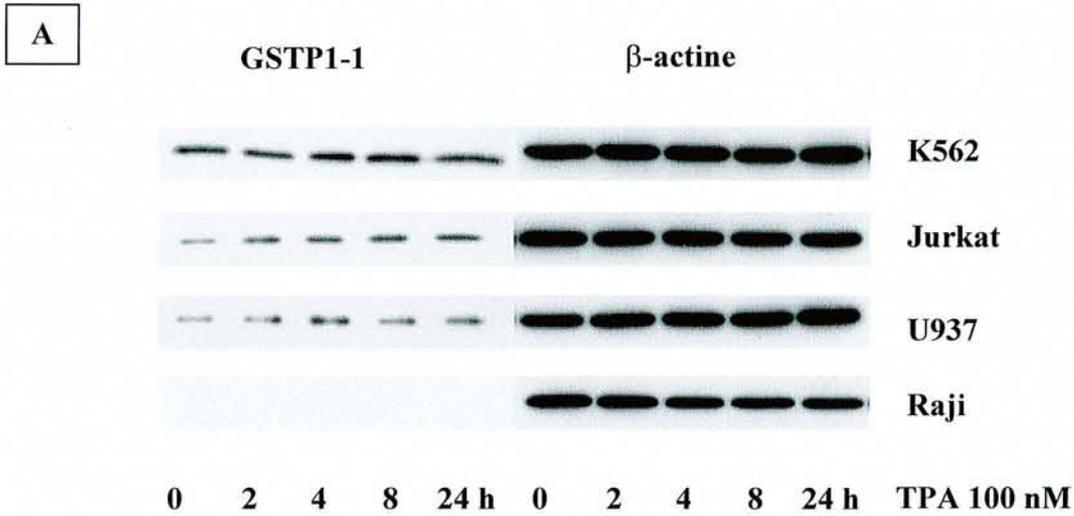


Figure 25: Etude des protéines par Western blot. Cellules des lignées K562, Jurkat, U937 et Raji traitées au TPA 100 nM pendant 0, 2, 4, 8 et 24h.

Des cellules non traitées, avec 0,1 % de SVF pendant 60h, sont témoins. (A) hybridation avec un anticorps anti-GSTP1-1 et un anticorps anti- β -actine. (B) représentation graphique de l'expression de la GSTP1-1 rapportée à l'expression de la β -actine, résultats de 3 expériences indépendantes. ** : $p < 0,01$.

2 - Etude de l'effet des métaux lourds sur l'expression de l'ARNm de la *GSTP1-1*

2.1 - Etude de l'effet du chlorure de cadmium sur l'expression de la *GSTP1-1*

I

Les métaux lourds ont déjà été décrits comme activant AP-1 et nous avons voulu étudier leur effet sur la transcription de l'ARNm de la *GSTP1-1*. Afin d'atteindre cet objectif, nous avons d'abord utilisé du chlorure de cadmium.

Nous avons traité des cellules avec 5 μ M de chlorure de cadmium pendant 0, 4, 8 et 24 h (figure 26) avant de réaliser des expériences de Northern blot sur les ARN de ces cellules. Dans la lignée K562, nous observons une diminution légère de l'expression de l'ARNm de la *GSTP1-1* dès 4 h (- 20 %). Cette diminution est significative ($p < 0,01$) à 8 et 24 h (- 30 %).

Pour confirmer nos résultats, nous avons fait subir le même traitement aux cellules de la lignée leucémique Jurkat, et nous observons une légère baisse de l'expression de l'ARNm de la *GSTP1-1* dès 4 h (-10 %), qui s'intensifie de façon significative ($p < 0,01$) à 8 h (-20 %) et à 24 h (-45 %).

Les mêmes traitements sur des cellules de la lignée Raji nous montrent que le traitement n'induit pas la *GSTP1-1* et que cette lignée ne l'exprime toujours pas.

Ces résultats sont en accord avec le fait que le TPA n'induit pas l'expression de la *GSTP1-1* et que nous observons une diminution du taux d'ARNm après traitement.

2.2 - Etude de l'effet du plomb sur l'expression de la *GSTP1-1*

Pour confirmer nos résultats, nous avons traité les cellules de la lignée K562 avec du plomb. Afin de vérifier que l'effet observé n'est pas dû au groupement qui substitue le plomb, nous avons utilisé 2 formes de plomb : acétate et nitrate de plomb.

Avant de traiter les cellules, nous avons vérifié que ces traitements ne sont pas toxiques (tableau IX). Comme vu précédemment, le passage des cellules dans un milieu avec 0,1 % de SVF augmente la mort cellulaire à 30 %. Par contre, le traitement pendant 24 h de cellules de la lignée K562 avec de l'acétate ou du nitrate de plomb à 10, 50 ou 100 nM n'a pas d'effet toxique sur les cellules.

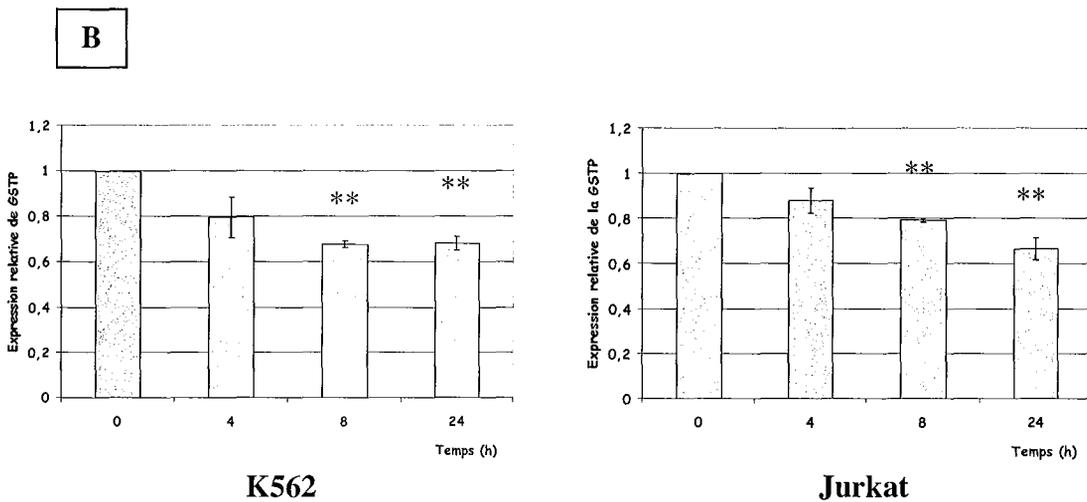
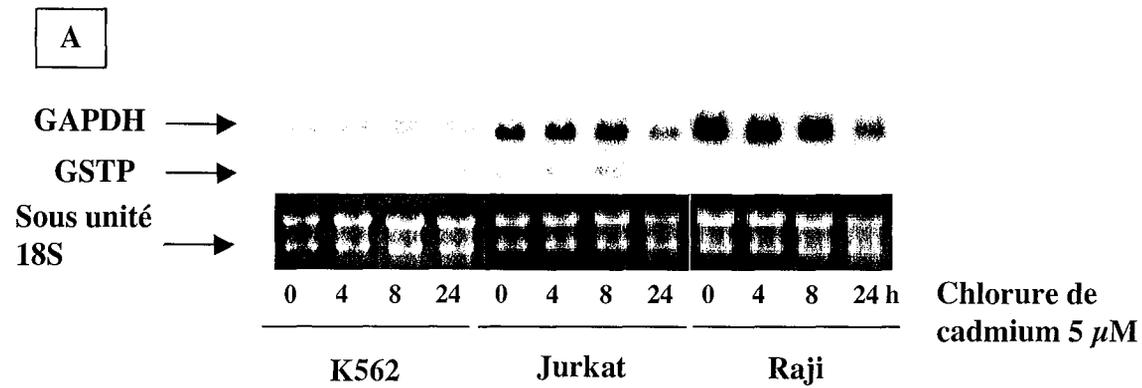


Figure 26: Etude de l'ARNm par Northern blot. Cellules des lignées K562, Jurkat et Raji traitées au chlorure de cadmium 5 μ M pendant 0, 4, 8 et 24h.

Des cellules non traitées, avec 0,1 % de SVF pendant 60h, sont témoins. (A) hybridation de la sonde *GSTP1-1* et coloration des sous-unités ribosomales au bromure d'éthidium. (B) représentation graphique de 3 expériences indépendantes. **: $p < 0,01$.

Tableau IX: Effet toxique du plomb sur les cellules de la lignée K562.

Traitement	Acétate de plomb	Nitrate de plomb
Témoin avec SVF	0	0
Témoin sans SVF	27 ±2,49	27 ±2,49
24 h sans SVF + 24 h plomb 10 nM	21,6 ±4,11	26 ±3,11
24 h sans SVF + 24 h plomb 30 nM	24,8 ±4,84	24,6 ±4,43
24 h sans SVF + 24 h plomb 50 nM	22,7 ±4,48	23,2 ±2,37
24 h sans SVF + 24 h plomb 100 nM	26,1 ±6,36	26,6 ±5,39

Les résultats sont exprimés en pourcentage de cytotoxicité.

Afin de poursuivre l'étude de la régulation du gène de la *GSTP1-1*, nous avons traité des cellules de la lignée K562 avec 10 nM de nitrate de plomb ou d'acétate de plomb pendant 0, 4, 8 et 24 h. Les ARN ont alors été analysés en Northern blot. Le traitement au nitrate de plomb a pour effet de diminuer de façon non significative l'expression de l'ARNm de la *GSTP1-1*, alors que le traitement à l'acétate de plomb n'a aucun effet (figure 27).

Ces résultats montrent encore une fois que ce type d'inducteur de AP-1 n'induit pas l'expression de la *GSTP1-1*.

2.3 - Etude de l'effet de l'arsenite de sodium sur l'expression de la GSTP1-1

Nous avons poursuivi cette étude par des traitements de 0, 4, 8 et 24 h de cellules de la lignée K562 à l'arsenite de sodium 10 μ M. Les ARN ont alors été hybridés à l'ADNc de la *GSTP1-1* marquée radioactivement. Ce traitement inhibe légèrement l'expression de l'ARNm de la *GSTP1-1* à 4 h (figure 28). Cette inhibition devient significative à 8 h (- 35 %) mais reste cependant légère à 24 h.

L'utilisation du métal lourd arsenite de sodium, qui est un inducteur typique de AP-1, ne permet pas d'activer l'expression de la *GSTP1-1*, confirmant les résultats obtenus en Northern blot et montrant que le site AP-1 présent sur le promoteur de la *GSTP1-1* réagit différemment du site AP-1 présent sur le promoteur de la GSTP de rat.

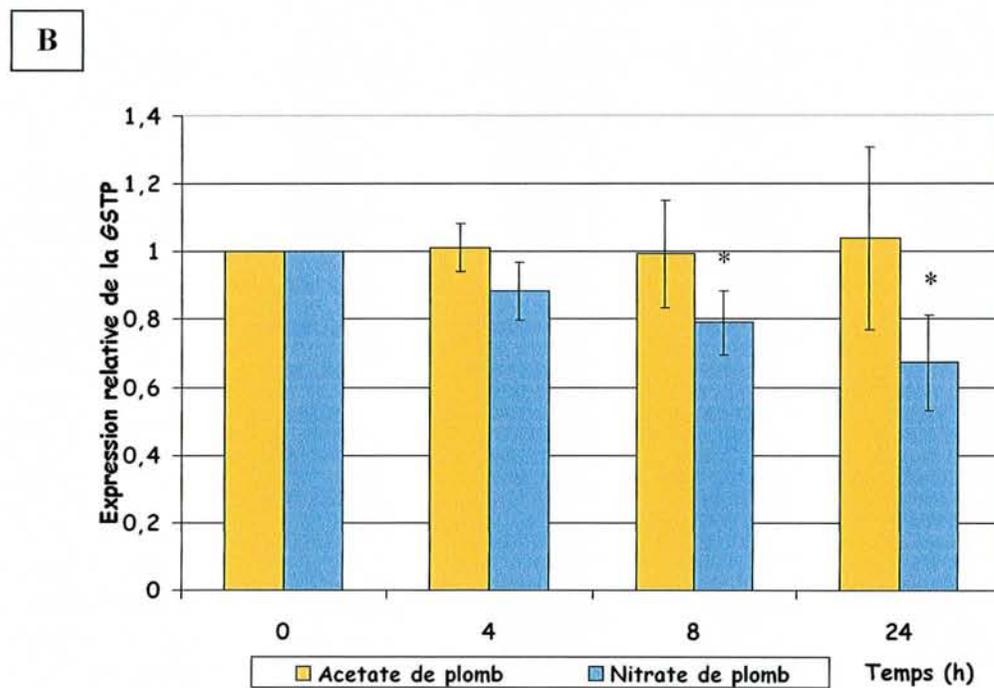
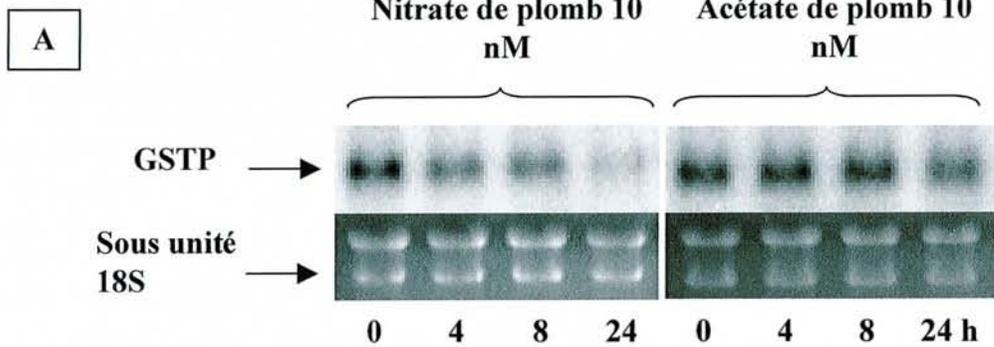
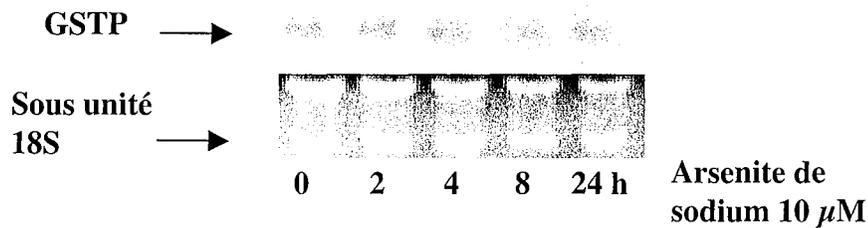


Figure 27: Etude de l'ARNm par Northern blot. Cellules de la lignée K562 traitées au plomb 10 nM pendant 0, 4, 8 et 24h.

Des cellules non traitées, avec 0,1 % de SVF pendant 60h, sont témoins. (A) hybridation de la sonde *GSTP1-1* et coloration des sous-unités ribosomales au bromure d'éthidium. (B) représentation graphique de 3 expériences indépendantes. * : $p < 0,06$.

A



B

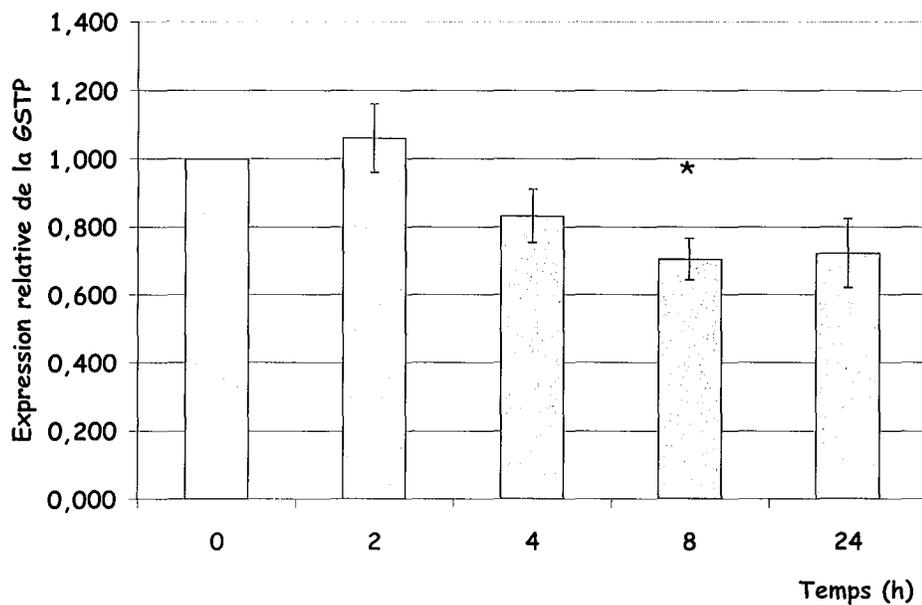


Figure 28: Etude de l'ARNm par Northern blot. Cellules de la lignée K562 traitées à l'arsenite de sodium 10 μM pendant 0, 4, 8 et 24h.

Des cellules non traitées, avec 0,1 % de SVF pendant 60h, sont témoins. (A) hybridation de la sonde *GSTP1-1* et coloration des sous-unités ribosomales au bromure d'éthidium. (B) représentation graphique de 3 expériences indépendantes. * : p < 0,05.

3 - Etude de la demi-vie de l'ARNm de la *GSTP1-1* dans les lignées K562 et Jurkat

Les résultats obtenus en Northern et Western blot, qui ne montrent pas d'activation de la *GSTP1-1* par le TPA alors que le gène contient un site TRE, nous ont amené à penser que la stabilité des ARN pourrait être modifiée par le traitement au TPA. En effet, une augmentation de la transcription du gène serait masquée par une diminution de la stabilité de l'ARNm. De plus, certaines équipes ont déjà montré que le TPA peut déstabiliser l'ARNm de certaines protéines dont la GSTA dans les cellules HepG2 (Eickelmann, *et al.*, 1995).

La demi-vie de l'ARNm de la *GSTP1-1* a été mesurée en traitant les cellules avec 5 $\mu\text{g/ml}$ d'actinomycine D, qui bloque la transcription et permet ainsi de mesurer la vitesse de dégradation des ARNm sans avoir néosynthèse.

Les lignées K562 et Jurkat sont traitées pendant 0, 8, 16 et 32 h avec 5 $\mu\text{g/ml}$ d'actinomycine D puis les ARNm sont étudiés en Northern blot avec l'ADNc de la *GSTP1-1*. La lignée Raji n'exprimant pas la *GSTP1-1*, nous n'avons pas étudié sa demi-vie. Les cellules de la lignée U937 ne résistent pas au traitement à l'actinomycine D et nous n'avons pas pu mesurer la demi-vie de l'ARNm de la *GSTP1-1* dans cette lignée.

Ces expériences nous montrent des demi-vies différentes pour chaque lignée (Tableau X). La lignée K562 présente un ARNm de *GSTP1-1* avec une longue demi-vie de 49 h alors que la lignée Jurkat a un ARNm moins stable, avec une demi-vie avoisinant les 15 h.

Les demi-vies de l'ARNm de la *GSTP1-1* de cellules cultivées sans SVF ne varient pas de façon significative et on peut considérer que la culture des cellules sans SVF n'a pas d'effet sur la longévité des ARNm de la *GSTP1-1*. Lors d'un traitement au TPA, la demi-vie de l'ARNm de la *GSTP1-1* dans les lignées K562 et Jurkat ne change pas de façon significative démontrant que le TPA n'induit pas de changements post-transcriptionnels.

Tableau X: Demi-vie de la *GSTP1-1*

Lignée	Expression de la <i>GSTP1-1</i>	Demi-vie pour des cellules cultivées avec SVF (h)	Demi-vie pour des cellules cultivées sans SVF (h)	Demi-vie pour des cellules cultivées avec SVF, +TPA 100 nM, 24 h (h)
K562	+	49,5 ±1,6	42 ±6	40 ±16
Jurkat	+	14,8 ±1,5	16,8 ±2,3	15,6 ±3,4
Raji	-	NA	NA	NA
U937	+	ND	ND	ND

NA: non applicable, ND : non déterminé, Les résultats sont la moyenne de 3 expériences indépendantes.

4 - Etude de l'effet de différents agents chimiothérapeutiques sur l'expression de la *GSTP1-1*

Nous avons ensuite voulu déterminer si un stress oxydant peut réguler l'expression de la *GSTP1-1*. Pour cela nous avons hybridé une macroarray : Cancer Cell Line Profiling Array (BD Clontech). 26 lignées cellulaires provenant de cancers humains ont été traitées avec 26 agents chimiothérapeutiques inducteurs de stress oxydant ou radiations. Les ARN polyA+, extraits des différentes lignées après traitement, ont subi une RT-PCR avant d'être déposés sur une membrane de nylon. Nous avons hybridé l'ADNc de la *GSTP1-1* sur cette membrane (figure 29).

En ne prenant en compte que les traitements qui activent plus de 5 ou 10 fois l'expression de la *GSTP1-1* par rapport au contrôle, nous voyons clairement apparaître 3 lignées cellulaires (MDA-MB-435S, un carcinome du sein, U-87 MG, un glioblastome du cerveau et ACHN, un adénocarcinome du rein, indiquées d'une flèche sur le figure 29) dont le profil nous montre que certains traitements induisent fortement l'expression de la *GSTP1-1* (Figure 30).

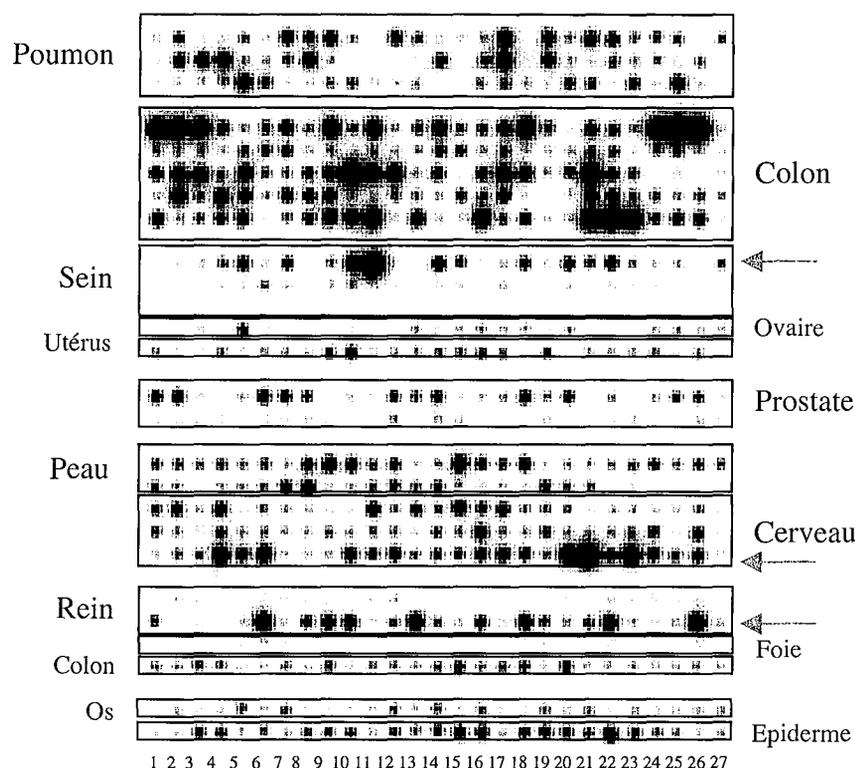


Figure 29: Cancer Cell Line profiling array hybridée avec l'ADNc de la *GSTP1-1*.

Poumon: A549, NCI-H460, NCI-H1299; Colon: HCT116, HCT116p21^{-/-}, HCT116p53^{-/-}, HCT-15, HT-29; Sein: MDA-MB-435S, MDA-MB-231, MCF7; Ovaire: SK-OV-3; Utérus: HeLa; Prostate: DU 145, PC-3; Peau: SK-MEL-28, SK-MEL-5; Cerveau: SK-N-SH, IMR-32, U-87 MG; Rein: 786-O, ACHN; Foie: Hep G2; Colon: COLO 587, Os: U-2 OS; Epiderme: A-431.

Chaque lignée a été traitée avec: 3) UV; 4) choc thermique; 5) cycloheximide; 6) actinomycine D; 7) hydroxyurée; 8) étoposide; 9) 5-FU; 10) cytosine arbinoside; 11) cytochalasine D; 12) doxorubicine; 13) desferrioxamine; 14) camptothécine; 15) geldanamycine; 16) aphildicoline; 17) carmustine; 18) cis-platine; 19) L-mimosine; 20) mitomycine; 21) démécoldine; 22) améthoptérine; 23) taxol; 24) thiotepa; 25) eau oxygénée; 26) N-(phosphonacétyl)-L-aspartate; 27) rayons gamma. 1) est un témoin des lignées cultivées avec 0,5 % de SVF, 2) est un contrôle des lignées non-traitées.

Des témoins négatifs sont aussi utilisés: ubiquitine (UBI), ARN total de levure, ARNt de levure, ARNt de E.coli, ADN de E.coli, poly r(A) et ADN Cot-1 humain.

	1	C	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
A549	0,4	1,0	0,7	0,8	0,7	0,5	2,7	2,3	2,6	0,7	0,4	1,9	0,9	0,4	0,3	0,6	3,2	0,6	2,3	0,8	2,1	1,9	0,7	1,0	0,9	0,4	0,8
NCI-H460	0,2	1,0	2,0	2,9	0,6	0,3	0,6	2,1	0,4	0,2	0,2	0,2	0,2	0,7	0,2	0,6	1,7	0,3	1,0	0,3	0,2	0,5	0,3	0,3	0,2	0,4	0,2
NCI-H1299	0,6	1,0	1,4	2,1	5,6	2,1	0,7	1,1	1,0	1,0	0,5	0,5	0,8	0,5	0,4	0,9	1,4	0,8	0,6	1,5	1,1	0,6	2,1	0,6	3,6	0,7	0,5
HCT116	0,9	1,0	0,8	0,2	0,1	0,1	0,2	0,1	0,7	0,1	0,4	0,0	0,1	0,3	0,1	0,1	0,2	0,6	0,1	0,0	0,2	0,1	0,1	0,9	1,3	1,6	0,1
HCT116p21-/-	1,0	1,0	0,8	0,4	0,5	0,5	0,5	0,3	0,6	0,6	0,4	0,2	0,2	0,5	0,4	0,2	0,5	0,4	0,2	0,2	0,5	0,5	0,2	0,5	0,7	0,5	0,2
HCT116p53-/-	0,5	1,0	1,1	0,3	0,9	0,3	0,2	0,3	0,8	3,8	1,1	1,0	0,1	0,3	0,1	0,4	1,4	0,9	0,1	0,3	2,5	0,5	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1
HCT-15	0,2	1,0	0,4	0,9	0,5	0,2	0,3	0,4	0,6	0,5	0,2	0,2	0,1	0,1	0,2	0,2	0,4	0,1	0,1	0,1	0,5	0,5	0,2	0,2	0,1	0,2	0,1
HT-29	1,7	1,0	0,9	1,6	1,9	0,4	0,5	1,1	3,2	3,6	4,5	0,5	1,5	0,4	0,4	5,9	0,8	1,1	0,3	0,4	6,8	8,8	6,0	1,0	1,1	1,4	0,3
MDA-MB-435S	0,8	1,0	1,3	3,1	6,8	1,8	3,7	1,2	2,6	14,7	60,2	4,9	1,0	6,4	3,0	1,0	1,1	3,7	1,2	4,0	2,9	7,1	1,8	1,5	1,4	0,9	1,9
MDA-MB-231	0,9	1,0	1,3	1,8	2,4	2,6	1,8	1,3	2,0	5,0	9,2	2,6	1,2	1,7	1,6	1,1	1,4	1,3	1,2	1,8	1,3	1,5	1,5	1,2	1,3	1,1	1,3
MCF7	0,9	1,0	1,0	1,2	1,5	1,5	1,2	1,1	1,4	1,6	1,3	1,2	1,2	1,1	1,2	1,0	1,0	1,1	0,9	1,2	1,1	1,0	1,1	1,2	1,3	1,2	1,1
SK-OV-3	0,9	1,0	1,1	1,3	4,0	1,5	1,0	1,1	1,3	1,4	1,0	1,0	1,9	1,3	1,5	1,9	1,5	1,4	1,0	1,7	0,9	1,0	1,1	1,8	2,0	1,6	1,6
HeLa	1,4	1,0	1,1	1,9	1,8	2,0	1,7	1,5	3,9	6,5	1,9	2,0	1,8	2,5	2,2	4,4	2,1	1,1	2,7	1,2	1,8	1,8	1,7	2,9	1,4	2,5	1,2
DU 145	0,8	1,0	0,3	0,2	0,4	1,4	1,0	0,8	0,2	0,3	0,3	0,8	0,6	1,0	0,3	0,3	0,4	1,4	0,4	0,9	0,2	0,3	0,2	0,3	0,7	0,8	0,3
PC-3	0,8	1,0	0,7	0,6	0,7	1,1	1,0	0,8	0,7	0,6	0,6	1,1	0,7	1,0	0,8	0,6	0,6	0,8	0,7	0,6	0,6	0,7	0,7	0,5	0,7	1,0	0,6
SK-MEL-28	0,9	1,0	0,8	1,1	0,8	1,0	0,9	2,7	3,6	2,9	1,4	1,8	0,7	1,2	6,2	2,4	1,4	2,9	0,7	0,6	0,6	0,7	1,1	1,6	0,9	1,6	1,0
SK-MEL-5	1,1	1,0	0,7	0,9	0,7	0,8	2,4	3,1	1,3	1,0	1,4	1,5	1,1	1,5	1,7	1,0	0,8	0,8	1,8	1,0	0,7	0,4	0,5	0,5	0,5	0,4	0,3
SK-N-SH	0,7	1,0	0,5	1,3	0,4	0,5	0,4	0,5	0,3	0,4	1,4	0,6	0,9	0,7	2,1	1,2	1,2	0,5	0,6	0,5	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4	0,2
IMR-32	0,9	1,0	1,0	2,1	1,3	1,4	0,8	0,7	0,8	1,0	1,3	1,3	0,9	1,2	1,5	3,7	1,6	1,1	1,6	2,1	2,6	1,7	2,3	2,3	0,8	2,1	0,5
U-87 MG	0,6	1,0	2,2	10,2	4,7	7,9	1,4	0,7	1,2	3,5	2,5	3,5	1,4	1,7	2,1	3,7	4,4	3,0	2,1	12,0	26,0	6,4	15,6	4,9	2,2	3,3	0,7
786-0	0,8	1,0	0,9	1,1	1,8	3,5	2,0	1,5	2,0	1,8	1,4	1,9	2,9	1,6	1,1	1,4	1,4	2,3	1,9	1,7	2,0	2,9	1,8	1,4	1,7	3,3	1,4
ACHN	1,6	1,0	1,0	1,2	4,0	18,7	4,3	3,9	6,8	6,7	2,3	4,0	14,7	4,3	2,1	4,8	3,1	11,6	4,8	2,4	4,2	15,1	3,2	1,7	3,7	22,4	4,1
Hep G2	1,0	1,0	1,1	1,3	2,1	4,7	2,4	2,1	2,7	2,6	1,6	2,2	4,1	2,5	1,9	2,3	2,3	3,6	2,2	1,8	2,2	3,7	1,8	1,3	2,0	4,4	1,8
COLO 587	1,0	1,0	1,3	1,0	0,9	1,0	1,2	1,0	1,4	1,0	1,2	1,2	1,2	1,7	2,4	1,7	2,0	2,4	1,4	2,8	1,3	1,1	1,1	1,0	1,1	1,3	0,9
U-2 OS	0,8	1,0	1,3	1,3	1,6	1,3	1,8	1,2	1,1	1,2	1,2	1,9	1,4	2,3	2,1	2,4	1,4	1,6	2,3	1,8	2,1	1,9	1,7	1,4	1,3	1,4	1,4
A-431	0,7	1,0	2,7	2,2	1,1	1,2	1,1	1,7	1,8	1,9	1,1	1,9	1,7	2,6	5,3	4,2	1,6	2,9	4,0	3,1	2,9	6,1	3,2	1,8	1,4	1,0	1,1

> 10C < 0,1C
> 5C < 0,2C

Figure 30: Représentation numérique de l'array Cancer Cell Line profiling array.

Les cases bleu foncé représentent les points dont l'intensité est inférieure à 10 % du contrôle (C), les cases bleu clair les points dont l'intensité est inférieure à 20 % du contrôle. Les cases jaune claire et foncée représentent les points dont l'intensité est supérieure à 5 et 10 fois le contrôle, respectivement.

En effet la cytochalasine D (colonne 11) et la cytosine arabinoside (colonne 10) induisent l'expression de la *GSTP1-1* dans la lignée MDA-MB-435S de 60,2 et 14,7 fois, respectivement. Dans la lignée U-87 MG, un choc thermique (colonne 4), la mitomycine (colonne 20), la déméclocine (colonne 21) et le taxol (colonne 23) induisent l'expression de la *GSTP1-1* de 10,2; 12; 26 et 15,6 fois, respectivement. Enfin, les traitements à l'actinomycine D (colonne 6), la desferrioxamine (colonne 13), le cis-platine (colonne 18), l'amethoptérine (colonne 22) et au PALA (colonne 26) activent la *GSTP1-1* de 18,7; 14,7; 11,6; 15,1 et 22,4 fois dans la lignée ACHN.

5 - Étude des voies de transduction du signal

Le promoteur de la *GSTP1-1* contient des sites liant potentiellement des facteurs de transcription mis en jeu dans le stress et l'inflammation. De plus, il a été montré que ces sites sont impliqués dans la régulation de la *GSTP1-1*. En effet, le site AP-1 fait partie du promoteur minimal et est essentiel à la transcription (Borde-Chiche, *et al.*, 2001a). Le site NF- κ B a lui été considéré comme étant un suppresseur de l'activité trans-activatrice induite par AP-1 (Moffat, *et al.*, 1996a). En effet, les 2 sites étant proches sur le promoteur, les facteurs de transcription se fixant sur le site NF- κ B peuvent interagir avec les facteurs fixés sur le site TRE et bloquer l'activation de la transcription du gène. Les voies de transduction du signal menant à l'activation des facteurs de transcription AP-1 et NF- κ B pourraient donc être impliquées dans la régulation de l'expression de la *GSTP1-1*. Pour vérifier cette hypothèse nous avons transfecté les cellules de la lignée K562 avec des vecteurs d'expression des acteurs majeurs des 2 voies de stress précédemment citées. Les cellules sont co-transfectées avec un vecteur combinant une partie du promoteur de la *GSTP1-1* avec le gène de la luciférase. Un plasmide exprimant de façon constitutive la luciférase Rénilla sera utilisé comme contrôle de transfection.

La voie de transduction du signal menant typiquement à l'activation de AP-1 a été étudiée en utilisant des vecteurs d'expression des kinases : Raf, cdc42, MEKK1, MEK1 ainsi que l'inhibiteur de Ras RhoA et une protéine mutée ERK1 dominant négatif (Figure 31).

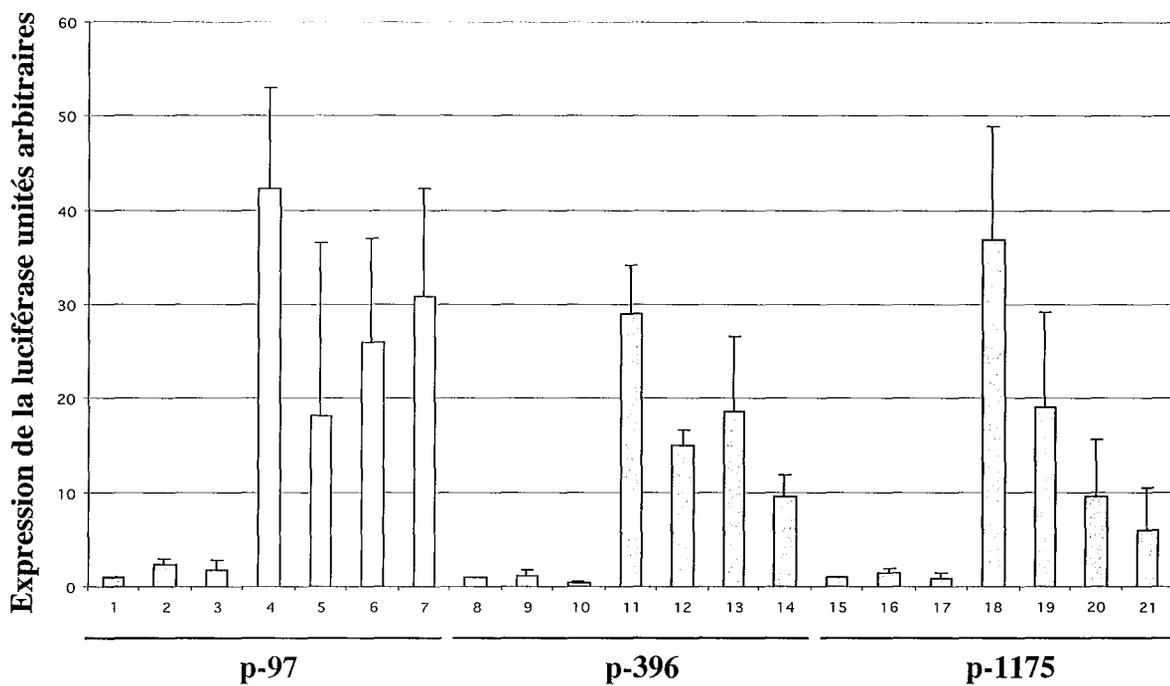


Figure 31: Etude du rôle des voies de signalisation par co-transfections. Cellules de la lignée K562 transfectées avec les vecteurs d'expression de la voie de signalisation mitogénique.

Colonnes 1, 8, 15: témoin, colonnes 2, 9, 16: vecteur d'expression ERK1 dominant négatif, colonnes 3, 10, 17: vecteur d'expression RhoA, colonnes 4, 11, 18: vecteur d'expression Raf, colonnes 5, 12, 19: vecteur d'expression MEK1, colonnes 6, 13, 20: vecteur d'expression cdc42, colonnes 7, 14, 21: vecteur d'expression MEKK1.

Les résultats suggèrent que la voie de signalisation Raf – cdc42 – MEKK1 – MEK1 est utilisée dans la régulation basale de la *GSTP1-1*. En effet, la co-transfection de ces vecteurs d'expression avec un gène luciférase sous le contrôle d'une construction du promoteur de la *GSTP1-1* induit l'expression de la luciférase. La surexpression de Raf, cdc42, MEKK1 et MEK1 accroît l'expression de la luciférase de 40, 25, 31 et 18 fois, respectivement. Par contre l'expression de l'inhibiteur de Ras et de la protéine ERK1 mutée n'a pas d'effet significatif sur l'activité luciférase dans les cellules K562, suggérant que les protéines Ras et ERK1 n'ont pas d'effet inhibiteur sur la voie de signalisation activant la *GSTP1-1*.

Pour vérifier que la voie activée aboutit à l'activation de la kinase phosphorylant c-Jun (JNK), et donc participe à l'activation du dimère AP-1, nous avons utilisé un inhibiteur spécifique de JNK, le SP600125 (anthra [1,9-cd]pyrazol-6(2H)-one). Les cellules de la lignée K562 sont traitées avec différentes concentrations de l'inhibiteur (Figure 32).

Les ARN totaux sont ensuite extraits et hybridés avec l'ADNc de la *GSTP1-1*. Que les cellules de la lignée K562 soient cultivées en présence (10 %) ou en l'absence (0,1 %) de SVF, le SP600125 a un effet inhibiteur sur l'expression basale de la *GSTP1-1* (-20 % en présence de SVF et -50 % en l'absence de SVF) dès 30 μ M.

Ces résultats confirment le fait que AP-1 participe à la régulation de la *GSTP1-1* car l'inhibition de sa phosphorylation réduit l'expression de la *GSTP1-1*. Nous confirmons donc ici le rôle important de AP-1 dans l'expression basale de la *GSTP1-1*. Toutefois, les inducteurs typiques de AP-1 comme le TPA ou les métaux lourds n'induisent l'expression ni de l'ARN, ni de la protéine correspondante.

De plus, nous avons réalisé des expériences de transfections transitoires à l'aide de vecteurs d'expression des protéines c-Jun et c-Fos. Les résultats nous montrent que c-Jun et c-Fos induisent fortement l'expression de la luciférase sous le contrôle de la construction p-1175 du promoteur de la *GSTP1-1* de 11,6 et 15,7 fois, respectivement (Figure 33).

Notre équipe a préalablement montré que l'expression de l'ARNm de la *GSTP1-1* varie d'une lignée à l'autre (Borde-Chiche, *et al.*, 2001a).

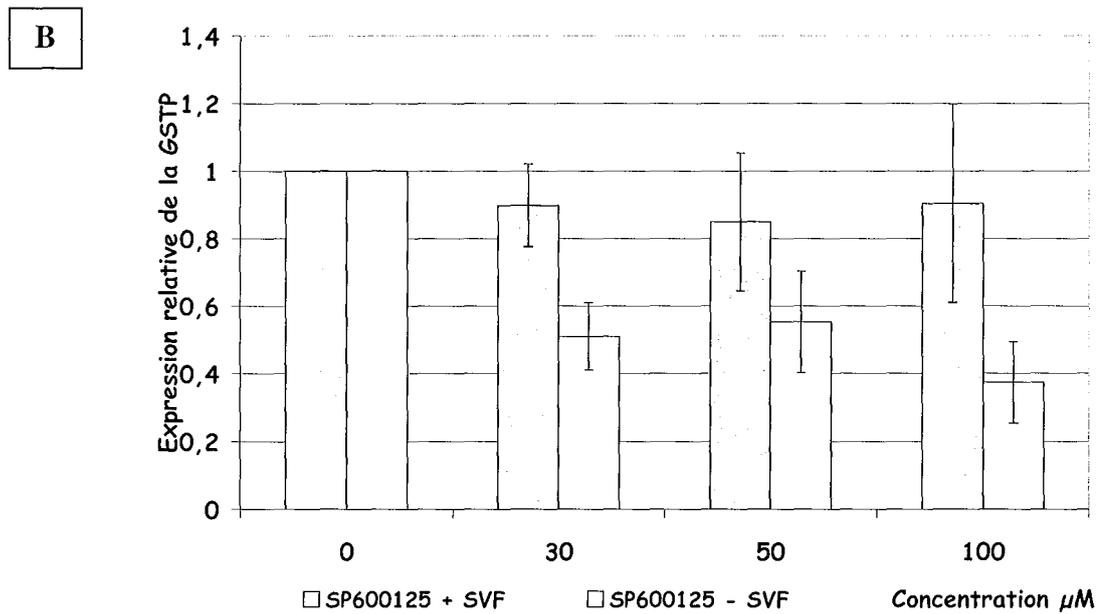
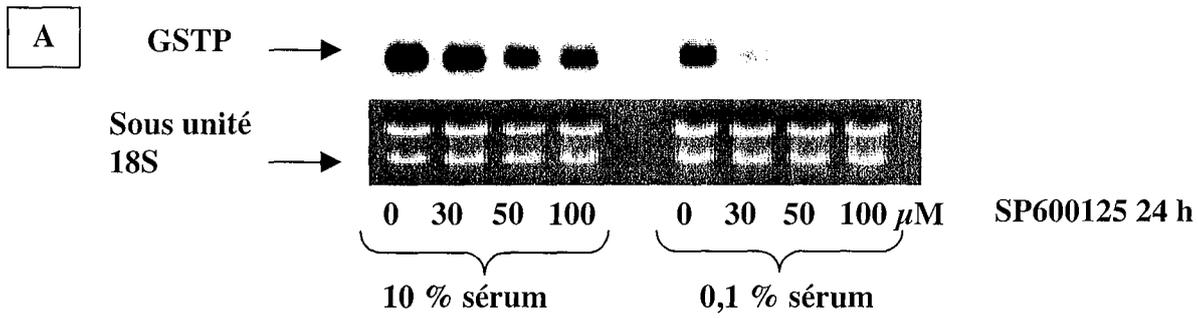


Figure 32: Etude de l'ARNm par Northern blot. Cellules de la lignée K562 traitées au SP600125 0, 30, 50 et 100 μM pendant 24 h.

Des cellules non traitées, avec 0,1 % de SVF pendant 60h, sont témoins. (A) hybridation de la sonde *GSTP1-1* et coloration des sous-unités ribosomales au bromure d'éthidium. (B) représentation graphique de 2 expériences indépendantes.

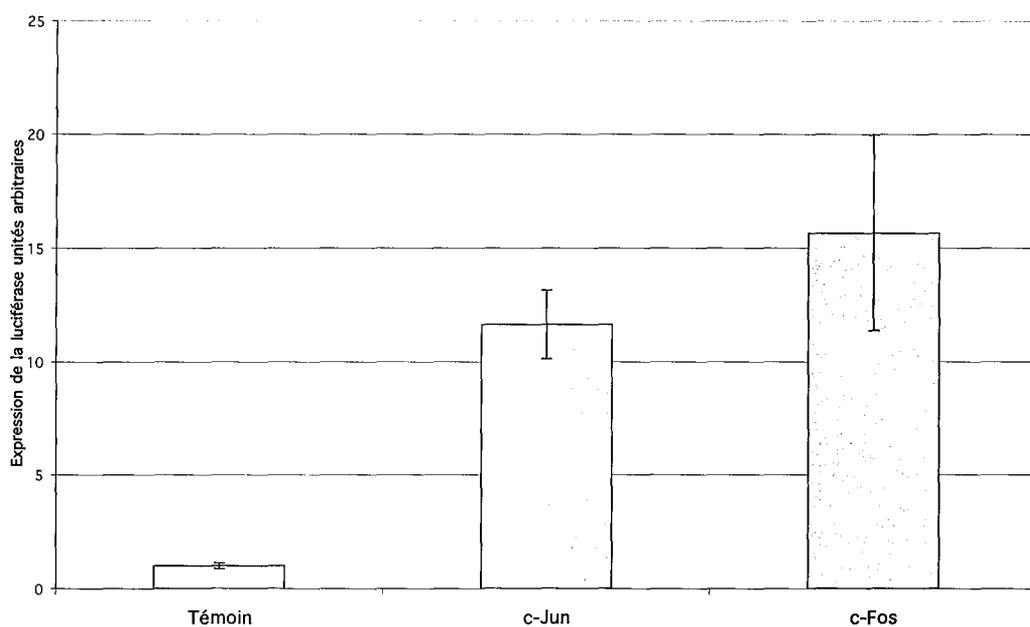


Figure 33: Etude du rôle de c-Jun et c-Fos par transfection. Cellules de la lignée K562 transfectées avec un vecteurs d'expression c-Jun ou c-Fos.

Des cellules non traitées sont témoins. Représentation de 3 expériences indépendantes.

Le site AP-1 situé dans le promoteur de la *GSTP1-1* humaine est essentiel dans la régulation de l'expression de cette enzyme:

La voie de transduction du signal Ras - Raf - MEKK1 - MEK1 - ERK1 est impliquée dans la régulation de l'expression de la *GSTP1-1*.

L'expression de l'ARNm de la *GSTP1-1* est inhibée par le SP600125, un inhibiteur spécifique de JNK.

La transfection des vecteurs d'expression c-Jun et c-Fos induit l'activité transcriptionnelle de la *GSTP1-1*.

Cependant les inducteurs typiques de AP-1 tels que le TPA et les métaux lourds n'induisent pas l'expression de la *GSTP1-1*. Les voies de transduction du signal activées par ces inducteurs sont peut-être inexistantes dans les cellules sanguines humaines. Il existe peut-être une régulation tissu et/ou espèce spécifique de l'expression de la *GSTP1-1*.

⇒ D'autres voies de transduction du signal sont-elles impliquées?

Partie 2: Etude de la voie inflammatoire

Nous venons de démontrer qu'une autre voie de signalisation pourrait être impliquée dans la régulation de l'expression de la GSTP1-1. Or, beaucoup de gènes régulés par AP-1 le sont aussi par NF-κB. De plus, nous savons qu'il existe un site fixant potentiellement les facteurs de transcription de la famille NF-κB en -93 du promoteur du gène de la *GSTP1-1* (Moffat, *et al.*, 1996a). Enfin, d'après Jardine et al. (2002), les effecteurs de l'inflammation influencent l'expression de la GCS (γ-glutamyl cystéinyl synthétase) et le métabolisme du glutathion (Jardine, *et al.*, 2002). La voie de signalisation de l'inflammation, menant à l'activation de AP-1 et de NF-κB pourrait donc être un bon candidat comme régulateur de l'expression de la GSTP1-1.

1 - Etude de l'effet du TNFα sur l'expression de l'ARNm de la *GSTP1-1*

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons traité les cellules de la lignée K562 au TNFα qui est un inducteur typique de cette voie (Figure 34). Les résultats des expériences de Northern blot nous montrent que dans les lignées leucémiques K562 et Jurkat, le TNFα induit l'expression de l'ARNm de la *GSTP1-1* indépendamment de la concentration en TNFα pour la lignée K562. Nous confirmons ainsi l'importance d'une deuxième voie de signalisation dans la régulation de l'expression de la GSTP1-1.

2 - Caractérisation du site NF-κB situé en -93 du promoteur

Comme il a été décrit un site NF-κB dans le promoteur de la *GSTP1-1*, nous avons décidé de le caractériser en réalisant des expériences de gel retard et de supershift avec des anticorps reconnaissant les protéines de la famille NF-κB: p50, p52, p65, relB, c-Rel et Bcl3 (Figure 35). Des cellules de la lignée K562 ont été traitées avec 20 ng/ml de TNFα et les protéines nucléaires ont été extraites et analysées en gel retard avec un oligonucléotide ayant la séquence du promoteur correspondant au site NF-κB. L'induction de NF-κB par le TNFα n'induit pas la fixation de nouveaux facteurs sur le site proximal.

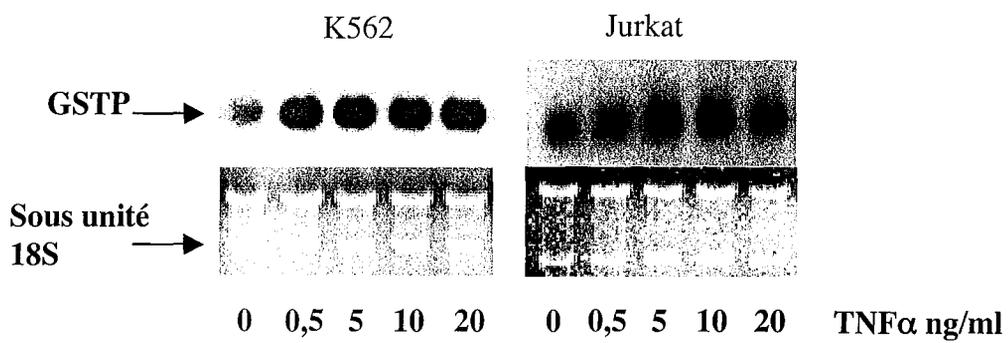
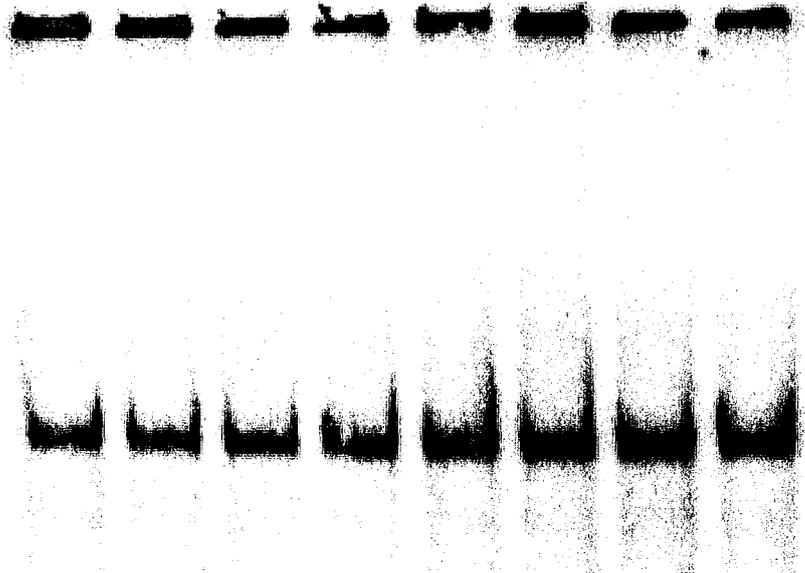


Figure 34: Etude de l'ARNm par Northern blot. Cellules des lignées K562 et Jurkat traitées au TNF α pendant 8h

Des cellules non traitées, avec 0,1 % de SVF pendant 60h, sont témoins.



Anticorps	-	-	p50	p52	p65	cRel	RelB	Bcl-3
TNF α	-	+	+	+	+	+	+	+

Figure 35: Caractérisation du site NF- κ B-like par gel retard. Cellules de la lignée K562 traitées au TNF α 20 ng/ml pendant 1h incubés en présence de sonde NF- κ B-like.

Des cellules non traitées, avec 0,1 % de SVF pendant 60h, sont témoins. (A) Compétition avec les sondes distale (D), mutée (M) et consensus (C). (B) Supershift avec des anticorps dirigés contre les protéines p50, p52, p65, RelB, cRel et Bcl-3.

Nous observons une bande unique non inductible. Nos résultats montrent qu'aucun des anticorps utilisés ne crée de supershift, démontrant la non-fonctionnalité de ce site NF- κ B.

3 - Recherche de nouveaux sites NF- κ B

Pour comprendre plus précisément comment l'expression de la *GSTP1-1* est régulée, nous avons recherché d'autres sites NF- κ B présents sur le promoteur de la *GSTP1-1* et potentiellement impliqués dans sa régulation.

Le logiciel MatInspector de Genomatix (<http://www.genomatix.de>) nous a permis d'établir la présence de sites de séquences consensus sur les 1200 premières paires de bases du promoteur (Heinemeyer, *et al.*, 1998).

Ce site nous permet de retrouver les éléments de fixation déjà connus comme les 2 sites Sp1, le site AP-1 et le site NF- κ B situé en -93 du promoteur de la *GSTP1-1*. Nous découvrons de plus plusieurs sites (figure 4) dont le plus intéressant est le site NF- κ B situé à -323, qui pourrait être le site impliqué dans la régulation de la *GSTP1-1* lors d'un traitement au TNF α (Figure 36). Il nous a alors paru important de caractériser ce site afin de déterminer s'il participe à la régulation de la *GSTP1-1*.

4 - Caractérisation du site NF- κ B distal

Nous avons étudié la fonctionnalité du site NF- κ B distal découvert grâce au site internet MatInspector. L'analyse par gel retard d'extraits nucléaires de cellules K562 traitées ou non au TNF α nous montre que la fixation de protéines sur cette sonde est inductible par le TNF α . On observe l'apparition de deux bandes supplémentaires après traitement au TNF α (Figure 37A).

Pour vérifier leur spécificité quant à la sonde distale, nous avons réalisé des expériences de compétition avec des sondes correspondant au site consensus, au site NF- κ B distal et au site distal muté. L'utilisation des oligonucléotides consensus et distal fait disparaître complètement les deux bandes inductibles par le TNF α . Par contre, l'utilisation de l'oligonucléotide muté n'a pas d'effet sur la fixation de facteurs de transcription sur la sonde NF- κ B distale. Les deux bandes inductibles par le TNF α sont donc spécifiques de NF- κ B.

File Edit View Search Go Bookmarks Tasks Aide 11:04

MatInspector professional: Result - Netscape 6

http://genomatix.gsf.de/mat_fam

V\$CRBP/CREBP1_01	cAMP-responsive element binding protein 1	711 - 718	(-)	1.000	0.803	tgACGTeg
V\$CREB/CREB_01	cAMP-responsive element binding protein	711 - 718	(-)	1.000	0.962	TGACgtag
V\$CDXF/CDX2_B	Cdx-2 mammalian caudal related intestinal transcr. factor	711 - 729	(-)	1.000	0.878	atttatTTA ^{tg} acgtag
Y\$TCFF/TCF11_01	TCF11/KCR-F1/Nr1 homodimers	715 - 727	(+)	1.000	0.960	GTCAtaaataaa
V\$CDXF/CDX2_B	Cdx-2 mammalian caudal related intestinal transcr. factor	761 - 779	(-)	1.000	0.868	ttattatTTA ^{tt} tatt
V\$PDX1/PDX1_B	Pdx1 (IDX1/PP1) pancreatic and intestinal homeodomain TF	765 - 783	(+)	1.000	0.748	aaaataaaTAAT ^{aa} ata
Y\$RPOA/POLY_C	Retroviral Poly A signal	766 - 783	(+)	1.000	0.778	aaATAAA ^{aa} ataataa
Y\$RPOA/LPOLYA_B	Lentiviral Poly A signal	809 - 816	(+)	1.000	0.992	aaATAAAg
Y\$IRFF/ISRE_01	interferon-stimulated response element	817 - 831	(-)	1.000	0.818	gaggaaagGAAA ^{tg}
Y\$NFAT/NFAT_O6	Nuclear factor of activated T-cells	817 - 828	(-)	1.000	0.952	gaaagGAAA ^{tg}
Y\$ETSF/PU1_B	Pu.1 (Pu120) Ets-like transcription factor identified in lymphoid B-cells	820 - 835	(-)	1.000	0.870	cttagCGAA ^g gaaa
Y\$STAT/STAT_01	signal transducers and activators of transcription	826 - 834	(-)	1.000	0.924	ttagaCGAA
V\$MINI/MUSCLE_INI_B	Muscle initiator	834 - 854	(+)	1.000	0.871	agcggcctCAC ^{cc} ctctcc
V\$PAX5/PAX5_01	B-cell-specific activating protein	838 - 865	(-)	0.952	0.823	tcacagGGCA ^g gggagggg ^{tg} gagc
Y\$IKRS/IK1_01	Ikams1	898 - 910	(+)	1.000	0.930	cttaGGG ^A atttc
Y\$NFKB/NFKAPPAB_01	NF-kappaB	902 - 911	(+)	1.000	1.000	GGGA ^A atttc
V\$MZF1/MZF1_01	MZF1	909 - 916	(-)	1.000	0.980	cggGGGGa
V\$PAX5/PAX9_B	zebrafish PAX9 binding sites	939 - 962	(-)	1.000	0.796	ggarCGCA ^g cgaagt ^{tg} cgcagc
Y\$ETSF/GABP_B	GABP GA binding protein	960 - 971	(-)	1.000	0.914	gcaGGA ^g agga
Y\$FKHD/FREAC2_01	Fork head RElated ACtivating-2	972 - 987	(-)	1.000	0.912	agggagTAA ^A cagaca
Y\$NOLF/NOLF1_01	olfactory neuron-specific factor	987 - 1008	(-)	1.000	0.818	cccaggTCCC ^c agcggg ^g cta
V\$MYOD/E47_01	E47	1027 - 1041	(-)	1.000	0.924	cgcGCA ^G ctg ^g ccgg
Y\$AP4R/AP4_O6	activator protein 4	1030 - 1039	(-)	1.000	0.962	cgCAG ^C tgcc
Y\$NOLF/NOLF1_01	olfactory neuron-specific factor	1039 - 1060	(-)	1.000	0.862	ctggagTCCC ^g ggagt ^g ccgc
Y\$REBV/R_01	Epstein-Barr virus transcription factor R	1072 - 1092	(+)	1.000	0.909	gcccgcagccc ^g GGTGca
Y\$EGRF/EGR3_01	early growth response gene 3 product	1073 - 1084	(-)	1.000	0.791	ggGCG ^T ggccg
Y\$AP2F/AP2_O6	activator protein 2	1110 - 1121	(-)	1.000	0.957	ctCCC ^G ccggcc
Y\$NFKB/NFKB_O6	NF-kappaB	1125 - 1138	(+)	1.000	0.863	gcGGGA ^{cc} ctccag
Y\$AP1F/NFE2_01	NF-E2 p45	1155 - 1165	(+)	1.000	1.000	gtactCA ^G ca
Y\$SP1F/GC_01	GC box elements	1166 - 1179	(+)	1.000	0.939	ctggGG ^{CG} ggcgg
Y\$SP1F/SP1_O6	stimulating protein	1176 - 1188	(+)	1.000	0.948	ggggGG ^{CG} ggacc
Y\$SRFF/SRF_C	Serum responsive factor	1190 - 1204	(+)	0.950	0.900	cCCTTA ^{ag} ggctg
Y\$EGRF/EGR1_01	Egr-1/Krox-24/NGFI-A immediate-early gene product	1231 - 1242	(-)	1.000	0.832	ctcggcGG ^{CG} Ga

Map :

Figure 36: Logiciel de recherche d'éléments de fixation des facteurs de transcription.

Nous retrouvons grâce à ce site les éléments Sp1, AP-1 et NF- κ B déjà connus et découvrons un site NF- κ B en -323.

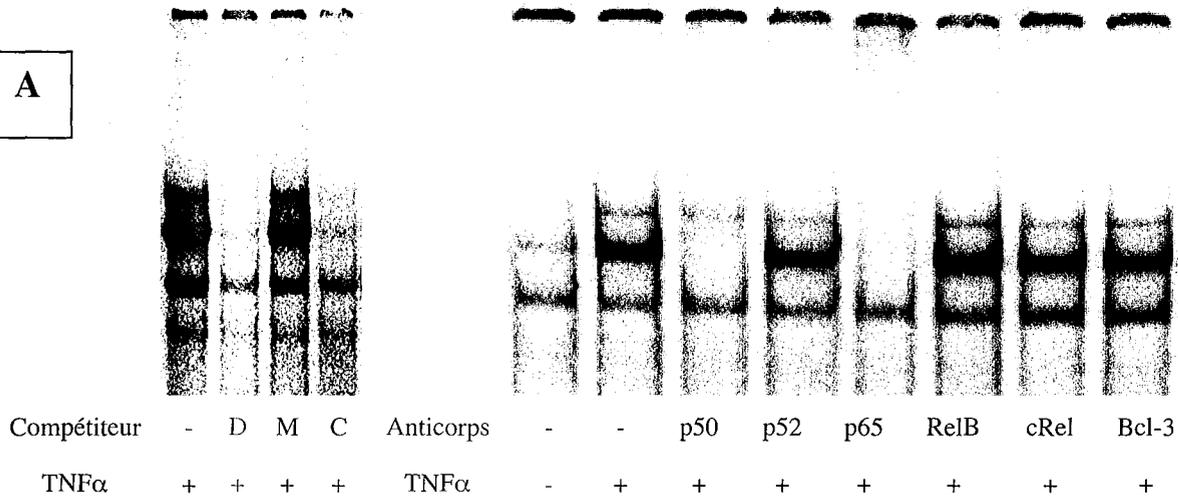
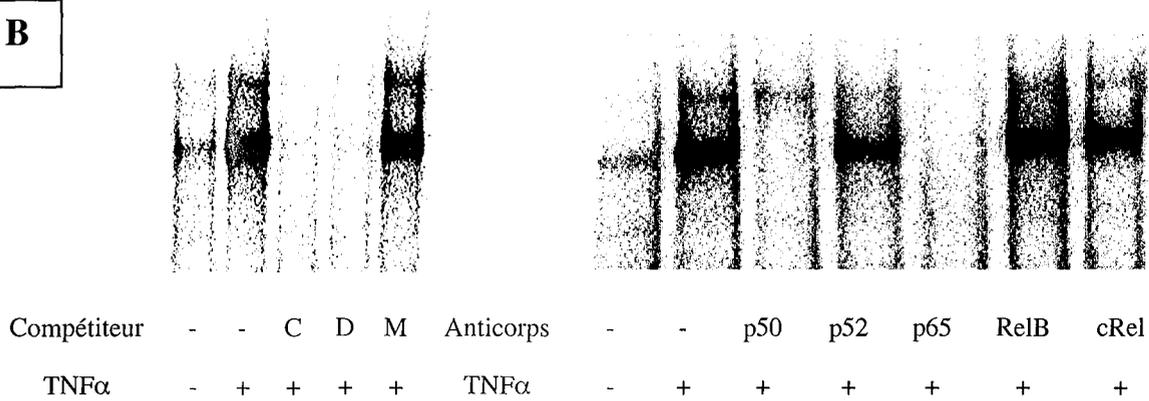
A**B**

Figure 37: Caractérisation du site NF-κB distal par gel retard. Cellules des lignées K562 et U937 traitées au TNFα 20 ng/ml pendant 1h incubés en présence de sonde NF-κB distale.

Des cellules non traitées, avec 0,1 % de SVF pendant 60h, sont témoins. Des compétitions avec les sondes distale (D), mutée (M) et consensus (C) et des supershifts avec des anticorps dirigés contre les protéines p50, p52, p65, RelB, cRel et Bcl-3 sont réalisés. (A) Lignée K562. (B) Lignée U937.

Pour déterminer quelles protéines de la famille NF- κ B se fixent sur ce site, nous avons réalisé des expériences de supershift avec des anticorps anti-p50, p65, p52, cRel, RelB et Bcl3. L'ajout de l'anticorps anti-p50 fait complètement disparaître la bande inférieure induite par le TNF α , alors que l'ajout de l'anticorps anti-p65 inhibe la formation des 2 bandes induites. Ces résultats suggèrent que la bande la plus retardée est constituée d'un dimère p65/p65 et que la bande inférieure est constituée d'un dimère p50/p65. Les autres anticorps de la famille NF- κ B n'ont pas d'effet sur la fixation des protéines sur la sonde NF- κ B distale, montrant que les protéines correspondantes n'interviennent pas dans les complexes.

Les mêmes expériences ont été réalisées dans les cellules de la lignée U937 (Figure 37B). Dans ce cas, on observe deux bandes induites par le TNF α même si la bande supérieure présente une intensité plus faible que dans la lignée K562. Les expériences de compétition réalisées avec les sondes NF- κ B consensus, distale et distale mutée mènent au même résultat que précédemment: les sondes consensus et distale font complètement disparaître les 2 bandes induites alors que la sonde mutée n'a aucun effet. Les deux complexes induits sont donc spécifiques. De façon à caractériser les protéines formant ces deux complexes, nous avons réalisé des expériences de supershift avec des anticorps reconnaissant les protéines p50, p52, p65, RelB et cRel. Comme pour la lignée K562, les deux anticorps anti-p50 et -p65 provoquent un supershift, démontrant que les complexes sont constitués d'un homodimère p65/p65 et d'un hétérodimère p50/p65.

Ces résultats confirment que le site NF- κ B distal du promoteur de la *GSTP1-1* est un site NF- κ B fonctionnel, alors que le site NF- κ B like décrit comme étant un répresseur ne fixe pas de protéine de la famille de NF- κ B.

5 - Etude de la transactivation des sites NF- κ B

Pour vérifier la fonctionnalité du site NF- κ B distal et son rôle transactivateur, nous avons réalisé des expériences de transfection transitoire en utilisant un gène rapporteur luciférase associé à 5 répétitions du site consensus (p-C κ B) ou du site NF- κ B distal du gène de la *GSTP1-1* (p-GSTNF- κ B) (Figure 38). Le traitement au TNF α des cellules transfectées par l'un des deux plasmides accroît considérablement l'activité luciférase. Les deux sites ont une activité transactivatrice dans les cellules de la lignée K562 même si le site du promoteur semble réagir plus fortement au TNF α (14 fois) que le site consensus (5 fois).

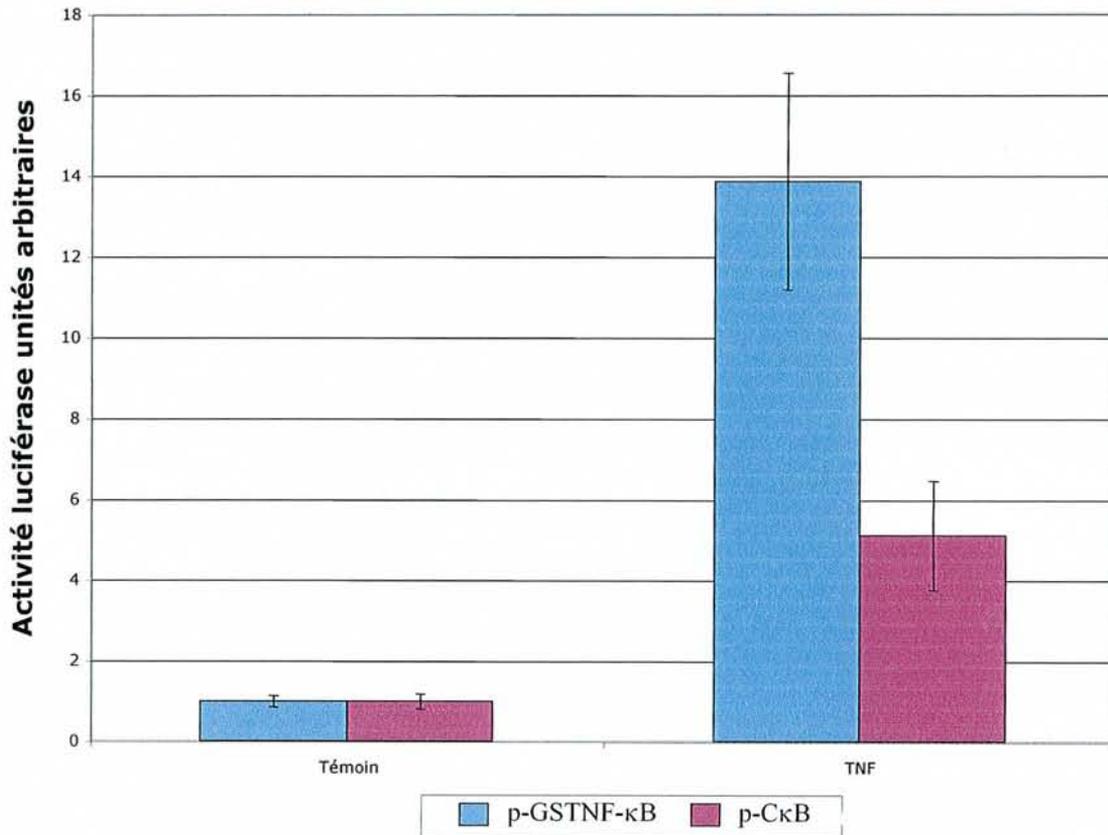


Figure 38: Etude du rôle de NF-κB par transfections. Cellules de la lignée K562 transfectées avec un plasmide rapporteur sous le contrôle de sites NF-κB puis traitées avec du TNF α .

Les cellules sont traitées avec 20 ng/ml de TNF α p-GSTNF-κB: plasmide sous le contrôle de 5 répétitions du site NF-κB distal du promoteur de la *GSTP1-1*. p-CκB: plasmide sous le contrôle de 5 répétitions du site NF-κB consensus.

Ces résultats montrent que le site NF- κ B distal, contrairement au site proximal, est fonctionnel et fixe les facteurs de transcription p50 et p65 en réponse à un traitement au TNF α .

6 - Etude de la voie de transduction du signal de l'inflammation

Afin de déterminer la voie de signalisation menant à l'activation des facteurs de transcription NF- κ B permettant l'expression de la GSTP1-1, nous avons réalisé des expériences de co-transfections. Nous avons transfecté des vecteurs d'expression des protéines de la voie de transduction du signal NF- κ B avec un plasmide codant la luciférase sous contrôle de construction du promoteur de la *GSTP1-1*: p-97, p-396 et pGSTNF- κ B (Figure 39). Les résultats montrent que la transfection des 2 plasmides p-97 et p-396 mène aux mêmes résultats. Nous observons une faible augmentation de l'activité luciférase lors de la co-transfection avec TRAF2 et NIK. La co-transfection de p65 induit légèrement l'activité luciférase codée par le plasmide p-97 (7 fois) et la présence du site NF- κ B distal (dans la construction p-396) permet une induction plus forte (16,5 fois). Nous n'observons pas de modification majeure avec la co-transfection de TNFR1 ou IKK β . Par contre, la co-transfection d'un dominant-négatif I κ B α entraîne une diminution de l'expression de la luciférase dans le cas des 2 plasmides p-97 et p-396 (33 et 35 %, respectivement).

Nous avons aussi utilisé un plasmide luciférase sous contrôle de 5 répétitions du site NF- κ B distal du promoteur de la *GSTP1-1*. Sa co-transfection avec les protéines TNFR1, TRAF2, NIK, IKK β ET P65 entraîne l'induction de l'expression de la luciférase (6,5; 20,6; 33; 3,7 et 35,6 fois respectivement). L'activité transactivatrice du site NF- κ B distal du promoteur de la *GSTP1-1* est induite par les protéines de la voie de signalisation NF- κ B utilisées. De plus, l'utilisation d'un dominant négatif de I κ B α réduit considérablement l'activité luciférase (83 %), démontrant l'implication de cette protéine dans l'activation de NF- κ B.

Nous démontrons ici que la voie de signalisation TNFR1, TRAF2, NIK, IKK β , I κ B α et p65 est impliquée dans l'activation de NF- κ B et donc dans la régulation de l'expression de la GSTP1-1. La similitude des résultats entre les plasmides p-97 et p-396 démontre que cette voie peut aussi induire l'expression de la GSTP1-1 par l'activation d'un autre facteur de transcription que NF- κ B, potentiellement AP-1.

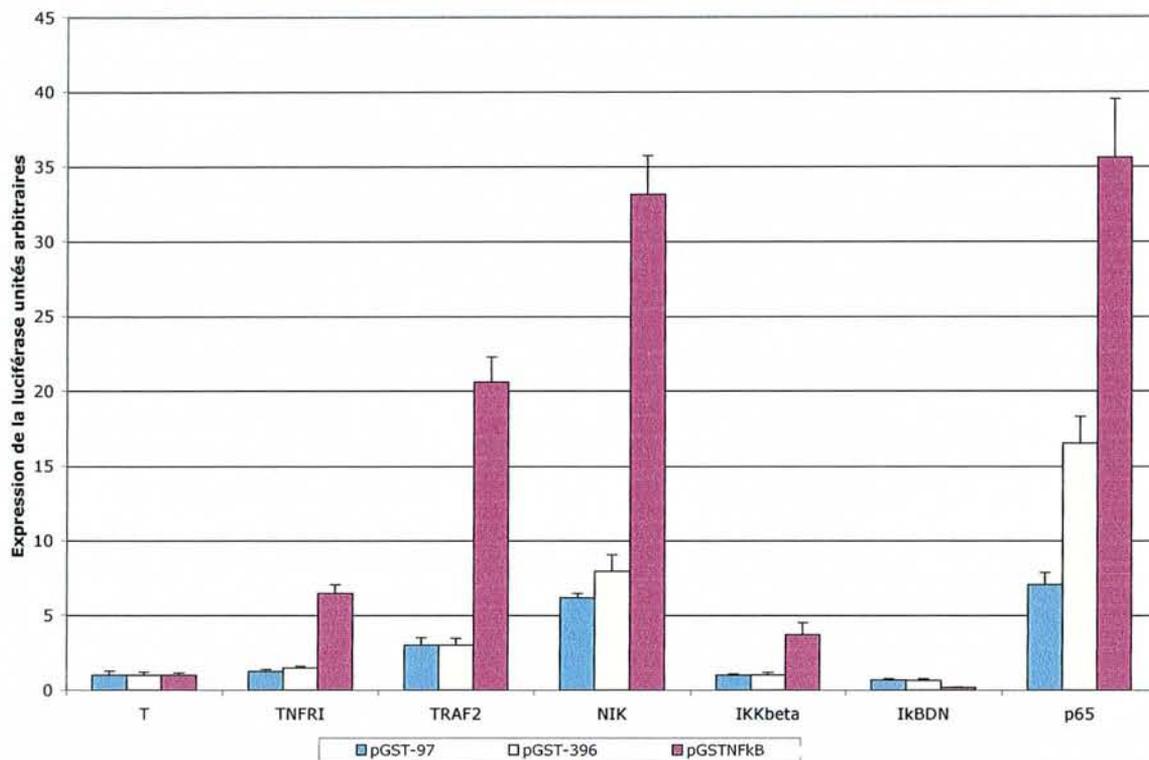


Figure 39: Etude des voies de signalisation par co-transfections. Cellules de la lignée K562 transfectées avec les vecteurs d'expression de la voie de signalisation inflammatoire.

Les cellules de la lignées K562 sont co-transfectées avec le plasmide rapporteur et les vecteurs d'expression TNFR1, TRAF2, NIK, IKK β , I κ B α dominant négatif (I κ B DN) et p65.

De plus, nous avons réalisé une mutagenèse dirigée du site NF- κ B distal. Des cellules de la lignée K562 ont été co-transfectées avec le plasmide sous contrôle du promoteur de la *GSTP1-1* contenant le site NF- κ B distal muté et le plasmide exprimant la sous-unité p65. La mutation de ce site réduit de façon significative l'activité luciférase avec ou sans co-transfection avec p65 (-28 % et -56 % par rapport à leur témoin correspondant) (Figure 40).

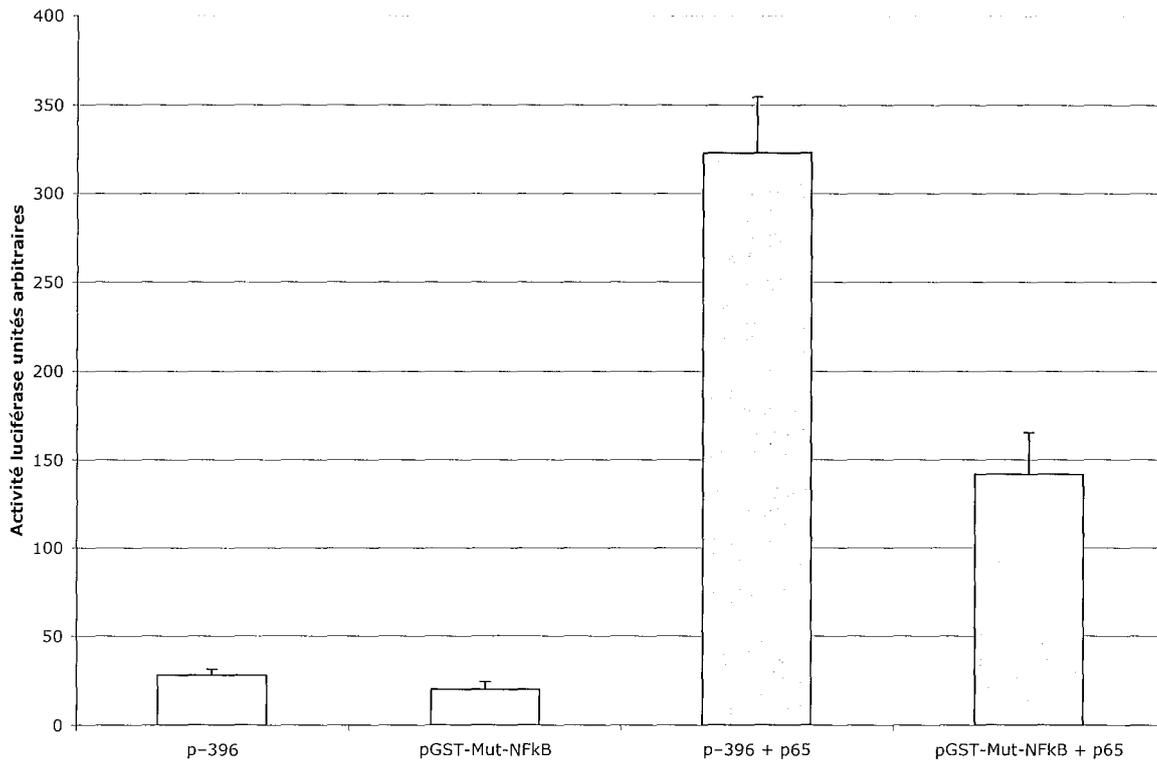


Figure 40: Etude du rôle de NF- κ B par co-transfections. Cellules de la lignée K562 transfectées avec un plasmide rapporteur sous le contrôle du promoteur de la *GSTP1-1* contenant le site NF- κ B muté (pGST-Mut-NF κ B) ou non (p-396), co-transfecté ou non avec la sous-unité p65.

La voie de signalisation NF- κ B est impliquée dans la régulation de l'expression de la *GSTP1-1* au travers d'un site NF- κ B distal en -323:

Le TNF α , inducteur typique de NF- κ B, active l'expression de l'ARNm de la *GSTP1-1* et l'activité transactivatrice du promoteur de la *GSTP1-1*.

La co-transfection des vecteurs d'expression TNFR1, TRAF2, NIK, IKK β et p65 induit l'activité transactivatrice du promoteur de la *GSTP1-1* alors qu'un dominant-négatif de I κ B α inhibe fortement cette activité.

Le site NF- κ B proximal ne fixe pas de facteurs de transcription de la famille NF- κ B.

Le site NF- κ B distal fixe 2 complexes constitués d'un homodimère p65/p65 et d'un hétérodimère p50/p65.

La mutation du site NF- κ B distal réduit l'activité transactivatrice du promoteur de la *GSTP1-1*.

Partie 3 : Etude de l'effet d'agents chimioopréventifs sur l'expression de la GSTP1-1

La GSTP1-1 a souvent été corrélée au développement de la chimiorésistance dans les cellules cancéreuses, limitant ainsi les effets des médicaments chimiothérapeutiques. Nous avons montré dans cette étude et par des travaux précédemment effectués que les facteurs de transcription AP-1 et NF- κ B peuvent être impliqués dans la régulation de l'expression de la GSTP1-1. Pour limiter les effets néfastes de la GSTP1-1 dans les cellules cancéreuses, des inhibiteurs des facteurs de transcription AP-1 et NF- κ B peuvent être envisagés pour développer un nouveau type de thérapies. Les agents chimioopréventifs sont des substances naturelles ou synthétiques non toxiques permettant la suppression, le retard ou l'inversion de la cancérogenèse sans effet secondaire (Kelloff, *et al.*, 1994). De plus, la plupart des agents chimioopréventifs décrits ont la capacité d'inhiber AP-1 et/ou NF- κ B. Il nous a paru intéressant d'étudier l'effet de ces agents dans la lignée cellulaire K562 et sur l'expression de la GSTP1-1 pour déterminer si ces substances pourraient améliorer les traitements chimiothérapeutiques classiques. Nous avons tout d'abord choisi d'étudier les effets de la curcumine qui est extraite de la racine de *Curcuma longa*. En effet, la curcumine a souvent été décrite comme inhibant les facteurs de transcription AP-1 et NF- κ B et ne présente pas de toxicité pour les cellules saines, comme l'ont prouvé les tests cliniques. Cette substance paraît donc être un bon candidat pour l'élaboration d'un nouvel agent anti-cancéreux.

1 - Effet de la curcumine

1.1 - Effet cytotoxique de la curcumine

Pour déterminer l'effet de la curcumine sur la viabilité des cellules leucémiques K562 et Jurkat, nous avons mesuré sa cytotoxicité après 24 h de traitement (Figure 41). La curcumine induit la mort cellulaire dans ces 2 lignées. La mortalité cellulaire atteint 100% dès 10 μ M pour la lignée Jurkat et dès 20 μ M pour la lignée K562.

Dans la suite de nos travaux, nous utiliserons donc 20 μ M et 10 μ M de curcumine pour les lignées K562 et Jurkat, respectivement.

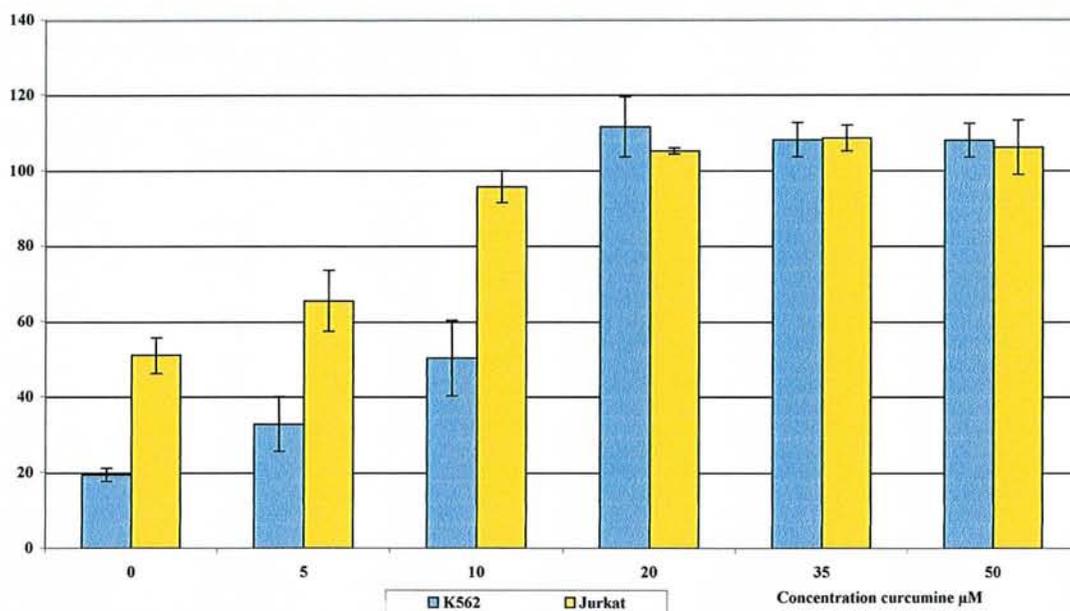


Figure 41: Test de cytotoxicité. Cellules des lignées K562 et Jurkat traitées à la curcumine pendant 24h.

La cytotoxicité a été mesurée par la technique de mesure de LDH libérée dans le milieu. Le pourcentage de cytotoxicité est calculé avec la formule: (mesure de l'activité LDH libérée / mesure de l'activité LDH totale).

1.2 - Effet de la curcumine sur l'expression de l'ARNm de la *GSTP1-1*

Nous avons ensuite voulu mesurer l'effet de la curcumine sur l'expression de la *GSTP1-1*. Afin d'atteindre cet objectif, nous avons réalisé des expériences de Northern Blot sur les cellules des lignées K562 et Jurkat après 24 h de traitement avec différentes concentrations de curcumine (Figure 42 et 43).

Nous obtenons une forte diminution (-50 %) de l'expression de l'ARNm de la *GSTP1-1* lorsque les cellules de la lignée K562 sont cultivées avec 0,1 % de SVF, alors que nous voyons l'expression de l'ARNm légèrement augmentée lorsque les cellules sont cultivées en présence de SVF. La curcumine n'a par contre aucun effet sur l'expression basale de la *GSTP1-1* indépendamment de la concentration en SVF dans les cellules Jurkat.

1.3 - Effet de la curcumine sur l'expression de la protéine *GSTP1-1*

Pour confirmer ces résultats, nous avons réalisé des expériences de Western Blot sur les mêmes lignées cellulaires traitées pendant 24 h avec différentes concentrations de curcumine. L'expression de la protéine *GSTP1-1* dans la lignée K562 est diminuée, alors qu'elle n'est pas modifiée dans la lignée Jurkat (figure 44).

1.4 - Effet de la curcumine sur l'activation de l'expression de l'ARNm de la *GSTP1-1* par le $TNF\alpha$

Le $TNF\alpha$ est un activateur de $NF-\kappa B$ et potentiellement de AP-1. Nous avons voulu induire l'expression de la *GSTP1-1* car son promoteur contient non seulement un site TRE mais aussi un site $NF-\kappa B$. Comme nous l'avons montré précédemment (Partie 2.5), le traitement de cellules de la lignée K562 par du $TNF\alpha$ pendant 8 h entraîne une augmentation de l'expression de l'ARNm dès 0,5 ng/ml (Figure 45). Cette augmentation atteint un plateau à 5 ng/ml pour la lignée K562 alors que l'augmentation observée pour la lignée Jurkat est dépendante de la concentration en $TNF\alpha$. Dans les 2 lignées, la curcumine inhibe fortement l'augmentation de l'expression de l'ARNm de la *GSTP1-1* par le $TNF\alpha$.

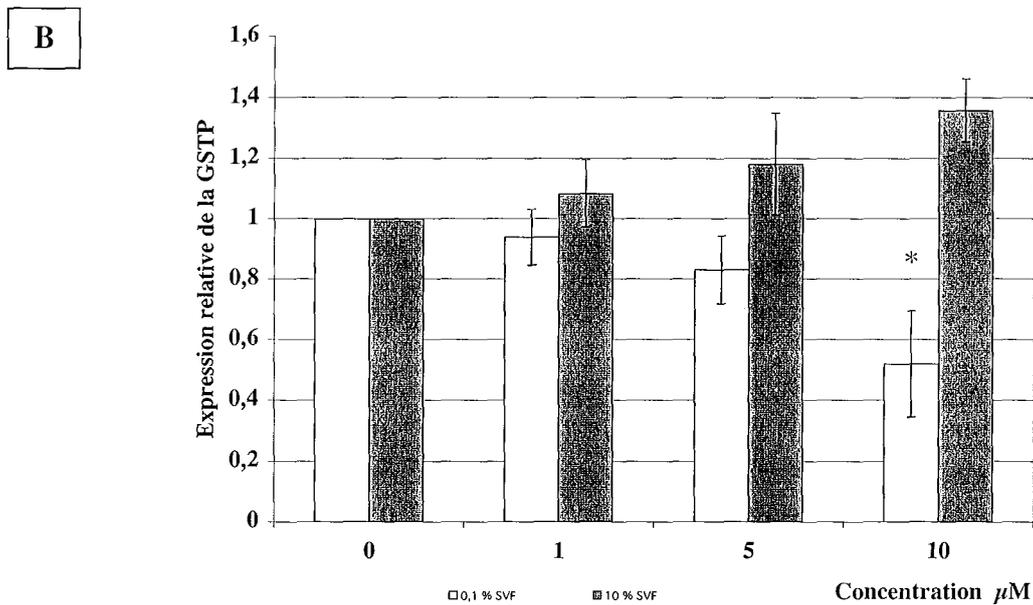
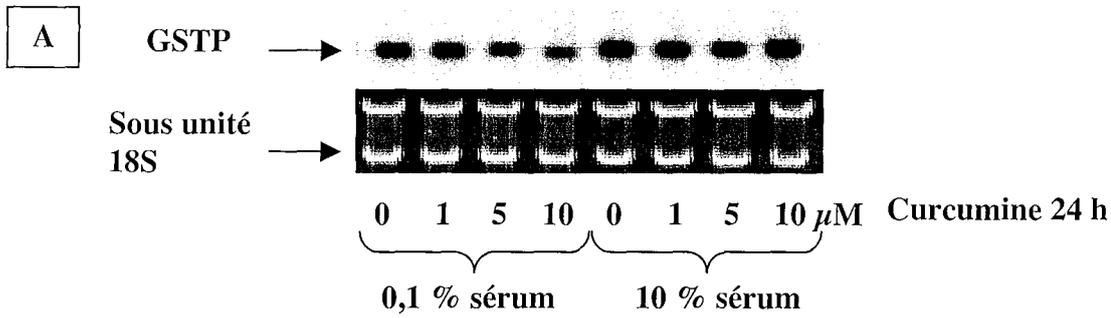


Figure 42: Etude de l'ARNm par Northern blot. Cellules de la lignée K562 traitées à la curcumine 0, 1, 5 et 10 μM pendant 24 h.

Des cellules non traitées, avec 0,1 % de SVF pendant 60h, sont témoins. (A) hybridation de la sonde *GSTP1-1* et coloration des sous-unités ribosomales au bromure d'éthidium. (B) Représentation graphique de 3 expériences indépendantes. * : $p < 0,05$ par rapport au témoin.

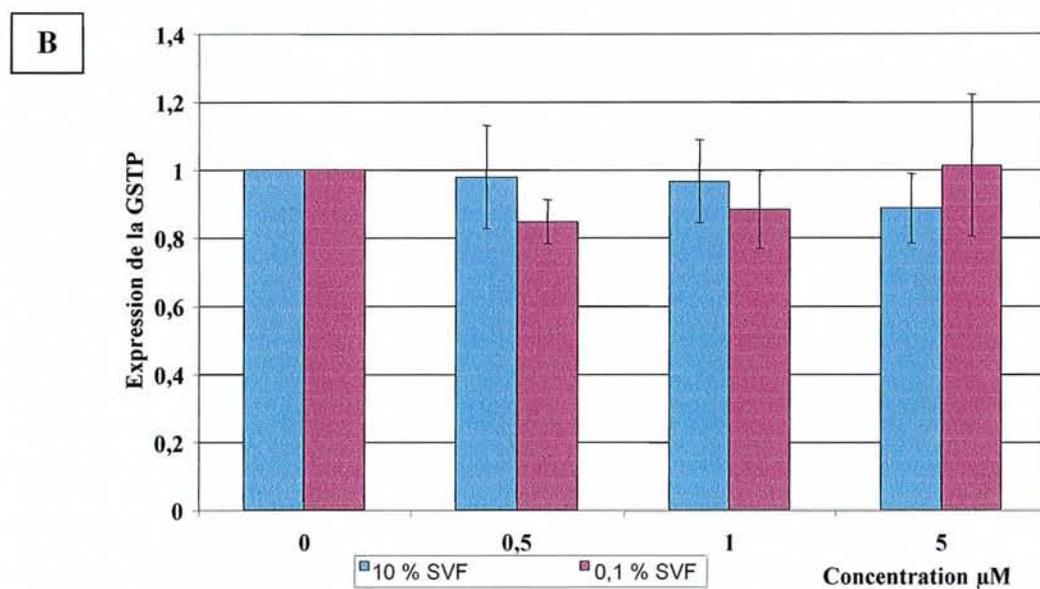
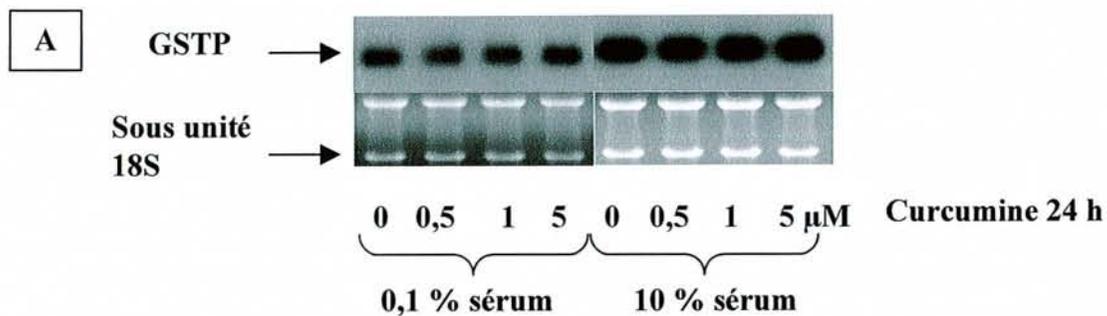


Figure 43: Etude de l'ARNm par Northern blot. Cellules de la lignée Jurkat traitées à la curcumine 0, 0,5, 1 et 5 μM pendant 24 h.

Des cellules non traitées, avec 0,1 % de SVF pendant 60h, sont témoins. (A) hybridation de la sonde *GSTP1-1* et coloration des sous-unités ribosomales au bromure d'éthidium. (B) Représentation graphique de 3 expériences indépendantes. * : $p < 0,05$ par rapport au témoin.

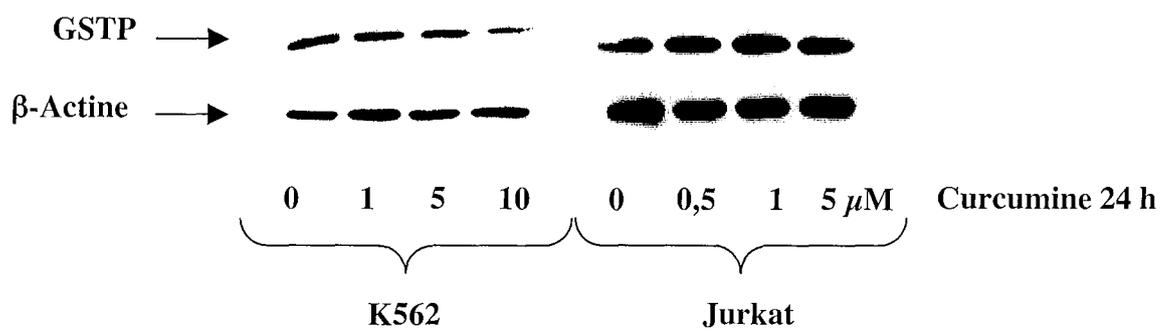


Figure 44: Etude des protéines par Western blot. Cellules des lignées K562 et Jurkat traitées à la curcumine pendant 24 h.

Des cellules non traitées, avec 0,1 % de SVF pendant 60h, sont témoins. Hybridation de la sonde *GSTP1-1* et coloration des sous-unités ribosomales au bromure d'éthidium (A) de la lignée K562 (B) de la lignée Jurkat.

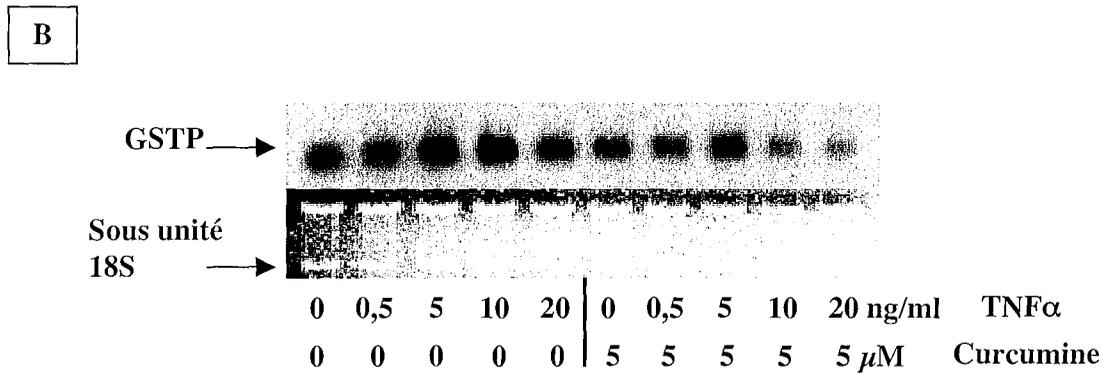
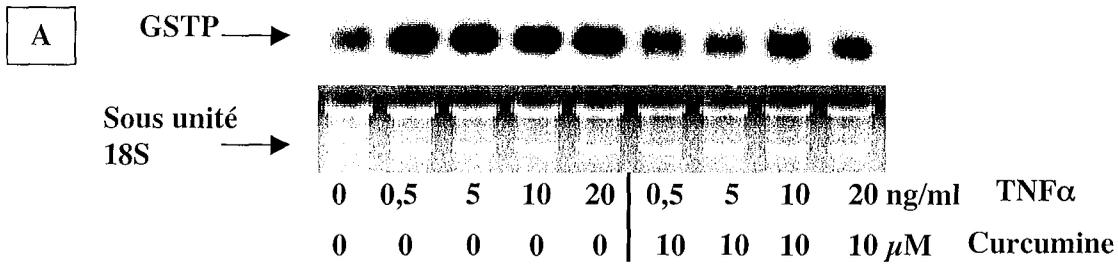


Figure 45: Etude de l'ARNm par Northern blot. Cellules des lignées K562 et Jurkat traitées au TNF α 0,5, 5, 10 et 20 ng/ml pendant 8h avec ou sans un prétraitement de 2h avec 10 μ M de curcumine.

Des cellules non traitées, avec 0,1 % de SVF pendant 60h, sont témoins. Hybridation de la sonde *GSTP1-1* et coloration des sous-unités ribosomales au bromure d'éthidium (A) de la lignée K562, (B) de la lignée Jurkat.

1.5 - Effet de la curcumine sur la fixation de AP-1 sur son site

Nous avons déjà observé qu'un traitement au TPA 100 nM pendant 2 h augmente de façon significative (+ 80 % par rapport au témoin) la fixation du facteur de transcription AP-1 sur le site TRE de la *GSTP1-1*. Nous avons donc prétraité les cellules avec la curcumine pendant 2 h, avant 2 h de traitement avec 100 nM de TPA, et étudié son effet sur la fixation de AP-1 sur son site par gel retard (figure 46).

Dans la lignée K562, nous observons que la curcumine inhibe nettement l'augmentation de la fixation de AP-1 à 10 μ M, que ce soit sur le site TRE de la *GSTP1-1* (-27 % par rapport au témoin) ou sur un site AP-1 consensus (+ 12 % par rapport au témoin).

1.6 - Effet de la curcumine sur la fixation de AP-1 induite par le TNF α

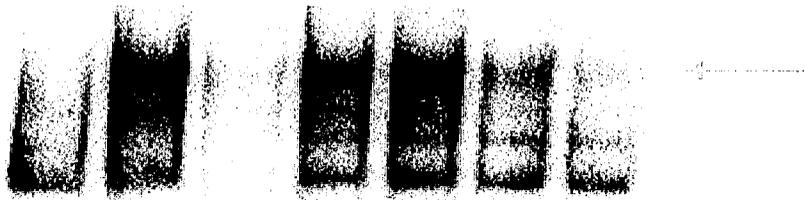
Nous avons aussi voulu évaluer l'effet du TNF α sur la fixation du facteur de transcription AP-1 sur le site TRE de la *GSTP1-1* humaine dans des cellules de la lignée K562. En effet, le TNF α peut aussi activer la fixation de AP-1 sur le site présent sur le promoteur de la *GSTP1-1* ou sur un site consensus (Figure 47). De plus un prétraitement à la curcumine inhibe fortement l'induction de la fixation de AP-1 sur les deux sites.

1.7 - Effet de la curcumine sur la fixation de NF- κ B induite par le TNF α

Le TNF α étant connu pour activer le facteur de transcription NF- κ B, et la curcumine pouvant inhiber ce même facteur, nous avons décidé d'étudier la fixation de ce facteur sur un site consensus ou sur le site distal présent sur le promoteur de la *GSTP1-1* (Figure 48). Dans la lignée cellulaire K562, le TNF α active la fixation de NF- κ B sur le site consensus et sur le site distal. Et nous observons que la curcumine inhibe fortement cette fixation.

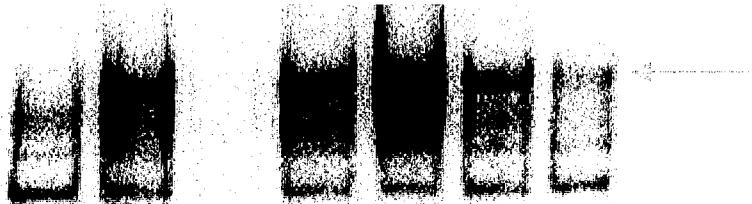
Pour confirmer ces résultats, nous avons réalisé des expériences de gel retard sur la lignée Jurkat (Figure 49). Dans tous les cas, la curcumine n'inhibe pas l'induction de la fixation des facteurs de transcription par le TPA ou le TNF α , confirmant les résultats précédemment obtenus en Northern blot et en Western blot.

A



FN	-	+	+	+	+	+	+	+
TPA	-	-	+	+	+	+	+	+
Curcumine	-	-	-	-	0,5	1	5	10
Sonde froide	-	-	-	+	-	-	-	-

B



FN	-	+	+	+	+	+	+	+
TPA	-	-	+	+	+	+	+	+
Curcumine	-	-	-	-	0,5	1	5	10
Sonde froide	-	-	-	+	-	-	-	-

Figure 46: Etude de l'effet de la curcumine par gel retard. Cellules de la lignée K562 traitées au TPA 100 nM pendant 2h avec ou sans prétraitement de 2h avec 0,5, 1, 5, 10 μ M de curcumine.

(A) Sonde -73 : site TRE de la *GSTP1-1*. (B) Sonde AP-1 consensus de la collagenase.

FN: Facteurs nucléaires

Des cellules non traitées, avec 0,1 % de SVF pendant 60h, sont témoins. Les flèches indiquent le complexe induit.

A



TNF α ng/ml	0	0,5	0,5	0,5	0,5
Curcumine μ M	0	0	1	5	10

B



TNF α ng/ml	0	0,5	0,5	0,5	0,5
Curcumine μ M	0	0	1	5	10

Figure 47: Etude de l'effet de la curcumine par gel retard. Cellules de la lignée K562 traitées au TNF α 0,5 ng/ml pendant 4h avec ou sans prétraitement de 2h avec 1, 5 ou 10 μ M de curcumine.

(A) Sonde -73. (B) Sonde AP-1 consensus.

Des cellules non traitées, avec 0,1 % de SVF pendant 60h, sont témoins. Les flèches indiquent le complexe induit.

A



TNF α ng/ml	0	0,5	0,5	0,5	0,5
Curcumine μ M	0	0	5	10	20

B



TNF α ng/ml	0	0,5	0,5	0,5	0,5
Curcumine μ M	0	0	5	10	20

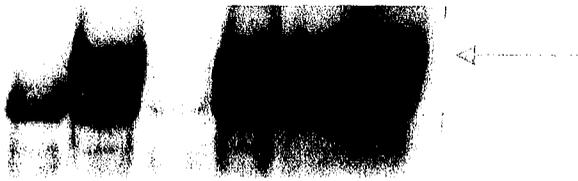
Figure 48: Etude de l'effet de la curcumine par gel retard. Cellules de la lignée K562 traitées au TNF α 0,5 ng/ml pendant 4h avec ou sans prétraitement de 2h avec 5, 10 ou 20 μ M de curcumine.

(A) Sonde NFkB D. (B) Sonde NFkB consensus.

Des cellules non traitées, avec 0,1 % de SVF pendant 60h, sont témoins. Les flèches indiquent le complexe induit.

A

TPA	-	+	+	+	+	+
Curcumine	-	-	-	0,5	1	5
Sonde froide	-	-	+	-	-	-

B

TPA	-	+	+	+	+	+
Curcumine	-	-	-	0,5	1	5
Sonde froide	-	-	+	-	-	-

C

TNF α ng/ml	0	0,5	0,5	0,5	0,5
Curcumine μ M	0	0	1	5	10

Figure 49: Etude de l'effet de la curcumine par gel retard. Cellules de la lignée Jurkat traitées au TPA 100 nM ou au TNF α 20 ng/ml pendant 2h avec ou sans prétraitement de 2h avec 0,5, 1, 5, 10 μ M de curcumine.

(A) Cellules traitées au TPA mise en présence de la sonde -73. (B) Cellules traitées au TPA mise en présence de la sonde AP-1 consensus de la collagénase. (C) Cellules traitées au TNF α mise en présence de la sonde NF- κ B consensus. Des cellules non traitées, avec 0,1 % de SVF pendant 60h, sont témoins. Les flèches indiquent le complexe induit.

1.8 - Effet de la curcumine sur les marqueurs de l'apoptose

Pour démontrer que la mort cellulaire induite par la curcumine est bien due à l'apoptose, nous avons traité les cellules de la lignée K562 avec 20 μM de curcumine pendant 0, 6, 11, 24 et 32 h (Figure 50). Des Western blots réalisés avec des anticorps anti-pro-caspase 8 et 9 et anti-PARP (Poly (ADP-ribose) polymerase) nous montrent que le taux de pro-caspase 8 et 9 diminue fortement tandis que les caspases apparaissent. De plus, on voit que la PARP est dégradée de façon significative au cours du temps, ce qui confirme un effet pro-apoptotique de la curcumine dans les cellules leucémiques K562 et Jurkat.

1.9 - Effet de la curcumine sur la transactivation d'un gène rapporteur

Enfin, nous avons voulu déterminer comment agissent le $\text{TNF}\alpha$ et la curcumine. Pour cela, nous avons transfecté des cellules de la lignée K562 avec différents plasmides d'expression (Figure 21):

-pGSTNFkB : plasmide contenant 5 répétitions du site NF-kB distal de la *GSTP1-1*

-p-97 : plasmide contenant le promoteur de la *GSTP1-1* jusque -97. Les sites Sp1, AP-1 et NF-kB like sont présents.

-p-396 : plasmide contenant le promoteur de la *GSTP1-1* jusque -396. Les sites Sp1, AP-1, NF-kB like et NF-kB distal sont présents.

-p-1175 : plasmide contenant le promoteur de la *GSTP1-1* jusque -1175. Les sites Sp1, AP-1, NF-kB like et NF-kB distal sont présents.

18 h après avoir été transfectées les cellules sont traitées au $\text{TNF}\alpha$ 0,5 ng/ml pendant 8 h, avec ou sans pré-traitement de 2 h à la curcumine 10 μM .

Dans tous les cas (pGSTNFkB, p-97, p-396 et p-1175), nous observons une forte induction de l'expression après traitement au $\text{TNF}\alpha$, bien que le plasmide pGSTNFkB montre une activation considérablement plus forte (125 fois) par rapport aux autres plasmides (5 fois) (Figure 51).

Les cellules traitées à la curcumine et transfectées par les constructions du promoteur de la *GSTP1-1* présentent une légère diminution de l'expression du plasmide par rapport à l'expression basale (-20 %). De plus, la curcumine inhibe complètement l'activation due au $\text{TNF}\alpha$ à un niveau plus faible qu'après un traitement à la curcumine seule (-50 % par rapport au niveau basal), ce qui est concordant avec le fait que la curcumine est un inhibiteur de NF-kB et de AP-1.

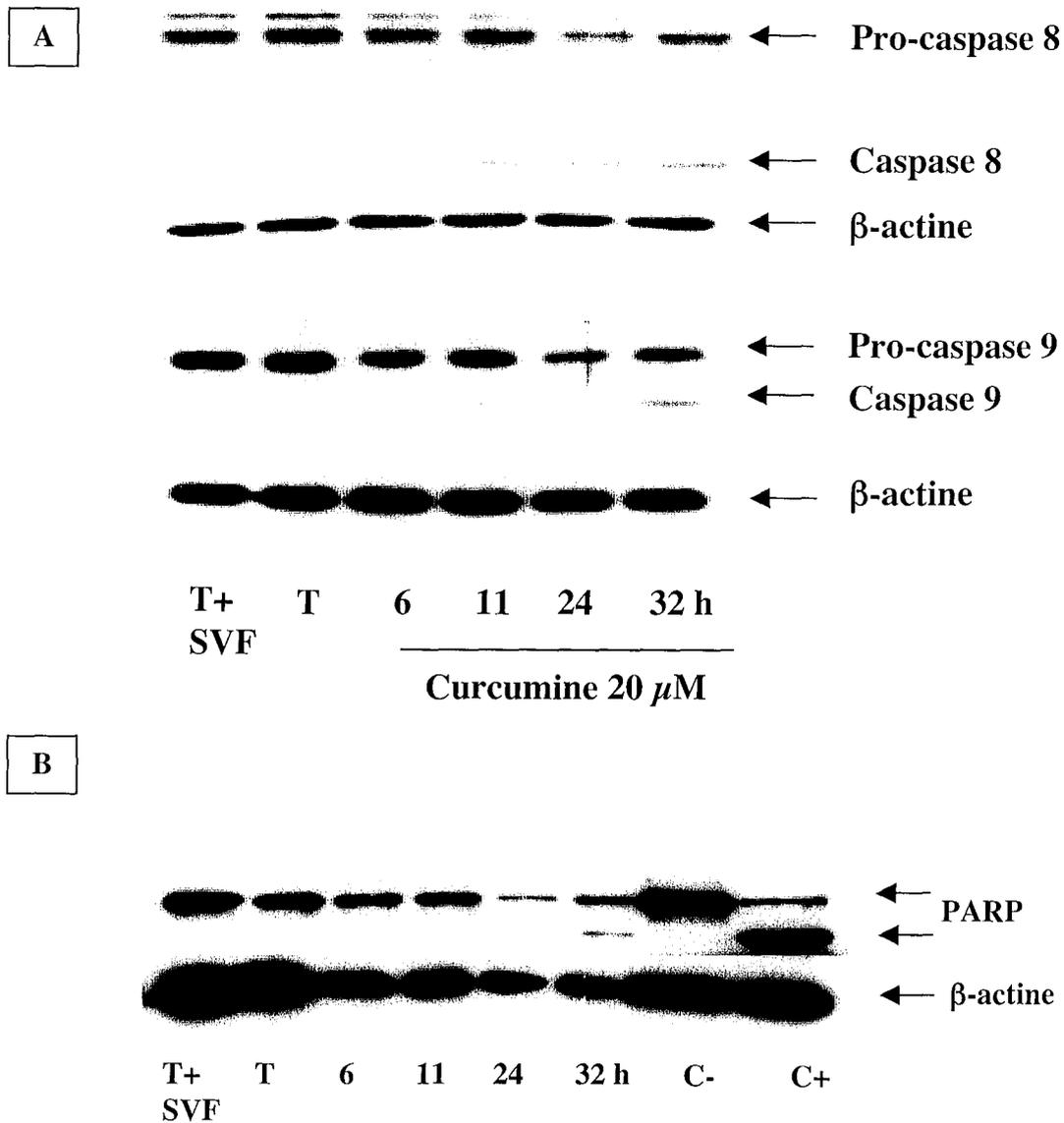


Figure 50: Mise en évidence de l'apoptose par Western blot. Cellules de la lignée K562 traitées à la curcumine 20 μ M.

(A) Hybridation avec les anticorps anti-pro-caspase 8, -pro-caspase 9 et - β -actine (B) Hybridation avec les anticorps anti-PARP et - β -actine.

Des cellules cultivées avec 10 % de SVF (T+SVF) et avec 0,1 % de SVF pendant 60h (T) sont témoins. C+, C-: HL60 traitées ou non à l'etoposide (contrôle positif et négatif de l'apoptose).

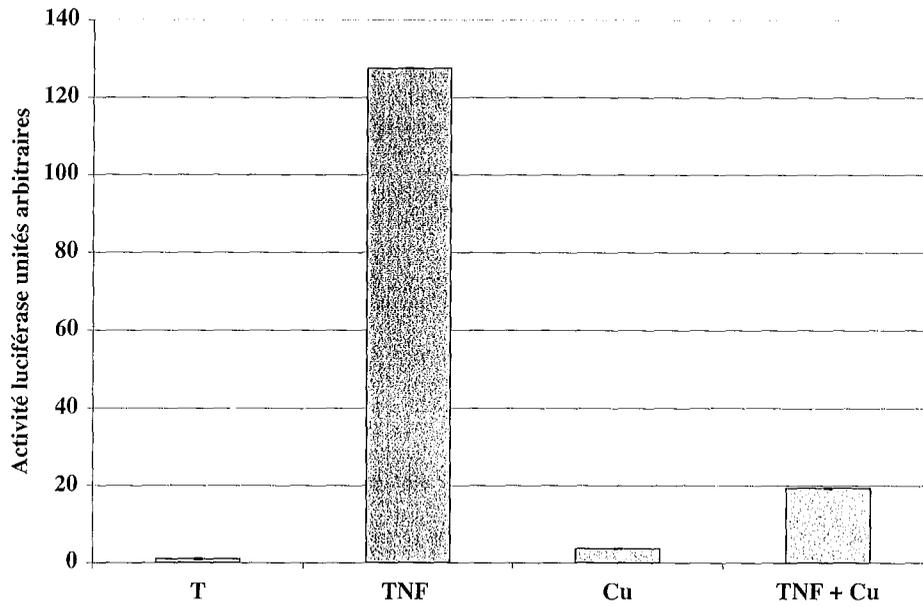
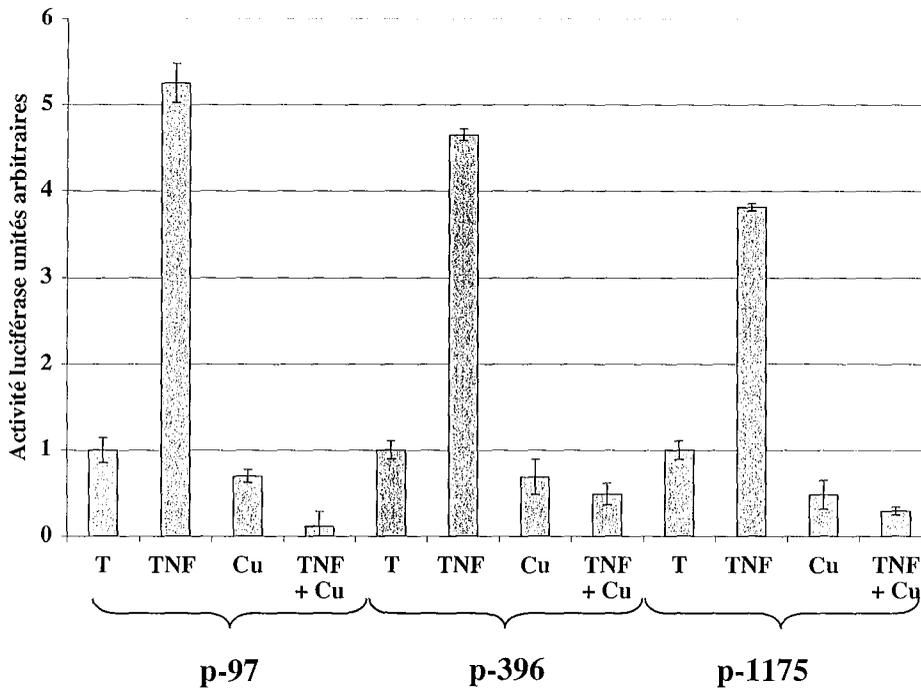
A**B**

Figure 51: Etude de l'effet de la curcumine par transfection. Cellules de la lignée K562 transfectées et traitées au TNF α 0,5 ng/ml, curcumine 10 μ M ou TNF α + Curcumine.

A) Transfection avec le plasmide pGSTNF- κ B. B) Transfection avec les plasmides p-97, p-396 ou p-1175.

En effet, non seulement ces deux facteurs de transcription peuvent entrer en compte dans l'activation de l'expression par le TNF α , mais aussi de l'activité basale des constructions.

Quant aux cellules transfectées par pGSTNF κ B, la curcumine n'inhibe pas l'expression basale du plasmide, mais bloque fortement l'activation due au TNF α (-84 %) tout en restant à un niveau plus élevé que le niveau basal (20 fois). Ces résultats suggèrent que le mode d'action de la curcumine est plutôt dirigé vers AP-1 que vers NF- κ B.

2 - Effets d'autres agents chimiopréventifs

Afin de généraliser les résultats obtenus avec la curcumine, nous avons utilisé d'autres agents chimiopréventifs dans les cellules K562 et U937: le resvératrol, le β -lapachone, le trans-anéthole, l'émodine, la capsaïcine, la sanguinarine et la silymarine. Nous avons réalisé des expériences de transfection transitoire et de gel retard.

2.1 - Effet du resvératrol

Nous avons tout d'abord réalisé des expériences de transfection transitoire dans les cellules de la lignée K562 avec le plasmide exprimant la luciférase sous contrôle de 5 répétitions du site NF- κ B consensus (p-C κ B) ou du promoteur de la *GSTP1-1* (p-GSTNF- κ B). Les cellules sont prétraitées au resvératrol 20, 50 ou 100 μ M pendant 2h avant un traitement au TNF α 20 ng/ml pendant 8h. Nos résultats montrent que le resvératrol, connu pour inhiber NF- κ B et AP-1, a un effet plutôt activateur de l'expression de la luciférase en présence comme en l'absence de TNF α quel que soit le plasmide transfecté (Figure 52). Nous avons ensuite confirmé ces résultats grâce à des expériences de gel retard qui nous montrent que le resvératrol n'inhibe ni la fixation de AP-1 ni celle de NF- κ B sur leur site (Figure 53). Dans le modèle cellulaire que nous avons utilisé, le resvératrol ne présente pas d'effet similaire à la curcumine contrairement aux résultats de la littérature.

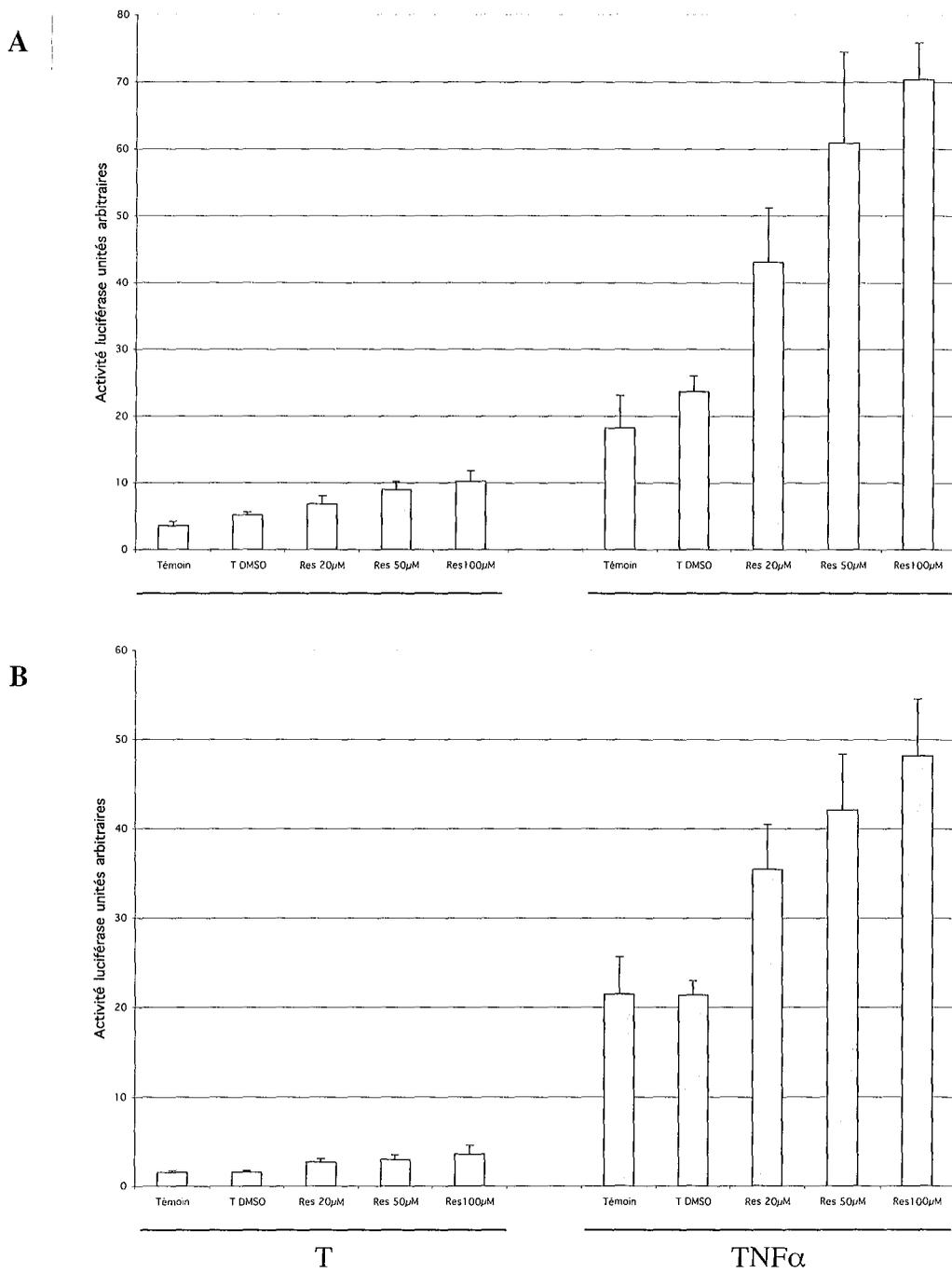
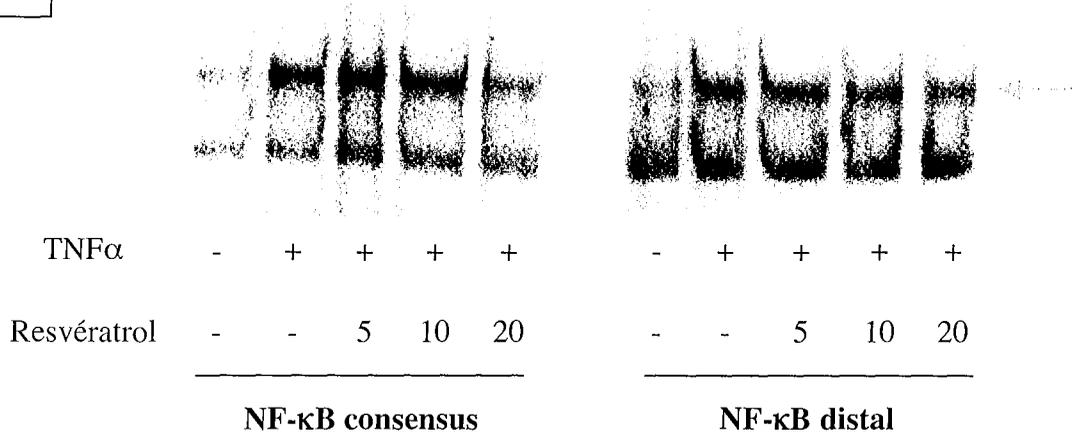


Figure 52: Etude de l'effet du resvératrol par transfections. Cellules de la lignée K562 transfectées et pré-traitées avec 20, 50 ou 100 μ M de resvératrol, puis traitées ou non au TNF α 20 ng/ml.

(A) Transfection du plasmide p-C κ B. (B) Transfection du plasmide p-GSTNF- κ B.

A



B

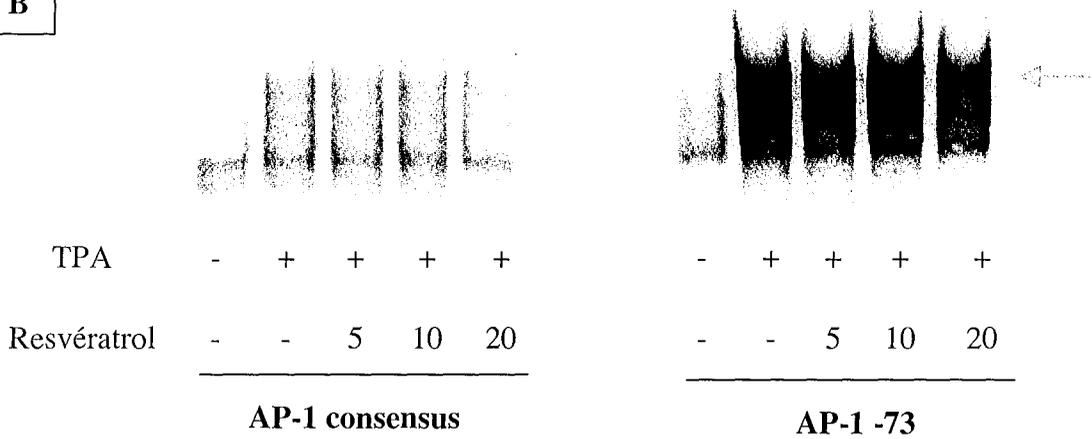


Figure 53: Etude de l'effet du resvératrol par gel retard. Cellules de la lignée K562 traitées au TPA 100 nM ou au TNF α 20 ng/ml pendant 2h avec ou sans prétraitement de 2h avec 5, 10, 20 μ M de resvératrol.

(A) Cellules traitées au TNF α mise en présence des sondes NF- κ B. (B) Cellules traitées au TPA et mise en présence des sondes AP-1.

Des cellules non traitées, avec 0,1 % de SVF pendant 60h, sont témoins. Les flèches indiquent le complexe induit.

2.2 - Effet des autres agents chimiopréventifs

Nos résultats montrent que les différents agents chimiopréventifs que nous avons utilisés ont des actions différentes au niveau de la fixation de AP-1, NF- κ B ou de l'expression de la luciférase (Figures 54 à 56). Seuls les agents β -lapachone, émodine, sanguinarine et silymarine ont un effet sur la fixation de NF- κ B induite par le TNF α . De plus, l'émodine et la silymarine font disparaître la bande que nous avons décrite comme étant non-spécifique et n'ont pas d'effet sur les bandes correspondant à NF- κ B.

D'autre part, seules l'émodine et la sanguinarine inhibent légèrement la fixation de AP-1 induite par le TNF α .

Enfin, les agents β -lapachone, émodine, sanguinarine et capsaïcine réduisent l'activité luciférase sous le contrôle de 5 répétitions du site NF- κ B du promoteur de la *GSTP1-1* induite par le TNF α .

En résumé, le tableau XI présente l'effet de chaque agent chimiopréventif sur la fixation de NF- κ B et AP-1 sur leur site, ainsi que leur effet sur l'expression de la luciférase sous le contrôle du promoteur de la *GSTP1-1*.

Tableau XI: Effet des différents agents chimiopréventifs.

	NF- κ B	AP-1	Expression de la Luciférase
β -lapachone	+++	-	+++
Trans-anéthole	-	-	-
Emodine	+++	+++	+++
Sanguinarine	+++	+++	++
Capsaïcine	-	-	++
Silymarine	+	-	-

+: Inhibition, -:Pas d'effet.

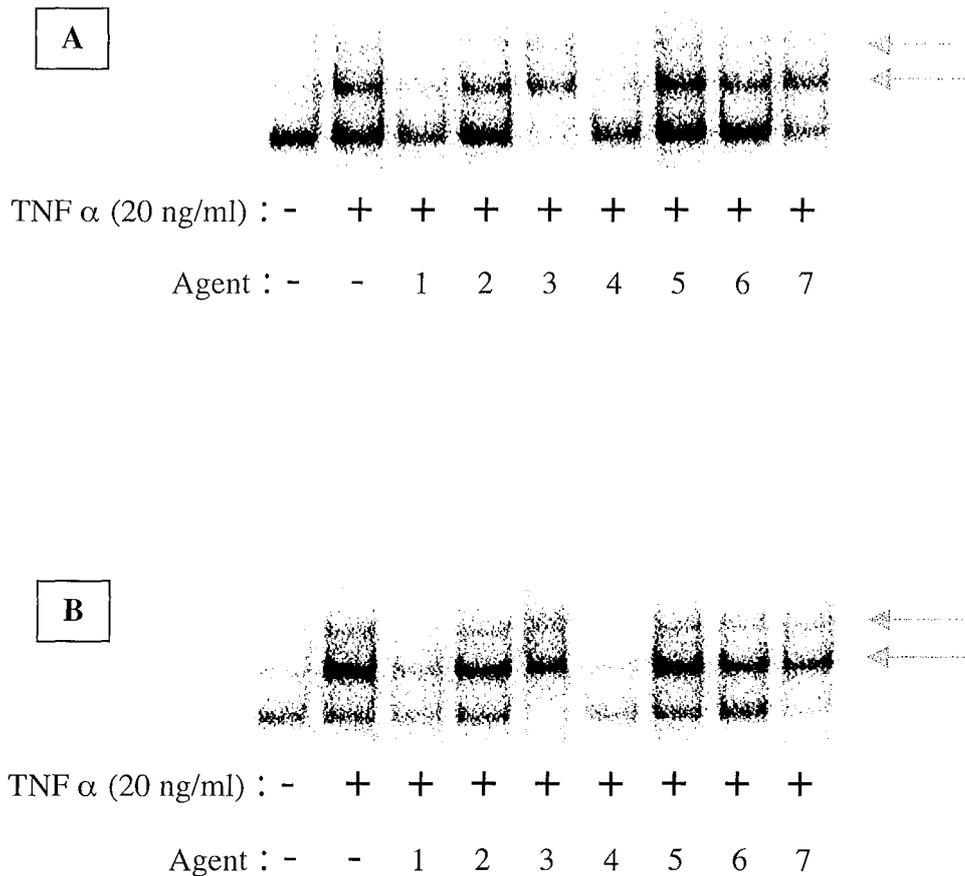


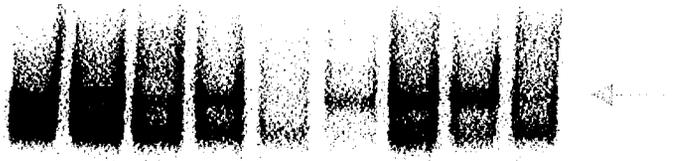
Figure 54: Etude de l'effet d'agents chimiopréventifs par gel retard. Cellules de la lignée K562 traitées au TNF α 20 ng/ml pendant 1h avec ou sans prétraitement de 2h avec des substances chimiopréventives.

(A) Sonde NF- κ B consensus. (B) Sonde NF- κ B distal.

Des cellules non traitées, avec 0,1 % de SVF pendant 60h, sont témoins.

1: β -lapachone 5 μ M, 2: trans-anéthole 1 mM, 3: émodine 50 μ g/ml, 4: sanguinarine: 5 μ M, 5: leflunomide 10 μ M, 6: capsaïcine 300 μ M, 7: silymarine 50 μ M. Les flèches indiquent les complexes induits.

A



TNF α (20 ng/ml) : - + + + + + + + +
Agent : - - 1 2 3 4 5 6 7

B



TNF α (20 ng/ml) : - + + + + + + + +
Agent : - - 1 2 3 4 5 6 7

Figure 55: Etude de l'effet d'agents chimiopréventifs par gel retard. Cellules de la lignée K562 traitées au TNF α 20 ng/ml pendant 1h avec ou sans prétraitement de 2h avec des substances chimiopréventives.

(A) Sonde AP-1 -73. (B) Sonde AP-1 consensus.

Des cellules non traitées, avec 0,1 % de SVF pendant 60h, sont témoins.

1: β -lapachone 5 μ M, 2: trans-anéthole 1 mM, 3: émodine 50 μ g/ml, 4: sanguinarine: 5 μ M, 5: leflunomide 10 μ M, 6: capsaïcine 300 μ M, 7: silymarine 50 μ M. Les flèches indiquent les complexes induits

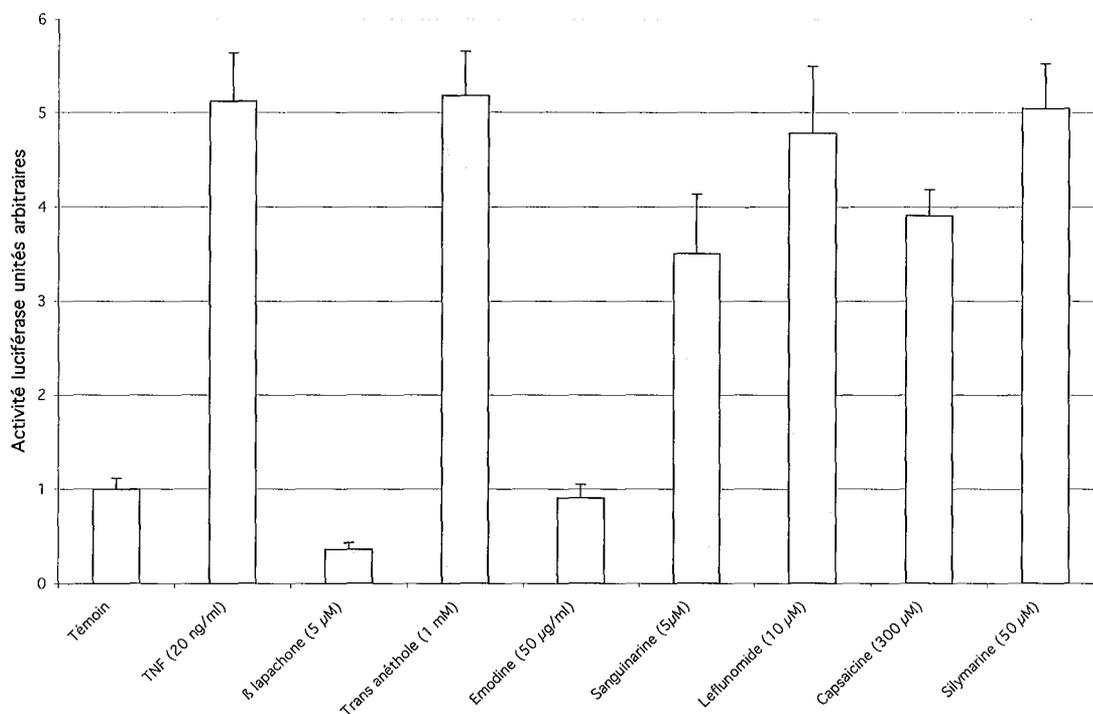


Figure 56: Etude de l'effet d'agents chimiopréventifs par transfections. Cellules de la lignée K562 transfectées et traitées au TNF α 20 ng/ml pendant 1h avec ou sans prétraitement de 2h avec des substances chimiopréventives.

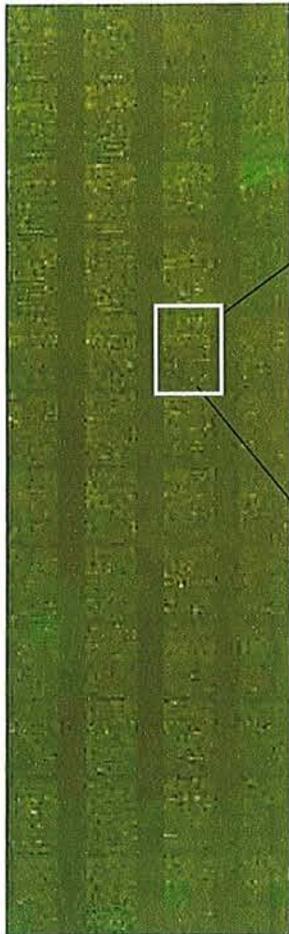
Des cellules non traitées, avec 0,1 % de SVF pendant 60h, sont témoins. *: $p < 0,01$ par rapport au traitement au TNF α .

2.3 - Effet de la curcumine sur l'induction de cellules K562 par le TNF α

Afin de mettre en évidence les variations au niveau du génome entier suite au traitement par un des agents chimiopréventifs, la curcumine, nous avons réalisé des hybridations de microarrays. Des cellules de la lignée K562 sont traitées avec 20 ng/ml de TNF α avec ou sans pré-traitement à la curcumine. Nous avons réalisé l'hybridation de 12 microarrays en comparant des cellules non-traitées avec des cellules traitées au TNF α avec ou sans pré-traitement à la curcumine. L'utilisation d'un marquage fluorescent vert ou rouge nous permet de comparer 2 traitements sur une même lame (Figure 57). Nos résultats montrent que de multiples gènes sont régulés par le TNF α et la curcumine. Les analyses statistiques de ces résultats nous révèlent que sur les 22 000 gènes humains hybridés, 8000 sont exploitables (certains gènes n'étant pas exprimés dans la lignée cellulaire utilisée, d'autres n'ayant pas été correctement hybridés sur toutes les microarrays...) et 500 montrent des modifications d'expression significatives entre les cellules non-traitées (T) et les cellules traitées au TNF α avec (TNF-Cu) ou sans (TNF) pré-traitement à la curcumine (Figure 58).

Les variations les plus intéressantes concernent la régulation des gènes codant les protéines du choc thermique. Ces résultats sont cependant préliminaires, il faudra assurer ces résultats par d'autres expérimentations, comme des RT-PCR ou PCR quantitatives.

A.



B.

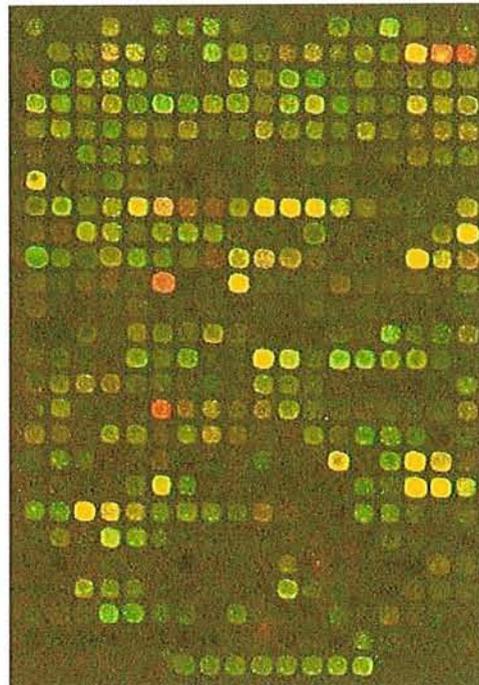


Figure 57: Hybridation de microarray. Cellules de la lignée K562 traitées au $TNF\alpha$ avec ou sans pré-traitement à la curcumine.

Cette figure représente un microarray entier (A) avec un agrandissement (B). L'analyse des résultats se fait en comparant l'intensité de la coloration verte (échantillon No1) par rapport à la coloration rouge (échantillon No 2).

Gene	Accession	Gene	Accession	Log2 Fold Change	P-value	Log2 Fold Change	P-value
Heat shock 70kD protein 1B	NM005346	HSPA6	3268	-2,16	35,06	35,06	75,60
Phenylalanyl-tRNA synthetase beta-subunit	D84430	HSPA1B	274402	-1,56	34,17	34,17	53,26
Heat shock 70kD protein 1A	NM005345	PheHB	9081	-1,18	24,84	24,84	29,37
ATPase, H+/K+ exchanging, alpha polypeptide	NM000704	HSPA1A	8997	-1,15	21,53	21,53	24,83
Actin, beta	AF111848	ATP4A	36992	-1,60	9,46	9,46	15,18
DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 1	NM006145	ACTB	288061	-1,19	11,44	11,44	13,65
Heat shock 105kD	NM006644	DNAJB1	82646	-1,07	12,32	12,32	13,17
Similar to Ovis aries chromosome repeat region OY11.1	D87011	HSP105B	36927	-1,55	7,32	7,32	11,32
DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 4	NM007034	3'OY11.1	178665	1,04	11,57	11,57	11,10
3-hydroxymethyl-3-methylglutaryl-Coenzyme A lyase (hydroxymethylglutaricaciduria)	NM000191	DNAJB4	41693	1,39	14,08	14,08	10,11
KIAA1376 protein	AB037797	HMGCL	831	1,40	13,00	13,00	9,26
Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp434E036 (from clone DKFZp434E036)	AL117431	KIAA1376	24684	-1,26	5,60	5,60	7,07
Matrix metalloproteinase 8 (neutrophil collagenase)	NM002424	MMP8	343664	1,09	6,99	6,99	6,43
Similar to TRANSCRIPTION FACTOR COE2 (EARLY B-CELL FACTOR 2) (EBF-2) (OLF-)	AK001144	COE2	343814	-1,04	5,75	5,75	5,97
KIAA1671 protein	AB051458	KIAA1671	7890	1,11	6,01	6,01	5,43
Wingless-type MMTV integration site family, member 7A	NM004625	WNT7A	72290	-1,24	4,36	4,36	5,39
Elastase 3B, pancreatic	NM007352	ELA3B	183864	-1,02	5,30	5,30	5,38
KIAA1069 protein	AB028992	KIAA1069	193143	-1,00	5,19	5,19	5,21
TYRO protein tyrosine kinase binding protein	NM003332	TYROBP	9963	-1,40	3,72	3,72	5,20
Human DNA sequence from PAC 124O9 on chromosome 6q21. Contains DNAJ2 (HDJ1)	AL021327	TYROBP	9963	-1,29	3,99	3,99	5,14
BCL2-associated athanogene 3	NM004281	BAG3	15259	-1,38	3,58	3,58	4,95
Homo sapiens cDNA FLJ11541 fis, clone HEMBA1002780	AK021603	BAG3	15259	-1,38	3,58	3,58	4,95
Homo sapiens, clone IMAGE:4303615, mRNA, partial cds	BC011648	BAG3	15259	-1,38	3,58	3,58	4,95
Homo sapiens clone CDABP0028 mRNA sequence	AY007126	BAG3	15259	-1,38	3,58	3,58	4,95

P-values				Standard Errors			
pTNF vs T	pTNF Cu vs T	pTNF Cu vs TNF	seTNF vs T	seTNF Cu vs T	seTNF Cu vs TNF		
0,14251	0,00011	0,00005	1,24	17,07	39,14		
0,02387	0,00000	0,00000	0,28	6,07	9,46		
0,08792	0,00000	0,00000	0,11	2,27	2,68		
0,09406	0,00000	0,00000	0,10	1,92	2,20		
0,02284	0,00000	0,00000	0,29	1,73	3,01		
0,04577	0,00000	0,00000	0,11	1,04	1,25		
0,75383	0,00000	0,00000	0,24	2,82	3,02		
0,00791	0,00000	0,00000	0,21	1,00	1,55		
0,84066	0,00000	0,00000	0,23	2,55	2,64		
0,15840	0,00003	0,00005	0,31	2,78	2,00		
0,25102	0,00005	0,00012	0,44	4,37	3,11		
0,04789	0,00000	0,00000	0,13	0,57	0,65		
0,65100	0,00000	0,00000	0,21	1,37	1,26		
0,77244	0,00000	0,00000	0,14	0,78	0,81		
0,37051	0,00002	0,00002	0,25	1,41	1,05		
0,66657	0,00014	0,00011	0,28	1,40	1,14		
0,14317	0,00001	0,00000	0,17	0,56	0,74		
0,90673	0,00000	0,00000	0,15	0,76	0,78		
0,98531	0,00000	0,00000	0,13	0,67	0,72		
0,02029	0,00000	0,00000	0,18	0,47	0,66		
0,00502	0,00000	0,00000	0,09	0,28	0,37		
0,01029	0,00000	0,00000	0,15	0,38	0,52		
0,46108	0,00000	0,00000	0,14	0,77	0,64		
0,42801	0,00001	0,00002	0,25	1,22	1,04		
0,90210	0,00000	0,00000	0,08	0,36	0,36		

Figure 58: Hybridation de microarray. 25 premiers résultats significatifs.

Ce tableau compare l'expression des gènes dans les différents échantillons (T: témoin, TNF: TNF α 20 ng/ml, TNF-Cu: TNF α 20 ng/ml + curcumine 20 μ M) et donne la valeur de p (p-values) et de l'écart type (standard errors).

La curcumine agit comme un agent anti-cancéreux puissant dans les cellules leucémiques K562:

La curcumine induit l'apoptose dans des cellules leucémiques par les voies mitochondriale et des récepteurs.

La curcumine inhibe l'expression basale et induite par le TNF α de l'ARNm de la *GSTP1-1*.

La curcumine inhibe l'expression basale de la protéine GSTP1-1.

La curcumine inhibe la fixation des facteurs de transcription AP-1 et NF- κ B sur les sites consensus et les sites présents dans le promoteur de la *GSTP1-1*.

Au niveau du génome, la curcumine induit la variation d'un nombre élevé de gènes et plus particulièrement les protéines du stress thermique ou heat shock proteins.

DISCUSSION

Partie 1: Etude de l'implication de la voie du stress et de la prolifération

Effet du TPA et des métaux lourds

Nos résultats montrent que, bien que le promoteur de la *GSTP1-1* possède un site de réponse au TPA pouvant fixer des facteurs de transcription de la famille AP-1 tels que c-Jun et Fra1 (Borde-Chiche, *et al.*, 2001a), les activateurs traditionnels de ce site tels que le TPA ou le chlorure de cadmium n'induisent pas l'expression de ce gène.

Nous avons en effet montré que le TPA a, d'une part, un effet plutôt inhibiteur sur l'expression de l'ARNm de la *GSTP1-1* dans la lignée K562 (figure 23, page 104). D'autre part, ce traitement n'a aucun effet sur l'expression de l'ARNm des lignées Jurkat, U937 et Raji (figure 24, page 105) et sur l'expression de la protéine dans les lignées K562 et Raji (figure 25, page 107). Ces résultats sont en accord avec le fait que l'activation du gène humain de la *GSTP1-1* par le TPA n'a jamais été démontrée. Lin et al. montrent d'ailleurs que le TPA n'est pas suffisant pour activer la *GSTP1-1* dans la muqueuse buccale du hamster (Lin, C. C., *et al.*, 1999a). D'un autre côté, si Hales et Huang réussissent à activer la transcription de la GST Yp du rat par le TPA, ils montrent que des régulations post-transcriptionnelles maintiennent stable le niveau de transcrits (Hales et Huang, 1994). Par ailleurs, bien que Nguyen et al. décrivent une activation du gène de la GSTYa du rat par le TPA, ils montrent que ce sont des facteurs autres que AP-1 qui se fixent sur le promoteur (Nguyen, *et al.*, 1994). Piu et al. découvrent que JDP-2, facteur de la famille AP-1, a un effet inhibiteur sur l'expression d'un gène, comme p53, par sa fixation sur la séquence cible de réponse au TPA (Piu, *et al.*, 2001).

Le fait que le TPA conduise à une légère augmentation de l'expression de la protéine dans la lignée Jurkat (figure 25, page 107) est en accord avec des régulations post-transcriptionnelles. La toxicité du traitement pour les cellules de la lignée U937 (tableau VI) pourrait expliquer la baisse d'expression de la protéine (figure 25, page 107).

D'autre part, nous avons montré une diminution de l'expression de l'ARNm de la *GSTP1-1* après traitement au chlorure de cadmium sur les lignées K562, Jurkat (figure 26, page 109). Ce traitement n'a aucun effet dans la lignée Raji (Figure 26, page 109). Danno et al. ont déjà découvert que le chlorure de cadmium n'a aucun effet sur l'expression de RBM3, une protéine impliquée dans la réponse au froid, dans une lignée de cellules K562 (Danno, *et al.*, 1997). Hiraiwa et al. précisent que le chlorure de cadmium a un effet activateur comparable au TPA sur l'expression du gène Fuc-T VII, dans la lignée Jurkat (Hiraiwa, *et al.*,

1997). D'après Matsuoka et al. la quantité de JNK phosphorylée ainsi que l'activité de la JNK (phosphorylation de c-jun) augmentent notablement après un traitement au chlorure de cadmium de cellules épithéliales de rein (LLC-PK1) (Matsuoka et Igisu, 1998, Matsuoka, *et al.*, 2000).

De plus, des traitements au nitrate de plomb et à l'acétate de plomb de cellules de la lignée K562 n'ont aucun effet sur l'expression de l'ARN de la *GSTP1-1* (figure 27, page 111), alors que Roomi et al. montrent que le plomb induit l'expression de la *GSTP1-1* chez le rat (Roomi, *et al.*, 1987). Koo et al. ajoutent que le plomb régule l'expression de cette protéine au niveau transcriptionnel, post-transcriptionnel et post-traductionnel (Koo, *et al.*, 1994). Suzuki et al., 1996 découvrent néanmoins que cette induction nécessite l'enhancer I (GPEI), présent dans le promoteur de la *GSTP1-1* du rat et absent chez l'homme (Suzuki, *et al.*, 1996). Nos résultats montrent que les gènes de rat et humain répondent différemment à un traitement au plomb.

Les traitements à l'arsenite de sodium inhibent légèrement l'expression de l'ARN de la *GSTP1-1* de cellules de la lignée K562 (figure 28, page 112). Chen et al. ont découvert que le traitement de cellules à l'arsenic conduit à une déplétion en S-adénosylméthionine, c'est-à-dire à une hypométhylation de l'ADN (Chen, H., *et al.*, 2001a). Nous avons déjà vu au laboratoire que le taux de méthylation du gène de la *GSTP1-1* est un facteur important de sa régulation (Borde-Chiche, *et al.*, 2001b) et nos résultats ne démontrent pas que l'arsenite induise une hypométhylation dans notre modèle. En effet l'hyperméthylation du gène de la *GSTP1-1* inhibe son expression. Par contre Cavigelli et al., 1996 découvrent que l'expression de c-jun et c-fos sont induites par l'arsenite (Cavigelli, *et al.*, 1996). Wesselborg et al. ajoutent que l'arsenite induit p38 mais pas NF- κ B (Wesselborg, *et al.*, 1997). Les différentes voies de signalisation sont donc régulées différemment par l'arsenite et l'effet de l'arsenite sur l'expression de la *GSTP1-1* peut être dû à une modulation de ces différentes voies.

Les métaux lourds comme le zinc et le cadmium ont cependant un effet positif sur l'activité des GST chez la larve de *Spodoptera exigua* exposée à ces substances, l'augmentation de l'activité GST étant corrélée avec la concentration en métaux lourds (Kafel, *et al.*, 2003). Struzynska et al. montrent qu'un traitement de rats Wistar adultes par du plomb augmente l'activité et la quantité de GST présente dans l'hippocampe et le cervelet mais pas dans le pro-encéphale (Struzynska, *et al.*, 2002). Ils suggèrent une susceptibilité au plomb tissu-spécifique qui pourrait expliquer nos résultats.

Cependant, une autre équipe montre que si la GSTP1-1 n'est pas induite par le platine après 24 h, une exposition chronique des cellules cancéreuses de poumon au platine pendant au moins un mois augmente l'expression de la GSTP1-1 de façon significative (Oguri, *et al.*, 2000).

Il semble évident que les sites de réponse au TPA et aux antioxydants sont apparentés mais il n'est cependant pas possible de dire jusqu'à quel point. Le site contenu dans le promoteur de *GSTP1-1* a été montré comme étant essentiel à la transcription basale de la *GSTP1-1*. Il a toujours été décrit comme un site de réponse au TPA mais jamais comme répondant au TPA, bien qu'on ait pu démontrer une augmentation de la fixation de c-Jun et l'augmentation de l'expression d'un gène rapporteur contrôlé par le promoteur de la *GSTP1-1*. Par ailleurs, ce site répond à des traitements aux antioxydants comme le tBHQ ou l'eau oxygénée. Cependant, bien qu'il fixe NFE2, il ne fixe ni MafK, ni Nrf1, 2 (Borde-Chiche, *et al.*, 2001a). Une des hypothèses avancées pour expliquer ces résultats est une interaction avec d'autres facteurs de transcription fixés sur des sites proches. Moffat et al décrivent le site NF- κ B like comme un répresseur. Le facteur NF- κ B fixé sur son site interagirait avec AP-1 et l'empêcherait ainsi de se fixer (figure 9, page 35) (Moffat, *et al.*, 1996a). Cependant, les auteurs suggèrent que le rôle répresseur de NF- κ B empêcherait la fixation de facteurs de transcription sur le site AP-1 dans les lignées n'exprimant pas la GSTP1-1. Cependant, nous avons montré que ce site NF- κ B n'est pas fonctionnel dans notre modèle cellulaire. De la même manière Chen et Ramos montrent une répression de AP-1 par le facteur Ah chez le rat (Chen, Y. H. et Ramos, 2000). Le gène de la GST-Ya de rat présente différents sites fonctionnels dont un site AhRE et un site de réponse aux antioxydants contenant un site C/EBP. Les auteurs montrent que le site C/EBP contenu dans le site de réponse aux antioxydants limite l'inductibilité du site voisin AhRE. Ils montrent aussi que le facteur de transcription C/EBP β est un répresseur de AhRE et du site de réponse aux antioxydants en interagissant avec ces 2 sites. Enfin ils découvrent que le facteur Ah a lui aussi une activité inhibitrice du site de réponse aux antioxydants. Le gène de la *GSTP1-1* humaine contient lui aussi un site de réponse aux antioxydants (ou de réponse au TPA) et plusieurs sites Ah. Une telle interaction et inhibition serait donc possible et pourrait expliquer que le TPA n'induit pas l'expression du gène, bien que les sites Ah soient éloignés du site de réponse au TPA sur le promoteur du gène de la *GSTP1-1*. Harris et al. proposent une alternative : dans le promoteur du gène de la FGF-2 humaine est présent un site AP-1 (Harris, *et al.*, 2000). Ce site est inhibé

par la présence d'une E-box, qui fixerait des éléments répresseurs. Il est possible qu'un tel site soit présent sur le promoteur que nous étudions, inhibant ainsi l'activation par le TPA.

D'autre part, la littérature montre différents effets du TPA sur des ARNm au niveau post-transcriptionnel (Tableau XII). Nous nous apercevons ainsi que le TPA peut n'avoir aucun effet, un effet stabilisateur ou déstabilisateur. Non seulement le TPA peut avoir des effets différents selon l'ARNm étudié, mais son effet peut aussi être différent suivant la lignée cellulaire utilisée. En effet l'ARNm de E2F1 est fortement déstabilisé par le TPA dans des kératinocytes humains, alors qu'il n'a une demi-vie que très légèrement diminuée dans des cellules SCC25 (lignée de cellules de carcinomes résistantes à un inhibiteur de croissance) (Saunders, *et al.*, 1998).

Tableau XII: Effet du TPA sur la stabilité de différents ARNm.

Gène	Lignée cellulaire	Effet du TPA sur la stabilité des ARNm	Référence
CFI (Complement factor I)	HepG2	→	(Minta et Fung, 1999)
AQP4 (Aquaporine 4)	Astrocytes de rat en culture	→	(Nakahama, <i>et al.</i> , 1999)
Récepteur A2a à l'adénosine	SH-SY5Y	→	(Peterfreund, <i>et al.</i> , 1997)
ODC (Ornithine décarboxylase)	Cellules d'hépatome de rat	→	(Butler, <i>et al.</i> , 1991)
Ribonucléotide réductase R1	COS7, BALB/c 3T3	↘	(Chen, F. Y., <i>et al.</i> , 1993, 1994)
Ribonucléotide réductase R2	BALB/c 3T3	↘	(Amara, <i>et al.</i> , 1994)
LDH A (Lactate déshydrogénase A)	Cellules de gliome de rat C6	↘	(Huang, D., <i>et al.</i> , 1995)
TIMP (Inhibiteur tissulaire des métalloprotéines)	U937	↘	(Shapiro, <i>et al.</i> , 1993)
E2F1	Kératinocytes humains	↘↘	(Saunders, <i>et al.</i> , 1998)
	SCC25	↘	
GST α	HepG2	↘	(Eickelmann, <i>et al.</i> , 1995)
Sous-unité alpha des canaux à sodium	Cellules surrénales chromaffines	↗	(Yanagita, <i>et al.</i> , 1999)
iNOS (nitric oxyde synthase inductible)	Hépatocytes primaires néonatales de rat	↗	(Menegazzi, <i>et al.</i> , 1996)
SP-B (Superfactant protéine B)		↗	(Pryhuber, <i>et al.</i> , 1994)
IL-2 (Interleukine 2)	Lymphocytes T activés	↗	(Bill, <i>et al.</i> , 1994)

Quant aux GST, il a été montré que les ARNm de classe alpha sont déstabilisés par le TPA dans des cellules HepG2 (Eickelmann, *et al.*, 1995). La stabilité des ARNm de la *GSTP1-1* a été mesurée dans une lignée de cellules HS578T et est supérieure à 24 h (Morrow, *et al.*, 1992). Nos résultats montrent que la durée de vie des ARNm de la *GSTP1-1* varie d'une lignée à l'autre et n'est pas influencée par le TPA (Tableau X).

Pour cette partie des résultats, nous pouvons conclure que le gène de la GSTP1-1 se comporte différemment malgré les homologies de séquence qui existent entre les différents gènes (Figure 59, page 167). Les inducteurs typiques comme le TPA et les métaux lourds régulent de façon différentielle le même gène chez les rongeurs et chez l'homme. Pour la famille des gènes de la GST, les modes de régulation ne sont donc pas simplement transmissibles de l'animal à l'homme. Dans la mesure où les GST font partie de la phase II des mécanismes de métabolisation des xénobiotiques, des résultats impliquant la détoxification d'un médicament obtenus expérimentalement chez le rat ne sont donc pas directement utilisables pour l'homme.

Les raisons peuvent être multiples. Dans ce travail, nous venons de mettre en évidence des différences fondamentales en ce qui concerne les voies de transduction du signal et des voies de régulation transcriptionnelles. Un des objectifs pour la suite de ce travail sera de comparer les voies des MAP kinases et des voies de l'inflammation entre le rongeur et l'homme afin de déterminer les principales différences au niveau de la régulation intracellulaire

*Ensuite, la plupart des résultats trouvés chez le rongeur ont été obtenus avec des modèles cellulaires impliquant le foie ou des lignées cellulaires cancéreuses correspondant à ce tissu ; nos résultats montrent que le modèle de cellules leucémiques en culture que nous étudions n'est pas régulé d'une façon comparable. En perspective, nous devons, à l'avenir, étudier les mécanismes de régulation de la *GSTP1-1* dans un tissu autre que le sang afin de pouvoir généraliser nos résultats et mettre en évidence des différences tissu- et/ou espèce spécifiques.*

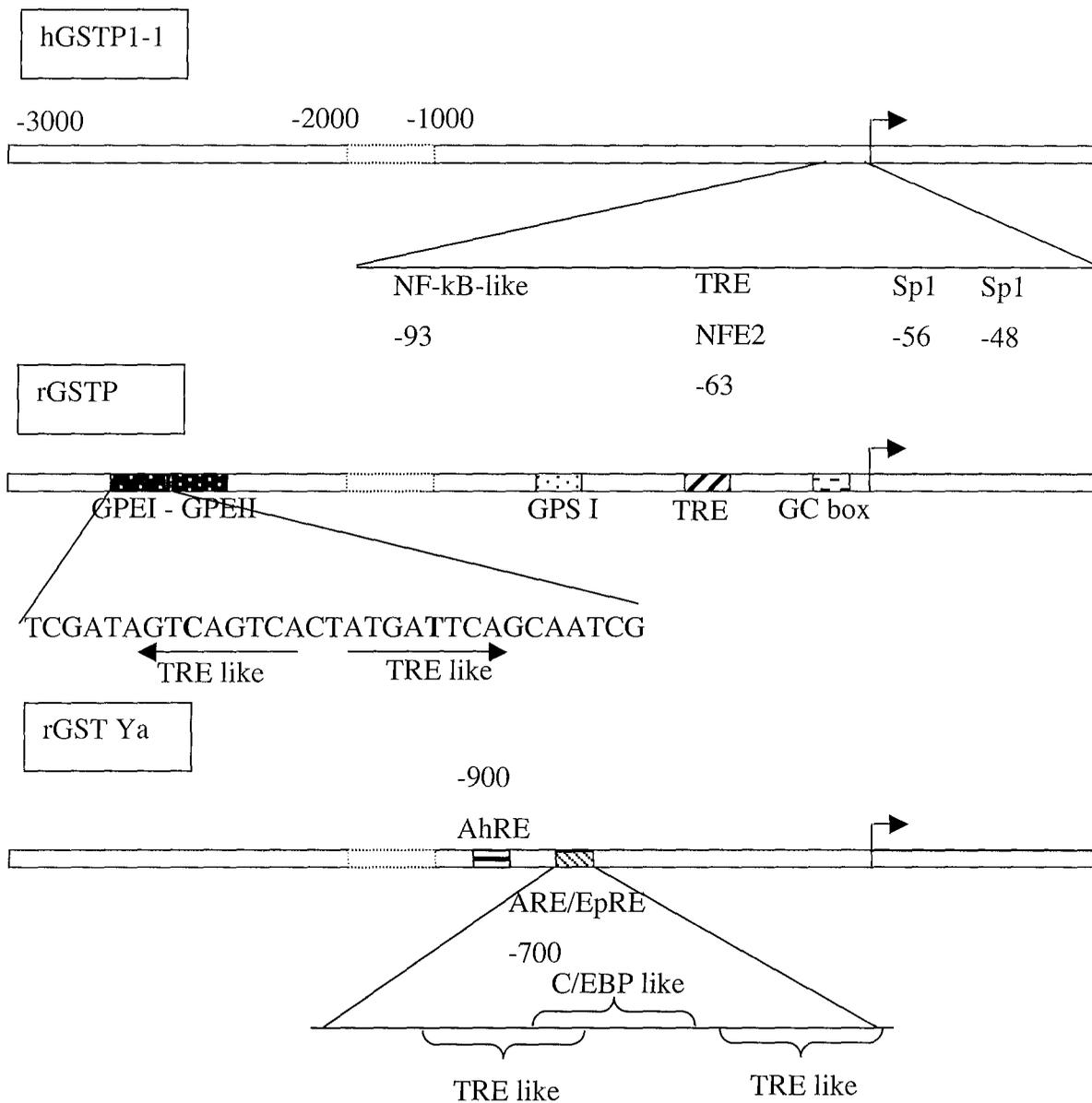


Figure 59: Comparaison de la structure des promoteurs des *GSTP1-1* humaine, de *GSTP* de rat et de *GST Ya* de rat.

Nos résultats précédents avaient montré une inductibilité in vitro du site AP-1 du gène de la GSTP1-1 plus particulièrement par les techniques de gel retard et de transfection transitoire. Un objectif pour l'avenir sera de cloner des fragments plus importants du promoteur de la GSTP1-1 humaine et de chercher des éléments régulateurs à effet inhibiteur de façon à comprendre définitivement le fonctionnement du site AP-1 pourtant essentiel pour l'expression de la GSTP1-1. Les quatre sites du récepteur Ah, que nous avons récemment mis en évidence en utilisant l'outil d'analyse informatique, pourraient également être de bons candidats pour une étude à la suite de cette thèse.

A notre connaissance, ces résultats montrent pour la première fois que le gène de la GSTP1-1 humaine est régulé de façon négative par les métaux lourds contrairement aux nombreuses études ayant porté sur le gène de rongeur correspondant.

Rôle de AP-1 dans la régulation de la GSTP1-1

Afin de déterminer si les voies de transduction du signal menant à l'activation de AP-1 et de NF- κ B sont impliquées dans la régulation basale de la GSTP1-1, nous avons réalisé des expériences de co-transfection de vecteurs exprimant les protéines impliquées dans les différentes voies de transduction et un vecteur rapporteur exprimant la luciférase sous le contrôle du promoteur de la GSTP1-1 (Figures 31, page 118 et 39, page 132).

Schiff et al. montrent que les tumeurs de sein résistantes au tamoxifène présentent une activité GST augmentée parallèlement à une expression accrue de AP-1 sans que sa composition ou sa capacité de fixation à l'ADN soient modifiées (Schiff, R., *et al.*, 2000). De plus, la Sm28GST, la GST de *Schistosoma mansoni*, de la même manière que la GSTP1-1, possède un site de fixation des facteurs de transcription AP-1 qui est essentiel à l'expression de cette enzyme induite par le TPA (Serra, *et al.*, 1997). En effet, Di Simone et al. décrivent le rôle de AP-1 dans l'activation de la GSTP1-1 dans les cellules plasmatiques (Di Simone, *et al.*, 1997).

Pour connaître le rôle de AP-1 dans la régulation basale de la GSTP1-1, nous avons utilisé un inhibiteur spécifique de la phosphorylation de AP-1 (Figure 32, page 119). Le SP600125 a été découvert par le screening d'une bibliothèque de substances potentiellement inhibitrices de la JNK, kinase activant AP-1. En fait, il a été montré que le SP600125 bloque l'activation de c-Jun et sa fixation sur l'ADN (Shin, *et al.*, 2002). Cette substance inhibe aussi

les gènes d'inflammation COX-2, IL-2, IFN- γ et TNF α (Bennett, *et al.*, 2001). De plus, il a récemment été mis en évidence que cet inhibiteur a la capacité d'induire l'expression de gènes dépendants de CREB. La phosphorylation de CREB ainsi que l'activité de p38 sont augmentées par des concentrations de SP600125 capables d'inhiber c-Jun (Vaishnav, *et al.*, 2003). Nous observons dans cette étude une diminution significative de l'expression de la GSTP1-1 probablement due à l'inhibition de la fixation de AP-1 sur le site TRE du promoteur de la GSTP1-1.

Effet d'agents chimiothérapeutiques sur l'expression de la GSTP1-1

L'hybridation de la macroarray "Cancer cell line" (Becton Dickinson) nous montre principalement que les effets des différentes substances et traitements sont cellules-spécifiques même si certains types cellulaires réagissent de façon similaire (Figures 29 et 30, pages 115-116). On remarque que dans certaines lignées, comme les carcinomes de colon, l'expression de la GSTP1-1 a tendance à être inhibée par plusieurs traitements, alors que dans d'autres lignées comme les cellules de glioblastome U-87 MG ou les cellules d'adénocarcinome du rein ACHN, l'expression de la GSTP1-1 est augmentée par différentes substances.

Dans des kératinocytes de rat, l'expression de l'isoforme majoritaire GSTP est significativement diminuée 24 h après une irradiation aux UVB à 40mJ/cm². Il semble que cela ne soit pas corrélé à la modification des taux de c-Jun et c-Fos qui subissent une activation transitoire avant d'être fortement diminués (Nakano, *et al.*, 1997). Cependant l'expression de la GSTP de rat est sous le contrôle du GPEI situé dans le promoteur, mais qui n'existe pas dans le promoteur de la GSTP1-1 humaine. Nos résultats ne montrent pas de changement significatif après traitement aux UV.

Les protéines du choc thermique, les Hsp, semblent être liées aux GST. En effet, la phosphorylation de la GSTA4-4 permet sa liaison à la molécule chaperone Hsp70 et sa localisation mitochondriale dans des cellules COS (Robin, *et al.*, 2003). Chez le rat, la liaison de la GST3-3 à Hsp90 dépend fortement du polymorphisme de la GST (Mayama, *et al.*, 2003). De plus, après un choc thermique, la GSTM1 libère ASK1 permettant ainsi son activation (Dorion, *et al.*, 2002). Par contre, la thiredoxine ne libère pas ASK1 après le même traitement. En fait, un choc thermique induit l'activation des GST en parallèle avec une activation des Hsp 27 et 72 et une inhibition de l'apoptose (Gibbons, *et al.*, 2000). Fortin et al. montrent que l'expression de Hsp27 ne varie qu'avec l'expression de la GSTP1-1 et avec la

chimiorésistance (Fortin, *et al.*, 2000). Il semble que l'expression de Hsp27, GSTP1-1 et LRP, qui varient dans le même sens, soit associée à l'échec d'un traitement chimiothérapeutique pré-opératoire (Uozaki, *et al.*, 1997). Nos résultats nous montrent que la GSTP1-1 est augmentée de 10, 2 fois dans les cellules de glioblastome U-87 MG alors que dans les cellules de carcinome de la prostate DU 145, on observe une diminution de 5 fois de l'expression de la GSTP1-1 après un choc thermique.

Le stress oxydant peut avoir différents effets sur la GSTP1-1: l'induction de sa transcription ou sa polymérisation. L'induction de son expression est une forme de protection de la cellule contre le stress oxydant alors que le second va permettre la libération de la JNK et l'induction de l'apoptose. L'étoposide induit la polymérisation de la GSTP1-1 et l'induction de l'apoptose dans les cellules de neuroblastome humain SH-SY5Y (Bernardini, *et al.*, 2002). Nos résultats montrent que l'étoposide est capable d'inhiber l'expression de la GSTP1-1 à 90 % dans des cellules de carcinome de colon HCT116.

Lors de l'acquisition de la résistance au 5-FU à la suite d'un traitement prolongé par cet agent, les cellules de carcinome hépatique humaine Bel(7402) développent une surexpression des enzymes MRP et GST (Jin, *et al.*, 2002). On observe une augmentation de l'expression de la GSTP1-1 lors d'un traitement de cellules de cancers gastrointestinaux humains au 5-FU ou au cisplatine. Cependant, un traitement par une faible concentration de cisplatine suivi d'une exposition continue au 5-FU conduit à une synergie cytotoxique et la GSTP1-1 n'est plus surexprimée (Nishiyama, *et al.*, 1999). Le même traitement permettant l'inhibition de la GSTP1-1 dans un carcinome œsophagien récurrent, a permis la disparition efficace de cette tumeur (Tominaga, *et al.*, 1999). Nos résultats montrent qu'un traitement de 24 h au 5-FU de cellules d'adénocarcinome de rein ACHN induit de plus de 6 fois l'expression de la GSTP1-1.

On sait que la GSTP1-1 peut conférer une résistance aux agents anti-cancéreux. En effet, une surexpression de la GSTP1-1 est liée à la résistance à la doxorubicine dans les cellules leucémiques K562 (Kalinina, *et al.*, 2001) et dans les cellules MCF7 résistantes à la doxorubicine (Wang, K., *et al.*, 1999). De plus, on observe après traitement à la doxorubicine une augmentation du transport nucléaire de la GSTP1-1 protégeant ainsi l'ADN contre les médicaments anticancéreux (Kalinina, *et al.*, 2001). Par contre, la survie d'un patient atteint de LMA (leucémie myéloïde aiguë) présentant le génotype *GSTP1-1* n'est pas influencée, alors que la survie d'un patient présentant le génotype *GSTM1* est diminuée (Autrup, *et al.*, 2002). De même, dans des cellules de carcinome Hep2A, l'acquisition de la résistance est corrélée avec une expression accrue de la GSTP1-1 et non des *GSTM* et *A* (Harbottle, *et al.*,

2001). Il a été décrit qu'un conjugué GSH-doxorubicine peut induire, de façon transitoire, l'expression de la GSTP1-1 et que sa surexpression rend les cellules d'hépatome de rat AH66 plus résistantes à la doxorubicine (Asakura, *et al.*, 2001, Tashiro, *et al.*, 2001). D'un autre côté, la GSTP1-1 peut participer à l'activation de pro-carcinogènes comme le TER286, et la résistance à ce produit sera accrue lors de l'inhibition de la GSTP1-1 (Rosario, *et al.*, 2000). Cependant, la doxorubicine, substrat potentiel des GST, agit directement sur leur activité dans des cellules de coeur de rat (Paranka et Dorr, 1994) bien que l'on n'observe pas d'effet remarquable (activation au delà de 5 fois) dans les lignées utilisées lors de nos expériences.

Deux lignées de gliome résistantes à la camptothécine-11 (T98G/CPT-11 et C6/CPT-11) ne présentent pas de modification de l'activité des GST totales ou de la GSTP1-1 par rapport aux lignées sensibles, démontrant que la GSTP1-1 n'est pas responsable de la résistance à la camptothécine (Matsumoto, *et al.*, 1995). Néanmoins, nos résultats montrent que la camptothécine active l'expression de la GSTP1-1 de 6 fois dans les cellules de carcinome du sein MDA-MB-435S alors qu'elle l'inhibe de 90 % dans les cellules d'adénocarcinome de colon HCT-15.

L'enzyme GSTM3-3 a été impliquée dans l'acquisition de la résistance à la carmustine avec la O6-méthylguanine-DNA méthyltransférase (MGMT) et le GSH. La lignée cellulaire U1810 (cancer de poumon non à petites cellules) qui exprime ces enzymes est plus résistante à la carmustine qu'une lignée de cancer de poumon à petites cellules qui n'exprime ni MGMT ni la GSTM3-3. Cependant, l'inhibition de la GSTM3-3 n'induit pas de potentialisation de la résistance contrairement à l'inhibition de la MGMT et à la déplétion en GSH remettant en cause le rôle des GST dans la résistance à la carmustine (Egyhazi, *et al.*, 1997). Nos résultats montrent que la GSTP1-1 est légèrement moins exprimée après un traitement à la carmustine dans les cellules HCT116.

L'effet d'un traitement au cisplatine dans des cellules tumorales de foie ou de reins et des cellules de lymphomes de Dalton de souris a été caractérisé. L'activité des GST est diminuée dans ces 3 types cellulaires sans corrélation avec le taux de GSH. Cet effet pourrait être la cause de la grande cytotoxicité du cisplatine et de ses propriétés anticancéreuses (Khyriam and Prasad, 2002). Le cisplatine a la particularité d'être ototoxique, particulièrement lors de chimiothérapie de cancers de la tête et du cou. L'expression de la GSTP1-1 est corrélée avec une efficacité complète du cisplatine sur des cellules tumorales (Cabelguenne, *et al.*, 2001), alors que l'expression de la GSTM3*B est corrélée avec une conservation de l'audition après traitement au cisplatine (Peters, *et al.*, 2000). De plus, il apparaît que l'expression des GST est diminuée par le cisplatine dans les cochlées de rat

(Touliatos, *et al.*, 2000). Lors de nos expériences nous avons constaté que la GSTP1-1 est activée lors d'un traitement au cisplatine dans les cellules ACHN, mais diminuée dans les cellules d'adénocarcinome de colon HCT-15.

Le thiotepa est un substrat de la GSTP1-1 et sera donc conjugué au GSH avant d'être expulsé de la cellule (Dirven, *et al.*, 1995). Cependant, Cnubben et al. montrent que la résistance au thiotepa de cellules MCF7 est dû plus à l'efficacité de la GST et de la pompe GS-X plutôt qu'à la surexpression de la GST elle-même (Cnubben, *et al.*, 1998). De plus, nos résultats montrent que le thiotepa réduit l'expression de la GSTP1-1 dans 2 lignées de cancer de colon: HCT116p53^{-/-} et HCT15.

Dans des érythrocytes de patients atteints de diabète, l'H₂O₂ induit l'activité GST indépendamment du diabète (Dincer, *et al.*, 2002). Parallèlement, la surexpression de la GSTA1/2 permet de protéger les cellules épithéliales de cristallin humain HLE B-3 de la peroxydation des lipides induite par l'H₂O₂ (Yang, Y., *et al.*, 2002). De la même manière, l'activité GST est augmentée dans des cellules dérivées d'hépatome de rat Fa32 après un traitement à l'H₂O₂ et l'isoforme GSTA est la plus induite (Dierickx, *et al.*, 1999). Au contraire, nos résultats montrent que l'expression de la GSTP1-1 est inhibée par l'H₂O₂ dans les lignées cellulaires NCI-H460, HCT116p53^{-/-} et HCT-15.

Une irradiation aux rayons gamma n'induit pas plus la GST chez des souris saines que chez des souris porteuses d'une tumeur Ehrlich à la cuisse (Agrawal, A., *et al.*, 2001). Une irradiation aux rayons gamma permet une adaptation des cellules qui présentent alors une légère induction de l'expression des GST qui participent en partie à la protection de la cellule lors d'une deuxième irradiation (Bravard, *et al.*, 1999). D'après nos résultats, une irradiation des cellules aux rayons gamma aurait tendance à inhiber l'expression de la GSTP1-1, particulièrement dans les cellules de carcinome de poumon à grosses cellules NCI-H460, les cellules de carcinome de colon HCT116, HCT116p21^{-/-}, HCT116p53^{-/-}, HCT-15 et les cellules de neuroblastome SK-N-SH.

Partie 2: Étude de l'implication de la voie de l'inflammation

Caractérisation des sites NF- κ B

Le site NF- κ B like situé en -93 du promoteur de la *GSTP1-1* a été décrit comme étant un élément régulateur. Cependant peu de données ont été publiées et son rôle dans la régulation de la *GSTP1-1* n'est pas clair. En effet, il a été déterminé que cette séquence agit comme un élément répresseur dans les cellules de carcinome du sein MCF7 en réponse à l'acide rétinoïque tout trans. Cependant, ce site ne présente pas d'effet répresseur dans la lignée résistante dérivée des MCF7, les VCREMS (Moffat, *et al.*, 1996a). Certains auteurs ont montré que l'effet répresseur du site NF- κ B-like pourrait être dû à une interaction avec les facteurs de transcription AP-1 dans les cellules MCF7 mais pas dans les cellules de carcinome de la vessie EJ (Moffat, *et al.*, 1996a, 1997). De façon contraire, Zhang *et al.*, ont découvert que ce site NF- κ B n'est pas impliqué dans l'inhibition du site TRE dans les kératinocytes (Zhang, Y., *et al.*, 2002). Cependant Xia *et al.* suggèrent que la réponse aux oxydants passe par NF- κ B alors que la réponse aux antioxydants passe par AP-1 (Xia, C. L., *et al.*, 1991). La régulation de la *GSTP1-1* pourrait donc résulter d'une coopération entre NF- κ B et AP-1 et le rôle de ce site pourrait être dépendant du type cellulaire ou de la réponse au traitement utilisé. Cependant, nous montrons pour la première fois que les protéines se fixant potentiellement sur ce site NF- κ B like ne font pas partie de la famille NF- κ B dans la lignée cellulaire K562 et qu'elles ne sont pas inductibles par le TNF α (Figure 35, page 125). Dans notre modèle, le rôle répresseur de ce site NF- κ B n'a pas pu être mis en évidence. Grâce à des expériences de co-transfection, nous avons pu démontrer que la voie de transduction du signal NF- κ B est impliquée dans la régulation basale de la *GSTP1-1* (Figure 39, page 132). Grâce au logiciel MatInspector, nous avons découvert un site NF- κ B potentiel qui pourrait être à l'origine de la mise en jeu de NF- κ B dans l'expression de la *GSTP1-1*. De plus, nous avons pu montrer que les dimères p50/p65 et p65/p65 peuvent se fixer sur ce site en réponse à un traitement au TNF α dans les 2 lignées leucémiques K562 et U937 (Figure 37, page 128). En effet, bien que les profils de gel retard dans ces 2 modèles cellulaires soient légèrement différents, on retrouve les 2 complexes inductibles qui sont reconnus et retardés par les anticorps anti-p50 et -p65. Ce site n'a jamais été décrit dans la littérature et nous permet de confirmer le rôle de

NF- κ B dans la régulation de l'expression de la GSTP1-1 basale ou induite par le TNF α . L'absence de fixation des facteurs de transcription de la famille NF- κ B sur le site NF- κ B like suggère une différence fondamentale quant au rôle des 2 sites étudiés dans la régulation de la GSTP1-1, bien que chacun des sites puisse être considéré comme étant consensus. En effet, la séquence qui fixe l'hétérodimère p65/p50 a été identifiée originellement dans un enhancer de la chaîne légère κ des immunoglobulines dans des lymphocytes B comme étant 5'-GGGACTTTCC-3' (Sen, R. et Baltimore, 1986). Cependant, la séquence consensus NF- κ B est maintenant définie comme 5'-GGGRNNYYCC-3' car NF- κ B est capable de réguler des gènes inductibles contenant une séquence correspondante (Grilli, *et al.*, 1993). Les sites NF- κ B qui ne correspondent pas à cette séquence lient des facteurs de transcription distincts de p50/p65. En fait, il a été montré récemment que la capacité d'un promoteur à recruter un dimère spécifique NF- κ B *in vivo* ne peut pas être prédite sur la base de résultats *in vitro*, le déterminant majeur de la sélectivité étant le "contexte" du promoteur plus que le site lui-même (Saccani, *et al.*, 2003).

Le TNF α peut activer des voies de signalisation intracellulaires telles que les voies de IKK, des MAPK, de JNK et de p38 qui peuvent à leur tour activer une gamme de facteurs de transcription comprenant NF- κ B (p50/p65) et AP-1 (c-Fos/c-Jun) (Heinemeyer, *et al.*, 1998, Mantovani, *et al.*, 1987). Pour confirmer que le site NF- κ B découvert grâce au logiciel MatInspector répond au TNF α , nous avons réalisé des expériences de transfection transitoire d'un gène rapporteur de la luciférase sous le contrôle de 5 répétitions du site NF- κ B situé à -323 ou du site NF- κ B consensus (Figure 38, page 130). Les résultats montrent que le site NF- κ B du promoteur de la GSTP1-1 réagit de la même façon qu'un site NF- κ B consensus après traitement au TNF α .

Rôle de NF- κ B dans la chimiorésistance

La famille de facteurs de transcription NF- κ B est impliquée dans l'acquisition de la résistance aux agents chimiothérapeutiques ainsi que dans l'apoptose. L'activation de l'expression de mdr1 par NF- κ B fait partie d'un mécanisme de protection anti-apoptotique des cellules proximales de tubules (PT) contre le stress oxydant et l'apoptose induits par le cadmium (Thevenod, *et al.*, 2000). Bentires-Alj *et al.* ont récemment montré que l'inhibition de NF- κ B sensibilise à la daunomycine des cellules de cancer du colon résistantes en réduisant l'expression de mdr1 confirmant la relation entre NF- κ B et la résistance à la chimiothérapie (Bentires-Alj, *et al.*, 2003). De plus, NF- κ B semble être un inducteur de gènes

anti-apoptotiques (Foo et Nolan, 1999). Les cellules des leucémies chroniques à cellules B présentent une résistance accrue aux agents induisant l'apoptose grâce à l'expression de gènes antiapoptotiques comme IAP et la famille TRAF (Munzert, *et al.*, 2002) qui sont des cibles de NF- κ B. Les cellules Hodgkin/Reed-Sternberg de la maladie de Hodgkin activent constitutivement NF- κ B, bloquant ainsi l'apoptose lors d'un stress (Bargou, *et al.*, 1997). D'autre part, il est maintenant admis que la plupart des familles d'agents anti-cancéreux (Gewirtz, 1999, Jordan, *et al.*, 1998, Pinedo et Peters, 1988, Schiff, P. B. et Horwitz, 1980) activent NF- κ B ce qui conduit à la chimiorésistance (Pahl, 1999). Ainsi, l'inhibition par le disulfiram de l'activation de NF- κ B, par le 5-FU augmente la cytotoxicité des inhibiteurs de synthèse d'ADN dans les lignées de cancers colorectaux (Wang, W., *et al.*, 2003). L'activation de NF- κ B par des inhibiteurs de topoisomérase comme le SN38 et la doxorubicine protège les cellules HeLa contre l'effet apoptotique de ces substances (Bottero, *et al.*, 2001). NF- κ B est donc relié à la résistance aux anticancéreux et à l'inhibition de l'apoptose de même que la GSTP1-1. Il paraît donc intéressant de vérifier si NF- κ B est impliqué dans la régulation de la GSTP1-1. Nous montrons que la voie de signalisation NF- κ B régule l'expression de la GSTP1-1 comme une large gamme de gènes impliqués dans la cancérogenèse et l'inhibition de l'apoptose. NF- κ B contribue à la surexpression de la COX2 due à l'âge (Wu, D., *et al.*, 2003) et contrôle l'augmentation de l'expression de la LOX dans des cellules d'erythroleucémie (Arakawa, *et al.*, 1995). De même, l'expression de la manganèse superoxyde dismutase (MnSOD) est induite par NF- κ B dans des cellules cancéreuses épithéliales en réponse au TNF α (Bernard, *et al.*, 2001).

Des résultats précédents démontrent clairement que des agents thérapeutiques anti-inflammatoires bloquent l'activation de NF- κ B induite par le TNF α , la phosphorylation et l'activation de IKK, JNK et AP-1 et inhibent l'apoptose initiée par le TNF α . Nos résultats de co-transfections des intermédiaires de la voie de transduction du signal TNFR1, NIK, TRAF2, IKK β , I κ B α et p65 démontrent que TRAF2, NIK, I κ B α et p65 sont impliqués dans la régulation basale de l'expression de la GSTP1-1. Nous montrons pour la première fois que l'expression de la GSTP1-1 est régulée par une voie TNFR1, TRAF2, NIK qui mène à l'activation de NF- κ B. La phosphorylation de I κ B α est contrôlée par un grand nombre de kinases comprenant IKK α , IKK β , IKK γ , NIK, TGF β -activated kinase 1, AKT et des kinases de la famille des MAPK. Cependant seul IKK β est un intermédiaire du signal induit par le TNF α et menant à la phosphorylation de I κ B α , ce qui pourrait expliquer le fort effet inhibiteur de l'expression d'un mutant dominant négatif de I κ B α .

Partie 3: Etude de l'effet d'agents chimiopréventifs sur l'expression de la GSTP1-1

Effet de la curcumine

La curcumine est un composé végétal connu pour ses propriétés anti-oxydantes et anti-cancérigènes (Ammon et Wahl, 1991, Huang, M. T., *et al.*, 1994, Huang, M. T., *et al.*, 1988, Satoskar, *et al.*, 1986, Shankar, *et al.*, 1980, Tanaka, *et al.*, 1994). Il a aussi été montré qu'elle a un effet inhibiteur sur l'activation de AP-1 et NF- κ B. On montre dans cette notre étude que la curcumine induit la mort cellulaire. Grâce à la technique du Western blot, nous avons déterminé que cette mort cellulaire est due à des phénomènes d'apoptose comme le montre le clivage des pro-caspases 8 et 9 et la dégradation de PARP (Figure 50, page 148). Mukhopadhyay *et al.* ont déjà montré que la curcumine induit l'apoptose dans les cellules humaines androgène-dépendantes LNCap, ainsi que dans des cellules de cancer de la prostate androgène-indépendantes DU 145, en inhibant l'expression de Bcl-2 et Bcl-X_L et en activant les caspases 3 et 8 (Mukhopadhyay, *et al.*, 2001). Des résultats similaires ont été obtenus par Bush *et al.* dans un modèle de mélanome (Bush, *et al.*, 2001). Nos résultats sont en accord avec les données de Bharti *et al.* qui montrent que la curcumine induit les caspases 7 et 9 dans des cellules de myélome multiple (Bharti, *et al.*, 2003). Piwocka *et al.* obtiennent les mêmes résultats dans les cellules de la lignée Jurkat (Piwocka, *et al.*, 1999). Les cellules de la lignée K562 portent le chromosome de Philadelphie avec la fusion de gène Bcr-Abl. L'oncoprotéine résultant de cette fusion active plusieurs voies impliquées dans la cancérogenèse telles que Myc, ras, c-Raf, MAPK/ERK, SAPK/JNK, Stat, NF- κ B, PI3 kinase et c-Jun grâce à l'activation constitutive de son activité tyrosine kinase. Dans les cellules portant cette fusion, l'apoptose est réduite et la prolifération cellulaire est augmentée. L'apoptose classique peut être activée en inhibant Ras, Raf, PI3K, Akt, Jun ou Myc. On a ici une inhibition de l'activation constitutive de AP-1 et NF- κ B menant à une mort cellulaire impliquant les voies mitochondriales et des récepteurs.

Comme nous avons montré précédemment que AP-1 et NF- κ B sont impliqués dans la régulation basale de la *GSTP1-1*, la curcumine doit induire une réduction de l'expression de la *GSTP1-1*. Nos expériences le confirment dans les lignées K562 et Jurkat (Figures 42 à 45, pages 138 à 141).

Singhal et al. ont montré que la curcumine induit très légèrement l'activité de l'isozyme hGST 5.8 α envers le 4-hydroxynonéal (Singhal, *et al.*, 1999). Cependant, la GSTP1-1 est l'isoforme principale (66 %) exprimée par les K562 et l'expression de cette isoforme est corrélée à la chimiorésistance dans les leucémies (Tidefelt, *et al.*, 1992) et les cancers du sein et des ovaires (Masanek, *et al.*, 1997, Miyazaki, *et al.*, 1990, Morrow, *et al.*, 1998, Moscow, *et al.*, 1989, Puchalski and Fahl, 1990). Le TNF α est connu pour activer AP-1 et NF- κ B et on voit qu'il active l'expression de la GSTP1-1. Morales et al. ont démontré que cette cytokine est capable d'induire l'expression d'une autre enzyme clé du système GSH, la γ GCS (γ glutamylcystéine synthétase), de 70 % dans un modèle d'hépatocytes de rat (Morales, *et al.*, 1997). Dans notre modèle, le TNF α et le TPA induisent la fixation des 2 facteurs de transcription AP-1 et NF- κ B. Ces 2 facteurs sont essentiels dans la régulation de la GSTP1-1 comme plusieurs équipes l'ont démontré. La fixation de ces 2 facteurs est inhibée par la curcumine, confirmant son effet inhibiteur sur AP-1 et NF- κ B, et suggérant un rôle important de la curcumine lors de la cancérogenèse en réduisant les problèmes de résistance à des agents chimiothérapeutiques.

Bharti et al. ont déjà montré que la curcumine inhibe l'activité du complexe IKK et donc la phosphorylation de I κ B α , ainsi que la translocation de p65 (Bharti, *et al.*, 2003) . Nous confirmons les résultats obtenus par Singh et al. décrivant l'inhibition de la fixation de AP-1 sur son site par la curcumine dans la lignée leucémique myélomonoblastique ML-1a (Singh et Aggarwal, 1995). L'effet inhibiteur de la curcumine sur l'expression de l'ARNm de la GSTP1-1 est suivie par une inhibition de l'expression de la protéine GSTP1-1. Pour mieux comprendre les mécanismes mis en jeu, nous avons étudié l'activité induite par le TNF α du promoteur. L'activité luciférase générée par les constructions associant le promoteur de la GSTP1-1 et le gène de la luciférase est fortement inhibée par la curcumine, de même que des constructions comportant 5 répétitions du site NF- κ B du promoteur de la GSTP1-1.

D'après Gilot et al. la surexpression de ASK1 restaure l'activation de la caspase 3 et l'apoptose dans des cultures primaires d'hépatocytes (Gilot, *et al.*, 2002). La co-transfection de la GSTM1/2, la GSTA1/2 ou la GSTP1-1 avec ASK1 réduit l'apoptose en antagonisant l'activité de ASK1 et des souris n'exprimant pas la GSTP1/2 présentent une expression accrue de JNK dans le foie et les poumons (Elsby, *et al.*, 2003). Il a en effet été démontré que la GSTP1-1 sous forme monomérique non-activée peut se fixer sur la JNK de la même manière que la GSTM1-1 se fixe sur ASK1 (Adler, *et al.*, 1999). Les 2 kinases sont alors inhibées et l'apoptose initiée par ces 2 enzymes est bloquée. Un stress va pouvoir libérer les GST qui vont

se dimériser et détoxifier la cellule tandis que les kinases vont activer l'apoptose. Nos résultats confirment le rôle antiapoptotique de la GSTP1-1. En effet, la curcumine induit l'apoptose alors que l'expression de la GSTP1-1 est réduite. De plus, une équipe a montré que la surexpression de la GSTP1-1 dans des cellules de la lignée HepG2, qui l'exprime faiblement, diminue l'activation de la caspase 3, alors que l'inhibition de l'expression de la GSTP1-1 dans des cellules de la lignée HT29, qui l'exprime fortement, augmente l'activation de la même caspase (Tashiro, *et al.*, 2001). Les mêmes résultats sont obtenus dans des cellules d'hépatome de rat AH66 (Asakura, *et al.*, 2001).

La curcumine semble être un bon candidat pour une nouvelle thérapie anticancéreuse particulièrement dans le cas des cellules cancéreuses résistantes aux agents chimiothérapeutiques classiques. En effet, elle allie l'inhibition de la GSTP1-1, en grande partie responsable de la résistance, à l'induction de l'apoptose. Elle est d'autant plus intéressante qu'elle n'est active que sur les cellules transformées. Jiang et al. montrent que la curcumine induit l'apoptose dans les cellules cancéreuses NIH 3T3 erb B2, S180, HT-29, 293 et HepG2 alors qu'elle n'a pas d'effet dans les fibroblastes embryonnaires de souris en culture primaire, les fibroblastes embryonnaires de rat et les fibroblastes de prépuce humains (Jiang, M. C., *et al.*, 1996). De même, le S-adenosylméthionine a un effet pro-apoptotique dans les cellules d'hépatome humain alors qu'il a un effet anti-apoptotique dans des cellules hépatiques de rat en culture, ce qui pourrait participer aux propriétés hépatoprotectrices et chimiopréventives de cette substance (Ansorena, *et al.*, 2002). Au contraire, il a été démontré que un mélange des agents chimiopréventifs épigallocatechin-3-gallate et curcumine inhibe la croissance de cellules normales, pré-malignes et malignes (Khafif, *et al.*, 1998).

Effet d'autres agents chimiopréventifs

A l'opposé, le resvératrol n'a aucun effet sur la fixation des facteurs de transcription AP-1 et NF- κ B sur leur site et potentialise même l'induction par le TNF α de l'expression de la luciférase sous le contrôle de 5 répétitions du site NF- κ B consensus ou du promoteur de la *GSTP1-1* (Figures 52 et 53, pages 151-152). Ceci confirme les résultats obtenus par Mollerup et al. qui montrent que le resvératrol ne modifie pas l'expression de la GSTP1 dans la lignée cellulaire d'épithélium bronchique humain BEP2D (Mollerup, *et al.*, 2001). Cependant, l'activité de cette enzyme est induite par le resvératrol dans des lymphocytes humains, ce qui pourrait participer à la protection des cellules contre le stress oxydant induit par l'H₂O₂ (Yen, *et al.*, 2003).

Le trans-anéthole induit l'activité cytosolique des GST totales ainsi que l'expression de la sous-unité 2 de la GST dans les cellules hépatiques de rat (Rompelberg, *et al.*, 1993). L'émodine a le même effet sur l'activité GST dans les foies de souris (Chiu, *et al.*, 2002). De la même façon, la capsaïcine active fortement les GST dans le foie et le colon de rat tout en bloquant l'initiation de tumeurs du colon (Yoshitani, *et al.*, 2001). Néanmoins, Iwama et al. ont montré qu'un traitement à la capsaïcine pendant un mois tend à diminuer l'activité GST alors qu'il active les enzymes microsomales de détoxification particulièrement en présence d'éthanol. Une absorption d'alcool accompagnée d'une ingestion d'une grande quantité de piments forts pourrait modifier le potentiel de détoxification des xénobiotiques chez ces personnes (Iwama, *et al.*, 1990). Dans les cas d'empoisonnements à la sanguinarine après une attaque de goutte récente, il a été montré que l'activité GST n'est pas modifiée dans les érythrocytes bien que la sanguinarine crée un stress oxydant qui pourrait jouer un rôle dans l'attaque de goutte (Banerjee, B. D., *et al.*, 2000).

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

1. Conclusions

Bien que la protection des cellules contre les électrophiles et les radicaux libres grâce aux enzymes de détoxification soit essentielle à la survie de la cellule, lors de la transformation de cellules, la détoxification peut mener à la résistance aux agents chimiothérapeutiques utilisés. L'étude des régulations de l'expression des gènes participant à la détoxification comme à la résistance des cellules cancéreuses est donc capitale pour les stratégies de chimioprévention des cancers. De plus, la recherche de nouvelles stratégies pouvant combattre cet effet secondaire semble être essentielle pour contourner le problème des résistances.

Nous avons défini au cours de cette thèse les éléments mis en jeu dans la régulation de l'expression de la GSTP1-1 dans des lignées leucémiques:

- Nous avons tout d'abord mis en évidence l'importance du site AP-1 dans la régulation de l'expression de cette enzyme. En effet, des expériences de transfection transitoire nous montrent que la voie de transduction du signal Ras - Raf - MEKK1 - MEK1 - ERK1 est impliquée dans la régulation de l'expression de la GSTP1-1. De plus, l'expression de l'ARNm de la *GSTP1-1* est inhibée par le SP600125, un inhibiteur spécifique de JNK. Enfin, la transfection des vecteurs d'expression c-Jun et c-Fos induit l'activité transcriptionnelle de la *GSTP1-1*
- Cependant les inducteurs typiques de AP-1 tels que le TPA et les métaux lourds n'induisent pas l'expression de la GSTP1-1. Les voies de transduction du signal activées par ces inducteurs sont peut-être inexistantes dans les cellules sanguines humaines. Il existe peut-être une régulation tissu et/ou espèce-spécifique de l'expression de la GSTP1-1.

Ces résultats nous ont amené à nous demander si d'autres voies de signalisation pourraient jouer un rôle dans la régulation de la GSTP1-1

- Nos résultats montrent que NF- κ B est impliqué dans la régulation de la *GSTP1-1*. En effet, le TNF α , inducteur typique de NF- κ B, active l'expression de l'ARNm de la *GSTP1-1*

1 et l'activité transactivatrice du promoteur de la *GSTP1-1*. De plus, la co-transfection des vecteurs d'expression TNFR1, TRAF2, NIK, IKK β et p65 induit l'activité transactivatrice du promoteur de la *GSTP1-1* alors qu'un dominant-négatif de I κ B α inhibe fortement cette activité

- Nous avons aussi démontré que le site NF- κ B décrit dans la littérature n'est pas fonctionnel et nous mettons en évidence un nouveau site NF- κ B qui fixe les dimères p50/p65. Ce site semble être important dans la régulation de la *GSTP1-1* comme le montrent les résultats des mutagenèses dirigées.

Après avoir déterminé les voies de signalisation impliquées dans la régulation de l'expression de la *GSTP1-1*, nous avons voulu étudier les effets d'agents chimiopréventifs sur les cellules leucémiques

- Nos résultats montrent que la curcumine agit comme un agent anti-cancéreux puissant dans les cellules leucémiques K562. En effet, cet agent induit l'apoptose dans des cellules leucémiques par les voies mitochondriales et des récepteurs.
- De plus, la curcumine inhibe l'expression basale et induite par le TNF α de l'ARNm de la *GSTP1-1* ainsi que de sa protéine. Cet effet de la curcumine serait dû à l'inhibition de la fixation des facteurs de transcription AP-1 et NF- κ B sur les sites présents sur le promoteur de la *GSTP1-1*.

2. Perspectives

Pour appréhender complètement le rôle de la GSTP1-1 dans le développement des cancers et des résistances aux anticancéreux, de nombreuses expériences sont encore nécessaires

Nous envisageons de traiter les cellules transfectées avec nos différentes constructions (voir 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.

Les résultats de cette thèse nous ont permis de mettre en évidence une régulation différentielle de la *GSTP1-1* en fonction de la lignée, de la pathologie ou en fonction du traitement. Il sera intéressant de comparer les mécanismes moléculaires menant à l'expression de la *GSTP1-1* des lignées contenues sur la macroarray afin de vérifier l'induction aussi bien que l'inhibition observée dans des conditions expérimentales réelles avec des gammes de concentration et des cinétiques différentes.

De plus en plus de résultats paraissent dans la littérature concernant l'importance de la structure de la chromatine. Des résultats préliminaires, non présentés dans cette thèse, nous ont permis de mettre en évidence un effet régulateur positif si nous transfectons une construction exprimant CBP/p300 avec les constructions contenant des parties du promoteur *GSTP1-1*. Cette induction peut être considérablement augmentée en présence de AP-1 ou p65 NF- κ B co-transfecté.

Par ailleurs la méthylation de ADN peut être directement corrélée à la structure de la chromatine. Des résultats précédemment obtenus au laboratoire avaient montré un impact de la méthylation sur l'expression de la *GSTP1-1*, notamment dans la lignée du lymphome de Burkitt Raji. Pour confirmer le rôle important de la méthylation du promoteur dans la régulation de l'expression de la *GSTP1-1*, nous voulons 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 peuvent transcrire le gène.

Nous avons observé un effet inhibiteur de certains agents chimiopréventifs tels que la curcumine sur l'expression de la GSTP1-1. Or une analyse par Microarray nous a permis de montrer des listes de gènes potentiellement augmentés ou diminués par un prétraitement à la curcumine suivi d'un traitement au TNF α . Les gènes codant les protéines du stress thermique sont parmi les gènes les plus touchés par ce type de traitement. Il faudra confirmer ces résultats par des RT-PCR, des Northern blots ou des PCR quantitatives.

Ces études peuvent être étendues à d'autres agents chimiopréventifs avec comme objectif de mettre en évidence des gènes activés par plusieurs agents naturels permettant de comprendre leur activité globale.

Nous devons également aborder la même étude avec des cellules 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 ou des tumeurs solides. 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.

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.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abraham SK** (2001). Anti-genotoxicity of trans-anethole and eugenol in mice. *Food Chem Toxicol*, **39** (5), 493-8.
- Acquaviva C, Bossis G, Ferrara P, Brockly F, Jariel-Encontre I and Piechaczyk M** (2002). Multiple degradation pathways for Fos family proteins. *Ann N Y Acad Sci*, **973** 426-34.
- Adler V, Yin Z, Fuchs SY, Benezra M, Rosario L, Tew KD, Pincus MR, Sardana M, Henderson CJ, Wolf CR, Davis RJ and Ronai Z** (1999). Regulation of JNK signaling by GSTp. *Embo J*, **18** (5), 1321-34.
- Agrawal A, Choudhary D, Upreti M, Rath PC and Kale RK** (2001). Radiation induced oxidative stress: I. Studies in Ehrlich solid tumor in mice. *Mol Cell Biochem*, **223** (1-2), 71-80.
- Agrawal RC, Wiessler M, Hecker E and Bhide SV** (1986). Tumour-promoting effect of chilli extract in BALB/c mice. *Int J Cancer*, **38** (5), 689-95.
- Ahmad N, Gali H, Javed S and Agarwal R** (1998). Skin cancer chemopreventive effects of a flavonoid antioxidant silymarin are mediated via impairment of receptor tyrosine kinase signaling and perturbation in cell cycle progression. *Biochem Biophys Res Commun*, **247** (2), 294-301.
- Ahmad N, Gupta S, Husain MM, Heiskanen KM and Mukhtar H** (2000). Differential antiproliferative and apoptotic response of sanguinarine for cancer cells versus normal cells. *Clin Cancer Res*, **6** (4), 1524-8.
- Albert-Puleo M** (1980). Fennel and anise as estrogenic agents. *J Ethnopharmacol*, **2** (4), 337-44.
- al-Harbi MM, Qureshi S, Raza M, Ahmed MM, Giangreco AB and Shah AH** (1995). Influence of anethole treatment on the tumour induced by Ehrlich ascites carcinoma cells in paw of Swiss albino mice. *Eur J Cancer Prev*, **4** (4), 307-18.
- Ali-Osman F, Akande O, Antoun G, Mao JX and Buolamwini J** (1997). Molecular cloning, characterization, and expression in *Escherichia coli* of full-length cDNAs of three human glutathione S-transferase Pi gene variants. Evidence for differential catalytic activity of the encoded proteins. *J Biol Chem*, **272** (15), 10004-12.
- Allan JM, Wild CP, Rollinson S, Willett EV, Moorman AV, Dovey GJ, Roddam PL, Roman E, Cartwright RA and Morgan GJ** (2001). Polymorphism in glutathione S-transferase P1 is associated with susceptibility to chemotherapy-induced leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98** (20), 11592-7.
- Amara FM, Chen FY and Wright JA** (1994). Phorbol ester modulation of a novel cytoplasmic protein binding activity at the 3'-untranslated region of mammalian ribonucleotide reductase R2 mRNA and role in message stability. *J Biol Chem*, **269** (9), 6709-15.
- Ammendola R, Mesuraca M, Russo T and Cimino F** (1994). The DNA-binding efficiency of Sp1 is affected by redox changes. *Eur J Biochem*, **225** (1), 483-9.
- Ammon HP and Wahl MA** (1991). Pharmacology of *Curcuma longa*. *Planta Med*, **57** (1), 1-7.
- Angel P, Imagawa M, Chiu R, Stein B, Imbra RJ, Rahmsdorf HJ, Jonat C, Herrlich P and Karin M** (1987). Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. *Cell*, **49** (6), 729-39.
- Angel P and Szabowski A** (2002). Function of AP-1 target genes in mesenchymal-epithelial cross-talk in skin. *Biochem Pharmacol*, **64** (5-6), 949-56.
- Ansorena E, Garcia-Trevijano ER, Martinez-Chantar ML, Huang ZZ, Chen L, Mato JM, Iriburu M, Lu SC and Avila MA** (2002). S-adenosylmethionine and methylthioadenosine are antiapoptotic in cultured rat hepatocytes but proapoptotic in human hepatoma cells. *Hepatology*, **35** (2), 274-80.
- Anto RJ, Mukhopadhyay A, Shishodia S, Gairola CG and Aggarwal BB** (2002). Cigarette smoke condensate activates nuclear transcription factor-kappaB through phosphorylation and degradation of IkappaB(alpha): correlation with induction of cyclooxygenase-2. *Carcinogenesis*, **23** (9), 1511-8.

- Arakawa T, Nakamura M, Yoshimoto T and Yamamoto S** (1995). The transcriptional regulation of human arachidonate 12-lipoxygenase gene by NF kappa B/Rel. *FEBS Lett*, **363** (1-2), 105-10.
- Arbiser JL, Klauber N, Rohan R, van Leeuwen R, Huang MT, Fisher C, Flynn E and Byers HR** (1998). Curcumin is an in vivo inhibitor of angiogenesis. *Mol Med*, **4** (6), 376-83.
- Archer VE and Jones DW** (2002). Capsaicin pepper, cancer and ethnicity. *Med Hypotheses*, **59** (4), 450-7.
- Arlt A, Gehrz A, Muerkoster S, Vorndamm J, Kruse ML, Folsch UR and Schafer H** (2003). Role of NF-kappaB and Akt/PI3K in the resistance of pancreatic carcinoma cell lines against gemcitabine-induced cell death. *Oncogene*, **22** (21), 3243-51.
- Arnott CH, Scott KA, Moore RJ, Hewer A, Phillips DH, Parker P, Balkwill FR and Owens DM** (2002). Tumour necrosis factor-alpha mediates tumour promotion via a PKC alpha- and AP-1-dependent pathway. *Oncogene*, **21** (31), 4728-38.
- Asakura T, Hashizume Y, Tashiro K, Searashi Y, Ohkawa K, Nishihira J, Sakai M and Shibasaki T** (2001). Suppression of GST-P by treatment with glutathione-doxorubicin conjugate induces potent apoptosis in rat hepatoma cells. *Int J Cancer*, **94** (2), 171-7.
- Autrup JL, Hokland P, Pedersen L and Autrup H** (2002). Effect of glutathione S-transferases on the survival of patients with acute myeloid leukaemia. *Eur J Pharmacol*, **438** (1-2), 15-8.
- Awasthi S, Pandya U, Singhal SS, Lin JT, Thivyanathan V, Seifert WE, Jr., Awasthi YC and Ansari GA** (2000). Curcumin-glutathione interactions and the role of human glutathione S-transferase P1-1. *Chem Biol Interact*, **128** (1), 19-38.
- Azuine MA and Bhide SV** (1992a). Chemopreventive effect of turmeric against stomach and skin tumors induced by chemical carcinogens in Swiss mice. *Nutr Cancer*, **17** (1), 77-83.
- Azuine MA and Bhide SV** (1992b). Protective single/combined treatment with betel leaf and turmeric against methyl (acetoxymethyl) nitrosamine-induced hamster oral carcinogenesis. *Int J Cancer*, **51** (3), 412-5.
- Bae JH, Park JW and Kwon TK** (2003). Ruthenium red, inhibitor of mitochondrial Ca²⁺ uniporter, inhibits curcumin-induced apoptosis via the prevention of intracellular Ca²⁺ depletion and cytochrome c release. *Biochem Biophys Res Commun*, **303** (4), 1073-9.
- Baeuerle PA and Henkel T** (1994). Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol*, **12** 141-79.
- Bailey S, Hall AG, Pearson AD, Reid MM and Redfern CP** (1999). Glucocorticoid resistance and the AP-1 transcription factor in leukaemia. *Adv Exp Med Biol*, **457** 615-9.
- Bakker J, Lin X and Nelson WG** (2002). Methyl-CpG binding domain protein 2 represses transcription from hypermethylated pi-class glutathione S-transferase gene promoters in hepatocellular carcinoma cells. *J Biol Chem*, **277** (25), 22573-80.
- Balogun E, Hoque M, Gong P, Killeen E, Green CJ, Foresti R, Alam J and Motterlini R** (2003). Curcumin activates the haem oxygenase-1 gene via regulation of Nrf2 and the antioxidant-responsive element. *Biochem J*, **371** (Pt 3), 887-95.
- Bamberger AM, Milde-Langosch K, Rossing E, Goemann C and Loning T** (2001). Expression pattern of the AP-1 family in endometrial cancer: correlations with cell cycle regulators. *J Cancer Res Clin Oncol*, **127** (9), 545-50.
- Banerjee BD, Seth V, Koner BC, Ahmed RS, Sharma M, Grover SS, Rautala RS, Avasthi R and Pasha ST** (2000). Evaluation of oxidative stress in some cases of argimone oil poisoning during a recent outbreak of epidemic dropsy in India. *Int J Environ Health Res*, **10** (4), 341-6.

- Banerjee S, Bueso-Ramos C and Aggarwal BB** (2002). Suppression of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary carcinogenesis in rats by resveratrol: role of nuclear factor-kappaB, cyclooxygenase 2, and matrix metalloprotease 9. *Cancer Res*, **62** (17), 4945-54.
- Bargou RC, Emmerich F, Krappmann D, Bommert K, Mapara MY, Arnold W, Royer HD, Grinstein E, Greiner A, Scheidereit C and Dorken B** (1997). Constitutive nuclear factor-kappaB-RelA activation is required for proliferation and survival of Hodgkin's disease tumor cells. *J Clin Invest*, **100** (12), 2961-9.
- Bartholomaeus AR, Bolton R and Ahokas JT** (1994). Inhibition of rat liver cytosolic glutathione S-transferase by silybin. *Xenobiotica*, **24** (1), 17-24.
- Beauparlant P, Kwan I, Bitar R, Chou P, Koromilas AE, Sonenberg N and Hiscott J** (1994). Disruption of I kappa B alpha regulation by antisense RNA expression leads to malignant transformation. *Oncogene*, **9** (11), 3189-97.
- Beg AA, Ruben SM, Scheinman RI, Haskill S, Rosen CA and Baldwin AS, Jr.** (1992). I kappa B interacts with the nuclear localization sequences of the subunits of NF-kappa B: a mechanism for cytoplasmic retention. *Genes Dev*, **6** (10), 1899-913.
- Benbrahim-Tallaa L, Boussouar F, Rey C and Benahmed M** (2002). Tumor necrosis factor-alpha inhibits glutathione S-transferase-alpha expression in cultured porcine Sertoli cells. *J Endocrinol*, **175** (3), 803-12.
- Bennett BL, Sasaki DT, Murray BW, O'Leary EC, Sakata ST, Xu W, Leisten JC, Motiwala A, Pierce S, Satoh Y, Bhagwat SS, Manning AM and Anderson DW** (2001). SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98** (24), 13681-6.
- Bentires-Alj M, Barbu V, Fillet M, Chariot A, Relic B, Jacobs N, Gielen J, Merville MP and Bours V** (2003). NF-kappaB transcription factor induces drug resistance through MDR1 expression in cancer cells. *Oncogene*, **22** (1), 90-7.
- Bernard D, Quatannens B, Begue A, Vandenbunder B and Abbadie C** (2001). Antiproliferative and antiapoptotic effects of crel may occur within the same cells via the up-regulation of manganese superoxide dismutase. *Cancer Res*, **61** (6), 2656-64.
- Bernardini S, Bellincampi L, Ballerini S, Ranalli M, Pastore A, Cortese C and Federici G** (2002). Role of GST P1-1 in mediating the effect of etoposide on human neuroblastoma cell line Sh-Sy5y. *J Cell Biochem*, **86** (2), 340-7.
- Bharti AC, Donato N, Singh S and Aggarwal BB** (2003). Curcumin (diferuloylmethane) down-regulates the constitutive activation of nuclear factor-kappa B and Ikappa Balpha kinase in human multiple myeloma cells, leading to suppression of proliferation and induction of apoptosis. *Blood*, **101** (3), 1053-62.
- Bhat-Nakshatri P, Sweeney CJ and Nakshatri H** (2002). Identification of signal transduction pathways involved in constitutive NF-kappaB activation in breast cancer cells. *Oncogene*, **21** (13), 2066-78.
- Bhuvaneswari V, Velmurugan B, Balasenthil S, Ramachandran CR and Nagini S** (2001). Chemopreventive efficacy of lycopene on 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced hamster buccal pouch carcinogenesis. *Fitoterapia*, **72** (8), 865-74.
- Bierhaus A, Zhang Y, Quehenberger P, Luther T, Haase M, Muller M, Mackman N, Ziegler R and Nawroth PP** (1997). The dietary pigment curcumin reduces endothelial tissue factor gene expression by inhibiting binding of AP-1 to the DNA and activation of NF-kappa B. *Thromb Haemost*, **77** (4), 772-82.
- Bill O, Garlisi CG, Grove DS, Holt GE and Mastro AM** (1994). IL-2 mRNA levels and degradation rates change with mode of stimulation and phorbol ester treatment of lymphocytes. *Cytokine*, **6** (1), 102-10.
- Blank V, Kourilsky P and Israel A** (1992). NF-kappa B and related proteins: Rel/dorsal homologies meet ankyrin-like repeats. *Trends Biochem Sci*, **17** (4), 135-40.

- Board PG, Baker RT, Chelvanayagam G and Jermiin LS** (1997). Zeta, a novel class of glutathione transferases in a range of species from plants to humans. *Biochem J*, **328** (Pt 3) 929-35.
- Board PG, Coggan M, Chelvanayagam G, Easteal S, Jermiin LS, Schulte GK, Danley DE, Hoth LR, Griffor MC, Kamath AV, Rosner MH, Chrnyk BA, Perregaux DE, Gabel CA, Geoghegan KF and Pandit J** (2000). Identification, characterization, and crystal structure of the Omega class glutathione transferases. *J Biol Chem*, **275** (32), 24798-806.
- Board PG and Webb GC** (1987). Isolation of a cDNA clone and localization of human glutathione S-transferase 2 genes to chromosome band 6p12. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84** (8), 2377-81.
- Bonte F, Noel-Hudson MS, Wepierre J and Meybeck A** (1997). Protective effect of curcuminoids on epidermal skin cells under free oxygen radical stress. *Planta Med*, **63** (3), 265-6.
- Borde-Chiche P, Diederich M, Morceau F, Wellman M and Dicato M** (2001a). Phorbol ester responsiveness of the glutathione S-transferase P1 gene promoter involves an inducible c-jun binding in human K562 leukemia cells. *Leuk Res*, **25** (3), 241-7.
- Borde-Chiche P, Diederich M, Morceau F, Puga A, Wellman M and Dicato M** (2001b). Regulation of transcription of the glutathione S-transferase P1 gene by methylation of the minimal promoter in human leukemia cells. *Biochem Pharmacol*, **61** (5), 605-12.
- Bose C, Guo J, Zimniak L, Srivastava SK, Singh SP, Zimniak P and Singh SV** (2002). Critical role of allyl groups and disulfide chain in induction of P1 class glutathione transferase in mouse tissues in vivo by diallyl disulfide, a naturally occurring chemopreventive agent in garlic. *Carcinogenesis*, **23** (10), 1661-5.
- Bottero V, Busuttill V, Loubat A, Magne N, Fischel JL, Milano G and Peyron JF** (2001). Activation of nuclear factor kappaB through the IKK complex by the topoisomerase poisons SN38 and doxorubicin: a brake to apoptosis in HeLa human carcinoma cells. *Cancer Res*, **61** (21), 7785-91.
- Bours V, Dejardin E, Bonizzi G, Merville M-P and Piette J** (1998). Le facteur transcriptionnel NF- κ B: rôle au cours de l'oncogenèse et de la réponse au traitement anticancéreux. *Médecine/Sciences*, **14** 566-571.
- Bouthillier L, Charbonneau M and Brodeur J** (1996). Assessment of the role of glutathione conjugation in the protection afforded by anethol dithiolthione against hexachloro-1,3-butadiene-induced nephrotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*, **139** (1), 177-85.
- Brabender J, Lord RV, Wickramasinghe K, Metzger R, Schneider PM, Park JM, Holscher AH, DeMeester TR, Danenberg KD and Danenberg PV** (2002). Glutathione S-transferase-pi expression is downregulated in patients with Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma. *J Gastrointest Surg*, **6** (3), 359-67.
- Bradford MM** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72** 248-54.
- Bravard A, Luccioni C, Moustacchi E and Rigaud O** (1999). Contribution of antioxidant enzymes to the adaptive response to ionizing radiation of human lymphoblasts. *Int J Radiat Biol*, **75** (5), 639-45.
- Brodin G, Ahgren A, ten Dijke P, Heldin CH and Heuchel R** (2000). Efficient TGF-beta induction of the Smad7 gene requires cooperation between AP-1, Sp1, and Smad proteins on the mouse Smad7 promoter. *J Biol Chem*, **275** (37), 29023-30.
- Buchalter L** (1969). Isolation and identification of emodin (1,3,8-tri-hydroxy-6-methyl anthraquinone) from *Rumex hymenosepalus*, family polygonaceae. *J Pharm Sci*, **58** (7), 904.
- Bush JA, Cheung KJ, Jr. and Li G** (2001). Curcumin induces apoptosis in human melanoma cells through a Fas receptor/caspase-8 pathway independent of p53. *Exp Cell Res*, **271** (2), 305-14.
- Butler AP, Mar PK, McDonald FF and Ramsay RL** (1991). Involvement of protein kinase C in the regulation of ornithine decarboxylase mRNA by phorbol esters in rat hepatoma cells. *Exp Cell Res*, **194** (1), 56-61.

- Byun MS, Jeon KI, Choi JW, Shim JY and Jue DM (2002).** Dual effect of oxidative stress on NF-kappaB activation in HeLa cells. *Exp Mol Med*, **34 (5)**, 332-9.
- Cabelguenne A, Lorient MA, Stucker I, Blons H, Koum-Besson E, Brasnu D, Beaune P, Laccourreye O, Laurent-Puig P and De Waziers I (2001).** Glutathione-associated enzymes in head and neck squamous cell carcinoma and response to cisplatin-based neoadjuvant chemotherapy. *Int J Cancer*, **93 (5)**, 725-30.
- Cadoret A, Bertrand F, Baron-Delage S, Levy P, Courtois G, Gespach C, Capeau J and Cherqui G (1997).** Down-regulation of NF-kappaB activity and NF-kappaB p65 subunit expression by ras and polyoma middle T oncogenes in human colonic Caco-2 cells. *Oncogene*, **14 (13)**, 1589-600.
- Cal C, Garban H, Jazirehi A, Yeh C, Mizutani Y and Bonavida B (2003).** Resveratrol and cancer: chemoprevention, apoptosis, and chemo-immunosensitizing activities. *Curr Med Chem Anti-Canc Agents*, **3 (2)**, 77-93.
- Campbell E, Takahashi Y, Abramovitz M, Peretz M and Listowsky I (1990).** A distinct human testis and brain mu-class glutathione S-transferase. Molecular cloning and characterization of a form present even in individuals lacking hepatic type mu isoenzymes. *J Biol Chem*, **265 (16)**, 9188-93.
- Carrasco D, Rizzo CA, Dorfman K and Bravo R (1996).** The v-rel oncogene promotes malignant T-cell leukemia/lymphoma in transgenic mice. *Embo J*, **15 (14)**, 3640-50.
- Cavigelli M, Li WW, Lin A, Su B, Yoshioka K and Karin M (1996).** The tumor promoter arsenite stimulates AP-1 activity by inhibiting a JNK phosphatase. *Embo J*, **15 (22)**, 6269-79.
- Chainy GB, Manna SK, Chaturvedi MM and Aggarwal BB (2000).** Anethole blocks both early and late cellular responses transduced by tumor necrosis factor: effect on NF-kappaB, AP-1, JNK, MAPKK and apoptosis. *Oncogene*, **19 (25)**, 2943-50.
- Chan MM, Fong D, Soprano KJ, Holmes WF and Heverling H (2003).** Inhibition of growth and sensitization to cisplatin-mediated killing of ovarian cancer cells by polyphenolic chemopreventive agents. *J Cell Physiol*, **194 (1)**, 63-70.
- Chaturvedi MM, Kumar A, Darnay BG, Chainy GB, Agarwal S and Aggarwal BB (1997).** Sanguinarine (pseudocheleerythrine) is a potent inhibitor of NF-kappaB activation, IkappaBalpha phosphorylation, and degradation. *J Biol Chem*, **272 (48)**, 30129-34.
- Chaudhary LR and Hruska KA (2003).** Inhibition of cell survival signal protein kinase B/Akt by curcumin in human prostate cancer cells. *J Cell Biochem*, **89 (1)**, 1-5.
- Chen FY, Amara FM and Wright JA (1993).** Mammalian ribonucleotide reductase R1 mRNA stability under normal and phorbol ester stimulating conditions: involvement of a cis-trans interaction at the 3' untranslated region. *Embo J*, **12 (10)**, 3977-86.
- Chen FY, Amara FM and Wright JA (1994).** Regulation of mammalian ribonucleotide reductase R1 mRNA stability is mediated by a ribonucleotide reductase R1 mRNA 3'-untranslated region cis-trans interaction through a protein kinase C-controlled pathway. *Biochem J*, **302 (Pt 1)** 125-32.
- Chen G, Cao P and Goeddel DV (2002a).** TNF-induced recruitment and activation of the IKK complex require Cdc37 and Hsp90. *Mol Cell*, **9 (2)**, 401-10.
- Chen H, Liu J, Merrick BA and Waalkes MP (2001a).** Genetic events associated with arsenic-induced malignant transformation: applications of cDNA microarray technology. *Mol Carcinog*, **30 (2)**, 79-87.
- Chen N, Nomura M, She QB, Ma WY, Bode AM, Wang L, Flavell RA and Dong Z (2001b).** Suppression of skin tumorigenesis in c-Jun NH(2)-terminal kinase-2-deficient mice. *Cancer Res*, **61 (10)**, 3908-12.

Chen YC, Shen SC, Lee WR, Hsu FL, Lin HY, Ko CH and Tseng SW (2002b). Emodin induces apoptosis in human promyeloleukemic HL-60 cells accompanied by activation of caspase 3 cascade but independent of reactive oxygen species production. *Biochem Pharmacol*, **64** (12), 1713-24.

Chen YH and Ramos KS (2000). A CCAAT/enhancer-binding protein site within antioxidant/electrophile response element along with CREB-binding protein participate in the negative regulation of rat GST-Ya gene in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*, **275** (35), 27366-76.

Chen YR and Tan TH (1998). Inhibition of the c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling pathway by curcumin. *Oncogene*, **17** (2), 173-8.

Cheng AL, Hsu CH, Lin JK, Hsu MM, Ho YF, Shen TS, Ko JY, Lin JT, Lin BR, Ming-Shiang W, Yu HS, Jee SH, Chen GS, Chen TM, Chen CA, Lai MK, Pu YS, Pan MH, Wang YJ, Tsai CC and Hsieh CY (2001). Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions. *Anticancer Res*, **21** (4B), 2895-900.

Chiu PY, Mak DH, Poon MK and Ko KM (2002). In vivo antioxidant action of a lignan-enriched extract of Schisandra fruit and an anthraquinone-containing extract of Polygonum root in comparison with schisandrin B and emodin. *Planta Med*, **68** (11), 951-6.

Cho SG, Lee YH, Park HS, Ryoo K, Kang KW, Park J, Eom SJ, Kim MJ, Chang TS, Choi SY, Shim J, Kim Y, Dong MS, Lee MJ, Kim SG, Ichijo H and Choi EJ (2001). Glutathione S-transferase mu modulates the stress-activated signals by suppressing apoptosis signal-regulating kinase 1. *J Biol Chem*, **276** (16), 12749-55.

Choi M, Rolle S, Wellner M, Cardoso MC, Scheidereit C, Luft FC and Kettritz R (2003). Inhibition of NF- κ B by a TAT-NEMO-binding domain peptide accelerates constitutive apoptosis and abrogates LPS-delayed neutrophil apoptosis. *Blood*, **102** (6), 2259-67.

Chuang SE, Yeh PY, Lu YS, Lai GM, Liao CM, Gao M and Cheng AL (2002). Basal levels and patterns of anticancer drug-induced activation of nuclear factor-kappaB (NF-kappaB), and its attenuation by tamoxifen, dexamethasone, and curcumin in carcinoma cells. *Biochem Pharmacol*, **63** (9), 1709-16.

Ciolino HP, Daschner PJ, Wang TT and Yeh GC (1998). Effect of curcumin on the aryl hydrocarbon receptor and cytochrome P450 1A1 in MCF-7 human breast carcinoma cells. *Biochem Pharmacol*, **56** (2), 197-206.

Cnubben NH, Rommens AJ, Oudshoorn MJ and Van Bladeren PJ (1998). Glutathione-dependent biotransformation of the alkylating drug thiotepa and transport of its metabolite monogluthionylthiotepa in human MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Res*, **58** (20), 4616-23.

Cohen L, Henzel WJ and Baeuerle PA (1998). IKAP is a scaffold protein of the IkappaB kinase complex. *Nature*, **395** (6699), 292-6.

Cohen MP, Shea E, Chen S and Shearman CW (2003). Glycated albumin increases oxidative stress, activates NF-kappa B and extracellular signal-regulated kinase (ERK), and stimulates ERK-dependent transforming growth factor-beta 1 production in macrophage RAW cells. *J Lab Clin Med*, **141** (4), 242-9.

Commandeur JN, Stijntjes GJ and Vermeulen NP (1995). 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** (2), 271-330.

Cookson MS, Reuter VE, Linkov I and Fair WR (1997). Glutathione S-transferase PI (GST-pi) class expression by immunohistochemistry in benign and malignant prostate tissue. *J Urol*, **157** (2), 673-6.

Crowley-Weber CL, Dvorakova K, Crowley C, Bernstein H, Bernstein C, Garewal H and Payne CM (2003). Nicotine increases oxidative stress, activates NF-kappaB and GRP78, induces apoptosis and sensitizes cells to genotoxic/xenobiotic stresses by a multiple stress inducer, deoxycholate: relevance to colon carcinogenesis. *Chem Biol Interact*, **145** (1), 53-66.

- Cullinan MP, Powell RN, Faddy MJ and Seymour GJ** (1997). Efficacy of a dentifrice and oral rinse containing sanguinaria extract in conjunction with initial periodontal therapy. *Aust Dent J*, **42** (1), 47-51.
- Danno S, Nishiyama H, Higashitsuji H, Yokoi H, Xue JH, Itoh K, Matsuda T and Fujita J** (1997). Increased transcript level of RBM3, a member of the glycine-rich RNA-binding protein family, in human cells in response to cold stress. *Biochem Biophys Res Commun*, **236** (3), 804-7.
- De M, De AK, Sen P and Banerjee AB** (2002). Antimicrobial properties of star anise (*Illicium verum* Hook f). *Phytother Res*, **16** (1), 94-5.
- Debiton E, Madelmont JC, Legault J and Barthelemy C** (2003). Sanguinarine-induced apoptosis is associated with an early and severe cellular glutathione depletion. *Cancer Chemother Pharmacol*, **51** (6), 474-82.
- Dejardin E, Bonizzi G, Bellahcene A, Castronovo V, Merville MP and Bours V** (1995). Highly-expressed p100/p52 (NFkB2) sequesters other NF-kappa B-related proteins in the cytoplasm of human breast cancer cells. *Oncogene*, **11** (9), 1835-41.
- Dejardin E, Deregowski V, Greimers R, Cai Z, Chouaib S, Merville MP and Bours V** (1998). Regulation of major histocompatibility complex class I expression by NF-kappaB-related proteins in breast cancer cells. *Oncogene*, **16** (25), 3299-307.
- Delhase M, Hayakawa M, Chen Y and Karin M** (1999). Positive and negative regulation of IkappaB kinase activity through IKKbeta subunit phosphorylation. *Science*, **284** (5412), 309-13.
- Delmas D, Passilly-Degrace P, Jannin B, Malki MC and Latruffe N** (2002). Resveratrol, a chemopreventive agent, disrupts the cell cycle control of human SW480 colorectal tumor cells. *Int J Mol Med*, **10** (2), 193-9.
- Devasena T, Rajasekaran KN, Gunasekaran G, Viswanathan P and Menon VP** (2003). Anticarcinogenic effect of bis-1,7-(2-hydroxyphenyl)-hepta-1,6-diene-3,5-dione a curcumin analog on DMH-induced colon cancer model. *Pharmacol Res*, **47** (2), 133-40.
- Devin A, Lin Y, Yamaoka S, Li Z, Karin M and Liu Z** (2001). The alpha and beta subunits of IkappaB kinase (IKK) mediate TRAF2-dependent IKK recruitment to tumor necrosis factor (TNF) receptor 1 in response to TNF. *Mol Cell Biol*, **21** (12), 3986-94.
- Dhakshinamoorthy S and Jaiswal AK** (2000). Small maf (MafG and MafK) proteins negatively regulate antioxidant response element-mediated expression and antioxidant induction of the NAD(P)H:Quinone oxidoreductase1 gene. *J Biol Chem*, **275** (51), 40134-41.
- Dhar A, Young MR and Colburn NH** (2002). The role of AP-1, NF-kappaB and ROS/NOS in skin carcinogenesis: the JB6 model is predictive. *Mol Cell Biochem*, **234-235** (1-2), 185-93.
- Di Simone D, Galimberti S, Mattii L and Petrini M** (1997). c-Jun and GST-pi expression in human plasma cells. *Haematologica*, **82** (1), 69-70.
- Diccianni MB, Imagawa M and Muramatsu M** (1992). The dyad palindromic glutathione transferase P enhancer binds multiple factors including AP1. *Nucleic Acids Res*, **20** (19), 5153-8.
- Dickinson DA, Iles KE, Zhang H, Blank V and Forman HJ** (2003). Curcumin alters EpRE and AP-1 binding complexes and elevates glutamate-cysteine ligase gene expression. *Faseb J*, **17** (3), 473-5.
- DiDonato JA, Hayakawa M, Rothwarf DM, Zandi E and Karin M** (1997). A cytokine-responsive IkappaB kinase that activates the transcription factor NF-kappaB. *Nature*, **388** (6642), 548-54.
- Diederich M, el yaagoubi M, Gerardin P, Wellman M and Siest G** (1995). Characterization and regulatory effect of gamma-glutamyltransferase messenger RNA untranslated regions in human leukemia. *Leukemia*, **9** (8), 1332-7.

Diederich M, Wellman M and 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** (2-3), 307-10.

Dierickx PJ, Nuffel GV and Alvarez I (1999). Glutathione protection against hydrogen peroxide, tert-butyl hydroperoxide and diamide cytotoxicity in rat hepatoma-derived Fa32 cells. *Hum Exp Toxicol*, **18** (10), 627-33.

Dincer Y, Akcay T, Alademir Z and Ilkova H (2002). Effect of oxidative stress on glutathione pathway in red blood cells from patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism*, **51** (10), 1360-2.

Dirven HA, Dictus EL, Broeders NL, van Ommen B and van Bladeren PJ (1995). The role of human glutathione S-transferase isoenzymes in the formation of glutathione conjugates of the alkylating cytostatic drug thiotepa. *Cancer Res*, **55** (8), 1701-6.

Dobrzanski P, Ryseck RP and Bravo R (1993). Both N- and C-terminal domains of RelB are required for full transactivation: role of the N-terminal leucine zipper-like motif. *Mol Cell Biol*, **13** (3), 1572-82.

Dong Z (2003). Molecular mechanism of the chemopreventive effect of resveratrol. *Mutat Res*, **523-524** 145-50.

Dorion S, Lambert H and Landry J (2002). Activation of the p38 signaling pathway by heat shock involves the dissociation of glutathione S-transferase Mu from Ask1. *J Biol Chem*, **277** (34), 30792-7.

Eaton DL and Bammler TK (1999). Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology. *Toxicol Sci*, **49** (2), 156-64.

Ebert MN, Beyer-Sehlmeyer G, Liegibel UM, Kautenburger T, Becker TW and Pool-Zobel BL (2001). Butyrate induces glutathione S-transferase in human colon cells and protects from genetic damage by 4-hydroxy-2-nonenal. *Nutr Cancer*, **41** (1-2), 156-64.

Egyhazi S, Edgren MR, Hansson J, Krockel D, Mannervik B and Ringborg U (1997). Role of O6-methylguanine-DNA methyltransferase, glutathione transferase M3-3 and glutathione in resistance to carmustine in a human non-small cell lung cancer cell line. *Eur J Cancer*, **33** (3), 447-52.

Eickelmann P, Morel F, Schulz WA and Sies H (1995). Turnover of glutathione S-transferase alpha mRNAs is accelerated by 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate in human hepatoma and colon carcinoma cell lines. *Eur J Biochem*, **229** (1), 21-6.

Elewaut D, Shaikh RB, Hammond KJ, De Winter H, Leishman AJ, Sidobre S, Turovskaya O, Prigozy TI, Ma L, Banks TA, Lo D, Ware CF, Cheroutre H and Kronenberg M (2003). NIK-dependent RelB activation defines a unique signaling pathway for the development of V alpha 14i NKT cells. *J Exp Med*, **197** (12), 1623-33.

Elsby R, Kitteringham NR, Goldring CE, Lovatt CA, Chamberlain M, Henderson CJ, Wolf CR and Park BK (2003). Increased constitutive c-Jun N-terminal kinase signaling in mice lacking glutathione S-transferase Pi. *J Biol Chem*, **278** (25), 22243-9.

Falkner KC, Pinaire JA, Xiao GH, Geoghegan TE and Prough RA (2001). Regulation of the rat glutathione S-transferase A2 gene by glucocorticoids: involvement of both the glucocorticoid and pregnane X receptors. *Mol Pharmacol*, **60** (3), 611-9.

Farrow B and Evers BM (2002). Inflammation and the development of pancreatic cancer. *Surg Oncol*, **10** (4), 153-69.

Favreau L and Pickett CB (1997). Oxidative stress and signal transduction, Forman H.J. CE, 272-288.

Fiebrich F and Koch H (1979a). Silymarin, an inhibitor of lipoxygenase. *Experientia*, **35** (12), 1548-60.

Fiebrich F and Koch H (1979b). Silymarin, an inhibitor of prostaglandin synthetase. *Experientia*, **35** (12), 1550-2.

- Fiorucci S, Meli R, Bucci M and Cirino G** (2001). Dual inhibitors of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase. A new avenue in anti-inflammatory therapy? *Biochem Pharmacol*, **62** (11), 1433-8.
- Firozi PF, Aboobaker VS and Bhattacharya RK** (1996). Action of curcumin on the cytochrome P450-system catalyzing the activation of aflatoxin B1. *Chem Biol Interact*, **100** (1), 41-51.
- Foo SY and Nolan GP** (1999). NF-kappaB to the rescue: RELs, apoptosis and cellular transformation. *Trends Genet*, **15** (6), 229-35.
- Fortin A, Raybaud-Diogene H, Tetu B, Deschenes R, Huot J and Landry J** (2000). Overexpression of the 27 KDa heat shock protein is associated with thermoresistance and chemoresistance but not with radioresistance. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, **46** (5), 1259-66.
- Frank N, Knauff J, Amelung F, Nair J, Wesch H and Bartsch H** (2003). No prevention of liver and kidney tumors in Long-Evans Cinnamon rats by dietary curcumin, but inhibition at other sites and of metastases. *Mutat Res*, **523-524** 127-35.
- Funakoshi-Tago M, Sonoda Y, Tanaka S, Hashimoto K, Tago K, Tominaga SI and Kasahara T** (2003). Tumor Necrosis Factor-induced Nuclear Factor {kappa}B Activation Is Impaired in Focal Adhesion Kinase-deficient Fibroblasts. *J Biol Chem*, **278** (31), 29359-29365.
- Gaddipati JP, Sundar SV, Calemine J, Seth P, Sidhu GS and Maheshwari RK** (2003). Differential regulation of cytokines and transcription factors in liver by curcumin following hemorrhage/resuscitation. *Shock*, **19** (2), 150-6.
- Gate L, Lunk A and Tew KD** (2003). Resistance to phorbol 12-myristate 13-acetate-induced cell growth arrest in an HL60 cell line chronically exposed to a glutathione S-transferase pi inhibitor. *Biochem Pharmacol*, **65** (10), 1611-22.
- Gehm BD, McAndrews JM, Chien PY and Jameson JL** (1997). Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94** (25), 14138-43.
- Gerhauser C, Klimo K, Heiss E, Neumann I, Gamal-Eldeen A, Knauff J, Liu GY, Sitthimonchai S and Frank N** (2003). Mechanism-based in vitro screening of potential cancer chemopreventive agents. *Mutat Res*, **523-524** 163-72.
- Gewirtz DA** (1999). A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol*, **57** (7), 727-41.
- Gibbons NB, Watson RW, Coffey RN, Brady HP and Fitzpatrick JM** (2000). Heat-shock proteins inhibit induction of prostate cancer cell apoptosis. *Prostate*, **45** (1), 58-65.
- Gilmore TD, Koedood M, Piffat KA and White DW** (1996). Rel/NF-kappaB/IkappaB proteins and cancer. *Oncogene*, **13** (7), 1367-78.
- Gilot D, Loyer P, Corlu A, Glaise D, Lagadic-Gossmann D, Atfi A, Morel F, Ichijo H and Guguen-Guillouzo C** (2002). Liver protection from apoptosis requires both blockage of initiator caspase activities and inhibition of ASK1/JNK pathway via glutathione S-transferase regulation. *J Biol Chem*, **277** (51), 49220-9.
- Godowski KC** (1989). Antimicrobial action of sanguinarine. *J Clin Dent*, **1** (4), 96-101.
- Gopalakrishna R and Jaken S** (2000). Protein kinase C signaling and oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, **28** (9), 1349-61.
- Goto S, Ihara Y, Urata Y, Izumi S, Abe K, Koji T and Kondo T** (2001). Doxorubicin-induced DNA intercalation and scavenging by nuclear glutathione S-transferase pi. *Faseb J*, **15** (14), 2702-14.
- Goto S, Kamada K, Soh Y, Ihara Y and Kondo T** (2002). Significance of Nuclear Glutathione S-Transferase pi in Resistance to Anti-cancer Drugs. *Jpn J Cancer Res*, **93** (9), 1047-56.

Gough AC, Zhong S, Wolf CR and Spurr NK (1994). Chromosome assignment of the human glutathione S-transferase mu 3 gene (GSTM3) to chromosome 1 by gene specific polymerase chain reaction. *Cytogenet Cell Genet*, **65** (1-2), 111-4.

Grilli M, Chiu JJ and Lenardo MJ (1993). NF-kappa B and Rel: participants in a multiform transcriptional regulatory system. *Int Rev Cytol*, **143** 1-62.

Gukovsky I, Reyes CN, Vaquero EC, Gukovskaya AS and Pandol SJ (2003). Curcumin ameliorates ethanol and nonethanol experimental pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **284** (1), G85-95.

Gururaj AE, Belakavadi M, Venkatesh DA, Marme D and Salimath BP (2002). Molecular mechanisms of anti-angiogenic effect of curcumin. *Biochem Biophys Res Commun*, **297** (4), 934-42.

Haefner B (2002). NF-kappa B: arresting a major culprit in cancer. *Drug Discov Today*, **7** (12), 653-63.

Hales BF and Huang C (1994). Regulation of the Yp subunit of glutathione S-transferase P in rat embryos and yolk sacs during organogenesis. *Biochem Pharmacol*, **47** (11), 2029-37.

Han SS, Keum YS, Chun KS and Surh YJ (2002). Suppression of phorbol ester-induced NF-kappaB activation by capsaicin in cultured human promyelocytic leukemia cells. *Arch Pharm Res*, **25** (4), 475-9.

Han SS, Keum YS, Seo HJ, Chun KS, Lee SS and Surh YJ (2001). Capsaicin suppresses phorbol ester-induced activation of NF-kappaB/Rel and AP-1 transcription factors in mouse epidermis. *Cancer Lett*, **164** (2), 119-26.

Hanahan D and Weinberg RA (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, **100** (1), 57-70.

Harbottle A, Daly AK, Atherton K and Campbell FC (2001). Role of glutathione S-transferase P1, P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein 1 in acquired doxorubicin resistance. *Int J Cancer*, **92** (6), 777-83.

Harris A, Coticchia A, List H-J, Wellstein A and Tate Riegel A (2000). Mitogen-induced expression of the fibroblast growth factor-binding protein is transcriptionally repressed through a non-canonical E-box element. *J Biol Chem*, **275** (37), 28539-28548.

Hatai T, Matsuzawa A, Inoshita S, Mochida Y, Kuroda T, Sakamaki K, Kuida K, Yonehara S, Ichijo H and Takeda K (2000). Execution of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1)-induced apoptosis by the mitochondria-dependent caspase activation. *J Biol Chem*, **275** (34), 26576-81.

He B and Weber GF (2003). Phosphorylation of NF-kappaB proteins by cyclic GMP-dependent kinase. A noncanonical pathway to NF-kappaB activation. *Eur J Biochem*, **270** (10), 2174-85.

Heilker R, Freuler F, Pulfer R, Di Padova F and Eder J (1999). All three IkappaB isoforms and most Rel family members are stably associated with the IkappaB kinase 1/2 complex. *Eur J Biochem*, **259** (1-2), 253-61.

Heinemeyer T, Wingender E, Reuter I, Hermjakob H, Kel AE, Kel OV, Ignatieva EV, Ananko EA, Podkolodnaya OA, Kolpakov FA, Podkolodny NL and Kolchanov NA (1998). Databases on transcriptional regulation: TRANSFAC, TRRD and COMPEL. *Nucleic Acids Res*, **26** (1), 362-7.

Hennigan RF and Stambrook PJ (2001). Dominant negative c-jun inhibits activation of the cyclin D1 and cyclin E kinase complexes. *Mol Biol Cell*, **12** (8), 2352-63.

Hergenhahn M, Soto U, Weninger A, Polack A, Hsu CH, Cheng AL and Rosl F (2002). The chemopreventive compound curcumin is an efficient inhibitor of Epstein-Barr virus BZLF1 transcription in Raji DR-LUC cells. *Mol Carcinog*, **33** (3), 137-45.

Hill-Kapturczak N, Thamilselvan V, Liu F, Nick HS and Agarwal A (2001). Mechanism of heme oxygenase-1 gene induction by curcumin in human renal proximal tubule cells. *Am J Physiol Renal Physiol*, **281** (5), F851-9.

- Hiraiwa N, Hiraiwa M and Kannagi R** (1997). Human T-cell leukemia virus-1 encoded Tax protein transactivates alpha 1-->3 fucosyltransferase Fuc-T VII, which synthesizes sialyl Lewis X, a selectin ligand expressed on adult T-cell leukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **231** (1), 183-6.
- Huang D, Hubbard CJ and Jungmann RA** (1995). Lactate dehydrogenase A subunit messenger RNA stability is synergistically regulated via the protein kinase A and C signal transduction pathways. *Mol Endocrinol*, **9** (8), 994-1004.
- Huang HC, Nguyen T and Pickett CB** (2000). Regulation of the antioxidant response element by protein kinase C-mediated phosphorylation of NF-E2-related factor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97** (23), 12475-80.
- Huang J, Tan PH, Thiyagarajan J and Bay BH** (2003). Prognostic significance of glutathione S-transferase-pi in invasive breast cancer. *Mod Pathol*, **16** (6), 558-65.
- Huang L and Pardee AB** (1999). beta-lapachone induces cell cycle arrest and apoptosis in human colon cancer cells. *Mol Med*, **5** (11), 711-20.
- Huang MT, Lou YR, Ma W, Newmark HL, Reuhl KR and Conney AH** (1994). Inhibitory effects of dietary curcumin on forestomach, duodenal, and colon carcinogenesis in mice. *Cancer Res*, **54** (22), 5841-7.
- Huang MT, Lysz T, Ferraro T, Abidi TF, Laskin JD and Conney AH** (1991). Inhibitory effects of curcumin on in vitro lipoxygenase and cyclooxygenase activities in mouse epidermis. *Cancer Res*, **51** (3), 813-9.
- Huang MT, Smart RC, Wong CQ and Conney AH** (1988). Inhibitory effect of curcumin, chlorogenic acid, caffeic acid, and ferulic acid on tumor promotion in mouse skin by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Res*, **48** (21), 5941-6.
- Huber WW, Scharf G, Nagel G, Prustomersky S, Schulte-Hermann R and Kaina B** (2003). Coffee and its chemopreventive components Kahweol and Cafestol increase the activity of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in rat liver--comparison with phase II xenobiotic metabolism. *Mutat Res*, **522** (1-2), 57-68.
- Hur GM, Lewis J, Yang Q, Lin Y, Nakano H, Nedospasov S, Liu ZG** (2003). The death domain kinase RIP has an essential role in DNA damage-induced NF-kappa B activation. *Genes Dev*, **17**(7), 873-82.
- Iersel ML, Ploemen JP, Struik I, van Amersfoort C, Keyzer AE, Schefferlie JG and van Bladeren PJ** (1996). Inhibition of glutathione S-transferase activity in human melanoma cells by alpha,beta-unsaturated carbonyl derivatives. Effects of acrolein, cinnamaldehyde, citral, crotonaldehyde, curcumin, ethacrynic acid, and trans-2-hexenal. *Chem Biol Interact*, **102** (2), 117-32.
- Ikeda H, Serria MS, Kakizaki I, Hatayama I, Satoh K, Tsuchida S, Muramatsu M, Nishi S and Sakai M** (2002). Activation of mouse Pi-class glutathione S-transferase gene by Nrf2(NF-E2-related factor 2) and androgen. *Biochem J*, **364** (Pt 2), 563-70.
- Ikezaki S, Nishikawa A, Furukawa F, Kudo K, Nakamura H, Tamura K and Mori H** (2001). Chemopreventive effects of curcumin on glandular stomach carcinogenesis induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine and sodium chloride in rats. *Anticancer Res*, **21** (5), 3407-11.
- Imagawa M, Osada S, Okuda A and Muramatsu M** (1991). Silencer binding proteins function on multiple cis-elements in the glutathione transferase P gene. *Nucleic Acids Res*, **19** (1), 5-10.
- Inoue J, Kerr LD, Kakizuka A and Verma IM** (1992). I kappa B gamma, a 70 kd protein identical to the C-terminal half of p110 NF-kappa B: a new member of the I kappa B family. *Cell*, **68** (6), 1109-20.
- Inoue T, Ishida T, Sugio K, Maehara Y and Sugimachi K** (1995). Glutathione S transferase Pi is a powerful indicator in chemotherapy of human lung squamous-cell carcinoma. *Respiration*, **62** (4), 223-7.
- Inskip A, Elexperu-Camiruaga J, Buxton N, Dias PS, MacIntosh J, Campbell D, Jones PW, Yengi L, Talbot JA, Strange RC and et al.** (1995). Identification of polymorphism at the glutathione S-transferase, GSTM3 locus: evidence for linkage with GSTM1*A. *Biochem J*, **312** (Pt 3) 713-6.

- Iqbal M, Sharma SD, Okazaki Y, Fujisawa M and Okada S (2003).** Dietary supplementation of curcumin enhances antioxidant and phase II metabolizing enzymes in ddY male mice: possible role in protection against chemical carcinogenesis and toxicity. *Pharmacol Toxicol*, **92 (1)**, 33-8.
- Ishii T, Itoh K, Takahashi S, Sato H, Yanagawa T, Katoh Y, Bannai S and Yamamoto M (2000).** Transcription factor Nrf2 coordinately regulates a group of oxidative stress-inducible genes in macrophages. *J Biol Chem*, **275 (21)**, 16023-9.
- Ishimoto TM and Ali-Osman F (2002).** Allelic variants of the human glutathione S-transferase P1 gene confer differential cytoprotection against anticancer agents in *Escherichia coli*. *Pharmacogenetics*, **12 (7)**, 543-53.
- Islam MQ, Platz A, Szpirer J, Szpirer C, Levan G and Mannervik B (1989).** Chromosomal localization of human glutathione transferase genes of classes alpha, mu and pi. *Hum Genet*, **82 (4)**, 338-42.
- Iwama M, Tojima T, Itoi Y, Takahashi N and Kanke Y (1990).** Effects of capsaicin and ethanol on hepatic drug-metabolizing enzymes in rat. *Int J Vitam Nutr Res*, **60 (1)**, 100-3.
- Jang JJ, Kim SH and Yun TK (1989).** Inhibitory effect of capsaicin on mouse lung tumor development. *In Vivo*, **3 (1)**, 49-53.
- Jardine H, MacNee W, Donaldson K and Rahman I (2002).** Molecular mechanism of transforming growth factor (TGF)-beta1-induced glutathione depletion in alveolar epithelial cells. Involvement of AP-1/ARE and Fra-1. *J Biol Chem*, **277 (24)**, 21158-66.
- Jayasurya A, Yap WM, Tan NG, Tan BK and Bay BH (2002).** Glutathione S-transferase pi expression in nasopharyngeal cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, **128 (12)**, 1396-9.
- Jhaveri MS and Morrow CS (1998).** 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)**, 179-90.
- Jiang MC, Yang-Yen HF, Yen JJ and Lin JK (1996).** Curcumin induces apoptosis in immortalized NIH 3T3 and malignant cancer cell lines. *Nutr Cancer*, **26 (1)**, 111-20.
- Jiang X, Takahashi N, Ando K, Otsuka T, Tetsuka T and Okamoto T (2003).** NF-kappa B p65 transactivation domain is involved in the NF-kappa B-inducing kinase pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, **301 (2)**, 583-90.
- Jin J, Huang M, Wei HL and Liu GT (2002).** Mechanism of 5-fluorouracil required resistance in human hepatocellular carcinoma cell line Bel(7402). *World J Gastroenterol*, **8 (6)**, 1029-34.
- Jordan A, Hadfield JA, Lawrence NJ and McGown AT (1998).** Tubulin as a target for anticancer drugs: agents which interact with the mitotic spindle. *Med Res Rev*, **18 (4)**, 259-96.
- Joshi SG, Francis CW, Silverman DJ and Sahni SK (2003).** Nuclear factor kappa B protects against host cell apoptosis during *Rickettsia rickettsii* infection by inhibiting activation of apical and effector caspases and maintaining mitochondrial integrity. *Infect Immun*, **71 (7)**, 4127-36.
- Jung K, Seidel B, Rudolph B, Lein M, Cronauer MV, Henke W, Hampel G, Schnorr D and Loening SA (1997).** Antioxidant enzymes in malignant prostate cell lines and in primary cultured prostatic cells. *Free Radic Biol Med*, **23 (1)**, 127-33.
- Kadonaga JT, Carner KR, Masiarz FR and Tjian R (1987).** Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain. *Cell*, **51 (6)**, 1079-90.
- Kadonaga JT and Tjian R (1986).** Affinity purification of sequence-specific DNA binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83 (16)**, 5889-93.

- Kafel A, Bednarska K, Augustyniak M, Witas I and Szulinska E** (2003). Activity of glutathione S-transferase in *Spodoptera exigua* larvae exposed to cadmium and zinc in two subsequent generations. *Environ Int*, **28** (8), 683-6.
- Kalinina E, Novichkova M, Scherbak NP, Solomka V and Saprin AN** (2001). GSH-dependent redox regulation and antioxidant enzymes in the formation of resistance to doxorubicin in K562 human erythroleukemia cells. *Adv Exp Med Biol*, **500** 241-4.
- Kang KW, Cho IJ, Lee CH and Kim SG** (2003). Essential role of phosphatidylinositol 3-kinase-dependent CCAAT/enhancer binding protein beta activation in the induction of glutathione S-transferase by oltipraz. *J Natl Cancer Inst*, **95** (1), 53-66.
- Karin M, Liu Z and Zandi E** (1997). AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol*, **9** (2), 240-6.
- Katiyar SK** (2002). Treatment of silymarin, a plant flavonoid, prevents ultraviolet light-induced immune suppression and oxidative stress in mouse skin. *Int J Oncol*, **21** (6), 1213-22.
- Kearns PR, Chrzanowska-Lightowlers ZM, Pieters R, Veerman A and Hall AG** (2003). Mu class glutathione S-transferase mRNA isoform expression in acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*, **120** (1), 80-8.
- Kelloff GJ, Boone CW, Steele VE, Fay JR, Lubet RA, Crowell JA and Sigman CC** (1994). Mechanistic considerations in chemopreventive drug development. *J Cell Biochem Suppl*, **20** 1-24.
- Khafif A, Schantz SP, Chou TC, Edelstein D and Sacks PG** (1998). Quantitation of chemopreventive synergism between (-)-epigallocatechin-3-gallate and curcumin in normal, premalignant and malignant human oral epithelial cells. *Carcinogenesis*, **19** (3), 419-24.
- Khanna S, Sen CK, Roy S, Christen MO and Packer L** (1998). Protective effects of anethole dithiolethione against oxidative stress-induced cytotoxicity in human Jurkat T cells. *Biochem Pharmacol*, **56** (1), 61-9.
- Khynriam D and Prasad SB** (2002). Changes in glutathione-related enzymes in tumor-bearing mice after cisplatin treatment. *Cell Biol Toxicol*, **18** (6), 349-58.
- Kitahara A, Satoh K, Nishimura K, Ishikawa T, Ruike K, Sato K, Tsuda H and Ito N** (1984). Changes in molecular forms of rat hepatic glutathione S-transferase during chemical hepatocarcinogenesis. *Cancer Res*, **44** (6), 2698-703.
- Kitteringham NR, Powell H, Jenkins RE, Hamlett J, Lovatt C, Elsby R, Henderson CJ, Wolf CR, Pennington SR and Park BK** (2003). Protein expression profiling of glutathione S-transferase pi null mice as a strategy to identify potential markers of resistance to paracetamol-induced toxicity in the liver. *Proteomics*, **3** (2), 191-207.
- Kohno H, Tanaka T, Kawabata K, Hirose Y, Sugie S, Tsuda H and Mori H** (2002). Silymarin, a naturally occurring polyphenolic antioxidant flavonoid, inhibits azoxymethane-induced colon carcinogenesis in male F344 rats. *Int J Cancer*, **101** (5), 461-8.
- Koo P, Nagai MK and Farber E** (1994). Multiple sites of control of glutathione S-transferase P1-1 in rat liver. *J Biol Chem*, **269** (20), 14601-6.
- Koyama J, Morita I, Tagahara K, Nobukuni Y, Mukainaka T, Kuchide M, Tokuda H and Nishino H** (2002). Chemopreventive effects of emodin and cassiamin B in mouse skin carcinogenesis. *Cancer Lett*, **182** (2), 135-9.
- Krajcinovic M, Labuda D and Sinnott D** (2002). Glutathione S-transferase P1 genetic polymorphisms and susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Pharmacogenetics*, **12** (8), 655-8.
- Kubo I, Fujita K and Lee SH** (2001). Antifungal mechanism of polygodial. *J Agric Food Chem*, **49** (3), 1607-11.

- Kumar A, Dhawan S and Aggarwal BB** (1998). Emodin (3-methyl-1,6,8-trihydroxyanthraquinone) inhibits TNF-induced NF-kappaB activation, IkappaB degradation, and expression of cell surface adhesion proteins in human vascular endothelial cells. *Oncogene*, **17** (7), 913-8.
- Lahiri-Chatterjee M, Katiyar SK, Mohan RR and Agarwal R** (1999). A flavonoid antioxidant, silymarin, affords exceptionally high protection against tumor promotion in the SENCAR mouse skin tumorigenesis model. *Cancer Res*, **59** (3), 622-32.
- Laisney V, Nguyen Van C, Gross MS and Frezal J** (1984). Human genes for glutathione S-transferases. *Hum Genet*, **68** (3), 221-7.
- Laisney V, Nguyen Van C, Gross MS, Parisi I, Foubert C, Weil D and Frezal J** (1983). [Localization of the LDHA-GST3-ESA4 synthetic group on human chromosome 11. Analyses of the classic man-rodent hybrids and of a new type (not adhering to the wall)]. *Ann Genet*, **26** (2), 69-74.
- Lallena MJ, Diaz-Meco MT, Bren G, Paya CV and Moscat J** (1999). Activation of IkappaB kinase beta by protein kinase C isoforms. *Mol Cell Biol*, **19** (3), 2180-8.
- Lamb JG and Franklin MR** (2002). Cell-based studies reveal differences in glutathione S-transferase induction between oltipraz and tert-butylhydroquinone. *J Biochem Mol Toxicol*, **16** (4), 154-61.
- Lappas M, Permezel M and Rice GE** (2003). N-Acetyl-cysteine inhibits phospholipid metabolism, proinflammatory cytokine release, protease activity, and nuclear factor-kappaB deoxyribonucleic acid-binding activity in human fetal membranes in vitro. *J Clin Endocrinol Metab*, **88** (4), 1723-9.
- Lee FS, Hagler J, Chen ZJ and Maniatis T** (1997). Activation of the IkappaB alpha kinase complex by MEKK1, a kinase of the JNK pathway. *Cell*, **88** (2), 213-22.
- Lee FS, Peters RT, Dang LC and Maniatis T** (1998). MEKK1 activates both IkappaB kinase alpha and IkappaB kinase beta. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95** (16), 9319-24.
- Lee HZ** (2001). Effects and mechanisms of emodin on cell death in human lung squamous cell carcinoma. *Br J Pharmacol*, **134** (1), 11-20.
- Legler DF, Micheau O, Doucey MA, Tschopp J and Bron C** (2003). Recruitment of TNF receptor 1 to lipid rafts is essential for TNFalpha-mediated NF-kappaB activation. *Immunity*, **18** (5), 655-64.
- Levenson AS, Gehm BD, Pearce ST, Horiguchi J, Simons LA, Ward JE, 3rd, Jameson JL and Jordan VC** (2003). Resveratrol acts as an estrogen receptor (ER) agonist in breast cancer cells stably transfected with ER alpha. *Int J Cancer*, **104** (5), 587-96.
- Lewis AD, Hickson ID, Robson CN, Harris AL, Hayes JD, Griffiths SA, Manson MM, Hall AE, Moss JE and Wolf CR** (1988). Amplification and increased expression of alpha class glutathione S-transferase-encoding genes associated with resistance to nitrogen mustards. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85** (22), 8511-5.
- Li CJ, Averboukh L and Pardee AB** (1993). beta-Lapachone, a novel DNA topoisomerase I inhibitor with a mode of action different from camptothecin. *J Biol Chem*, **268** (30), 22463-8.
- Li CJ, Wang C and Pardee AB** (1995). Induction of apoptosis by beta-lapachone in human prostate cancer cells. *Cancer Res*, **55** (17), 3712-5.
- Li JK and Lin-Shia SY** (2001). Mechanisms of cancer chemoprevention by curcumin. *Proc Natl Sci Coun Repub China B*, **25** (2), 59-66.
- Li M, Ittmann MM, Rowley DR, Knowlton AA, Vaid AK and Epner DE** (2003). Glutathione S-transferase pi is upregulated in the stromal compartment of hormone independent prostate cancer. *Prostate*, **56** (2), 98-105.
- Li Y, Kang J, Friedman J, Tarassishin L, Ye J, Kovalenko A, Wallach D and Horwitz MS** (1999). Identification of a cell protein (FIP-3) as a modulator of NF-kappaB activity and as a target of an adenovirus inhibitor of tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96** (3), 1042-7.

- Li Z and Nabel GJ** (1997). A new member of the I kappaB protein family, I kappaB epsilon, inhibits RelA (p65)-mediated NF-kappaB transcription. *Mol Cell Biol*, **17** (10), 6184-90.
- Liao MX, Liu DY, Zuo J and Fang FD** (2002). Yeast one-hybrid system used to identify the binding proteins for rat glutathione S-transferase P enhancer I. *Biomed Environ Sci*, **15** (1), 36-40.
- Liebermann DA, Gregory B and Hoffman B** (1998). AP-1 (Fos/Jun) transcription factors in hematopoietic differentiation and apoptosis. *Int J Oncol*, **12** (3), 685-700.
- Lim GP, Chu T, Yang F, Beech W, Frautschy SA and Cole GM** (2001). The curry spice curcumin reduces oxidative damage and amyloid pathology in an Alzheimer transgenic mouse. *J Neurosci*, **21** (21), 8370-7.
- Lin CC, Chen YK and Lin LM** (1999a). Placental glutathione S-transferase isoenzyme expression during promotion of two-stage hamster cheek-pouch carcinogenesis. *Arch Oral Biol*, **44** (6), 525-9.
- Lin JK, Chen YC, Huang YT and Lin-Shiau SY** (1997). Suppression of protein kinase C and nuclear oncogene expression as possible molecular mechanisms of cancer chemoprevention by apigenin and curcumin. *J Cell Biochem Suppl*, **28-29** 39-48.
- Lin KI, Lee SH, Narayanan R, Baraban JM, Hardwick JM and Ratan RR** (1995). Thiol agents and Bcl-2 identify an alphavirus-induced apoptotic pathway that requires activation of the transcription factor NF-kappa B. *J Cell Biol*, **131** (5), 1149-61.
- Lin S, Li JJ, Fujii M and Hou DX** (2003). Rhein inhibits TPA-induced activator protein-1 activation and cell transformation by blocking the JNK-dependent pathway. *Int J Oncol*, **22** (4), 829-33.
- Lin X, Asgari K, Putzi MJ, Gage WR, Yu X, Cornblatt BS, Kumar A, Piantadosi S, DeWeese TL, De Marzo AM and Nelson WG** (2001). Reversal of GSTP1 CpG island hypermethylation and reactivation of pi-class glutathione S-transferase (GSTP1) expression in human prostate cancer cells by treatment with procainamide. *Cancer Res*, **61** (24), 8611-6.
- Lin X, Cunningham ET, Jr., Mu Y, Geleziunas R and Greene WC** (1999b). The proto-oncogene Cot kinase participates in CD3/CD28 induction of NF-kappaB acting through the NF-kappaB-inducing kinase and IkappaB kinases. *Immunity*, **10** (2), 271-80.
- Liptay S, Weber CK, Ludwig L, Wagner M, Adler G and Schmid RM** (2003). Mitogenic and antiapoptotic role of constitutive NF-kappaB/Rel activity in pancreatic cancer. *Int J Cancer*, **105** (6), 735-46.
- Liu D, Liao M, Zuo J and Fang F** (2002). Effect of trans-acting factor on rat glutathione S-transferase P1 gene transcription regulation in tumor cells. *Chin Med J (Engl)*, **115** (1), 103-6.
- Liu D, Liao M, Zuo J, Henner WD and Fan F** (2001). The effect of chemical carcinogenesis on rat glutathione S-transferase P1 gene transcriptional regulation. *Mol Biol Rep*, **28** (1), 19-25.
- Liu JY, Lin SJ and Lin JK** (1993). Inhibitory effects of curcumin on protein kinase C activity induced by 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate in NIH 3T3 cells. *Carcinogenesis*, **14** (5), 857-61.
- Lozzio CB and Lozzio BB** (1975). Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood*, **45** (3), 321-34.
- Lu R and Serrero G** (1999). Resveratrol, a natural product derived from grape, exhibits antiestrogenic activity and inhibits the growth of human breast cancer cells. *J Cell Physiol*, **179** (3), 297-304.
- Luque I and Gelinas C** (1997). Rel/NF-kappa B and I kappa B factors in oncogenesis. *Semin Cancer Biol*, **8** (2), 103-11.
- MacCarrone M, Lorenzon T, Guerrieri P and Agro AF** (1999). Resveratrol prevents apoptosis in K562 cells by inhibiting lipoxygenase and cyclooxygenase activity. *Eur J Biochem*, **265** (1), 27-34.

- Macian F, Lopez-Rodriguez C and Rao A** (2001). Partners in transcription: NFAT and AP-1. *Oncogene*, **20** (19), 2476-89.
- Malewicz M, Zeller N, Yilmaz ZB and Weih F** (2003). NF-kappa B controls the balance between Fas and TNF cell death pathways during T cell receptor-induced apoptosis via the expression of its target gene A20. *J Biol Chem*, **278** (35), 32825-33.
- Manna SK, Gad YP, Mukhopadhyay A and Aggarwal BB** (1999). Suppression of tumor necrosis factor-activated nuclear transcription factor-kappaB, activator protein-1, c-Jun N-terminal kinase, and apoptosis by beta-lapachone. *Biochem Pharmacol*, **57** (7), 763-74.
- Manna SK, Mukhopadhyay A and Aggarwal BB** (2000). Resveratrol suppresses TNF-induced activation of nuclear transcription factors NF-kappa B, activator protein-1, and apoptosis: potential role of reactive oxygen intermediates and lipid peroxidation. *J Immunol*, **164** (12), 6509-19.
- Mantovani R, Malgaretti N, Giglioli B, Comi P, Cappellini N, Nicolis S and Ottolenghi S** (1987). A protein factor binding to an octamer motif in the gamma-globin promoter disappears upon induction of differentiation and hemoglobin synthesis in K562 cells. *Nucleic Acids Res*, **15** (22), 9349-64.
- Masanek U, Stammler G and Volm M** (1997). Messenger RNA expression of resistance proteins and related factors in human ovarian carcinoma cell lines resistant to doxorubicin, taxol and cisplatin. *Anticancer Drugs*, **8** (2), 189-98.
- Mathas S, Lietz A, Janz M, Hinz M, Jundt F, Scheidereit C, Bommert K and Dorken B** (2003). Inhibition of NF- κ B essentially contributes to arsenic-induced apoptosis. *Blood*, **102** (3), 1028-1034.
- Matsumoto Y, Fujiwara T and Nagao S** (1995). Determinants of drug response in camptothecin-11-resistant glioma cell lines. *J Neurooncol*, **23** (1), 1-8.
- Matsuoka M and Igisu H** (1998). Activation of c-Jun NH2-terminal kinase (JNK/SAPK) in LLC-PK1 cells by cadmium. *Biochem Biophys Res Commun*, **251** (2), 527-32.
- Matsuoka M, Wispriyono B, Iryo Y and Igisu H** (2000). Mercury chloride activates c-Jun N-terminal kinase and induces c-jun expression in LLC-PK1 cells. *Toxicol Sci*, **53** (2), 361-8.
- Mayama J, Kumano T, Hayakari M, Yamazaki T, Aizawa S, Kudo T and Tsuchida S** (2003). Polymorphic glutathione S-transferase subunit 3 of rat liver exhibits different susceptibilities to carbon tetrachloride: differences in their interactions with heat-shock protein 90. *Biochem J*, **372** (Pt 2), 611-6.
- Menegazzi M, Guerriero C, Carcereri de Prati A, Cardinale C, Suzuki H and Armato U** (1996). TPA and cycloheximide modulate the activation of NF-kappa B and the induction and stability of nitric oxide synthase transcript in primary neonatal rat hepatocytes. *FEBS Lett*, **379** (3), 279-85.
- Mercurio F, Murray BW, Shevchenko A, Bennett BL, Young DB, Li JW, Pascual G, Motiwala A, Zhu H, Mann M and Manning AM** (1999). IkappaB kinase (IKK)-associated protein 1, a common component of the heterogeneous IKK complex. *Mol Cell Biol*, **19** (2), 1526-38.
- Mercurio F, Zhu H, Murray BW, Shevchenko A, Bennett BL, Li J, Young DB, Barbosa M, Mann M, Manning A and Rao A** (1997). IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated IkappaB kinases essential for NF-kappaB activation. *Science*, **278** (5339), 860-6.
- Michiels C, Minet E, Michel G, Mottet D, Piret JP and Raes M** (2001). HIF-1 and AP-1 cooperate to increase gene expression in hypoxia: role of MAP kinases. *IUBMB Life*, **52** (1-2), 49-53.
- Millar DS, Paul CL, Molloy PL and Clark SJ** (2000). A distinct sequence (ATAAA)_n separates methylated and unmethylated domains at the 5'-end of the GSTP1 CpG island. *J Biol Chem*, **275** (32), 24893-9.
- Miller BS and Zandi E** (2001). Complete reconstitution of human IkappaB kinase (IKK) complex in yeast. Assessment of its stoichiometry and the role of IKKgamma on the complex activity in the absence of stimulation. *J Biol Chem*, **276** (39), 36320-6.

- Minta J and Fung M** (1999). Transcriptional modulation of the human complement factor I gene in Hep G2 cells by protein kinase C activation. *Mol Cell Biochem*, **201** (1-2), 111-23.
- Mitchell JA, Larkin S and Williams TJ** (1995). Cyclooxygenase-2: regulation and relevance in inflammation. *Biochem Pharmacol*, **50** (10), 1535-42.
- Miyanishi K, Takayama T, Ohi M, Hayashi T, Nobuoka A, Nakajima T, Takimoto R, Kogawa K, Kato J, Sakamaki S and Niitsu Y** (2001). Glutathione S-transferase-pi overexpression is closely associated with K-ras mutation during human colon carcinogenesis. *Gastroenterology*, **121** (4), 865-74.
- Miyazaki M, Kohno K, Saburi Y, Matsuo K, Ono M, Kuwano M, Tsuchida S, Sato K, Sakai M and Muramatsu M** (1990). Drug resistance to cis-diamminedichloroplatinum (II) in Chinese hamster ovary cell lines transfected with glutathione S-transferase pi gene. *Biochem Biophys Res Commun*, **166** (3), 1358-64.
- Moffat GJ, McLaren AW and Wolf CR** (1994). 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*, **269** (23), 16397-402.
- Moffat GJ, McLaren AW and Wolf CR** (1996a). Functional characterization of the transcription silencer element located within the human Pi class glutathione S-transferase promoter. *J Biol Chem*, **271** (34), 20740-7.
- Moffat GJ, McLaren AW and Wolf CR** (1996b). Sp1-mediated transcriptional activation of the human Pi class glutathione S-transferase promoter. *J Biol Chem*, **271** (2), 1054-60.
- Moffat GJ, McLaren AW and Wolf CR** (1997). Transcriptional and post-transcriptional mechanisms can regulate cell-specific expression of the human Pi-class glutathione S-transferase gene. *Biochem J*, **324** (Pt 1) 91-5.
- Mohammadzadeh GS, Nasser Moghadam S, Rasaee MJ, Zaree AB, Mahmoodzadeh H and Allameh A** (2003). Measurement of glutathione S-transferase and its class-pi in plasma and tissue biopsies obtained after laparoscopy and endoscopy from subjects with esophagus and gastric cancer. *Clin Biochem*, **36** (4), 283-8.
- Mollerup S, Ovrebø S and Haugen A** (2001). Lung carcinogenesis: resveratrol modulates the expression of genes involved in the metabolism of PAH in human bronchial epithelial cells. *Int J Cancer*, **92** (1), 18-25.
- Monden N, Abe S, Sutoh I, Hishikawa Y, Kinugasa S and Nagasue N** (1997). Prognostic significance of the expressions of metallothionein, glutathione-S-transferase-pi, and P-glycoprotein in curatively resected gastric cancer. *Oncology*, **54** (5), 391-9.
- Morales A, Garcia-Ruiz C, Miranda M, Mari M, Colell A, Ardite E and Fernandez-Checa JC** (1997). Tumor necrosis factor increases hepatocellular glutathione by transcriptional regulation of the heavy subunit chain of gamma-glutamylcysteine synthetase. *J Biol Chem*, **272** (48), 30371-9.
- Mori N, Fujii M, Iwai K, Ikeda S, Yamasaki Y, Hata T, Yamada Y, Tanaka Y, Tomonaga M and Yamamoto N** (2000). Constitutive activation of transcription factor AP-1 in primary adult T-cell leukemia cells. *Blood*, **95** (12), 3915-21.
- Morris GZ, Williams RL, Elliott MS and Beebe SJ** (2002). Resveratrol induces apoptosis in LNCaP cells and requires hydroxyl groups to decrease viability in LNCaP and DU 145 cells. *Prostate*, **52** (4), 319-29.
- Morrow CS, Chiu J and Cowan KH** (1992). Posttranscriptional control of glutathione S-transferase pi gene expression in human breast cancer cells. *J Biol Chem*, **267** (15), 10544-50.
- Morrow CS, Goldsmith ME and Cowan KH** (1990). 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** (2), 215-25.

Morrow CS, Smitherman PK and Townsend AJ (1998). Combined expression of multidrug resistance protein (MRP) and glutathione S-transferase P1-1 (GSTP1-1) in MCF7 cells and high level resistance to the cytotoxicities of ethacrynic acid but not oxazaphosphorines or cisplatin. *Biochem Pharmacol*, **56** (8), 1013-21.

Moscow JA, Townsend AJ and Cowan KH (1989). Elevation of pi class glutathione S-transferase activity in human breast cancer cells by transfection of the GST pi gene and its effect on sensitivity to toxins. *Mol Pharmacol*, **36** (1), 22-8.

Mukhopadhyay A, Bueso-Ramos C, Chatterjee D, Pantazis P and Aggarwal BB (2001). Curcumin downregulates cell survival mechanisms in human prostate cancer cell lines. *Oncogene*, **20** (52), 7597-609.

Munzert G, Kirchner D, Stobbe H, Bergmann L, Schmid RM, Dohner H and Heimpel H (2002). Tumor necrosis factor receptor-associated factor 1 gene overexpression in B-cell chronic lymphocytic leukemia: analysis of NF-kappa B/Rel-regulated inhibitors of apoptosis. *Blood*, **100** (10), 3749-56.

Murakami A, Matsumoto K, Koshimizu K and Ohigashi H (2003). Effects of selected food factors with chemopreventive properties on combined lipopolysaccharide- and interferon-gamma-induced IkappaB degradation in RAW264.7 macrophages. *Cancer Lett*, **195** (1), 17-25.

Nakahama K, Nagano M, Fujioka A, Shinoda K and Sasaki H (1999). Effect of TPA on aquaporin 4 mRNA expression in cultured rat astrocytes. *Glia*, **25** (3), 240-6.

Nakajima T, Takayama T, Miyanishi K, Nobuoka A, Hayashi T, Abe T, Kato J, Sakon K, Naniwa Y, Tanabe H and Niitsu Y (2003). Reversal of Multiple Drug Resistance in Cholangiocarcinoma by the GST- π Specific Inhibitor: O1-hexadecyl γ -glutamyl-S-benzylcysteinyl-D-phenylglycine ethylester. *J Pharmacol Exp Ther*, **306** (3), 861-9.

Nakano H, Kimura J, Kumano T, Hanada K, Satoh K, Hashimoto I and Tsuchida S (1997). Decrease in class pi glutathione transferase mRNA levels by ultraviolet irradiation of cultured rat keratinocytes. *Jpn J Cancer Res*, **88** (11), 1063-9.

Nanji AA, Jokelainen K, Tipoe GL, Rahemtulla A, Thomas P and Dannenberg AJ (2003). Curcumin prevents alcohol-induced liver disease in rats by inhibiting the expression of NF-kappa B-dependent genes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **284** (2), G321-7.

Naoe T, Tagawa Y, Kiyoi H, Kodera Y, Miyawaki S, Asou N, Kuriyama K, Kusumoto S, Shimazaki C, Saito K, Akiyama H, Motoji T, Nishimura M, Shinagawa K, Ueda R, Saito H and Ohno R (2002). Prognostic significance of the null genotype of glutathione S-transferase-T1 in patients with acute myeloid leukemia: increased early death after chemotherapy. *Leukemia*, **16** (2), 203-8.

Natarajan C and Bright JJ (2002). Curcumin inhibits experimental allergic encephalomyelitis by blocking IL-12 signaling through Janus kinase-STAT pathway in T lymphocytes. *J Immunol*, **168** (12), 6506-13.

Nemoto S, DiDonato JA and Lin A (1998). Coordinate regulation of IkappaB kinases by mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1 and NF-kappaB-inducing kinase. *Mol Cell Biol*, **18** (12), 7336-43.

Neu B, Puschmann AJ, Mayerhofer A, Hutzler P, Grossmann J, Lippl F, Schepp W and Prinz C (2003). TNF-alpha induces apoptosis of parietal cells. *Biochem Pharmacol*, **65** (10), 1755-60.

Nguyen D-T, Alarco A-M and Raymond M (2000). Multiple YAP-1p-binding sites mediate induction of the yeast major facilitator *FLR1* gene in response to drugs, oxidants, and alkylating agents. *J Biol Chem*, **276** (2), 1138-1145.

Nguyen T, Huang HC and Pickett CB (2000). Transcriptional regulation of the antioxidant response element. Activation by Nrf2 and repression by MafK. *J Biol Chem*, **275** (20), 15466-73.

Nguyen T, Rushmore TH and Pickett CB (1994). 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*, **269** (18), 13656-62.

Ninomiya-Tsuji J, Kishimoto K, Hiyama A, Inoue J, Cao Z and Matsumoto K (1999). The kinase TAK1 can activate the NIK-I kappaB as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway. *Nature*, **398** (6724), 252-6.

Nishiyama M, Yamamoto W, Park JS, Okamoto R, Hanaoka H, Takano H, Saito N, Matsukawa M, Shirasaka T and Kurihara M (1999). Low-dose cisplatin and 5-fluorouracil in combination can repress increased gene expression of cellular resistance determinants to themselves. *Clin Cancer Res*, **5** (9), 2620-8.

Oetari S, Sudibyo M, Commandeur JN, Samhoedi R and Vermeulen NP (1996). Effects of curcumin on cytochrome P450 and glutathione S-transferase activities in rat liver. *Biochem Pharmacol*, **51** (1), 39-45.

Ogasa M, Miyazaki Y, Hiraoka S, Kitamura S, Nagasawa Y, Kishida O, Miyazaki T, Kiyohara T, Shinomura Y and Matsuzawa Y (2003). Gastrin activates nuclear factor kappaB (NFkappaB) through a protein kinase C dependent pathway involving NFkappaB inducing kinase, inhibitor kappaB (IkappaB) kinase, and tumour necrosis factor receptor associated factor 6 (TRAF6) in MKN-28 cells transfected with gastrin receptor. *Gut*, **52** (6), 813-9.

Oguri T, Fujiwara Y, Katoh O, Daga H, Ishikawa N, Fujitaka K, Yamasaki M, Yokozaki M, Isobe T, Ishioka S and Yamakido M (2000). Glutathione S-transferase-pi gene expression and platinum drug exposure in human lung cancer. *Cancer Lett*, **156** (1), 93-9.

Ohno H, Takimoto G and McKeithan TW (1990). The candidate proto-oncogene bcl-3 is related to genes implicated in cell lineage determination and cell cycle control. *Cell*, **60** (6), 991-7.

Okuda A, Imagawa M, Maeda Y, Sakai M and Muramatsu M (1989). Structural and functional analysis of an enhancer GPEI having a phorbol 12-O-tetradecanoate 13-acetate responsive element-like sequence found in the rat glutathione transferase P gene. *J Biol Chem*, **264** (28), 16919-26.

Okuda A, Imagawa M, Sakai M and Muramatsu M (1990). Functional cooperativity between two TPA responsive elements in undifferentiated F9 embryonic stem cells. *Embo J*, **9** (4), 1131-5.

Olman MA, Hagood JS, Simmons WL, Fuller GM, Vinson C and White KE (1999). Fibrin fragment induction of plasminogen activator inhibitor transcription is mediated by activator protein-1 through a highly conserved element. *Blood*, **94** (6), 2029-38.

Osada S, Daimon S, Ikeda T, Nishihara T, Yano K, Yamasaki M and Imagawa M (1997). Nuclear factor 1 family proteins bind to the silencer element in the rat glutathione transferase P gene. *J Biochem (Tokyo)*, **121** (2), 355-63.

Osada S, Takano K, Nishihara T, Suzuki T, Muramatsu M and Imagawa M (1995). CCAAT/enhancer-binding proteins alpha and beta interact with the silencer element in the promoter of glutathione S-transferase P gene during hepatocarcinogenesis. *J Biol Chem*, **270** (52), 31288-93.

Osborn MT, Berry A, Ruberu MS, Ning B, Bell LM and Chambers TC (1999). Phorbol ester induced MDR1 expression in K562 cells occurs independently of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Oncogene*, **18** (42), 5756-64.

Oya M, Takayanagi A, Horiguchi A, Mizuno R, Ohtsubo M, Marumo K, Shimizu N and Murai M (2003). Increased nuclear factor-kappa B activation is related to the tumor development of renal cell carcinoma. *Carcinogenesis*, **24** (3), 377-84.

Ozes ON, Mayo LD, Gustin JA, Pfeffer SR, Pfeffer LM and Donner DB (1999). NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature*, **401** (6748), 82-5.

Pahl HL (1999). Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene*, **18** (49), 6853-66.

Pan MH, Chang WL, Lin-Shiau SY, Ho CT and Lin JK (2001). Induction of apoptosis by garcinol and curcumin through cytochrome c release and activation of caspases in human leukemia HL-60 cells. *J Agric Food Chem*, **49** (3), 1464-74.

Paranka NS and Dorr RT (1994). Effect of doxorubicin on glutathione and glutathione-dependent enzymes in cultured rat heart cells. *Anticancer Res*, **14** (5A), 2047-52.

Park KJ, Gaynor RB and Kwak YT (2003). Heat shock protein 27 association with the I kappa B kinase complex regulates tumor necrosis factor alpha -induced NF-kappa B activation. *J Biol Chem*, **278**(37), 35272-8.

Park KK and Surh YJ (1997). Effects of capsaicin on chemically-induced two-stage mouse skin carcinogenesis. *Cancer Lett*, **114** (1-2), 183-4.

Pearson WR, Vorachek WR, Xu SJ, Berger R, Hart I, Vannais D and Patterson D (1993). Identification of class-mu glutathione transferase genes GSTM1-GSTM5 on human chromosome 1p13. *Am J Hum Genet*, **53** (1), 220-33.

Pemble S, Schroeder KR, Spencer SR, Meyer DJ, Hallier E, Bolt HM, Ketterer B and Taylor JB (1994). Human glutathione S-transferase theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. *Biochem J*, **300** (Pt 1) 271-6.

Pemble SE, Wardle AF and Taylor JB (1996). Glutathione S-transferase class Kappa: characterization by the cloning of rat mitochondrial GST and identification of a human homologue. *Biochem J*, **319** (Pt 3) 749-54.

Pendurthi UR, Williams JT and Rao LV (1997). Inhibition of tissue factor gene activation in cultured endothelial cells by curcumin. Suppression of activation of transcription factors Egr-1, AP-1, and NF-kappa B. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **17** (12), 3406-13.

Pendyala L, Perez R, Weinstein A, Zdanowicz J and Creaven PJ (1997). Effect of glutathione depletion on the cytotoxicity of cisplatin and iproplatin in a human melanoma cell line. *Cancer Chemother Pharmacol*, **40** (1), 38-44.

Peterfreund RA, Gies EK and Fink JS (1997). Protein kinase C regulates adenosine A2a receptor mRNA expression in SH-SY5Y cells. *Eur J Pharmacol*, **336** (1), 71-80.

Peters U, Preisler-Adams S, Hebeisen A, Hahn M, Seifert E, Lanvers C, Heinecke A, Horst J, Jurgens H and Lamprecht-Dinnesen A (2000). Glutathione S-transferase genetic polymorphisms and individual sensitivity to the ototoxic effect of cisplatin. *Anticancer Drugs*, **11** (8), 639-43.

Phan TT, See P, Lee ST and Chan SY (2001). Protective effects of curcumin against oxidative damage on skin cells in vitro: its implication for wound healing. *J Trauma*, **51** (5), 927-31.

Piccolella E, Spadaro F, Ramoni C, Marinari B, Costanzo A, Levrero M, Thomson L, Abraham RT and Tuosto L (2003). Vav-1 and the IKK alpha subunit of I kappa B kinase functionally associate to induce NF-kappa B activation in response to CD28 engagement. *J Immunol*, **170** (6), 2895-903.

Pinedo HM and Peters GF (1988). Fluorouracil: biochemistry and pharmacology. *J Clin Oncol*, **6** (10), 1653-64.

Pink JJ, Wuerzberger-Davis S, Tagliarino C, Planchon SM, Yang X, Froelich CJ and Boothman DA (2000). Activation of a cysteine protease in MCF-7 and T47D breast cancer cells during beta-lapachone-mediated apoptosis. *Exp Cell Res*, **255** (2), 144-55.

Piper JT, Singhal SS, Salameh MS, Torman RT, Awasthi YC and Awasthi S (1998). Mechanisms of anticarcinogenic properties of curcumin: the effect of curcumin on glutathione linked detoxification enzymes in rat liver. *Int J Biochem Cell Biol*, **30** (4), 445-56.

Piu F, Aronheim A, Katz S and Karin M (2001). AP-1 repressor protein JDP-2: inhibition of UV-mediated apoptosis through p53 down-regulation. *Mol Cell Biol*, **21** (9), 3012-24.

Piwocka K, Bielak-Mijewska A and Sikora E (2002). Curcumin induces caspase-3-independent apoptosis in human multidrug-resistant cells. *Ann N Y Acad Sci*, **973** 250-4.

Piwocka K, Jaruga E, Skierski J, Gradzka I and Sikora E (2001). Effect of glutathione depletion on caspase-3 independent apoptosis pathway induced by curcumin in Jurkat cells. *Free Radic Biol Med*, **31** (5), 670-8.

Piwocka K, Zablocki K, Wieckowski MR, Skierski J, Feiga I, Szopa J, Drela N, Wojtczak L and Sikora E (1999). A novel apoptosis-like pathway, independent of mitochondria and caspases, induced by curcumin in human lymphoblastoid T (Jurkat) cells. *Exp Cell Res*, **249** (2), 299-307.

Planchon SM, Pink JJ, Tagliarino C, Bornmann WG, Varnes ME and Boothman DA (2001). beta-Lapachone-induced apoptosis in human prostate cancer cells: involvement of NQO1/xip3. *Exp Cell Res*, **267** (1), 95-106.

Planchon SM, Wuerzberger S, Frydman B, Witiak DT, Hutson P, Church DR, Wilding G and Boothman DA (1995). Beta-lapachone-mediated apoptosis in human promyelocytic leukemia (HL-60) and human prostate cancer cells: a p53-independent response. *Cancer Res*, **55** (17), 3706-11.

Platz EA, Krithivas K, Kantoff PW, Stampfer MJ and Giovannucci E (2002). ATAAA repeat upstream of glutathione S-transferase P1 and prostate cancer risk. *Urology*, **59** (1), 159-64.

Poyet JL, Srinivasula SM, Lin JH, Fernandes-Alnemri T, Yamaoka S, Tsichlis PN and Alnemri ES (2000). Activation of the I κ B kinases by RIP via IKK γ /NEMO-mediated oligomerization. *J Biol Chem*, **275** (48), 37966-77.

Pryhuber GS, Church SL, Kroft T, Panchal A and Whitsett JA (1994). 3'-untranslated region of SP-B mRNA mediates inhibitory effects of TPA and TNF-alpha on SP-B expression. *Am J Physiol*, **267** (1 Pt 1), L16-24.

Puchalski RB and Fahl WE (1990). Expression of recombinant glutathione S-transferase pi, Ya, or Yb1 confers resistance to alkylating agents. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87** (7), 2443-7.

Qiao D, Chen W, Stratagoules ED and Martinez JD (2000). Bile acid-induced activation of activator protein-1 requires both extracellular signal-regulated kinase and protein kinase C signaling. *J Biol Chem*, **275** (20), 15090-8.

Racke FK, Lewandowska K, Goueli S and Goldfarb AN (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), 23366-70.

Rahman I, Gilmour PS, Jimenez LA, Biswas SK, Antonicelli F and Aruoma OI (2003). Ergothioneine inhibits oxidative stress- and TNF-alpha-induced NF-kappa B activation and interleukin-8 release in alveolar epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **302** (4), 860-4.

Ramachandran C, Fonseca HB, Jhabvala P, Escalon EA and Melnick SJ (2002). Curcumin inhibits telomerase activity through human telomerase reverse transcriptase in MCF-7 breast cancer cell line. *Cancer Lett*, **184** (1), 1-6.

Rashmi R, Santhosh Kumar TR and Karunagaran D (2003). Human colon cancer cells differ in their sensitivity to curcumin-induced apoptosis and heat shock protects them by inhibiting the release of apoptosis-inducing factor and caspases. *FEBS Lett*, **538** (1-3), 19-24.

Reddy BS (1996). Chemoprevention of colon cancer by minor dietary constituents and their synthetic analogues. *Prev Med*, **25** (1), 48-50.

Reddy BS (1997). Chemoprevention of colon cancer by dietary administration of naturally-occurring and related synthetic agents. *Adv Exp Med Biol*, **400B** 931-6.

Reddy BS, Rao CV, Rivenson A and Kelloff G (1993). Chemoprevention of colon carcinogenesis by organosulfur compounds. *Cancer Res*, **53** (15), 3493-8.

- Reddy S and Aggarwal BB** (1994). Curcumin is a non-competitive and selective inhibitor of phosphorylase kinase. *FEBS Lett*, **341** (1), 19-22.
- Regnier CH, Song HY, Gao X, Goeddel DV, Cao Z and Rothe M** (1997). Identification and characterization of an I κ B kinase. *Cell*, **90** (2), 373-83.
- Ribrag V, Koscielny S, Carpiuc I, Cebotaru C, Vande Walle H, Talbot M, Fenaux P and Bosq J** (2003). Prognostic value of GST-pi expression in diffuse large B-cell lymphomas. *Leukemia*, **17** (5), 972-7.
- Rinaldi AL, Morse MA, Fields HW, Rothas DA, Pei P, Rodrigo KA, Renner RJ and Mallery SR** (2002). Curcumin activates the aryl hydrocarbon receptor yet significantly inhibits (-)-benzo(a)pyrene-7R-trans-7,8-dihydrodiol bioactivation in oral squamous cell carcinoma cells and oral mucosa. *Cancer Res*, **62** (19), 5451-6.
- Robin MA, Prabu SK, Raza H, Anandatheerthavarada HK and Avadhani NG** (2003). Phosphorylation enhances mitochondrial targeting of GSTA4-4 through increased affinity for binding to cytoplasmic Hsp70. *J Biol Chem*, **278** (21), 18960-70.
- Robinson CM, Prime SS, Huntley S, Stone AM, Davies M, Eveson JW and Paterson IC** (2001). Overexpression of JunB in undifferentiated malignant rat oral keratinocytes enhances the malignant phenotype in vitro without altering cellular differentiation. *Int J Cancer*, **91** (5), 625-30.
- Rohlf C, Ahmad S, Borellini F, Lei J and Glazer RI** (1997). Modulation of transcription factor Sp1 by cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem*, **272** (34), 21137-41.
- Romashkova JA and Makarov SS** (1999). NF- κ B is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. *Nature*, **401** (6748), 86-90.
- Rompelberg CJ, Verhagen H and van Bladeren PJ** (1993). Effects of the naturally occurring alkenylbenzenes eugenol and trans-anethole on drug-metabolizing enzymes in the rat liver. *Food Chem Toxicol*, **31** (9), 637-45.
- Roomi MW, Columbano A, Ledda-Columbano GM and Sarma DS** (1987). Induction of the placental form of glutathione S-transferase by lead nitrate administration in rat liver. *Toxicol Pathol*, **15** (2), 202-5.
- Rosario LA, O'Brien ML, Henderson CJ, Wolf CR and Tew KD** (2000). Cellular response to a glutathione S-transferase P1-1 activated prodrug. *Mol Pharmacol*, **58** (1), 167-74.
- Rosson D and O'Brien TG** (1998). AP-1 activity affects the levels of induced erythroid and megakaryocytic differentiation of K562 cells. *Arch Biochem Biophys*, **352** (2), 298-305.
- Rothe M, Sarma V, Dixit VM and Goeddel DV** (1995). TRAF2-mediated activation of NF- κ B by TNF receptor 2 and CD40. *Science*, **269** (5229), 1424-7.
- Rothe M, Wong SC, Henzel WJ and Goeddel DV** (1994). A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell*, **78** (4), 681-92.
- Rothwarf DM and Karin M** (1999). The NF- κ B activation pathway: a paradigm in information transfer from membrane to nucleus. *Sci STKE*, **1999** (5), RE1.
- Rothwarf DM, Zandi E, Natoli G and Karin M** (1998). IKK- γ is an essential regulatory subunit of the I κ B kinase complex. *Nature*, **395** (6699), 297-300.
- Roy M, Chakraborty S, Siddiqi M and Bhattacharya RK** (2002). Induction of Apoptosis in Tumor Cells by Natural Phenolic Compounds. *Asian Pac J Cancer Prev*, **3** (1), 61-67.
- Rui YC** (1991). Advances in pharmacological studies of silymarin. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, **86 Suppl 2** 79-85.
- Ryseck RP, Bull P, Takamiya M, Bours V, Siebenlist U, Dobrzanski P and Bravo R** (1992). RelB, a new Rel family transcription activator that can interact with p50-NF- κ B. *Mol Cell Biol*, **12** (2), 674-84.

- Saccani S, Pantano S and Natoli G** (2003). Modulation of NF-kappaB activity by exchange of dimers. *Mol Cell*, **11** (6), 1563-74.
- Sakai M, Muramatsu M and Nishi S** (1992). Suppression of glutathione transferase P expression by glucocorticoid. *Biochem Biophys Res Commun*, **187** (2), 976-83.
- Sakai M, Okuda A and Muramatsu M** (1988). Multiple regulatory elements and phorbol 12-O-tetradecanoate 13-acetate responsiveness of the rat placental glutathione transferase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85** (24), 9456-60.
- Sakurai H, Miyoshi H, Toriumi W and Sugita T** (1999). Functional interactions of transforming growth factor beta-activated kinase 1 with IkappaB kinases to stimulate NF-kappaB activation. *J Biol Chem*, **274** (15), 10641-8.
- Salh B, Assi K, Templeman V, Parhar K, Owen D, Gomez-Munoz A and Jacobson K** (2003). Curcumin attenuates DNB-induced murine colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **285** (1), G235-43.
- Sanz L, Sanchez P, Lallena MJ, Diaz-Meco MT and Moscat J** (1999). The interaction of p62 with RIP links the atypical PKCs to NF-kappaB activation. *Embo J*, **18** (11), 3044-53.
- Satoskar RR, Shah SJ and Shenoy SG** (1986). Evaluation of anti-inflammatory property of curcumin (diferuloyl methane) in patients with postoperative inflammation. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol*, **24** (12), 651-4.
- Sauerbrey A, Zintl F and Volm M** (1994). P-glycoprotein and glutathione S-transferase pi in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Cancer*, **70** (6), 1144-9.
- Saunders NA, Dicker AJ, Jones SJ and Dahler AL** (1998). E2F1 messenger RNA is destabilized in response to a growth inhibitor in normal human keratinocytes but not in a squamous carcinoma cell line. *Cancer Res*, **58** (8), 1646-9.
- Schiff PB and Horwitz SB** (1980). Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **77** (3), 1561-5.
- Schiff R, Reddy P, Ahotupa M, Coronado-Heinsohn E, Grim M, Hilsenbeck SG, Lawrence R, Deneke S, Herrera R, Chamness GC, Fuqua SA, Brown PH and Osborne CK** (2000). Oxidative stress and AP-1 activity in tamoxifen-resistant breast tumors in vivo. *J Natl Cancer Inst*, **92** (23), 1926-34.
- Schisselbauer JC, Silber R, Papadopoulos E, Abrams K, LaCreta FP and Tew KD** (1990). Characterization of glutathione S-transferase expression in lymphocytes from chronic lymphocytic leukemia patients. *Cancer Res*, **50** (12), 3562-8.
- Schmitt E, Lehmann L, Metzler M and Stopper H** (2002). Hormonal and genotoxic activity of resveratrol. *Toxicol Lett*, **136** (2), 133-42.
- Schreiber E, Matthias P, Muller MM and 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.
- Schroder CP, Godwin AK, O'Dwyer PJ, Tew KD, Hamilton TC and Ozols RF** (1996). Glutathione and drug resistance. *Cancer Invest*, **14** (2), 158-68.
- Sen CK, Traber KE and Packer L** (1996). Inhibition of NF-kappa B activation in human T-cell lines by anetholdithiolthione. *Biochem Biophys Res Commun*, **218** (1), 148-53.
- Sen R and Baltimore D** (1986). Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell*, **46** (5), 705-16.
- Serra E, Zemzoumi K and Dissous C** (1997). Deletion analysis of the Schistosoma mansoni 28-kDa glutathione S-transferase gene promoter in mammalian cells--importance of a proximal activator-protein-1 site. *Eur J Biochem*, **248** (1), 113-9.

- Shankar TN, Shantha NV, Ramesh HP, Murthy IA and Murthy VS** (1980). Toxicity studies on turmeric (*Curcuma longa*): acute toxicity studies in rats, guineapigs & monkeys. *Indian J Exp Biol*, **18** (1), 73-5.
- Shao ZM, Shen ZZ, Liu CH, Sartippour MR, Go VL, Heber D and Nguyen M** (2002). Curcumin exerts multiple suppressive effects on human breast carcinoma cells. *Int J Cancer*, **98** (2), 234-40.
- Shapiro SD, Doyle GA, Ley TJ, Parks WC and Welgus HG** (1993). Molecular mechanisms regulating the production of collagenase and TIMP in U937 cells: evidence for involvement of delayed transcriptional activation and enhanced mRNA stability. *Biochemistry*, **32** (16), 4286-92.
- Shaulian E and Karin M** (2001). AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene*, **20** (19), 2390-400.
- Shaulian E and Karin M** (2002). AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol*, **4** (5), E131-6.
- Shelly C, Petruzzelli L and Herrera R** (1998). PMA-induced phenotypic changes in K562 cells: MAPK-dependent and -independent events. *Leukemia*, **12** (12), 1951-61.
- Shimada K, Nakamura M, Ishida E, Kishi M and Konishi N** (2003). Roles of p38- and c-jun NH2-terminal kinase-mediated pathways in 2-methoxyestradiol-induced p53 induction and apoptosis. *Carcinogenesis*, **24** (6), 1067-75.
- Shin M, Yan C and Boyd D** (2002). An inhibitor of c-jun aminoterminal kinase (SP600125) represses c-Jun activation, DNA-binding and PMA-inducible 92-kDa type IV collagenase expression. *Biochim Biophys Acta*, **1589** (3), 311-6.
- Shinkura R, Kitada K, Matsuda F, Tashiro K, Ikuta K, Suzuki M, Kogishi K, Serikawa T and Honjo T** (1999). Alymphoplasia is caused by a point mutation in the mouse gene encoding Nf-kappa b-inducing kinase. *Nat Genet*, **22** (1), 74-7.
- Shishodia S, Potdar P, Gairola CG and Aggarwal BB** (2003). Curcumin (diferuloylmethane) down-regulates cigarette smoke-induced NF-kappaB activation through inhibition of IkappaBalpha kinase in human lung epithelial cells: correlation with suppression of COX-2, MMP-9 and cyclin D1. *Carcinogenesis*, **24** (7), 1269-79.
- Shukla Y and Arora A** (2003). Suppression of altered hepatic foci development by curcumin in wistar rats. *Nutr Cancer*, **45** (1), 53-9.
- Sikora E, Bielak-Zmijewska A, Piwocka K, Skierski J and Radziszewska E** (1997). Inhibition of proliferation and apoptosis of human and rat T lymphocytes by curcumin, a curry pigment. *Biochem Pharmacol*, **54** (8), 899-907.
- Simeonidis S, Liang S, Chen G and Thanos D** (1997). Cloning and functional characterization of mouse IkappaBepsilon. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94** (26), 14372-7.
- Singal R, van Wert J and Bashambu M** (2001). Cytosine methylation represses glutathione S-transferase P1 (GSTP1) gene expression in human prostate cancer cells. *Cancer Res*, **61** (12), 4820-6.
- Singh S and Aggarwal BB** (1995). Activation of transcription factor NF-kappa B is suppressed by curcumin (diferuloylmethane) [corrected]. *J Biol Chem*, **270** (42), 24995-5000.
- Singh S, Natarajan K and Aggarwal BB** (1996). Capsaicin (8-methyl-N-vanillyl-6-nonenamide) is a potent inhibitor of nuclear transcription factor-kappa B activation by diverse agents. *J Immunol*, **157** (10), 4412-20.
- Singhal SS, Awasthi S, Pandya U, Piper JT, Saini MK, Cheng JZ and Awasthi YC** (1999). The effect of curcumin on glutathione-linked enzymes in K562 human leukemia cells. *Toxicol Lett*, **109** (1-2), 87-95.
- Skottova N and Krecman V** (1998). Silymarin as a potential hypocholesterolaemic drug. *Physiol Res*, **47** (1), 1-7.

Somasundaram S, Edmund NA, Moore DT, Small GW, Shi YY and Orlowski RZ (2002). Dietary curcumin inhibits chemotherapy-induced apoptosis in models of human breast cancer. *Cancer Res*, **62** (13), 3868-75.

Song JZ, Stırzaker C, Harrison J, Melki JR and Clark SJ (2002). Hypermethylation trigger of the glutathione-S-transferase gene (GSTP1) in prostate cancer cells. *Oncogene*, **21** (7), 1048-61.

Squires MS, Hudson EA, Howells L, Sale S, Houghton CE, Jones JL, Fox LH, Dickens M, Prigent SA and Manson MM (2003). Relevance of mitogen activated protein kinase (MAPK) and phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B (PI3K/PKB) pathways to induction of apoptosis by curcumin in breast cells. *Biochem Pharmacol*, **65** (3), 361-76.

Stoehlmacher J, Park DJ, Zhang W, Groshen S, Tsao-Wei DD, Yu MC and Lenz HJ (2002). Association between glutathione S-transferase P1, T1, and M1 genetic polymorphism and survival of patients with metastatic colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst*, **94** (12), 936-42.

Struzynska L, Sulkowski G, Lenkiewicz A and Rafalowska U (2002). Lead stimulates the glutathione system in selective regions of rat brain. *Folia Neuropathol*, **40** (4), 203-9.

Surh Y (1999). Molecular mechanisms of chemopreventive effects of selected dietary and medicinal phenolic substances. *Mutat Res*, **428** (1-2), 305-27.

Surh YJ, Han SS, Keum YS, Seo HJ and Lee SS (2000). Inhibitory effects of curcumin and capsaicin on phorbol ester-induced activation of eukaryotic transcription factors, NF-kappaB and AP-1. *Biofactors*, **12** (1-4), 107-12.

Surh YJ, Lee E and Lee JM (1998). Chemoprotective properties of some pungent ingredients present in red pepper and ginger. *Mutat Res*, **402** (1-2), 259-67.

Surh YJ, Lee RC, Park KK, Mayne ST, Liem A and Miller JA (1995). Chemoprotective effects of capsaicin and diallyl sulfide against mutagenesis or tumorigenesis by vinyl carbamate and N-nitrosodimethylamine. *Carcinogenesis*, **16** (10), 2467-71.

Surh YJ and Lee SS (1995). Capsaicin, a double-edged sword: toxicity, metabolism, and chemopreventive potential. *Life Sci*, **56** (22), 1845-55.

Suryanarayana P, Krishnaswamy K and Reddy GB (2003). Effect of curcumin on galactose-induced cataractogenesis in rats. *Mol Vis*, **9** 223-30.

Susan M and Rao MN (1992). Induction of glutathione S-transferase activity by curcumin in mice. *Arzneimittelforschung*, **42** (7), 962-4.

Suzuki T, Imagawa M, Nomura K, Hochi S, Hirabayashi M, Ueda M, Kitagawa T and Muramatsu M (1995). Tissue-specific activation of tumor marker glutathione transferase P transgenes in transgenic rats. *J Cancer Res Clin Oncol*, **121** (9-10), 606-11.

Suzuki T, Morimura S, Diccianni MB, Yamada R, Hochi S, Hirabayashi M, Yuki A, Nomura K, Kitagawa T, Imagawa M and Muramatsu M (1996). Activation of glutathione transferase P gene by lead requires glutathione transferase P enhancer I. *J Biol Chem*, **271** (3), 1626-32.

Tagliarino C, Pink JJ, Dubyak GR, Nieminen AL and Boothman DA (2001). Calcium is a key signaling molecule in beta-lapachone-mediated cell death. *J Biol Chem*, **276** (22), 19150-9.

Takada Y, Mukhopadhyay A, Kundu GC, Mahabeleshwar GH, Singh S and Aggarwal BB (2003). Hydrogen peroxide activates NF-kappa B through tyrosine phosphorylation of I kappa B alpha and serine phosphorylation of p65: evidence for the involvement of I kappa B alpha kinase and Syk protein-tyrosine kinase. *J Biol Chem*, **278** (26), 24233-41.

Takaesu G, Surabhi RM, Park KJ, Ninomiya-Tsuji J, Matsumoto K and Gaynor RB (2003). TAK1 is critical for I kappa B kinase-mediated activation of the NF-kappaB pathway. *J Mol Biol*, **326** (1), 105-15.

Takahashi Y, Campbell EA, Hirata Y, Takayama T and Listowsky I (1993). A basis for differentiating among the multiple human Mu-glutathione S-transferases and molecular cloning of brain GSTM5. *J Biol Chem*, **268** (12), 8893-8.

Takasaka M, Konoshima T, Kuroki S, Tokuda H and Nishino H (2001). Cancer chemopreventive activity of phenylpropanoid esters of sucrose, vanicoside B and lapathoside A, from *Polygonum lapathifolium*. *Cancer Lett*, **173** (2), 133-8.

Tanaka T, Makita H, Ohnishi M, Hirose Y, Wang A, Mori H, Satoh K, Hara A and Ogawa H (1994). Chemoprevention of 4-nitroquinoline 1-oxide-induced oral carcinogenesis by dietary curcumin and hesperidin: comparison with the protective effect of beta-carotene. *Cancer Res*, **54** (17), 4653-9.

Tashiro K, Asakura T, Fujiwara C, Ohkawa K and Ishibashi Y (2001). Glutathione-S-transferase-pi expression regulates sensitivity to glutathione-doxorubicin conjugate. *Anticancer Drugs*, **12** (8), 707-12.

Terrier P, Townsend AJ, Coindre JM, Triche TJ and Cowan KH (1990). An immunohistochemical study of pi class glutathione S-transferase expression in normal human tissue. *Am J Pathol*, **137** (4), 845-53.

Tew KD (1994). Glutathione-associated enzymes in anticancer drug resistance. *Cancer Res*, **54** (16), 4313-20.

Thapliyal R and Maru GB (2001). Inhibition of cytochrome P450 isozymes by curcumins in vitro and in vivo. *Food Chem Toxicol*, **39** (6), 541-7.

Thevenod F, Friedmann JM, Katsen AD and Hauser IA (2000). Up-regulation of multidrug resistance P-glycoprotein via nuclear factor-kappaB activation protects kidney proximal tubule cells from cadmium- and reactive oxygen species-induced apoptosis. *J Biol Chem*, **275** (3), 1887-96.

Thimmulappa RK, Mai KH, Srisuma S, Kensler TW, Yamamoto M and Biswal S (2002). Identification of Nrf2-regulated genes induced by the chemopreventive agent sulforaphane by oligonucleotide microarray. *Cancer Res*, **62** (18), 5196-203.

Thompson JE, Phillips RJ, Erdjument-Bromage H, Tempst P and Ghosh S (1995). I kappa B-beta regulates the persistent response in a biphasic activation of NF-kappa B. *Cell*, **80** (4), 573-82.

Tidefelt U, Elmhorn-Rosenborg A, Paul C, Hao XY, Mannervik B and Eriksson LC (1992). Expression of glutathione transferase pi as a predictor for treatment results at different stages of acute nonlymphoblastic leukemia. *Cancer Res*, **52** (12), 3281-5.

Tobiume K, Matsuzawa A, Takahashi T, Nishitoh H, Morita K, Takeda K, Minowa O, Miyazono K, Noda T and Ichijo H (2001). ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis. *EMBO Rep*, **2** (3), 222-8.

Toffoli G, Frustaci S, Tumiotto L, Talamini R, Gherlinzoni F, Picci P and Boiocchi M (1992). Expression of MDR1 and GST-pi in human soft tissue sarcomas: relation to drug resistance and biological aggressiveness. *Ann Oncol*, **3** (1), 63-9.

Tominaga K, Arakawa T, Imano M, Kato M, Hamaguchi Y, Watanabe T, Takaishi O, Fujiwara Y, Fukuda T, Higuchi K, Osugi H, Chono S and Kuroki T (1999). Complete regression of recurrent esophageal carcinoma with reduced expression of glutathione S-transferase-pi by treatment with continuous infusion of 5-fluorouracil and low-dose cisplatin infusion. *Am J Gastroenterol*, **94** (6), 1664-8.

Touliatos JS, Neitzel L, Whitworth C, Rybak LP and Malafa M (2000). Effect of cisplatin on the expression of glutathione-S-transferase in the cochlea of the rat. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, **257** (1), 6-9.

Tully DB, Collins BJ, Overstreet JD, Smith CS, Dinse GE, Mumtaz MM and Chapin RE (2000). Effects of arsenic, cadmium, chromium, and lead on gene expression regulated by a battery of 13 different promoters in recombinant HepG2 cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, **168** (2), 79-90.

Tyagi A, Bhatia N, Condon MS, Bosland MC, Agarwal C and Agarwal R (2002). Antiproliferative and apoptotic effects of silibinin in rat prostate cancer cells. *Prostate*, **53** (3), 211-7.

- Uozaki H, Horiuchi H, Ishida T, Iijima T, Imamura T and Machinami R** (1997). Overexpression of resistance-related proteins (metallothioneins, glutathione-S-transferase pi, heat shock protein 27, and lung resistance-related protein) in osteosarcoma. Relationship with poor prognosis. *Cancer*, **79** (12), 2336-44.
- Vaishnav D, Jambal P, Reusch JE and Pugazhenti S** (2003). SP600125, an inhibitor of c-jun N-terminal kinase, activates CREB by a p38 MAPK-mediated pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, **307** (4), 855-60.
- van Dam H and Castellazzi M** (2001). Distinct roles of Jun : Fos and Jun : ATF dimers in oncogenesis. *Oncogene*, **20** (19), 2453-64.
- Venugopal R and Jaiswal AK** (1996). 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 U S A*, **93** (25), 14960-5.
- Verma IM, Stevenson JK, Schwarz EM, Van Antwerp D and Miyamoto S** (1995). Rel/NF-kappa B/I kappa B family: intimate tales of association and dissociation. *Genes Dev*, **9** (22), 2723-35.
- Vidanes GM, Paton V, Wallen E, Peehl DM, Navone N and Brooks JD** (2002). Silencing of pi-class glutathione S-transferase in MDA PCa 2a and MDA PCa 2b cells. *Prostate*, **51** (4), 225-30.
- Voss SH, Whalen R and Boyer TD** (2002). Mechanism of negative regulation of rat glutathione S-transferase A2 by the cytokine interleukin 6. *Biochem J*, **365** (Pt 1), 229-37.
- Vuong H, Patterson T, Shapiro P, Kalvakolanu DV, Wu R, Ma WY, Dong Z, Kleeberger SR and Reddy SP** (2000). Phorbol ester-induced expression of airway squamous cell differentiation marker, SPRR1B, is regulated by protein kinase Cdelta /Ras/MEKK1/MKK1-dependent/AP-1 signal transduction pathway. *J Biol Chem*, **275** (41), 32250-9.
- Wagner EF** (2002). Functions of AP1 (Fos/Jun) in bone development. *Ann Rheum Dis*, **61** Suppl 2 ii40-2.
- Wang B and 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** (3), 645-52.
- Wang CY, Mayo MW and Baldwin AS, Jr.** (1996). TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB. *Science*, **274** (5288), 784-7.
- Wang K, Ramji S, Bhathena A, Lee C and Riddick DS** (1999). Glutathione S-transferases in wild-type and doxorubicin-resistant MCF-7 human breast cancer cell lines. *Xenobiotica*, **29** (2), 155-70.
- Wang T, Arifoglu P, Ronai Z and Tew KD** (2001). Glutathione S-transferase P1-1 (GSTP1-1) inhibits c-Jun N-terminal kinase (JNK1) signaling through interaction with the C terminus. *J Biol Chem*, **276** (24), 20999-1003.
- Wang W, McLeod HL and Cassidy J** (2003). Disulfiram-mediated inhibition of NF-kappaB activity enhances cytotoxicity of 5-fluorouracil in human colorectal cancer cell lines. *Int J Cancer*, **104** (4), 504-11.
- Wasserman WW and Fahl WE** (1997). Functional antioxidant responsive elements. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94** (10), 5361-6.
- Weerasinghe P, Hallock S and Liepins A** (2001a). Bax, Bcl-2, and NF-kappaB expression in sanguinarine induced bimodal cell death. *Exp Mol Pathol*, **71** (1), 89-98.
- Weerasinghe P, Hallock S, Tang SC and Liepins A** (2001b). Role of Bcl-2 family proteins and caspase-3 in sanguinarine-induced bimodal cell death. *Cell Biol Toxicol*, **17** (6), 371-81.
- Weerasinghe P, Hallock S, Tang SC and Liepins A** (2001c). Sanguinarine induces bimodal cell death in K562 but not in high Bcl-2-expressing JM1 cells. *Pathol Res Pract*, **197** (11), 717-26.

- Weg-Remers S, Ponta H, Herrlich P, Konig H** (2001). Regulation of alternative pre-mRNA splicing by the ERK MAP-kinase pathway. *EMBO J*, **20**(15), 4194-203.
- Wellington K and Jarvis B** (2001). Silymarin: a review of its clinical properties in the management of hepatic disorders. *BioDrugs*, **15** (7), 465-89.
- Wells JM, Cole RJ and Kirksey JW** (1975). Emodin, a toxic metabolite of *Aspergillus wentii* isolated from weevil-damaged chestnuts. *Appl Microbiol*, **30** (1), 26-8.
- Wesselborg S, Bauer MK, Vogt M, Schmitz ML and Schulze-Osthoff K** (1997). Activation of transcription factor NF-kappaB and p38 mitogen-activated protein kinase is mediated by distinct and separate stress effector pathways. *J Biol Chem*, **272** (19), 12422-9.
- Whiteside ST, Epinat JC, Rice NR and Israel A** (1997). I kappa B epsilon, a novel member of the I kappa B family, controls RelA and cRel NF-kappa B activity. *Embo J*, **16** (6), 1413-26.
- Whitmarsh AJ and Davis RJ** (1996). Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J Mol Med*, **74** (10), 589-607.
- Woo JH, Kim YH, Choi YJ, Kim DG, Lee KS, Bae JH, Min do S, Chang JS, Jeong YJ, Lee YH, Park JW and Kwon TK** (2003). Molecular mechanisms of curcumin-induced cytotoxicity: induction of apoptosis through generation of reactive oxygen species, down-regulation of Bcl-XL and IAP, the release of cytochrome c and inhibition of Akt. *Carcinogenesis*, **24** (7), 1199-208.
- Wu D, Marko M, Claycombe K, Paulson KE and Meydani SN** (2003). Ceramide-induced and age-associated increase in macrophage COX-2 expression is mediated through up-regulation of NF-kappa B activity. *J Biol Chem*, **278** (13), 10983-92.
- Wu M, Lee H, Bellas RE, Schauer SL, Arsura M, Katz D, FitzGerald MJ, Rothstein TL, Sherr DH and Sonenshein GE** (1996). Inhibition of NF-kappaB/Rel induces apoptosis of murine B cells. *Embo J*, **15** (17), 4682-90.
- Xia C, Hu J, Ketterer B and Taylor JB** (1996). The organization of the human GSTP1-1 gene promoter and its response to retinoic acid and cellular redox status. *Biochem J*, **313** (Pt 1) 155-61.
- Xia CL, Cowell IG, Dixon KH, Pemble SE, Ketterer B and Taylor JB** (1991). Glutathione transferase pi its minimal promoter and downstream cis-acting element. *Biochem Biophys Res Commun*, **176** (1), 233-40.
- Xia Y, Wu Z, Su B, Murray B and Karin M** (1998). JNKK1 organizes a MAP kinase module through specific and sequential interactions with upstream and downstream components mediated by its amino-terminal extension. *Genes Dev*, **12** (21), 3369-81.
- Xie T, Belinsky M, Xu Y and Jaiswal AK** (1995). ARE- and TRE-mediated regulation of gene expression. Response to xenobiotics and antioxidants. *J Biol Chem*, **270** (12), 6894-900.
- Xu YX, Pindolia KR, Janakiraman N, Chapman RA and Gautam SC** (1997). Curcumin inhibits IL1 alpha and TNF-alpha induction of AP-1 and NF-kB DNA-binding activity in bone marrow stromal cells. *Hematopathol Mol Hematol*, **11** (1), 49-62.
- Yamamoto Y, Verma UN, Prajapati S, Kwak YT, Gaynor RB** (2003). Histone H3 phosphorylation by IKK-alpha is critical for cytokine-induced gene expression. *Nature*. **423** (6940), 655-9.
- Yamaoka S, Courtois G, Bessia C, Whiteside ST, Weil R, Agou F, Kirk HE, Kay RJ and Israel A** (1998). Complementation cloning of NEMO, a component of the IkappaB kinase complex essential for NF-kappaB activation. *Cell*, **93** (7), 1231-40.
- Yamazaki S, Muta T and Takeshige K** (2001). A novel IkappaB protein, IkappaB-zeta, induced by proinflammatory stimuli, negatively regulates nuclear factor-kappaB in the nuclei. *J Biol Chem*, **276** (29), 27657-62.

- Yanagita T, Kobayashi H, Yamamoto R, Takami Y, Yokoo H, Yuhi T, Nakayama T and Wada A** (1999). Protein kinase C and the opposite regulation of sodium channel alpha- and beta1-subunit mRNA levels in adrenal chromaffin cells. *J Neurochem*, **73** (4), 1749-57.
- Yang C and Frenkel K** (2002). Arsenic-mediated cellular signal transduction, transcription factor activation, and aberrant gene expression: implications in carcinogenesis. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, **21** (4), 331-42.
- Yang L, Ross K and Qwarnstrom EE** (2003). RelA control of I κ B α phosphorylation- A positive feedback loop for high affinity NF-kappa B complexes. *J Biol Chem*,
- Yang Y, Sharma R, Cheng JZ, Saini MK, Ansari NH, Andley UP, Awasthi S and Awasthi YC** (2002). Protection of HLE B-3 cells against hydrogen peroxide- and naphthalene-induced lipid peroxidation and apoptosis by transfection with hGSTA1 and hGSTA2. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **43** (2), 434-45.
- Yen GC, Duh PD and Lin CW** (2003). Effects of resveratrol and 4-hexylresorcinol on hydrogen peroxide-induced oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Free Radic Res*, **37** (5), 509-14.
- Yin Z, Ivanov VN, Habelhah H, Tew K and Ronai Z** (2000). Glutathione S-transferase p elicits protection against H₂O₂-induced cell death via coordinated regulation of stress kinases. *Cancer Res*, **60** (15), 4053-7.
- Yoshitani SI, Tanaka T, Kohno H and Takashima S** (2001). Chemoprevention of azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis by dietary capsaicin and rotenone. *Int J Oncol*, **19** (5), 929-39.
- Young MR, Yang HS and Colburn NH** (2003). Promising molecular targets for cancer prevention: AP-1, NF-kappa B and Pcd4. *Trends Mol Med*, **9** (1), 36-41.
- Yu R, Chen C, Mo YY, Hebbar V, Owuor ED, Tan TH and Kong AN** (2000a). Activation of mitogen-activated protein kinase pathways induces antioxidant response element-mediated gene expression via a Nrf2-dependent mechanism. *J Biol Chem*, **275** (51), 39907-13.
- Yu R, Hebbar V, Kim DW, Mandlekar S, Pezzuto JM and Kong AN** (2001). Resveratrol inhibits phorbol ester and UV-induced activator protein 1 activation by interfering with mitogen-activated protein kinase pathways. *Mol Pharmacol*, **60** (1), 217-24.
- Yu R, Lei W, Mandlekar S, Weber MJ, Der CJ, Wu J and Kong AT** (1999). Role of a mitogen-activated protein kinase pathway in the induction of phase II detoxifying enzymes by chemicals. *J Biol Chem*, **274** (39), 27545-52.
- Yu R, Mandlekar S, Lei W, Fahl WE, Tan TH and Kong AT** (2000b). p38 mitogen-activated protein kinase negatively regulates the induction of phase II drug-metabolizing enzymes that detoxify carcinogens. *J Biol Chem*, **275** (4), 2322-7.
- Yuille M, Condie A, Hudson C, Kote-Jarai Z, Stone E, Eeles R, Matutes E, Catovsky D and Houlston R** (2002). Relationship between glutathione S-transferase M1, T1, and P1 polymorphisms and chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, **99** (11), 4216-8.
- Zandi E, Rothwarf DM, Delhase M, Hayakawa M and Karin M** (1997). The I κ B kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKK α and IKK β , necessary for I κ B phosphorylation and NF-kappaB activation. *Cell*, **91** (2), 243-52.
- Zhang K, Mack P and Wong KP** (1998). Glutathione-related mechanisms in cellular resistance to anticancer drugs. *Int J Oncol*, **12** (4), 871-82.
- Zhang L, Chang CJ, Bacus SS and Hung MC** (1995). Suppressed transformation and induced differentiation of HER-2/neu-overexpressing breast cancer cells by emodin. *Cancer Res*, **55** (17), 3890-6.
- Zhang Y, Gonzalez V and Xu MJ** (2002). Expression and regulation of glutathione S-transferase P1-1 in cultured human epidermal cells. *J Dermatol Sci*, **30** (3), 205-14.

Zhao M, New L, Kravchenko VV, Kato Y, Gram H, di Padova F, Olson EN, Ulevitch RJ and Han J (1999). Regulation of the MEF2 family of transcription factors by p38. *Mol Cell Biol*, **19** (1), 21-30.

PUBLICATIONS ISSUES DE CE TRAVAIL

-**A Duvoix**, M. Schmitz, M. Schnekenburger, M. Dicato, F. Morceau, M.-M. Galteau, M. Diederich, Transcriptional regulation of Glutathione S-transferase P1-1 in human leukemia, *Biofactors*, 17(1-4): 131-8.

-**Annelyse Duvoix**, Franck Morceau, Sylvie Delhalle, Martine Schmitz, Michaël Schnekenburger, Marie-Madeleine Galteau, Mario Dicato and Marc Diederich, Induction of apoptosis by curcumin: mediation by glutathione S-transferase P1-1 inhibition, *Biochem. Pharmacol*, 66: 1475-83.

-**A. Duvoix**, F. Morceau, M. Schnekenburger, S. Delhalle, M.M. Galteau, M. Dicato and M. Diederich, Curcumin-induced cell death in two leukemia cell lines: K562 and Jurkat, *Annals of NYAS*, Acceptée.

-Franck Morceau, **Annelyse Duvoix**, Sylvie Delhalle, Michaël Schnekenburger, Mario Dicato, and Marc Diederich, Regulation of Glutathione S-transferase P1-1 gene expression by NF-kappaB in tumor necrosis factor alpha-treated K562 leukemia cells, *Biochem. Pharmacol.*, Acceptée.

PUBLICATION 1

Transcriptional regulation of glutathione *S*-transferase P1-1 in human leukemia¹

A. Duvoix, M. Schmitz, M. Schnekenburger, M. Dicato, F. Morceau, M.-M. Galteau and M. Diederich*

Laboratoire RCMS, Centre Universitaire du Luxembourg, Bâtiment des Sciences, 162A Avenue de la Faïencerie, L-1511 Luxembourg, Luxembourg
Tel.: +352 46 66 44 434; Fax: +352 46 66 44 438

1. Introduction

The glutathione *S*-transferases (GST) (EC 2.5.1.18) are a multigene superfamily of enzymes that catalyze the conjugation with glutathione of a number of electrophilic compounds including xenobiotic drugs, toxins and carcinogens, as well as some endogenous cellular electrophiles [1,2]. GST are believed to play a key role in the protection of cells from the toxicities of xenobiotic compounds, as well as from lipid hydroperoxides generated by oxidative stress [3]. Mammalian GSTs have been classified into nine distinct gene families: seven cytosolic groups (alpha, mu, pi, theta, omega, kappa and zeta), one microsomal form and one form present in erythrocytes. GST α 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 [4,5]. In many human tumors, like prostate carcinoma [6], squamous-cell carcinoma [7], acute lymphoblastic leukemia [8] and chronic lymphoid leukemia [9], GSTP1-1 is overexpressed, even though in the corresponding normal tissues the protein is either absent or expressed at very low levels. GSTP1-1 can thus be used as a valuable prognostic tool in sarcoma [10] or gastric carcinoma [11]. 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. Indeed, MCF7, an oestrogen-receptor positive breast cancer cell line, was found to overexpress GSTP1-1 and to develop a resistance to ethacrynic acid [12], doxorubicin and benzopyren [13]. Other cell lines that also overexpress GSTP1-1 are resistant to doxorubicin or taxol [14]. COS cells become resistant to doxorubicin [15] and CHO cells resist to cisplatin and carboplatin [16] after transfection of the GSTP1-1 gene.

¹This article also appeared in *Thiol Metabolism and Redox Regulation of Cellular Functions*, A. Pompella, G. Bánhegyi and M. Wellman-Rousseau, eds, IOS Press, Amsterdam.

*Corresponding author. E-mail: diederic@cu.lu.

2. GSTP1-1 in human leukemia

Wang et al. (2000) [17] studied the expression and the activity of GST isoenzymes in 14 haematopoietic lineages. They found that GSTP1 expression was higher than other GSTs in 13 out of 14 cell lines and they established the best correlation between GSTP1 expression and 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) conjugation activity in U937, K562 and Jurkat cells. Increased levels of GSTP1-1 are associated with tumor development and carcinogenesis [6]. Sauerbrey et al. (1994) [8] have shown elevated GSTP1-1 levels in the blasts from childhood acute lymphoblastic leukemia; moreover their data show an association between increased GSTP1-1 levels and a higher relapse rate, as well as a lower probability of the first continuous complete remission. The expression of GSTP1-1 in acute non-lymphoblastic leukemia cells is significantly correlated with response to induction therapy, duration of first remission, and overall survival of the patients [18]. However, a predictive correlation with tumor development has not been conclusively established, as Marie et al. (1995) [19] have shown a decrease in *GSTP1* gene expression in mononuclear cells of patients with chronic lymphocytic leukemia. An involvement of *GSTP1* in the development of resistance to some antineoplastic drugs and genotoxic carcinogens has also been implicated in cell lines selected for resistance to a range of anticancer drugs. However the molecular mechanisms responsible for changes in *GSTP1* expression are poorly understood.

3. Comparison of the human and rat GSTP promoters

Detailed studies of the rat P class GST (*GSTP*) promoter have identified several regulatory elements necessary for basal and inducible expression. Analyses of the 5'-flanking region of the human *GSTP1* gene have suggested that transcriptional regulation of *GSTP1* differs significantly from the rat *GSTP* homologue. The rat also expresses a GSTP that is not present in liver, however, unlike GSTP1-1 in human, the enzyme expression is increased during hepatocarcinogenesis [20]. This difference is due to the structure of the rat GSTP gene promoter (Fig. 1). This promoter contains two enhancers (GPEI and GPEII), a silencer (GPS1), a GC box and a TRE [21]. GPEI, a strong enhancer, is composed of two non-consensus TRE and mediates GSTP expression. Each TRE alone is inactive but synergistically cis-activate GSTP. Their activity is orientation dependant [22], and the upstream 19 nucleotides are essential for the maximal activity of the enhancer [23]. Its basal activity is not due to the binding of AP-1 transcription factors, although it can bind to the downstream TRE and increase GSTP expression [24, 25]. Other factors, not yet known, bind to GPEI to activate it. Some of those factors are not found in normal liver but are present in hepatocarcinoma, and that could explain the increase expression of GSTP in those cells [26]. GPEII is a weak enhancer composed of two SV40 and one polyoma enhancer. The TRE, close to the site of initiation of the transcription, could also be part of the regulation system as its deletion can strongly decrease GSTP expression [27]. GPS1 is a silencer and is position and orientation independent [28]. This region binds several factors (Silencer Factor (SF) -A, -B, -C). SF-A is part of the family CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP). In normal liver cells, C/EBP α bind to the silencer. In carcinoma cells, the ratio C/EBP α / C/EBP β decrease and C/EBP β binds to GPS1 increasing the GSTP expression. That could be another explanation for the increased GSTP activity found in hepatocarcinoma [29]. SF-A is part of the Nuclear Factor (NF) -1 family and contributes to the silencing of GSTP [30].

For the human gene, Morrow et al. (1990) [2] reported the localization of a region spanning from -80 to -8, which is absolutely required for reporter gene activity in transient transfection experiment. Moreover a region from -73 to +8, as shown by Xia et al. (1996) [31], is absolutely required for retino-

by Xia et al. (1996) [31].

4. Regulation of GSTP expression by activating protein 1

Protein components of activating protein 1 (AP-1) are encoded by a set of genes called “immediate-early genes?” whose transcription is rapidly induced, independently of *de novo* protein synthesis. The AP-1 transcription factor is a complex composed of proteins of the *fos* and *jun* proto-oncogene families, which need to dimerize to promote binding of the complex to the AP-1 recognition site. Moffat et al. (1994) [32] have already shown, in a human breast carcinoma cell line, the binding of Jun and Fos proteins to the AP-1 site located in the *GSTP1* promoter. The basal transcription of the human NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 gene, another drug metabolizing enzyme, is mediated by antioxidant response elements (ARE) containing perfect AP-1 sites or TRE-like elements. Xie et al. (1995) [34] demonstrated that ARE (composed of two TRE or TRE-like elements)-containing detoxifying enzymes genes are responsive to xenobiotics and antioxidants. JunD and c-Fos proteins, which are present in the nuclear extracts derived from hepatic cells, have been shown to bind to the AP-1 site located in the promoter of the human NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 (NQO1) gene [35].

Exposure of murine hepatoma cells to chemical inducers of GST Ya gene expression such as phorbol esters was found to induce an increase in AP-1 binding activity. This increase was shown to involve the induction of *fos* and *jun* gene expression with accumulation of increased levels of the respective mRNA and a *de novo* synthesis of the AP-1 protein components [36].

5. Methylation of the GSTP promoter

In addition to transacting factors, epigenetic events like CpG island methylation near the *GSTP1* gene might be of importance for the regulation of *GSTP1* expression. Such CpG island methylations close to the *GSTP1* locus accompany development of human breast [37] and prostatic carcinomas [38]. A better understanding of the molecular basis of the expression of glutathione metabolizing enzymes is crucial for the understanding of the protecting role against alkylating agents of glutathione in human chronic leukemia. Involvement of DNA methylation in the lineage specific gene regulation in haematopoietic cells has already been demonstrated in calcitonin gene hypermethylation in chronic myeloid leukemia [39] and hypomethylation of the major *bcr* gene in Ph positive acute lymphoid leukemias [40]. In a recent study [41] 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 found 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 (Fig. 2).

6. Molecular mechanisms of GSTP1-1 expression in human leukemia

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 [42,43]. We showed recently that TPA activation of human leukemia K562 cells produces an increase in the level of *GSTP1* mRNA [44]. Our results were in conflict with previous reports that showed the absence of effect of TPA on *GSTP1* mRNA

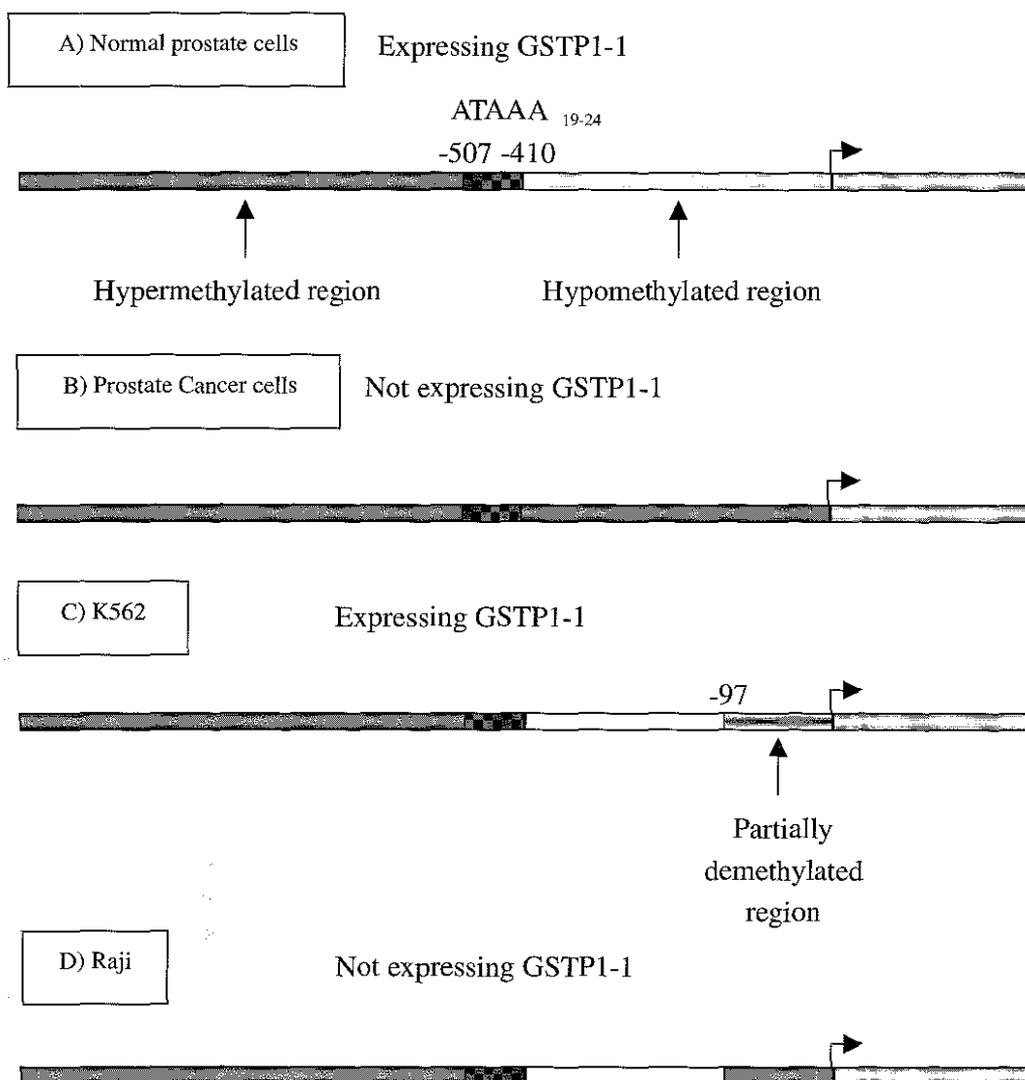


Fig. 2. Methylation state of GSTP1 gene promoter in different cell human tissues or cell lines. A) Normal prostate cells (expressing GSTP1-1): hypermethylated region upstream of -500 bp, and hypomethylated region between +1 and -400 bp. B) Prostate cancer cells (not expressing GSTP1-1): fully hypermethylated promoter. C) K562 cell line (expressing GSTP1-1): partially demethylated promoter in the region +1 -97. D) Raji lymphoma cell line (not expressing GSTP1-1): region +1 -97 is fully methylated.

in HeLa cells [2] or in HepG2 cells [45]. For these authors, their results were paradoxical as they showed that the integrity of the AP-1 binding site is essential for the basal activity of the *GSTP1* promoter [42]. The reason for the discrepancy between our results and previous data is unknown, but may be related to the different types of cells used. In agreement with that hypothesis, TPA was shown to be effective on the expression of murine GST Ya [36] or rat GST P [21], whose promoters contain two AP-1 binding sites. Moreover, TPA was shown to increase the binding of AP-1 factors to the promoters of erythroid-specific genes in the K562 cells [46].

To understand the molecular mechanism of the transcriptional induction of GSTP1-1 in response to TPA, we cloned the 5'-flanking region of the GSTP1 into a luciferase reporter system. Following

transfection in K562 cells, we observed that TPA up-regulated the promoter region of the *GSTP1* gene, measured as increased luciferase activity. This suggests that TPA acts at the level of transcription to induce *GSTP1* mRNA in human leukemia cells. We next elucidated the transcriptional regulatory mechanism by which TPA exerted its effect on the induction of *GSTP1*. Some investigators have shown the critical role of the AP-1 recognition sequence for transcriptional activity of the *GSTP1* promoter [32, 33]. However they have suggested that the distal Sp1 site and a putative NF- κ B like site [31] may be important in regulating *GSTP1* gene expression. We therefore used TPA to assess the role of the AP-1 transcription factor in the transcriptional up-regulation of *GSTP1* [44]. Exposure of leukemia cells to TPA produced a significant increase in the DNA binding activities of nuclear proteins. The competition studies confirmed the activation of AP-1 by TPA in our cells.

To identify which components of AP-1 are responsible for the up-regulation of *GSTP1*, we used antibodies directed against c-Fos and c-Jun families of proteins. Antibodies that cross-reacted with c-Jun and Fra1 produced a supershift. In support of this, several investigators have suggested possible involvement of AP-1/Jun family members in the regulation of *GSTP1*. Jhaveri and Morrow (1998) [33] failed to demonstrate the presence of transcription factors belonging to the Jun family in the protein complexes bound on a TRE probe with nuclear extracts derived from MCF7 or HS578T cells. Dixon et al. (1989) [45] and Morrow et al. (1989) [47] had already shown that the AP-1 site in the *GSTP1* promoter was unresponsive to the Jun and Fos trans-acting factors in HeLa and HepG2 cells. But they did not use supershift experiments to obtain these results; cells were co-transfected with *v-jun*, *c-jun* or *c-fos* expression vectors, alone or in combination. In contrast, Moffat et al. (1994) [32] demonstrated, by using specific antisera, that Jun and Fos proteins are integral components of the VCREMS nuclear complex bound on the AP-1 site; however these specific effects of antisera were not observed with MCF7 cells. Their results mean that the same promoter region of *GSTP1* is able to bind members of the Jun and Fos protein families in some cell lines but not in all the cells.

7. Conclusion

Our leukemia model might be of particular interest for the better understanding of the expression mechanisms of the *GSTP1-1* gene, a human gene specifically related to drug resistance. Our findings contribute to a better understanding of the molecular mechanisms involved in *GSTP1* expression which are of major importance for the development of chemoresistance reducing the impact of therapeutic agents in human haematopoietic diseases.

Acknowledgments

This work was supported by the Fondation de Recherche "Cancer et Sang". AD, MS, and MScl were supported by fellowships from the Government of Luxembourg. 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 supporting this project.

References

- [1] D.L. Schipper, Glutathione S-Transferases and cancer, *Int. J. Oncol.* **10** (1997), 1261–1264.

- [2] C. Morrow, 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) (1990), 215–225.
- [3] Y. Yang, Role of glutathione S-transferase in protection against lipid peroxidation. Overexpression of hGSTA2-2 in K562 cells protects against hydrogen peroxide-induced apoptosis and inhibits JNK and caspase 3 activation, *J. Biol. Chem.* **276**(22) (2001), 19220–19230.
- [4] P.G. Board, Biochemical genetics of glutathione-S-transferase in man, *Am J Hum Genet* **33**(1) (1981), 36–43.
- [5] J. Commandeur, Enzymes and transport systems involved in the formation and disposition of glutathione S-conjugates, *Pharmacol. Rev.* **47**(2) (1995), 271–330.
- [6] M.S. Cookson, Glutathione S-transferase pi class expression by immunohistochemistry in benign and malignant prostate tissue, *J. Urol.* **157** (1997), 673–676.
- [7] T. Inoue, Glutathione S-transferase pi is a powerful indicator in chemotherapy of human lung squamous-cell carcinoma, *Respiration* **62** (1995), 223–227.
- [8] A. Sauerbrey, P-glycoprotein and glutathione S-transferase π in childhood acute lymphoblastic leukemia, *Br. J. Cancer* **70** (1994), 1144–1149.
- [9] J.C. Schisselbauer, Characterisation of glutathione S-transferase expression in lymphocytes from chronic lymphoblastic leukemia cancer, *Cancer Res.* **50** (1990), 3562–3568.
- [10] G. Toffoli, Expression of MDR1 and GST-pi in human soft tissue sarcomas: relation to drug resistance and biological aggressiveness, *Ann Oncol* **3**(1) (1992), 63–69.
- [11] N. Monden, Prognostic significance of the expressions of metallothionein, glutathione-S-transferase-pi, and P-glycoprotein in curatively resected gastric cancer, *Oncology* **54**(5) (1997), 391–399.
- [12] C.S. Morrow, Combined expression of multidrug resistance protein (MRP) and glutathione S-transferase P1-1 (GSTP1-1) in MCF7 cells and high level resistance to the cytotoxicities of ethacrynic acid but not oxazaphosphorines or cisplatin, *Biochem Pharmacol* **56**(8) (1998), 1013–1021.
- [13] J.A. Moscow, Elevation of π class glutathione transferase activity in human breast cancer cells by transfection of the GST π gene and its effect on sensitivity to toxins, *Molecular Pharmacology* **36** (1989), 22–28.
- [14] U. Masanek, Messenger RNA expression of resistance proteins and related factors in human ovarian carcinoma cell lines resistant to doxorubicin, taxol and cisplatin, *Anticancer Drugs* **8**(2) (1997), 189–198.
- [15] R.B. Puchalski and W.E. Fahl, Expression of recombinant glutathione S-transferase π , Ya, or Yb1 confers resistance to alkylating agents, *Medical Sciences* **87** (1990), 2443–2447.
- [16] M. Miyazaki, Drug resistance to cis-diamminedichloroplatinum (II) in Chinese hamster ovary cell lines transfected with glutathione S-transferase pi gene, *Biochem Biophys Res Commun* **166**(3) (1990), 1358–1364.
- [17] L. Wang, Glutathione S-transferase enzyme expression in hematopoietic cell lines implies a differential protective role for T1 and A1 isoenzymes in erythroid and for M1 in lymphoid lineages, *Haematologica* **85** (2000), 573–579.
- [18] U. Tidefelt, Expression of glutathione transferase π as a predictor for treatment result at different stages of acute nonlymphoblastic leukemia, *Cancer Res.* **52** (1992), 3281–3285.
- [19] J.P. Marie, Glutathione S-transferase and mdr1 mRNA expression in normal lymphocytes and chronic lymphocytic leukemia, *Leukemia* **9** (1995), 1742–1747.
- [20] A. Kitahara, Changes in molecular forms of rat hepatic glutathione S-transferase during chemical hepatocarcinogenesis, *Cancer Res.* **44**(6) (1984), 2698–2703.
- [21] M. Sakai, multiple regulatory elements and phorbol 12-O-tetradecanoate 13-acetate responsiveness of the rat placental glutathione transferase gene, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **85**(24) (1988), 9456–9460.
- [22] A. Okuda, Functional cooperativity between two TPA responsive elements in undifferentiated F9 embryonic stem cells, *EMBO* **9**(4) (1990), 1131–1135.
- [23] A. Okuda, Structural and functional analysis of an enhancer GPEI having a phorbol 12-O-tetradecanoate 13-acetate responsive element-like sequence found in the rat glutathione transferase P gene, *J. Biol. Chem.* **264**(28) (1989), 16919–16926.
- [24] M.B. Diccianni, The dyad palindromic glutathione transferase P enhancer binds multiple factors including AP-1, *Nucleic Acid Res.* **20**(19) (1992), 5153–5158.
- [25] M. Sakai, Suppression of glutathione transferase P expression by glucocorticoid, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **187**(2) (1992), 976–983.
- [26] D. Liu, Effect of trans-acting factors on rat glutathione S-transferase P1 gene transcription regulation in tumor cells, *Chin. Med. J.* **115**(1) (2002), 103–106.
- [27] T. Suzuki, Tissue-specific activation of tumor marker glutathione transferase P transgenes in transgenic rats, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **121**(9–10) (1995), 606–611.
- [28] M. Imagawa, Silencer binding proteins function on multiple cis-element in the glutathione transferase P gene, *Nucleic Acid Res.* **19**(1) (1991), 5–10.
- [29] S. Osada, CCAAT/enhancer-binding proteins alpha and beta interact with the silencer element in the promoter of glutathione S-transferase P gene during hepatocarcinogenesis, *J. Biol. Chem.* **270**(52) (1995), 31288–31293.

- [30] S. Osada, Nuclear factor A family proteins bind to the silencer element in the rat glutathione transferase P gene, *J. Biochem.* **121**(2) (1997), 355–363.
- [31] C. Xia, The organisation of the human GSTP1-1 gene promoter and its response to retinoic acid and cellular redox status. *Biochem. J* **313** (1996), 155–161.
- [32] G.J. Moffat, 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.* **269** (1994), 16397–16402.
- [33] M. Jhaveri and C. Morrow, 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) (1998), 179–190.
- [34] T. Xie, ARE- and TRE-mediated regulation of gene expression, *J. Biol. Chem.* **270**(12) (1995), 6894–6900.
- [35] Y. Li and A. Jaiswal, Identification of jun-B as third member in human antioxidant response element-nuclear proteins complex, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **188** (1992), 992–996.
- [36] R. Pinkus, Role of oxydants and antioxydants in the induction of AP-1, NF-kB, and glutathione S-transferase gene expression, *J. Biol. Chem.* **271**(23) (1996), 13422–13429.
- [37] M.S. Jhaveri and C.S. Morrow, Methylation-mediated regulation of the glutathione S-transférase P1 gene in human breast cancer cells, *Gene* **210** (1998), 1–7.
- [38] W.H. Lee, Cytidine methylation of regulatory sequences near the π -class glutathione S-transferase gene accompanies human prostatic carcinogenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91** (1994), 11733–11737.
- [39] J.R. Melki, Concurrent DNA hypermethylation of multiple genes in acute myeloid leukemia, *Cancer Res.* **59** (1999), 3730–3740.
- [40] J.H. Ohyashiki, The methylation status of the major breakpoint cluster region in human leukemia cells, including Philadelphia chromosome-positive cells, is linked to the lineage of hematopoietic cells, *Leukemia* **7**(6) (1993), 801–807.
- [41] P. Borde-Chiché, Regulation of transcription of the glutathione S-transferase P1 gene by methylation of the minimal promoter in human leukemia cells, *Biochem. Pharmacol.* **61**(5) (2001), 605–612.
- [42] L. Xia, Glutathione transferase pi: its minimal promoter and downstream cis-acting element, *Biochem. Biophys. Res. Com.* **176** (1991), 233–240.
- [43] G. Cirillo, 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) (1999), 6240–6252.
- [44] P. Borde-Chiché, Phorbol ester responsiveness of the glutathione S-transferase P1 gene promoter involves an inducible c-jun binding in K562 leukemia cells, *Leuk. Res.* **25**(3) (2001), 241–247.
- [45] K.H. Dixon, Control of expression of the human glutathione S-transferase π gene differs from its rat orthologue, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **163**(2) (1989), 815–822.
- [46] W.B. Solomon, 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) (1993), 5089–5096.
- [47] C.S. Morrow, Structure of the human genomic glutathione S-transferase pi gene, *Gene* **75** (1989), 3–11.

PUBLICATION 2



Induction of apoptosis by curcumin: mediation by glutathione S-transferase P1-1 inhibition

Annelyse Duvoix^a, Franck Morceau^a, Sylvie Delhalle^a, Martine Schmitz^a,
Michaël Schnekenburger^a, Marie-Madeleine Galteau^b,
Mario Dicato^a, Marc Diederich^{a,*}

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

^bFaculté de Pharmacie 30, Thiols et Fonctions Cellulaires, rue Lionnois, F-54000 Nancy, France

Received 28 February 2003; accepted 24 April 2003

Abstract

Expression of glutathione S-transferase P1-1 (GSTP1-1) is correlated to carcinogenesis and resistance of cancer cells against chemotherapeutic agents. Curcumin, a natural compound extracted from *Curcuma longa*, has shown strong antioxidant and anticancer properties and also the ability to regulate a wide variety of genes that require activating protein 1 and nuclear factor κ B (NF- κ B) activation. In the present study, we examined the inhibitory effect of curcumin on the expression of GSTP1-1 mRNA as well as protein, and we correlated this inhibition with the apoptotic effect of curcumin on K562 leukemia cells. Curcumin efficiently inhibited the tumour necrosis factor α - and phorbol ester-induced binding of AP-1 and NF- κ B transcription factors to sites located on the GSTP1-1 gene promoter. NF α -induced GSTP1-1 promoter activity was also inhibited by curcumin as shown by reporter gene assay. In parallel, curcumin induced pro-caspases 8 and 9 as well as poly ADP ribose polymerase cleavage and thus leading to apoptosis in K562 cells. Our results overall add a novel role for curcumin as this chemoprotective compound could contribute to induce apoptosis by its ability to inhibit the GSTP1-1 expression at the level of transcription.

© 2003 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: GSTP1-1; Curcumin; Carcinogenesis; Drug resistance; Apoptosis; Leukemia

Introduction

GSTs (E.C. 2.5.1.18) are a multigene superfamily of enzymes that have been classified into eight distinct gene families coding for seven cytosolic isoforms (alpha, mu, pi, ta, omega, kappa and zeta) and one microsomal form. TP1-1, or GST pi, is expressed in most human tissues except in adult liver and in cancer cell lines like the Burkitt lymphoma Raji, HepG2 hepatoma and MCF7 breast cancer cells [1]. Its subunits are between 23 and 28 kDa and its gene has a length of 2.8 kbp with 7 exons and 6 introns.

Studies of human GSTP1-1 promoter show that the necessary regulatory elements are situated in the region –80 to –8, containing AP-1 and Sp1 sites [2].

GSTs play an important role in detoxification by catalysing the conjugation of electrophilic compounds such as xenobiotic drugs, toxins and carcinogens [3,4] to glutathione (GSH) allowing the drug to be exported from the cell through the GS-X pump in an ATP-dependent way. However, GSTs also allow the development of resistance to chemotherapy and elevated levels of GSTP1-1 mRNA are found in cell lines resistant to a range of anticancer drugs. Indeed, MCF7, an estrogen-receptor positive breast cancer cell line, was found to develop a resistance to ethacrynic acid [5], doxorubicin and benzopyrene [6] when transfected with GSTP1-1 and multidrug resistant protein 1. Ovarian cancer cell lines overexpressing GSTP1-1 are resistant to doxorubicin or taxol [7]. COS cells become resistant to doxorubicin [8] and CHO cells

*Corresponding author. Tel.: +352-46-66-44-434;

+352-46-66-44-438.

mail address: diederich@cu.lu (M. Diederich).

Abbreviations: GST, glutathione S-transferase; NF- κ B, nuclear factor κ B; AP-1, activating protein 1; TNF α , tumour necrosis factor α ; TPA, 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate.

resist to cisplatin and carboplatin [9] after transfection with the GSTP1-1 gene. Moreover, carcinogenesis is found to be related in many cases to an overexpression of GSTs, in particular GSTP1-1. Indeed, in many human tumours, like prostate carcinoma [10], squamous-cell carcinoma [11], acute lymphoblastic leukemia [12] and chronic lymphoid leukemia [13], GSTP1-1 is overexpressed, even though in the corresponding normal tissues the protein is either absent or expressed at very low levels. GSTP1-1 can thus be used as a valuable prognostic tool in sarcoma [14] or gastric carcinoma [15].

AP-1 [16,17] and NF- κ B activation is inhibited by curcumin (diferuloylmethane) [18,19], the yellow component of *Curcuma longa* that gives curry its colour and flavour. Curcumin has shown anti-inflammatory and antioxidant properties [20–26] due to the inhibition of cyclooxygenase 2 and lipoxygenase [27,28]. Curcumin inhibits tumour initiation (by benz[a]pyrene and 7,12-dimethylbenz[a]anthracene [29]) and promotion (by phorbol esters) thus showing anticarcinogenic properties [30,31].

In order to understand the relationship between apoptosis and transcriptional regulation of the GSTP1-1 gene, we examined the effect of curcumin on the GSTP1-1 expression correlated to cellular viability in cultured human leukemia cells. In this study, we provide evidence that curcumin significantly reduces GSTP1-1 mRNA and protein levels as well as TNF α - or phorbol ester-activated NF- κ B and AP-1 transcription factor binding to consensus and GSTP1-1 promoter probes. This inhibition was also confirmed by reporter gene assays demonstrating the effect of curcumin at the molecular level and thus underlining its chemopreventive potential. Furthermore, the appearance of apoptotic cleavage products is correlated to a curcumin-induced reduction of GSTP1-1 expression.

2. Materials and methods

2.1. Cells and medium

K562 cells (human chronic myelogenous leukemia) were cultured in RPMI medium (Bio-Whittaker) containing 10% (v/v) fetal calf serum (FCS) (Bio-Whittaker) and 1% (v/v) antibiotic–antimycotic (Bio-Whittaker) at 37°, 5% of CO₂. Before treatments, cells were cultured in RPMI with 0.1% (v/v) FCS and 1% (v/v) antibiotic–antimycotic for 72 hr at 37°.

2.2. Compounds

TPA was obtained from ICN, TNF α and curcumin were purchased from Sigma Chemical Co. Curcumin and TPA were dissolved in 100% DMSO at 20, 1 mM, respectively. TNF α was dissolved at 10 μ g/mL in 1 \times PBS supplemented with 0.5% (w/v) BSA according to the manufacturer

instructions. All subsequent dilutions were made in culture media.

2.3. Northern blot analysis

Total RNA was isolated from approximately 10 \times 10⁶ cells using Nucleo-spin RNA II kit (Macherey-Nagel). Ten micrograms total RNA were separated on a 1% (w/v) denaturing agarose gel with 2% (v/v) formaldehyde and transferred on a Hybond XL membrane (AP-Biotech). Membranes were hybridised with a 0.72 kbp cDNA coding for human GSTP1-1 that was ³²P-labelled by random priming using Rediprime II kit (AP-Biotech). Pre-hybridisation and hybridisation were carried out in 50% (v/v) formamide, 6 \times SSC, 5 mM EDTA, 0.1% (v/v) SDS, 200 μ g/mL herring sperm DNA, 100 μ g/mL yeast tRNA and 5 \times Denhart's at 42°. Membranes were washed 5 min with 2 \times SSC, 0.5% (v/v) SDS at room temperature, 3 \times 5 min with 2 \times SSC, 0.1% (v/v) SDS at room temperature and 3 \times 30 min with 1 \times SSC, 0.1% (v/v) SDS at 68°. Quantifications were performed by phosphorimaging of the membranes on a Cyclone (Perkin-Elmer).

2.4. Western blot

Five micrograms total proteins, extracted with M-PER mammalian protein extraction reagent (Pierce) or with 1% SDS, were run on a 4% acrylamide concentration gel and a 10% acrylamide separation gel and transferred on a Hybond P membrane (AP-Biotech). Membranes were pre-hybridised in 1 \times PBS containing 0.1% (v/v) Tween 20 (PBS-T) and 5% fat free milk. Hybridisation was carried out in PBS-T containing 5% fat free milk with primary antibody. Membranes were washed 3 \times for 5 min and 2 \times for 10 min in PBS-T before hybridisation in PBS-T containing 5% fat free milk with secondary antibody. Membranes were washed 3 \times for 5 min and 2 \times for 10 min in PBS-T. Proteins of interest were visualised with ECL-plus Western blot detection reagent (AP-Biotech). Polyclonal rabbit anti-pro-caspase 9 and anti-pro-caspase 8 antibodies (PharMingen), a polyclonal mouse anti-GSTP1-1 antibody (Transduction Laboratories), a monoclonal mouse anti- β -actin (Sigma), a monoclonal mouse anti-PARP (PharMingen) and secondary anti-rabbit and anti-mouse antibodies (Santa Cruz) were used.

2.5. Cytotoxicity assay

The percentages of cell death were determined using CytoTox 96 non-radioactive cytotoxicity assay (Promega). LDH activity is measured by an enzymatic assay that results in the conversion of a tetrazolium (INT) into a red formazan product detected at 490 nm. Percentage of cytotoxicity is calculated in relation with 100% lysis control obtained by adding lysis buffer for 45 min at 37°, 5% CO₂ on the same number of cells.

2.6. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

Nuclear extracts were prepared using the method described by Müller *et al.* [32] and stored at -80° .

The following oligonucleotides and their complementary sequences were used as probes: -73 (AP-1 site of human GSTP1-1 promoter) 5'-GCCGTGACTCAGCACTGGGG-3', COL (consensus AP-1 site in the collagenase promoter) 5'-CGCTTGATGACTCAGCCGGAA-3', consensus NF- κ B site: 5'-AGTTGAGGGGACTTCCCA-GGC-3' and NF- κ B site of human GSTP1-1 promoter: 5'-TCTTAGGGAATTTCCCCCGCGA-3'. They were hybridised and labelled as previously described [33].

Five micrograms of cell nuclear extracts were incubated 20 min at 4° with 32 P-ATP labelled probe in 20 μ L reaction mixture containing 4% glycerol, 1 mM $MgCl_2$, 0.5 mM EDTA, 509 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.5 mM DTT and 0.25 μ g/mL poly(dI-dC). Each reaction mixture was then loaded on a 5% polyacrylamide gel containing $0.5\times$ TBE. Electrophoresis was performed at 16 mA per gel for 2 hr at room temperature. The gel was then dried and autoradiographed.

2.7. Transfections

Transfections of K562 cells were performed by electroporation using a BioRad gene Pulser. For each experiment 7.5×10^6 cells at a concentration of 1.5×10^7 cells/mL were electroporated at the following settings: 250 V and 90 μ F. Ten micrograms reporter gene construct has been used for each pulse. After 48 hr the cells were harvested and resuspended in 300 μ L reporter lysis buffer (Promega). Light emission resulting from luciferase activity was measured in a Turner luminometer by integration of peak light emission over 15 s at 25° . Luciferase activity was measured in $1\times$ reporter lysis buffer (Promega) using 10 μ L pernatant.

The ratio between arbitrary luciferase light units and total protein content was normalised relatively to the cells transfected with pGL3-control (Promega). All results were expressed as a fold increase or decrease over the standardised luciferase activity of this pGL3-control defined as 100%. Each value is the average of the results of at least three independent transfection experiments. Assays were repeated twice.

Results

Inhibition of the basal GSTP1-1 expression by curcumin

K562 cells were treated with curcumin (0, 1, 5 or 10 μ M) 24 hr at 37° . Figure 1A shows that 10 μ M curcumin strongly inhibits (-25%) the expression of the 1.2 kbp transcript corresponding to the human GSTP1-1 mRNA.

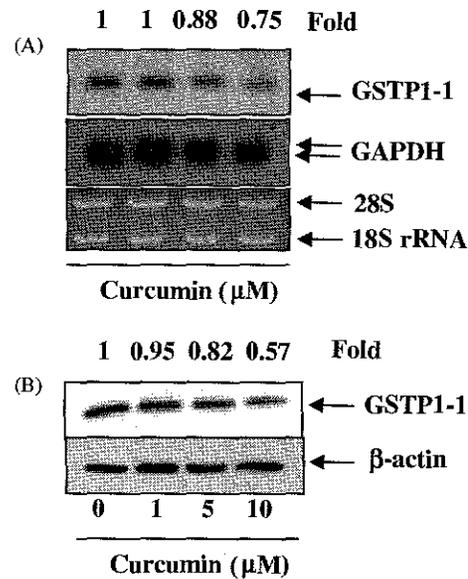


Fig. 1. Effect of curcumin on GSTP1-1 mRNA and protein expression. Cells were treated with curcumin for 24 hr (A) GSTP1-1 mRNA expression was analysed by Northern blot technique. Results shown are representative of three independent experiments. (B) GSTP1-1 protein expression was analysed by Western blot technique. Results shown are representative of three independent experiments.

This inhibition was not due to an unspecific downregulation of RNA synthesis, since curcumin treatment did not significantly modify the expression of GAPDH mRNA. Figure 1B shows that GSTP1-1 protein expression was decreased as well with 10 μ M curcumin under low serum conditions.

3.2. Inhibition of TNF α -induced GSTP1-1 mRNA expression by curcumin

K562 chronic myelogenous leukemia cells expressed detectable levels of a 1.2 kbp transcript corresponding to human GSTP1-1 mRNA, which were increased after TNF α treatment (Fig. 2). The 1.8-fold induction of GST gene expression was observed at 0.5 ng/mL TNF α after 8 hr treatment and did not increase at higher concentrations of TNF α . This induction was not due to an unspecific upregulation of RNA synthesis, since TNF α treatment did not significantly modify the levels of GAPDH mRNA expression.

K562 cells were incubated with 10 μ M curcumin for 2 hr before the addition of TNF α (0.5 ng/mL). This pre-treatment prevented the previously observed increase in GSTP1-1 transcript synthesis suggesting that curcumin is able to interfere with the signal transduction mechanisms leading to GSTP1-1 expression at the transcriptional level.

3.3. Inhibition of TNF α -activated AP-1 binding by curcumin

It was previously shown that curcumin is a potent inhibitor of NF- κ B [34] and AP-1 [35]. Whether curcumin can suppress constitutive and TNF α -induced AP-1 and

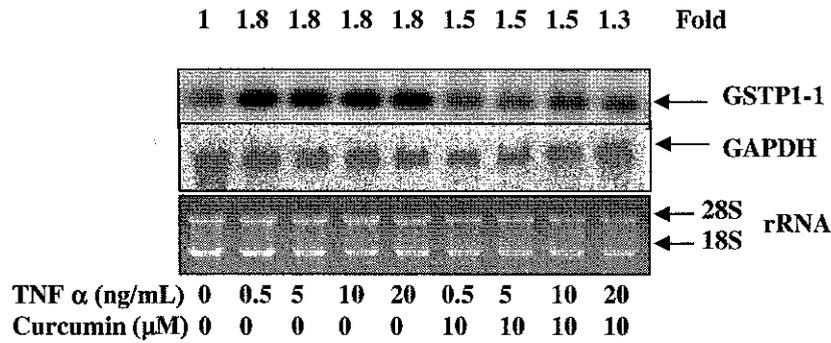


Fig. 2. Inhibition of TNF α -dependent activation of GSTP1-1 mRNA expression by curcumin on K562 cells. Cells were cultured for 8 hr with TNF α with or without a 2 hr pre-treatment with 10 μ M curcumin. GSTP1-1 mRNA expression was analysed by Northern blot technique. Results shown are representative of three independent experiments.

NF- κ B binding on human GSTP1-1 gene promoter in K562 cells was investigated. Cells were pre-incubated for 2 hr with different concentrations of curcumin before treatment with TNF α (0.5 ng/mL). Nuclear extracts were then examined for AP-1 binding by EMSA using two probes: a consensus AP-1 site from the collagenase promoter (COL), and the AP-1 site located near the transcription initiation site of GSTP1-1 (-73). Ten micromolars curcumin completely suppressed TNF α -induced AP-1 binding on GSTP1-1 probe after a 2 hr pre-treatment in K562 cells (Fig. 3A). The use of a consensus AP-1 probe (Fig. 3B) confirmed that curcumin was able to suppress the TNF α -induced activation of AP-1 in K562 cells.

3.4. Inhibition of TPA-activated AP-1 binding by curcumin

The phorbol ester TPA, known to induce AP-1 binding in several cell types [36,37], was included in these experiments

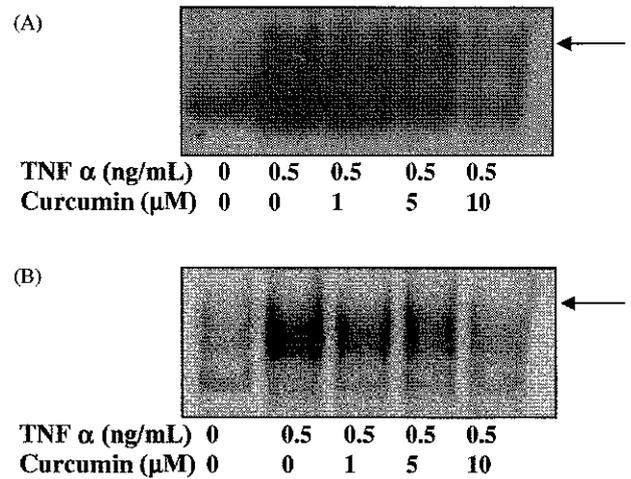


Fig. 3. Effect of curcumin and TNF α on AP-1 binding in K562 cells. K562 cells were treated for 4 hr with 0.5 ng/mL TNF α with or without a 2 hr curcumin pre-treatment. (A) Nuclear extracts were analysed by EMSA with AP-1 (-73) probe or (B) with AP-1 collagenase probe (arrows indicate specific binding).

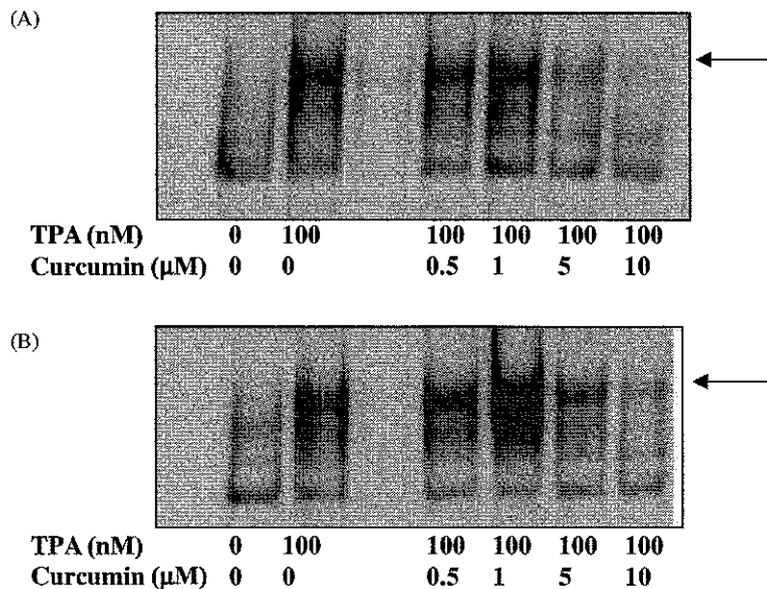


Fig. 4. Effect of curcumin and TPA on AP-1 binding in K562 cells. K562 cells were treated for 2 hr with 100 nM TPA with or without a 2 hr curcumin pre-treatment. (A) Nuclear extracts were analysed by EMSA with AP-1 (-73) probe or (B) with AP-1 collagenase probe (arrows indicate specific binding).

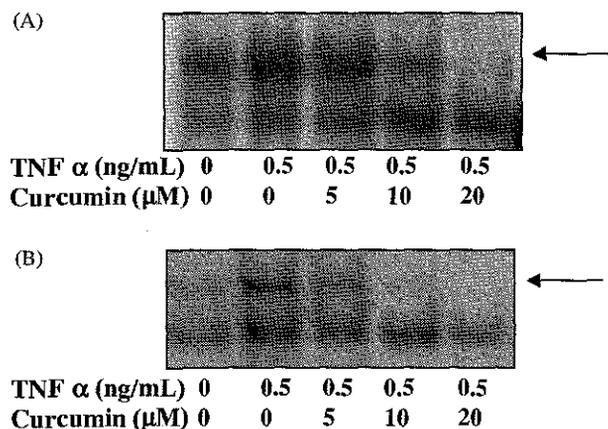


Fig. 5. Effect of curcumin and TNF α on NF- κ B binding in K562 cells. K562 cells were treated for 4 hr with 0.5 ng/mL TNF α with or without a 2 hr curcumin pre-treatment. (A) Nuclear extracts were analysed by EMSA with GSTP1-1 NF- κ B probe or (B) with NF- κ B consensus probe (arrows indicate specific binding).

for comparison with TNF α . Cells were pre-incubated for 2 hr with different concentrations of curcumin and then treated with TPA (100 nM) for 2 hr at 37°. As previously shown [33], TPA induces AP-1 binding on both sites in K562 cell lines. The results in Fig. 4A and B indicate that 10 μ M curcumin inhibits TPA activation on both the consensus site (-50%) and the GSTP1 site (-60%).

3.5. Inhibition of TNF α -dependent NF- κ B binding by curcumin

TNF α being a well-characterised activator of NF- κ B, we studied the effect of curcumin on NF- κ B activation in K562 cells by EMSA. K562 cells were treated for 4 hr at 37° with 0.5 ng/mL TNF α with or without a 2 hr pre-treatment with 5, 10 or 20 μ M curcumin. Figure 5A and B show that TNF α activates NF- κ B binding on both the

consensus site and the GSTP1-1 NF- κ B site. Pre-treatments with curcumin lead to inhibition of the NF- κ B binding on both sites showing the effect of curcumin on the NF- κ B signalling pathway.

3.6. Inhibition of TNF α activated transcription by curcumin

We next examined the effect of TNF α alone, or in combination with curcumin, on the activity of the human GSTP1-1 gene promoter. Human GSTP1-1 genomic fragments of different length (97, 396 and 1175 bp relative to the transcriptional start site) were ligated upstream of the firefly luciferase reporter gene and were assessed for luciferase activity in K562 cells. An additional construct harbouring five repeats of the GSTP1-1 NF- κ B site (pGSTNF κ B) was also used for this study (Fig. 6). A comparison of luciferase activities generated by transfection of those constructs between unstimulated and TNF α -stimulated cells showed that the GST promoter activity was enhanced following TNF α treatment, indicating that this human promoter contains TNF α -responsive sequences that might account for the TNF α -mediated induction of GSTP1-1 in these cells.

TNF α treatment on K562 cells transfected with pGSTNF κ B (Fig. 7A) strongly induced the expression of luciferase gene (125-fold) showing the functionality of the GSTP1-1 NF- κ B site located at -323. The same treatment on cells transfected with the other plasmids led to an average 5-fold increase of the luciferase expression (Fig. 7B). Moreover, there was no difference between transfection of the plasmid p-97 and plasmids p-396 and p-1175 containing the NF- κ B site. Another site located downstream of p-97 can thus bind a transcription factor reacting to TNF α . Curcumin treatments had a significant inhibitory effect on luciferase activity whatever the plasmid transfected. Moreover, TNF α -dependent induction

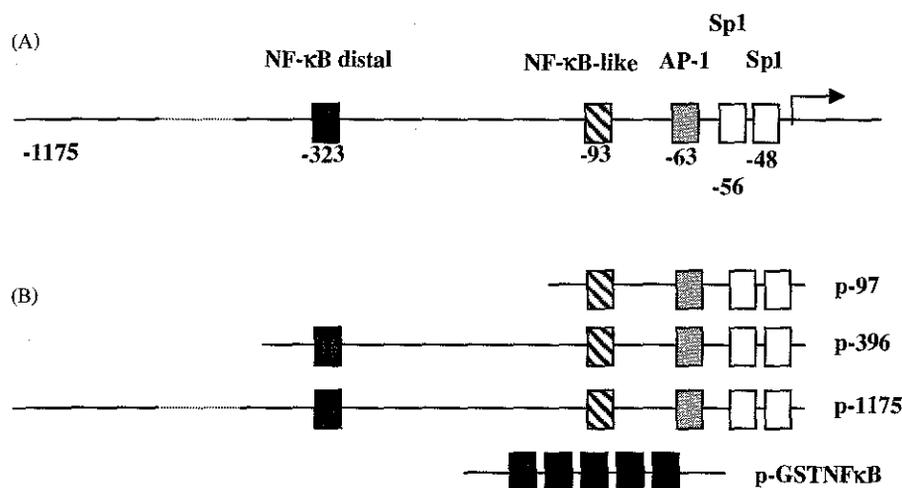


Fig. 6. Transfection constructs of the human GSTP1-1 promoter. (A) The position of the different transcription factor binding sites are indicated related to the transcription start site. (B) Promoter constructs used in transfection experiments: p-97, p-396 and p-1175 are constructs derived from the GSTP1-1 gene promoter. pGSTNF κ B is a construct with five repeats of the NF- κ B site located at -323 on the GSTP1-1 gene promoter.

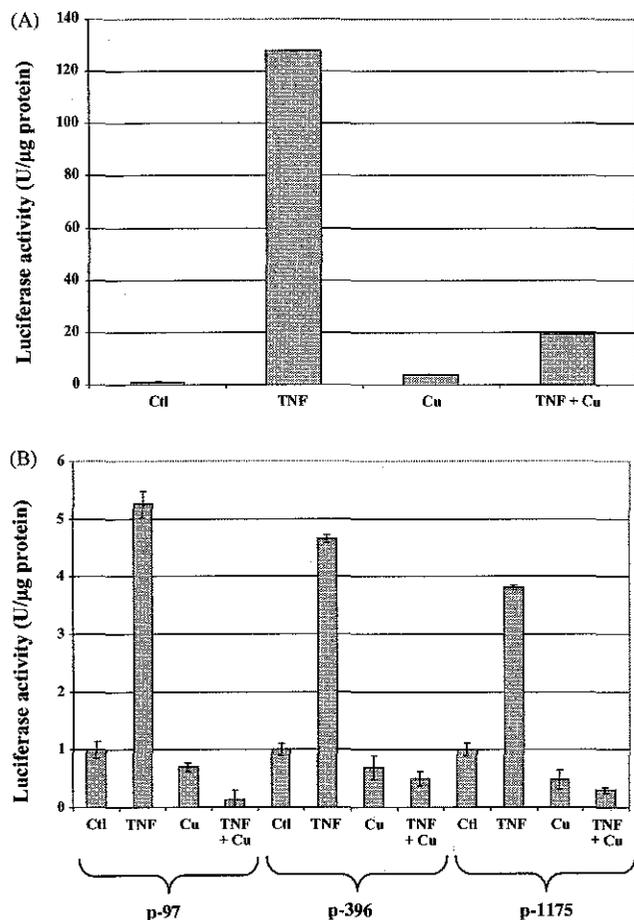


Fig. 7. Transfections experiments. K562 cells were transfected with the different constructs and treated with TNF α 0.5 ng/mL (TNF), curcumin 10 μ M (Cu) or TNF α + curcumin (TNF + Cu) or without treatment (Ctl). (A) Transfection with pGSTNF κ B. (B) Transfection with plasmids p-97, p-396 and p-1175.

was reduced by 80% by curcumin when cells were transfected with pGSTNF κ B (Fig. 7A). Inhibition was even stronger (98, 90 and 93%) when the cells were transfected with the three promoter constructs p-97, p-396 and p-1175, respectively.

3.7. Decreases of leukemia cell survival by inducing apoptosis by curcumin

Whether or not the treatment by curcumin leads to an increase of cellular death was then investigated. Cells were treated with curcumin for 24 hr at 37°. As shown in Fig. 8A, cytotoxicity of curcumin increased in a concentration-dependent manner reaching a maximum at 20 μ M. To determine whether curcumin-induced cell death was due to apoptosis, we tested the ability of curcumin to activate caspases 8 and 9. K562 cells were treated with 20 μ M curcumin for various times. Western blot analysis (Fig. 8B) showed that curcumin reduced pro-caspase 9 levels reaching a maximum inhibition at 24 hr (80%) demonstrating its apoptotic effect on K562 cells. This was confirmed by the

decrease of pro-caspase 8 levels after 24 hr treatment with curcumin. Finally curcumin also induced caspase-dependent cleavage of poly ADP ribose polymerase (PARP) in a time-dependent manner with the appearance of 85 kDa cleavage product at 24 hr of treatment.

4. Discussion

Curcumin is a compound known for its antioxidant and anticarcinogenic properties [20–26]. It has also been shown to have an inhibitory effect on AP-1 and NF- κ B activation. We investigated here its effects on GSTP1-expression in leukemia cell lines. Indeed, GSTP1-1 was found to be related to carcinogenesis and resistance to anticancer drugs [38]. The implication of NF- κ B and AP-1 [3,39] in GSTP1-1 regulation was demonstrated and the use of curcumin in leukemia could lead to a valuable therapeutic tool.

We show here that treatment by the chemopreventive agent curcumin of K562 cells leads to increased cell death compared to cells cultured without curcumin. Apoptosis is characterised by caspase activation [40]. Mukhopadhyaya *et al.* [41] previously showed that curcumin induce apoptosis in human androgen-dependent LNCaP as well as androgen-independent DU145 human prostate cancer cell lines by down-regulating the expression of Bcl-2 and Bcl-X_L and the activation of the pro-caspases 3 and 9. Similar results were obtained by Bush *et al.* [42] by using melanoma cell model. Our results agree with the data obtained by Barthi *et al.* [43] where in multiple myeloma cells curcumin induces caspases 7 and 9. We show here that apoptosis can be induced by curcumin in K562 cells through activation of caspases 8 and 9 indicating that both the mitochondrial and death receptor pathways are activated.

K562 cells carry the Philadelphia chromosome with the Bcr-Abl fusion gene. The Bcr-Abl oncoprotein activates several pathways implicated in carcinogenesis such as Myc, Ras, c-Raf, MAPK/ERK, SAPK/JNK, Stat, NF- κ B, PI-3 kinase and c-Jun due to a constitutively activated tyrosine kinase activity. In cells carrying such a translocation, apoptosis is decreased and cell proliferation is up-regulated. In K562 cells, classical apoptosis can only be induced in cells by inhibiting Ras, Raf, PI3K, Akt, Jun and Myc [44]. In our hands, inhibition of constitutively active AP-1 and NF- κ B in K562 by curcumin leads to caspase 8 and 9-dependent cell death. Similar results were obtained by Barthi *et al.* [43] in human prostate cancer cells and Piwocka *et al.* in Jurkat T cells [45].

As AP-1 and NF- κ B binding activities are correlated to GSTP1-1 expression, inhibition of those transcription factors by curcumin should induce a reduction of GSTP1 expression at the mRNA level. Singhal *et al.* [46] previously showed a weak induction by curcumin of the alpha class hGST 5.8 isozyme, indicated by an increased activity toward 4-hydroxynonenal. We show here a substanc

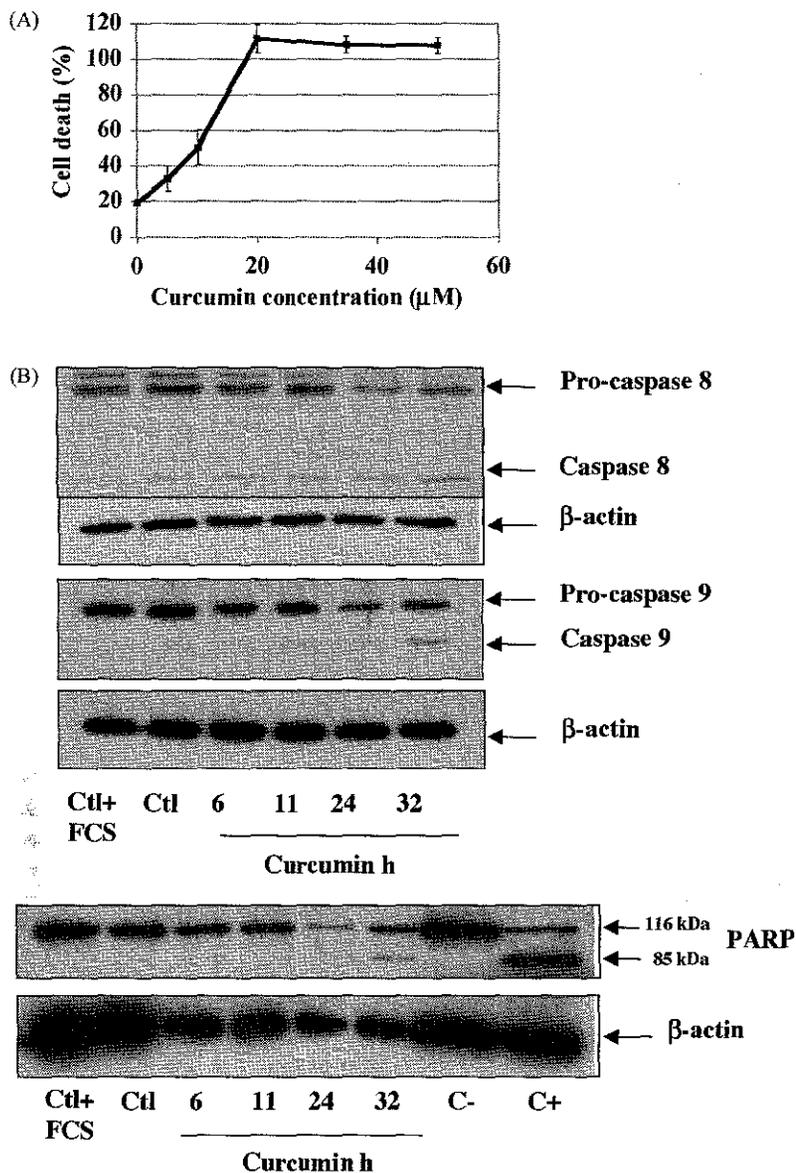


Fig. 8. Effect of curcumin on K562 cell death. Cells were treated with curcumin for 24 hr. (A) Toxicity was measured. (B) Cells were treated with 20 μM of curcumin. Pro-caspases 8 and 9 as well as PARP activation was detected by Western blot technique. Ctl + FCS designates control K562 cells cultured at 10% S, Ctl designates control K562 cells cultured at 0.1% FCS. C- designates untreated HL-60 cells and C+ designates etoposide-treated HL-60 cells as negative and positive PARP cleavage controls respectively.

duction of GSTP1-1 mRNA expression in human K562 chronic myelogenous leukemia cells. It is of interest to note that with 66%, GSTP1-1 is the major GST isoform expressed by K562 and that the expression of this isoform is correlated to chemoresistance in leukemia [47], breast and ovarian cancer [5–9].

Morales *et al.* [48] previously demonstrated the effect of proinflammatory cytokine TNF α [49] on the expression of another key enzyme of the glutathione pathway, gamma-glutamyl cysteine synthetase (γGCS). TNF α was able to decrease the γGCS mRNA expression by 70% in a rat hepatocyte model. In this model, TNF α was able to induce NF- κB as well as AP-1 transcription factors. As we and other groups recently showed the importance of both AP-1

[33] and NF- κB sites in the regulation of the GSTP1-1 expression, inhibition of DNA bindings of both transcription factors by curcumin should be responsible for a decrease in GSTP1-1 gene expression and thus could contribute to reduce drug resistance and carcinogenesis due to GSTP1-1 activity.

Our results show an inhibition of both constitutive and TNF α -induced GSTP1-1 mRNA expression in K562 cells. This transcriptional inhibition was paralleled by a progressive reduction of GSTP1-1 protein expression. In order to understand the molecular mechanisms responsible for these variations we examined the effect of curcumin on promoter activity as well as AP-1 and NF- κB binding onto the GSTP1-1 promoter.

Barthi *et al.* [43] previously showed that curcumin inhibits IKK complex activity and thus I κ B α phosphorylation as well as the p65 nuclear translocation. Those data are in agreement with our results obtained by gel shift assays using GSTP1-1 promoter and consensus NF- κ B probes. Moreover, luciferase activities generated by constructs associating GSTP1-1 promoter fragments of increasing length to a luciferase reporter gene were strongly inhibited by curcumin as was a similar construct harbouring five NF- κ B repeats. In 1995, Singh and Aggarwal [18] using a ML-1a myelomonoblastic leukemia cell line showed that curcumin inhibits AP-1 binding onto a consensus AP-1 site. These results are in agreement with our data, where curcumin strongly inhibits TNF α - and TPA-induced bindings onto GSTP1-1 and consensus AP-1 probes. Inhibition of both NF- κ B and AP-1 bindings thus accounts for the observed transcriptional inhibition.

Moreover, Gilot *et al.* [50] noticed that overexpression of ASK-1 restored caspase-3 activation and apoptosis in primary cultures of hepatocytes. Co-transfections of GSTM1/2, GSTA1/2 or GSTP1-1 isoforms with ASK-1 reduced apoptosis by antagonising ASK-1 activity and thus demonstrating the antiapoptotic function of the GSTs.

We confirm these data as reduction of GSTP1-1 expression by curcumin is paralleled by an onset of apoptosis as shown by caspases 8 and 9 activation as well as Poly ADP Ribose Polymerase cleavage.

In conclusion, these results add a novel role for curcumin: this chemoprotective compound could contribute to induce apoptosis by its ability to inhibit the GSTP1-1 expression at the level of transcription.

Acknowledgments

The authors thank B. Aggarwal for helpful discussions. This work was supported by the Fondation de Recherche "Cancer et Sang". A.D., Ma.S. and Mi.S. are supported by fellowships from the Government of Luxembourg. This work was in part supported by the Télévie grant 7.4577.02.

References

- [1] Castro VM, Soderstrom M, Carlberg I, Widersten M, Platz A, Mannervik B. Differences among human tumor cell lines in the expression of glutathione transferases and other glutathione-linked enzymes. *Carcinogenesis* 1990;11(9):1569–76.
- [2] 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(Pt 1):155–61.
- [3] 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.
- [4] Schipper L. Glutathione *S*-transferases and cancer. *Int J Oncol* 1997;10:1261–4.
- [5] Morrow CS, Smitherman PK, Townsend AJ. Combined expression of multidrug resistance protein (MRP) and glutathione *S*-transferase P1-1 (GSTP1-1) in MCF7 cells and high level resistance to the cytotoxicities of ethacrynic acid but not oxazaphosphorines or cisplatin. *Biochem Pharmacol* 1998;56(8):1013–21.
- [6] Moscow JA, Townsend AJ, Cowan KH. Elevation of pi class glutathione *S*-transferase activity in human breast cancer cells by transfection of the GST pi gene and its effect on sensitivity to toxins. *Mc Pharmacol* 1989;36(1):22–8.
- [7] Masanek U, Stammli G, Volm M. Messenger RNA expression of resistance proteins and related factors in human ovarian carcinoma cell lines resistant to doxorubicin taxol and cisplatin. *Anticancer Drugs* 1997;8(2):189–98.
- [8] Puchalski RB, Fahl WE. Expression of recombinant glutathione *S*-transferase pi, Ya, or Yb1 confers resistance to alkylating agents. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87(7):2443–7.
- [9] Miyazaki M, Kohno K, Saburi Y, Matsuo K, Ono M, Kuwano M, Tsuchida S, Sato K, Sakai M, Muramatsu M. Drug resistance to *cis*-diamminedichloroplatinum(II) in Chinese hamster ovary cell line transfected with glutathione *S*-transferase pi gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;166(3):1358–64.
- [10] 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(2):673–6.
- [11] Inoue T, Ishida T, Sugio K, Maehara Y, Sugimachi K. Glutathione *S*-transferase pi is a powerful indicator in chemotherapy of human lung squamous-cell carcinoma. *Respiration* 1995;62(4):223–7.
- [12] Sauerbrey A, Zintl F, Volm M. *P*-glycoprotein and glutathione *S*-transferase pi in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br Cancer* 1994;70(6):1144–9.
- [13] Schisselfbauer JC, Silber R, Papadopoulos E, Abrams K, LaCreta FI, Tew KD. Characterization of glutathione *S*-transferase expression in lymphocytes from chronic lymphocytic leukemia patients. *Cancer Res* 1990;50(12):3562–8.
- [14] Toffoli G, Frustaci S, Tumiotto L, Talamini R, Gherlinzoni F, Picci I, Boiocchi M. Expression of MDR1 and GST-pi in human soft tissue sarcomas: relation to drug resistance and biological aggressiveness. *Ann Oncol* 1992;3(1):63–9.
- [15] Monden N, Abe S, Sutoh I, Hishikawa Y, Kinugasa S, Nagasue N. Prognostic significance of the expressions of metallothionein, glutathione-*S*-transferase-pi, and *P*-glycoprotein in curatively resected gastric cancer. *Oncology* 1997;54(5):391–9.
- [16] Bierhaus A, Zhang Y, Quehenberger P, Luther T, Haase M, Muller N, Mackman N, Ziegler R, Nawroth PP. The dietary pigment curcumin reduces endothelial tissue factor gene expression by inhibiting binding of AP-1 to the DNA and activation of NF- κ B. *Thromb Haemostasis* 1997;77(4):772–82.
- [17] Chen YR, Tan TH. Inhibition of the c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling pathway by curcumin. *Oncogene* 1998;17(2):173–8.
- [18] Singh S, Aggarwal BB. Activation of transcription factor NF- κ B is suppressed by curcumin (diferuloylmethane) [corrected]. *J Biol Chem* 1995;270(42):24995–5000.
- [19] Chan MM. Inhibition of tumor necrosis factor by curcumin, a phytochemical. *Biochem Pharmacol* 1995;49(11):1551–6.
- [20] Rao CV, Rivenson A, Simi B, Reddy BS. Chemoprevention of colon carcinogenesis by dietary curcumin a naturally occurring plant polyphenolic compound. *Cancer Res* 1995;55(2):259–66.
- [21] Satoskar RR, Shah SJ, Shenoy SG. Evaluation of anti-inflammatory property of curcumin (diferuloyl methane) in patients with postoperative inflammation. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol* 1986;24(6):651–4.
- [22] Tanaka T, Makita H, Ohnishi M, Hirose Y, Wang A, Mori H, Satoh Hara A, Ogawa H. Chemoprevention of 4-nitroquinoline 1-oxide induced oral carcinogenesis by dietary curcumin and hesperidin: comparison with the protective effect of beta-carotene. *Cancer Res* 1994;54(17):4653–9.

- [23] Huang MT, Lou YR, Ma W, Newmark HL, Reuhl KR, Conney AH. Inhibitory effects of dietary curcumin on forestomach duodenal and colon carcinogenesis in mice. *Cancer Res* 1994;54(22):5841–7.
- [24] Huang MT, Smart RC, Wong CQ, Conney AH. Inhibitory effect of curcumin, chlorogenic acid, caffeic acid, and ferulic acid on tumor promotion in mouse skin by 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Res* 1988;48(21):5941–6.
- [25] Ammon HP, Wahi MA. Pharmacology of *Curcuma longa*. *Planta Med* 1991;57(1):1–7.
- [26] Shankar TN, Shantha NV, Ramesh HP, Murthy IA, Murthy VS. Toxicity studies on turmeric (*Curcuma longa*): acute toxicity studies in rats, uineapigs & monkeys. *Indian J Exp Biol* 1980;18(1):73–5.
- [27] Huang MT, Lysz T, Ferraro T, Abidi TF, Laskin JD, Conney AH. Inhibitory effects of curcumin on *in vitro* lipoxygenase and cyclooxygenase activities in mouse epidermis. *Cancer Res* 1991;51(3):813–9.
- [28] Flynn DL, Rafferty MF, Boctor AM. Inhibition of 5-hydroxy-eicosatetraenoic acid (5-HETE) formation in intact human neutrophils by naturally-occurring diarylheptanoids: inhibitory activities of curcuminoids and yakuchinones. *Prostaglandins Leukot Med* 1986;22(3):357–60.
- [29] Huang MT, Wang ZY, Georgiadis CA, Laskin JD, Conney AH. Inhibitory effects of curcumin on tumor initiation by benzo[*a*]pyrene and 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene. *Carcinogenesis* 1992;13(11):2183–6.
- [30] Azuine MA, Bhide SV. Chemopreventive effect of turmeric against stomach and skin tumors induced by chemical carcinogens in Swiss mice. *Nutr Cancer* 1992;17(1):77–83.
- [31] Azuine MA, Bhide SV. Protective single/combined treatment with betel leaf and turmeric against methyl (acetoxymethyl) nitrosamine-induced hamster oral carcinogenesis. *Int J Cancer* 1992;51(3):412–5.
- [32] Müller MM, Schreiber E, Schaffner W, Matthias P. 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(15):6420.
- [33] Borde-Chiche P, Diederich M, Morceau F, Wellman M, Dicato M. Phorbol ester responsiveness of the glutathione *S*-transferase P1 gene promoter involves an inducible c-jun binding in human K562 leukemia cells. *Leuk Res* 2001;25(3):241–7.
- [34] Singh S, Aggarwal BB. Protein-tyrosine phosphatase inhibitors block tumor necrosis factor-dependent activation of the nuclear transcription factor NF-kappa B. *J Biol Chem* 1995;270(18):10631–9.
- [35] Han SS, Keum YS, Seo HJ, Surh YJ. Curcumin suppresses activation of NF-kappaB and AP-1 induced by phorbol ester in cultured human promyelocytic leukemia cells. *J Biochem Mol Biol* 2002;35(3):337–42.
- [36] Lamph WW, Wamsley P, Sassone-Corsi P, Verma IM. Induction of proto-oncogene JUN/AP-1 by serum and TPA. *Nature* 1988;334(6183):629–31.
- [37] Lee W, Mitchell P, Tjian R. Purified transcription factor AP-1 interacts with TPA-inducible enhancer elements. *Cell* 1987;49(6):741–52.
- [38] 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(6):445–600.
- [39] Moffat GJ, McLaren AW, Wolf CR. 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(23):16397–402.
- [40] Reed JC. Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol* 2000;157(5):1415–30.
- [41] Mukhopadhyay A, Bueso-Ramos C, Chatterjee D, Pantazis P, Aggarwal BB. Curcumin downregulates cell survival mechanisms in human prostate cancer cell lines. *Oncogene* 2001;20(52):7597–609.
- [42] Bush JA, Cheung Jr KJ, Li G. Curcumin induces apoptosis in human melanoma cells through a Fas receptor/caspase-8 pathway independent of p53. *Exp Cell Res* 2001;271(2):305–14.
- [43] Barthi AC, Donato N, Singh S, Aggarwal BB. Curcumin (diferuloylmethane) down-regulates the constitutive activation of nuclear factor-kappa B and Ikappa Balpha kinase in human multiple myeloma cells, leading to suppression of proliferation and induction of apoptosis. *Blood* 2003;101(3):1053–62.
- [44] Advani AS, Pendergast AM. Bcr-Abl variants: biological and clinical aspects. *Leuk Res* 2002;26(8):713–20.
- [45] Piwocka K, Zablocki K, Wieckowski MR, Skierski J, Feiga I, Szopa J, Drela N, Wojtczak L, Sikora E. A novel apoptosis-like pathway, independent of mitochondria and caspases, induced by curcumin in human lymphoblastoid T (Jurkat) cells. *Exp Cell Res* 1999;249(2):299–307.
- [46] Singhal SS, Awasthi S, Pandya U, Piper JT, Saini MK, Cheng JZ, Awasthi YC. The effect of curcumin on glutathione-linked enzymes in K562 human leukemia cells. *Toxicol Lett* 1999;109(1/2):87–95.
- [47] Tidefelt U, Elmhorn-Rosenborg A, Paul C, Hao XY, Mannervik B, Eriksson LC. Expression of glutathione transferase pi as a predictor for treatment results at different stages of acute nonlymphoblastic leukemia. *Cancer Res* 1992;52(12):3281–5.
- [48] Morales A, Garcia-Ruiz C, Miranda M, Mari M, Colell A, Ardite E, Fernandez-Checa JC. Tumor necrosis factor increases hepatocellular glutathione by transcriptional regulation of the heavy subunit chain of gamma-glutamylcysteine synthetase. *J Biol Chem* 1997;272(48):30371–9.
- [49] Baud V, Karin M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol* 2001;11(9):372–7.
- [50] Gilot D, Loyer P, Corlu A, Glaire D, Lagadic-Gossmann D, Atfi A, Morel F, Ichijo H, Guguen-Guillouzo C. Liver protection from apoptosis requires both blockage of initiator caspase activities and inhibition of ASK1/JNK pathway via glutathione *S*-transferase regulation. *J Biol Chem* 2002;277(51):49220–9.

PUBLICATION 3

Curcumin-Induced Cell Death in Two Leukemia Cell Lines: K562 and Jurkat

A. DUVOIX,^a F. MORCEAU,^a M. SCHNEKENBURGER,^a S. DELHALLE,^a
M.M. GALTEAU,^b M. DICATO,^a AND M. DIEDERICH^a

^aLaboratoire RCMS, Centre Universitaire du Luxembourg, 162A Avenue de la
Faïencerie, L-1511 Luxembourg, Luxembourg

^bLaboratoire Thiols et Fonctions Cellulaires, Faculté de Pharmacie, Université Henri
Poincaré-Nancy 1, 30 rue Lionnois, 54000 Nancy, France

ABSTRACT: Curcumin presents strong antioxidant and anticancer properties. However, molecular mechanisms leading to curcumin-induced cell death are poorly understood. The effect of curcumin was compared in two different leukemia cell lines: K562 and Jurkat. Cell death was induced in both cell lines, and apoptosis pathways were investigated by Western blot analysis. Decreases in pro-caspase 8 and 9 levels were observed. BH₃ interacting domain death agonist (Bid) was also cleaved. Jurkat cells appeared to be more sensitive to curcumin, and apoptosis takes place earlier.

KEYWORDS: curcumin; leukemia; apoptosis

INTRODUCTION

Curcumin, the yellow pigment extracted from *Curcuma longa*, has shown strong anticancer and antioxidant properties. Its chemopreventive effect and ability to induce cell death in leukemia cell lines could become of therapeutic importance. We compare here its effect on two different leukemia cell lines: K562, a Philadelphia-positive CML and Jurkat, a T cell leukemia. K562 cells present the Bcr/Abl translocation that decreases apoptosis and upregulates cell proliferation. By Western blot analysis we show that curcumin induces apoptosis in both cell lines and that Jurkat T cells are more sensitive to curcumin than is the K562 cell line.

MATERIALS AND METHODS

Cells were cultured for 72 h with 0.1% FCS before treatment with curcumin (Sigma, Bornem, Belgium). They were then harvested and washed with PBS 1X and the total protein content was extracted with the M-Per Mammalian Protein Extraction

Address for correspondence: M. Diederich, Centre Universitaire du Luxembourg, 162A avenue de la faïencerie, L-1511 Luxembourg, Luxembourg. Voice: +352 46 66 44 432; fax: +352 46 66 44 438.

diederich@cu.lu

Ann. N.Y. Acad. Sci. 1010: 1–4 (2003). © 2003 New York Academy of Sciences.
doi: 10.1196/annals.1299.001

Reagent (Pierce, Rockford, USA). Proteins were separated by SDS-PAGE, transferred on Hybond P membrane (AP-Biotech, Little Chalfont, UK) and incubated with anti-pro-caspase 8, -pro-caspase 9, BH₃ interacting domain death agonist (Bid), and β -actin antibodies. Membranes were then incubated with secondary anti-rabbit or anti-mouse antibodies; proteins of interest were visualized with ECL-plus Western blot detection reagent (AP-Biotech). Cytotoxicity was measured with Cytotox 96@ Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega) by determining the quantity of lactate dehydrogenase (LDH released in the medium).

RESULTS

Cells from the two leukemia cell lines, K562 and Jurkat, were treated for 24 h with different concentrations of curcumin, and the cytotoxicity of this chemopreventive agent was measured. FIGURE 1A shows that Jurkat T cells are more sensitive to culture in 0.1% FCS, as 50% of the cells were dead after 72 h and only 20% of the K562 cells were dead after the same treatment. Curcumin treatments, then, induce more cell death, and 100% of cell death is obtained with 10 μ M and 20 μ M of curcumin for Jurkat and K562 cells, respectively.

Curcumin was then used at 20 μ M in both K562 and Jurkat cell lines. Proteins were extracted and analyzed by Western blotting using anti-pro-caspase 8, anti-pro-caspase 9, anti-Bid antibodies and anti- β -actin antibodies. In both cell lines, pro-caspase 8 and 9 levels were reduced by curcumin treatments (FIG. 1B). In Jurkat cells, pro-caspase 8 and 9 decrease at 6 h to disappear at 24 h. Interestingly, in K562

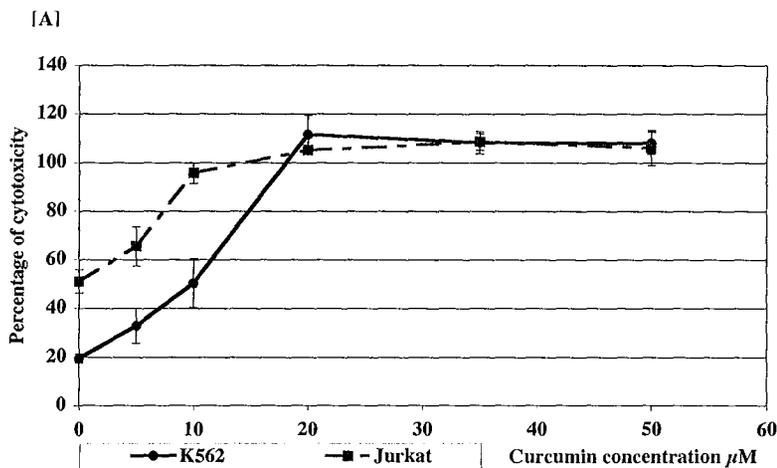


FIGURE 1A. Effect of curcumin on K562 and Jurkat cell lines: Percentage of cell death after 24-h curcumin treatment. LDH release was measured with Cytotox 96@ Non-Radioactive Cytotoxicity Assay.

[B]

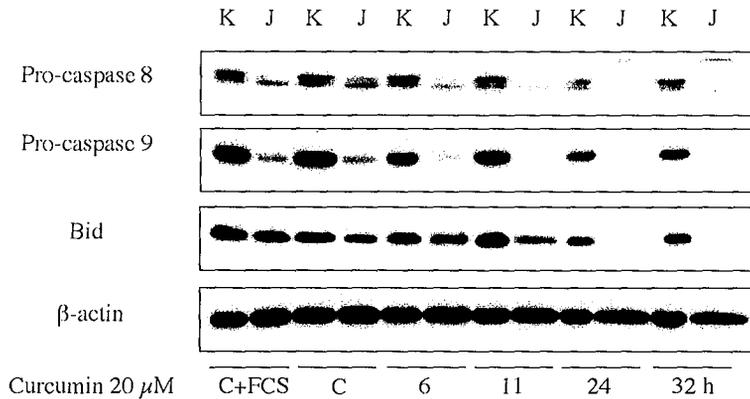


FIGURE 1B. Effect of curcumin on K562 and Jurkat cell lines: Western blotting of total protein extract after 20- μ M curcumin treatments using anti-pro-caspase 8, anti-pro-caspase 9, Bid and β -actin antibodies. K: K562 cell line; J: Jurkat cell line; C+FCS: untreated cells cultured in 10 % FCS medium; C: untreated cells cultured in 0.1 % FCS medium.

cells, pro-caspase 8 and 9 are reduced at 24 h without disappearing, even at 32 h. These results indicate that apoptosis is induced in both leukemia cell lines by curcumin even if they react differently to the treatment. It shows that both mitochondrial and receptor apoptosis pathways are used in both cell lines. To confirm this, we used anti-Bid antibody. Indeed, mitochondrial pathway is induced through the cleavage of Bid and its insertion in the mitochondrial membrane. Western blottings reveal that Bid is cleaved in Jurkat cell line at 24 h. Levels of intact Bid are reduced in the K562 cell line at 32 h. These data confirm the fact that both apoptosis pathway are used in leukemia cell lines and that K562 cells are less sensitive to curcumin treatments than Jurkat cells. Hybridization with β -actin shows a regular pattern, indicating that the same amount of protein was charged onto the gel.

DISCUSSION

Curcumin is a compound known for its anti-inflammatory¹ and anti-carcinogenic properties.² Indeed, it can reduce cancer incidence as well as tumor progression. One way curcumin can fight cancer is to induce apoptosis in transformed cells. It has been shown that curcumin alone induced programmed cell death in the Jurkat cell line.³ Mukhopadhyay *et al.* showed in 2001 that curcumin also induced apoptosis in human androgen-dependent LNCaP as well as in androgen-independent DU145 human prostate cancer cell lines by downregulating the expression of Bcl-2 and Bcl-XL and the activation of the pro-caspases 3 and 8.⁴ Similar results were obtained by Bush *et al.* by using a melanoma cell model.⁵ Our results agree with the data showed

by Barthi *et al.* demonstrating that curcumin induces caspases 7 and 9 in multiple myeloma cells.⁶ We also show here that curcumin is able to induce apoptosis in the K562 cell line, which is Philadelphia-positive and thus apoptosis-resistant.

In conclusion, our work demonstrates the ability of curcumin to provoke programmed cell death in leukemia cell death, showing its anti-cancer property.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank B. Aggarwal for helpful discussions. This work was supported by the Fondation de Recherche "Cancer et Sang." A.D. and M.S. are supported by fellowships from the Government of Luxembourg. This work was in part supported by the Télévie grant 7.4577.02.

REFERENCES

1. GUKOVSKY, I., C.N. REYES, E.C. VAQUERO, *et al.* 2003. Curcumin ameliorates ethanol and nonethanol experimental pancreatitis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **284**: G85–95.
2. IKEZAKI, S., A. NISHIKAWA, F. FURUKAWA, *et al.* 2001. Chemopreventive effects of curcumin on glandular stomach carcinogenesis induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine and sodium chloride in rats. *Anticancer Res.* **21**: 3407–3411.
3. PIWOCKA, K., K. ZABLOCKI, M.R. WIECKOWSKI, *et al.* 1999. A novel apoptosis-like pathway, independent of mitochondria and caspases, induced by curcumin in human lymphoblastoid T (Jurkat) cells. *Exp. Cell. Res.* **249**: 299–307.
4. MUKHOPADHYAY, A., C. BUESO-RAMOS, D. CHATTERJEE, *et al.* 2001. Curcumin down-regulates cell survival mechanisms in human prostate cancer cell lines. *Oncogene* **20**: 7597–7609.
5. BUSH, J.A., K.J. CHEUNG, JR. & G. LI. 2001. Curcumin induces apoptosis in human melanoma cells through a Fas receptor/caspase-8 pathway independent of p53. *Exp. Cell Res.* **271**: 305–314.
6. BHARTI, A.C., N. DONATO, S. SINGH & B.B. AGGARWAL. 2003. Curcumin (diferuloylmethane) down-regulates the constitutive activation of nuclear factor-kappa B and Ikappa Balpha kinase in human multiple myeloma cells, leading to suppression of proliferation and induction of apoptosis. *Blood* **101**: 1053–1062.

PUBLICATION 4

Regulation of Glutathione S-transferase P1-1 gene expression by NF-kappaB in tumor necrosis factor alpha-treated K562 leukemia cells

Franck Morceau, Annelise Duvoix, Sylvie Delhalle, Michaël Schnekenburger, Mario Dicato, Marc Diederich^o

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.

^oCorresponding author: Tel.: +352 46 66 44 434; Fax : +352 46 66 44 438

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

Classification : 1. Molecular and Cellular Pharmacology

Abbreviations : GST, Glutathione S-transferase; NF-κB, Nuclear Factor kappa-B; TNFα, Tumor Necrosis Factor alpha.

Abstract

Glutathione *S*-transferases (GST) play an important role in the protection of cells against xenobiotics and lipid hydroperoxides generated by oxidative stress. In human, the GSTP1-1 expression is commonly increased in many tumors and involved in the development of antineoplastic drug resistance. Reactive oxygen species are released at inflammation sites and oxidative stress conditions enhance the expression of genes encoding antioxidant enzymes such as GSTs. Here we investigated the regulation of the *GSTP1-1* gene expression in the K562 cell line by nuclear factor κ B (NF- κ B) and the pro-inflammatory cytokine tumor necrosis factor alpha (TNF α). By studying *GSTP1-1* mRNA expression and NF- κ B/*GSTP1-1* promoter interactions, we showed the implication of NF- κ B in the *GSTP1-1* gene expression and we described a new specific TNF α -inducible NF- κ B binding site upstream of the minimal promoter. Moreover, TNF α treatment as well as cotransfection of NF- κ B signaling pathway intermediates induced an activation of the *GSTP1-1* gene promoter in K562 cells. Site-directed mutagenesis of the NF- κ B site strongly inhibited TNF α - and NF κ B p65-induced promoter activation. Altogether, we showed that a sequence located at -323/-314 within the *GSTP1-1* promoter bound NF- κ B p50/65 and p65/p65 dimers and that this κ B site was involved in the regulation of the gene by TNF α .

Keywords: GSTP1-1; TNF α ; NF- κ B; leukemia; Inflammation; K562.

1. INTRODUCTION

Glutathione *S*-transferases (GSTs) (EC 2.5.1.18) are phase II metabolizing enzymes which catalyze the conjugation of a wide range of electrophilic compounds, including carcinogens, mutagens and anticancer drugs [1-6], to the ubiquitous tripeptide glutathione (GSH). Therefore, GSTs play an important role in the protection of cells against the toxicity of xenobiotic compounds and lipid hydroperoxides generated by oxidative stress [7, 8]. In leukemic lineages, studies of the expression and the activity of GST isoenzymes revealed that the human Pi class GST isoform (*GSTP1-1*) is the most represented, particularly in U937, K562 and Jurkat cells [9]. *GSTP1-1* is commonly increased in many tumors [10-14] and involved in the development of antineoplastic drug resistance [15-18]. Interestingly, *GSTP1-1* has been shown to be involved in preventing apoptosis in hematopoietic cells [19] and to protect against H₂O₂-induced cell death *via* the coordinated regulation of stress kinases [20]. On the other hand, the gene expression of inflammatory and immune responses [21-23] as well as antioxidant enzyme genes such as GSTs [24, 25] are enhanced in oxidative stress conditions. However, molecular mechanisms of the *GSTP1-1* gene regulation are poorly understood. It has been shown that the region between -80 and -8 is necessary for constitutive expression of the gene [26] and the organization of a minimal promoter has been described [27]. As shown in Fig. 1, *cis*-acting elements were identified within the minimal promoter [28]. The role of the activator protein 1 (AP-1) binding site -69/-63 has been shown in the regulation of the *GSTP1-1* gene expression, notably in VCREMS breast cancer cells [29]. In addition, we have demonstrated by promoter deletion analyses that this site was crucial for 12-O-tetradecanoyl phorbol 13-acetate (TPA)-mediated GSTP1 gene transcription [30]. Two Sp1 response elements were also identified [31] as well as a NF-κB like sequence [32, 33].

As GSH cellular redox status is critical for various biological phenomena including apoptosis and inflammation [34, 35] we hypothesized that inflammation could modulate *GSTP1-1* gene expression. Indeed, reactive oxygen species (ROS) are released at inflammation sites and can be eliminated from cells after conjugation to GSH by GSTP1-1. TNF α also known as cachectin or differentiation-inducing factor (DIF) [36] causes inflammation, tumorigenesis, cellular differentiation and proliferation, necrotic and apoptotic cell death, by binding to TNF receptors (TNFR) 1 and 2 [37-39]. However, it is widely admitted that binding of TNF α to TNFR1 initiates the majority of the biological activities of TNF α [40]. This interaction leads to the dissociation of the silencer of the death domain from the intracellular death domain (DD) of TNFR1. The TNF receptor-associated death domain (TRADD) then interacts with TNFR1 through its DD sequence and recruits other adaptor proteins among which the TNF-R-associated receptor 2 (TRAF2). TRAF2 interacts with the NF- κ B inducing kinase (NIK) which phosphorylates the enzyme inhibitor of κ B kinase (IKK), itself implicated in the activation of the NF- κ B transcription factors family by phosphorylation of inhibitor of κ B (I κ B) leading to its degradation by the proteasome. The mammalian NF- κ B transcription factors are involved in immune and inflammatory responses as well as cell growth. They reside in the cytoplasm in an inactive homo- or heterodimer form bound to inhibitory proteins of the I κ B family [41, 42]. NF- κ B activation results in its translocation to the nucleus where it will interact with its target genes, although NF- κ B may shuttle between nucleus and cytoplasm in unstimulated cells [43, 44]. Redox-sensitive transcription factors such as NF- κ B and AP-1 are known to play a key role in proinflammatory processes such as transcription of cytokine genes, and in induction of protective antioxidant genes [45-47]. These transcription factors are modulated by TNF α [48, 49] and anticancer drugs which may induce oxidative stress stimulating various signaling pathways including NF- κ B [50, 51].

Considering the role of the GSTP1-1 enzyme in the cellular response to oxidative stress, we investigated the involvement of both TNF α and NF- κ B in the regulation of *GSTP1-1* gene expression in K562 cells. We demonstrated that the *GSTP1-1* promoter is activated by TNF α and NF- κ Bp65 overexpression in K562 cells and we identified a new TNF α -inducible NF- κ B binding site located at -323 within the *GSTP1-1* promoter. The deletion of this site led to a drastic decrease of the TNF α -induced activation of the *GSTP1-1* promoter gene. Altogether, we report here for the first time that the *GSTP1-1* gene expression is inducible by the TNF α signaling cascade leading to NF- κ B-activated *GSTP1-1* promoter.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture

The human chronic myeloid leukemia (CML) K562 cell line (American Type Culture Collection), was maintained in culture in RPMI 1640 with Ultraglutamine 1 containing 10% fetal calf serum (FCS, BioWhittaker) and supplemented with a penicillin-streptomycin-fungizone mixture 100X (BioWhittaker). The cells in exponential growth phase were cultured in 0.1% FCS containing medium for 48 hours before TNF α treatments.

2.2. Reagents and antibodies

TNF- α (Sigma) was resuspended in a 0.5 % bovine serum albumin solution in sterile PBS (1X) at 10 μ g/ml. Stock solutions of NF- κ B inhibitors (all Calbiochem), carbobenzoxy-L-leucyl-L-leucyl-L-leucinal (MG-132) and (E)3-[(4-methylphenyl)sulfonyl]-2-propenenitrile (BAY11-7082), were

resuspended at 20 mM in ethanol and 10 mM in dimethyl sulfoxide respectively. When used, NF- κ B inhibitors were added to the cell cultures 2 hours prior TNF α treatments. The anti-Rel protein antibodies α p50, α p52, α p65, α c-Rel, α relB and α Bcl3 were purchased from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Sanvertech).

2.3. DNA sequence analysis

GSTP1-1 promoter sequence was analysed using Matinspector (Genomatix) [52]

2.4. Nuclear protein extraction and electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

Nuclear proteins from 10^7 cells were prepared as previously described [53] in the presence of protease inhibitors pepstatin, leupeptin, aprotinin (Roche, Prophac), 1, 10-phenanthroline and phenylmethylsulfonyl fluoride. Nuclear protein/DNA binding activity and electrophoretic runs were performed as previously described [54]. Briefly, 10 μ g nuclear extracts were incubated for 30 min on ice with [γ - 32 P]ATP-labeled oligonucleotides in 20 μ l reaction mixture containing protease inhibitors, 10 mM Tris-HCl, pH 8.5, 5 % glycerol, 50 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.5 mM dithiothreitol, 1 mM MgCl $_2$, 2.5 mM poly(dI-dC), 0.2 μ g/ μ l BSA and 4 mg/ml spermidine. Reaction mixtures were loaded onto a 5 % polyacrylamide gel (29:1 cross-linking ratio) and electrophoresis were performed. In supershift/immunodepletion experiments, the nuclear extracts and labeled probes were incubated in the reaction mixture for 30 min on ice prior a 30 min incubation with 2 μ g antibody on ice. In competition experiments nuclear extracts and 50 fold molar excess of unlabeled probes were pre-incubated in the reaction mixture for 20 min on-ice. The human recombinant protein NF- κ Bp50 at 50 gsu (for gel shift units) (Promega) was 30 fold diluted in an anti-proteases containing solution before use and 1 μ l was incubated in the presence of oligonucleotidic probes. Sequences of DNA

oligonucleotides sense strands (Eurogentec) were as follows : probe -323κB (-328 to -306) 5'-TCTTAGGGAATTTCCCC CCGCGA-3' ; probe -98κB (-104 to -82) 5'-GTCCGCGGGACCCTCCAGAAGAG-3' ; probe -323κBM corresponding to the -323κB mutated one 5'-TCTTACTCAATTTCCCCCGCGA-3' ; probe CκB containing consensus NF-κB binding sequence from the immunoglobulin light κ chain gene 5'-AGTTGAGGGGACTTTCCAGGC-3'. Sense and antisense strands, 150 μg each, 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 : 5 min at 90° C, 10 min at 65° C, 10 min at 37° C and 10 min at 20° C. The double strand oligonucleotides were ³²P-labelled at the 5'-ends by the polynucleotide kinase PNK (Roche, Prophac) following manufacturer's instructions with [γ-³²P]ATP 7000 Ci/mmol (ICN) and purified on a spin column QIAquick Nucleotide Removal Kit (Qiagen, Westburg).

2.5. RNA extraction and Northern blot analysis

Total RNA was isolated from 10⁷ treated or untreated cells using NucleoSpin RNAII kit (Macherey-Nagel) and 10 μg RNA were submitted to electrophoresis in a 1% agarose gel followed by transfer to nylon membrane (Hybond XL, Amersham AP Biotech) using a vacuum blotter (Appligene). Membranes were pre-hybridized for 1 hour in the presence of 200 μg/ml herring sperm DNA and 100 μg/ml yeast tRNA at 42° C in 10 ml hybridization buffer (50 % (v/v) formamide, 6X SSC, 5 mM EDTA, 0.1 % (v/v) SDS and 5X Denhart's). Membranes were then hybridized with 25 ng GSTP1-1 probe and rehybridized with 25 ng GAPDH probe overnight at 42° C in 10 ml hybridization buffer containing herring sperm DNA and yeast tRNA. Membranes were washed 5 min with 2X SSC, 0.5 % (v/v) SDS at room temperature, 3 times 5 min with 2X SSC, 0.1 % (v/v) SDS at room temperature, and 3 times 30 min with 1X SSC, 0.1 % (v/v) SDS at 55° C. cDNA probes were ³²P-labeled by

random priming using RediprimeII kit (AP-Biotech). Quantifications were performed by phosphorimaging the membranes on a Cyclone (Perkin-Elmer).

2.6. Plasmid constructs

Human genomic DNA was extracted from human peripheral blood cells following standard procedures. Primers and experimental conditions used for the PCR amplification of a 396 bp and a 1175 bp region from the *GSTP1-1* gene promoter on the basis of sequences deposited in GenBank [26] (Accession Number X08058) were previously described [30]. The PCR products were subcloned into a pCRII-Topo plasmid (Invitrogen), excised by *KpnI* and *HindIII*, and then cloned in the dephosphorylated pGL3-Enhancer plasmid (Promega). The final constructs were named -396pGSTP and -1175pGSTP according to the size of promoter region cloned relative to the transcriptional start site. The 5XpκB-323 was prepared by cloning five copies of the -323 to -314 sequence from the *GSTP1-1* gene promoter in the *HindIII/XhoI* sites of a pMCS vector (Stratagene). The five copies of the consensus NF-κB sequence containing pMCS vector was named 5XpκB-C (Stratagene). TNFR1, TRAF2, p65, NIK, IκB-DN and IKKβ expression vectors were kindly provided by B. Aggarwal [37]. Deletion of the -323/-314 NF-κB site was obtained by directed mutagenesis and led to the pGST-Mut-NFκB reporter plasmid. Mutagenesis was performed by PCR using the GeneTaylor kit (Invitrogen), according to manufacturer's instructions. Due to the high G-C content of the promoter sequence, PCRx Enhancer System (Invitrogen) was added to the reaction mixture to allow amplification. Sequences of the primers spanning the NF-κB distal site were as follows: sense, 5'-ATCGCAGCGGTCTTACCCCGCGATGT-3'; antisense, 5'-TAAGACCGCTGCGATCCCGGAGCTT-3'. Primers synthesis and sequencing of the mutated plasmids in both orientations were made by Eurogentec.

2.7. Transient transfections

Transfections of K562 cells were performed by electroporation using a BioRad gene Pulser. For each experiment 3.75×10^6 cells at a concentration of 1.5×10^7 cells/ml were electroporated at the following settings: 250 V and 500 μ F. Five micrograms luciferase reporter gene construct and 5 μ g Renilla plasmid have been used for each pulse. After 48 hours the cells were harvested and resuspended in growth medium (RPMI/FCS 10%) to a final concentration of 10^5 cells/ml in wells of microtitration plates and then treated or not. Following treatments, 75 μ l Dual-GloTM Luciferase Reagent were added to cells for a 10 minutes-incubation at 22° C before luciferase activity assay. Then, 75 μ l Dual-GloTM Stop & Glo® Reagent were added for 10 min. at 22° C in order to assay Renilla activity. Luciferase and Renilla activities were measured using a Berthold Orion microplate luminometer (Berthold) by integrating peaks of light emission for 10 s. Data are relative values of firefly luciferase normalized to Renilla luciferase.

3. Results

3.1. Effect of TNF α and BAY11-7082 on the *GSTP1-1* mRNA expression

Tumor necrosis factor α is an activator of the NF- κ B signal transduction pathway and of reactive oxygen species (ROS) production, which can be conjugated to GSH. In order to determine the effect of TNF α on *GSTP1-1* expression, K562 cells were treated for 15 hours with various concentrations of TNF α , then total RNA were extracted and analyzed by Northern blot (Fig.2A). To investigate whether the TNF α -induced *GSTP1-1* mRNA expression could involve NF- κ B transcription factors, K562 cells were treated with the inhibitor of TNF α -induced I κ B α phosphorylation, BAY11-7082, for 2 hours, prior to a 15-hour TNF α treatment (Fig.2B). Quantification of *GSTP1-1* mRNA levels showed a significant increase (1.6 fold) in cells treated with 20 ng/ml TNF α as well as a reduction by BAY11-7082 of the TNF α -induced *GSTP1-1* mRNA increase (-72 %) (Fig.2C). Neither TNF α nor BAY11-7082 had an effect on the expression of the human GAPDH mRNA.

3.2. Effect of TNF α on the *GSTP1-1* promoter activity

According to the increased expression of the *GSTP1-1* mRNA induced by TNF α we examined the *GSTP1-1* promoter activity in TNF α -treated K562 cells by performing reporter gene transfection assays. K562 cells were transiently transfected with the reporter -1175pGSTP plasmid in which the luciferase gene is driven by a *GSTP1-1* promoter region (see Experimental Procedures section). Transfected cells were treated with 20 ng/ml TNF α for 8 hours. As shown in Fig. 3, TNF α induced a 2.9 fold activation of the *GSTP1-1* gene promoter suggesting that TNF α signal transduction cascade is able to activate the *GSTP1-1* gene transcription.

3.3. Binding activity of two putative NF- κ B sequences within the *GSTP1-1* promoter gene

3.3.1. Effect of TNF α on the binding activity of the putative NF- κ B sites

As NF- κ B inhibition altered the effect of TNF α -induced expression of the *GSTP1-1* mRNA in K562 cells, we investigated the capacity of the *GSTP1-1* promoter to interact with a NF- κ B dimer by electromobility shift assay (EMSA). We thus studied the NF- κ B like site (-98 to -89) as well as a putative NF- κ B sequence in position -323/-314 which was identified by DNA sequence analysis as well as the corresponding mutated sequences. We examined the capacity of TNF α to induce the binding activity on both NF- κ B sites. Moreover, the oligonucleotidic probe C- κ B, containing the consensus NF- κ B binding site, was used as a positive control. With the C- κ B probe two binding complexes were increased in TNF α -treated cells, whatever the concentration used (Fig.4A). Using the -98 κ B probe, a single binding complex unaffected by TNF α treatments was formed (Fig.4B). In contrast, the -323 κ B probe showed a similar pattern to that of the C- κ B probe with two binding complexes (C1 and C2) which were strongly induced by TNF α (Fig. 4C). The mutation within the putative NF- κ B -323/-314 sequence abolished the TNF α -specific bindings (Fig. 4D). These results suggest that C1 and C2 are composed of nuclear factors which specifically bind to the -323/-314 region.

3.3.2. Specificity of TNF α -induced binding complexes and effect of NF- κ B inhibitors

Binding specificity of C1 and C2 was then determined by EMSA using cold competitor oligonucleotides (Fig. 5A). TNF α -induced K562 nuclear extracts were incubated in the presence of radiolabeled -323 κ B probe and with a 50 fold molar excess of the corresponding or the C- κ B

unlabeled probe. In these conditions C1 and C2 bindings were competed whereas the -323κBM unlabeled probe failed to abolish the binding confirming the specificity of C1 and C2 complexes. In addition, treatments by BAY11-7082 or the proteasome inhibitor MG132 prior to TNFα exposure suppressed induction of C1 and C2 binding by TNFα (Fig. 5A). Moreover, human recombinant NF-κB p50 subunit bound to the -323κB probe but not to the -93κB probe (Fig. 5B). Altogether, data show that the -323/-314 sequence specifically binds TNFα-inducible NF-κB dimers whereas the -98κB site does not act as a NF-κB binding site in our leukemia model.

3.3.3. Composition of the induced binding complexes

To further characterize these complexes, immunodepletion experiments were performed with antibodies directed against p50, p52, p65, c-Rel, RelB and Bcl3. As shown in Fig. 6, TNFα-induced binding complexes C1 and C2 disappeared in presence of αp50 and αp65 antibodies. Thus, complex C1 corresponds to a NF-κB p65/p65 homodimer whereas the main complex C2 is identified as a NF-κB p50/p65 heterodimer. Other antibodies did not affect either the specific or the unspecific bindings. No supershift or immunodepletion was detected in experiments using the -98κB probe. Results led us to conclude that the -323κB site specifically binds the TNFα-induced NF-κB p50/p65 and p65/p65 dimers whereas the -98κB site is not a NF-κB binding site in K562 leukemia cells.

3.4. Activation of GSTP1-1 promoter by TNFα signaling pathway via the -323NF-κB site

Our previous results showed an increased binding to the -323NF-κB site in response to TNFα indicating that this cytokine may be able to regulate *GSTP1-1* gene transcription through this response element. In order to determine whether the -323NF-κB site is sensitive to TNFα treatment,

K562 cells were transfected with reporter plasmids containing five copies of the -323/-314 NF- κ B site (5X κ B-323) or five repeats of a consensus NF- κ B site from (5X κ B-C) (Fig. 7A). TNF α -treatment for 8 hours of cells transfected with 5X κ B-323 or 5X κ B-C resulted in a 14.6 fold and 6.8 fold stimulation respectively. Results are consistent with the activation of the promoter and *GSTP1-1* mRNA expression by TNF α in K562 cells, *via* the identified NF- κ B site.

In addition, expression vectors of the TNF α pathway intermediates (TNFR1, TRAF2, NIK, IKK β , I κ B-DN, NF- κ B p65) were co-transfected with the 5X κ B-323 reporter plasmid into K562 cells (Fig. 7B). NF- κ Bp65 as well as NIK overexpression induced the most effective promoter activation with a 35.6 and a 33 fold activation, respectively. TRAF2 and TNFR1 expression vectors induced a 20.6 and a 6.5 fold increase respectively whereas the activation by IKK β was 3.7 fold increased only. The expression of dominant negative I κ B α (I κ B-DN) totally inhibited luciferase activity.

Furthermore, co-transfection of -396pGSTP reporter plasmid with the same NF- κ B expression vectors led to a significant increase of reporter gene activity (Fig. 8A). NF- κ Bp65 as well as NIK overexpression induced the most effective promoter activation with a 16.5 and a 8 fold activation, respectively. TRAF2 and TNFR1 expression vectors induced a 3 and a 1.5 fold increase respectively whereas the activation by IKK β did not induce any increase. The expression of dominant negative I κ B α (I κ B-DN) again inhibited luciferase activity. In contrast, a construct without a functional NF- κ B site at -323 obtained by site-directed mutagenesis (pGST-Mut-NF κ B) significantly reduced the reporter gene activity with or without a cotransfection with a p65 expression vector (-28 % and -56 % respectively) (Fig. 8B). Taken together these results demonstrate that TNF α activates the *GSTP1-1* gene through the -323NF- κ B site.

4. Discussion

TNF α regulates various cellular mechanisms, particularly immune responses, by induction of specific early responsive genes among which transcription factors such as *c-jun* and NF- κ B [55, 56]. TNF α production is increased in a number of stressful and pathological states and as a proinflammatory cytokine it promotes cell damage through several mechanisms including the overproduction of ROS which is responsible for TNF α toxicity especially in cancer cells [23, 57, 58]. Besides, it has been reported that TNF α induces several protective genes among which enzymes of the (GSH) metabolism such as γ -glutamylcysteine synthetase in HepG2 cells [59] and the murine GSTA4 in regenerating liver [60]. Our present study investigates for the first time the potential role of TNF α as well as the NF- κ B family of transcription factors in *GSTP1-1* gene expression in human leukemia cells. First of all, an increase in mRNA expression was observed in TNF α -treated K562 cells and transient transfection assays clearly showed an activation of the *GSTP1-1* promoter gene. In addition, inhibition of TNF α -induced mRNA expression using the specific I κ B α phosphorylation inhibitor BAY11-7082 [61] supported our hypothesis that NF- κ B is involved in the *GSTP1-1* gene activation by TNF α . Results obtained by Mori et al. recently demonstrated that BAY11-7082 could be used as a suitable therapeutic agent to treat T cell leukemia since NF- κ B pathway is crucial in the development of this pathology and apoptotic resistance [62]. Other detoxifying enzymes including the multidrug resistance P-glycoprotein (MDR1) are inhibited by BAY11-7082 in kidney proximal tubule cells when stimulated with cadmium [63]. Studies by Hideshima et al, [64] demonstrate that proteasome inhibitors such as PS1145 and PS341 inhibit TNF α -induced NF- κ B activation in a dose and time dependant fashion in multiple myeloma cells. Therefore, proteasome inhibitors are also of interest as therapeutic tools for inhibition of *GSTP1-1*-related drug resistance mechanisms.

In order to determine whether NF- κ B could interact with *GSTP1-1* promoter, we performed electromobility shift assays (EMSA). One NF- κ B like (-98 κ B) binding site was previously described in the *GSTP1-1* promoter as a regulator element. However, few data about this site have been published and its role in the *GSTP1-1* gene regulation remains unclear. Indeed, the sequence -98/-89 was shown to act as a repressor binding site in the human mammary carcinoma cell line MCF7 whereas it was not effective in the VCREMS cells, a MCF7 multidrug-resistant derivative cell line [32]. Authors showed that the silencing effect of this NF- κ B like site occurred by interacting with the AP-1 site in MCF7 cells but not in the human bladder carcinoma EJ cells [32, 33]. In contrast, Zhang et al. provided evidence that this NF- κ B site is not involved in silencing the TRE/ARE function in keratinocytes [65]. On the other hand, Xia et al., [66] showed that response of *GSTP1* to oxidants is mediated by a NF- κ B like site while response to anti-oxidants is mediated by the AP-1 site. Thus, regulation of *GSTP1* can result from cooperation between NF- κ B like and AP-1 sites and the function of the -98/-89 sequence might be cell type and/or drug dependent. However, neither the capacity of the -98 κ B site to bind a NF- κ B dimer nor the involvement of this transcription factor in the *GSTP1-1* gene regulation had been demonstrated until now, particularly in leukemic cell lines in which the enzyme is largely expressed [9, 67]. By DNA sequence analysis [52] we identified a distal DNA sequence -323/-314 downstream from the minimal promoter as a putative NF- κ B binding site. We then studied binding activity of both putative κ B sites. EMSA experiments using K562 nuclear extracts and probes containing NF- κ B consensus from the immunoglobulin κ light chain (C- κ B) or the -323/-314 sequence (-323 κ B) exhibited similar patterns. Indeed, two binding complexes were induced by TNF α resulting from a specific interaction within the -323/-314 sequence as assessed by competition experiments with wild type (-323 κ B, C- κ B) and mutated (-323 κ BM) probes. In contrast, we observed a single binding activity on the NF- κ B like site (-98/-89) unaffected by TNF α .

treatments in K562 cells. Moreover, no binding of human recombinant NF- κ B p50 protein to this probe was observed suggesting fundamental differences in the potential roles of -98/-89 and -323/-314 sequences. Additional studies are needed to demonstrate the importance of the sequences flanking the two NF- κ B sites.

NF- κ B activation is regulated *via* a well known signaling pathway [13, 15, 16]. In order to characterize C1 and C2 bindings, we used MG-132 and BAY11-7082 which inhibit TNF α -induced NF- κ B by blocking proteasome activity and phosphorylation of I κ B α , respectively [61, 68]. The -323 κ B site was shown to bind TNF α -activated NF- κ B dimers since both specific complexes (C1 and C2) were inhibited by MG132 and BAY11-7082. C1 and C2 complexes were then identified by super-shift experiments as p65/p65 and p50/p65 NF- κ B dimers, respectively. In contrast, super-shift experiments did not reveal any binding of NF- κ B dimers to the -98 κ B probe.

In order to study the -323 κ B binding site we performed transfection experiments and so we could establish that its transactivation potential is similar to the one of the consensus site. Previous results clearly demonstrate that anti-inflammatory therapeutic agents block TNF-induced NF- κ B activation, I κ B α phosphorylation and activation of IKK, JNK, and AP-1, and suppressed TNF-induced apoptosis. Our results obtained by co-transfection of expression constructs coding for TNFR1, NIK, TRAF2, IKK β , I κ B α and p65/NF- κ B specifically show that TRAF2, NIK, I κ B α and NF- κ B/p65 are involved in the regulated activation of the *GSTP1-1* promoter. We show here for the first time that the *GSTP1-1* promoter is regulated by a TNFR1, TRAF2, NIK pathway which leads to activation of NF- κ B. The phosphorylation of I κ B α is regulated by a large number of kinases, including IKK- α , IKK- β , IKK- γ , NIK, TGF- β -activated kinase-1, AKT, and mitogen-activated protein/extracellular signal-related kinases. However, only IKK β mediates TNF-induced

phosphorylation of I κ B α at positions 32 and 36 which explains the strong negative effect of a dominant negative mutant of I κ B α in our assays. On the other hand, a mutated form of the -396pGSTP promoter shows a strongly reduced luciferase activity if co-transfected with p65/NF- κ B confirming the importance of NF- κ B in the expression of *GSTP1-1* gene. Nevertheless, this mutated construct maintains luciferase reporter gene activity which is potentially due to the presence of a consensus AP-1 site at -73. Our results confirm our previous reports describing the role of the -73 AP-1 site in constitutive and TPA-induced reporter gene activity [30].

The NF- κ B family of transcription factors is involved in acquisition of resistance to anticancer drugs as well as to apoptosis. NF- κ B-mediated *mdr1* gene upregulation is part of the anti-apoptotic protection mechanism of proximal tubule (PT) cells against cadmium-induced oxidative stress and apoptosis [63]. Bentires-Alj et al., [69] have recently shown a new relationship between NF- κ B and resistance to chemotherapy through the regulation of human *mdr1* gene expression since the inhibition of NF- κ B activity sensitizes resistant colon cancer cells to daunomycin through a decreased *mdr1* gene expression. In addition, NF- κ B seems to be an inducer of anti-apoptotic genes [70]. B cell chronic lymphocytic leukemia presents a strong resistance to apoptosis inducing agents due to expression of antiapoptotic genes such as the inhibitor of apoptosis protein (IAP) and TNF receptor associated protein TRAF gene families [71] which are NF- κ B target genes. Hodgkin's disease tumor cells constitutively activate NF- κ B p50 in Hodgkin/Reed-Sternberg cells preventing apoptosis under stress conditions [72]. Moreover, it is now admitted that most of the anticancer drug families [73-76] have in common the activation of NF- κ B [77] which leads to chemoresistance. Thus, inhibition of 5-Fluorouracil-activated NF- κ B by disulfiram enhances cytotoxicity of the DNA synthesis inhibitor in colorectal cancer cell lines [78] and activation of NF- κ B by topoisomerase poisons such as SN38 and doxorubicin protects HeLa cells from the apoptotic effect of the drugs [79].

We show here that *GSTP1-1* gene expression is regulated by NF- κ B as a wide range of genes involved in carcinogenesis and in apoptosis inhibition. NF- κ B contributes to the age-associated up-regulation of cyclooxygenase-2 [80] and controls the over-expression of the 12-lipoxygenase in human erythroleukemia cells [81]. As well, manganese superoxide dismutase (MnSOD) expression is induced by NF- κ B in epithelial cancer cells in response to TNF- α [82]. In the same way, *GSTP1-1* protein is involved in carcinogenesis and in resistance to apoptosis. Indeed, Gilot et al., [83] demonstrated that GSTP1-1 can inhibit Jun N-terminal Kinase (JNK), preventing apoptosis in rat hepatocytes and GSTP1/P2^(-/-) knock-out mice present increased JNK activity in liver and lung [84]. Furthermore, *GSTP1-1* is up-regulated in chronic lymphoid leukemia [85] and its overexpression has been associated with a severe prognosis in B cell lymphoma [86].

In conclusion, we report for the first time the binding activity of a functional NF- κ B site upstream of the minimal promoter of the *GSTP1-1* gene in K562 leukemia cell line whereas the previously described NF- κ B like sequence (-98 to -89) in the minimal promoter is not able to bind NF- κ B in our experimental conditions and cellular model. Together, our results show the activation of the *GSTP1-1* gene during inflammation and potentially during cancer. Further identification of the mechanisms underlying transcriptional control of *GSTP1-1* gene will be important for the development of novel therapeutic strategies in chemoresistant leukemia.

Acknowledgments

This work was supported by the "Fondation de Recherche Cancer et Sang", the "Recherches scientifiques Luxembourg" association as well as the Télévie grant 7.4577.02. AD and MS were supported by fellowships from the Government of Luxembourg. The authors thank Bharat Aggarwal for the kind gifts of TNFR1, TRAF2, NIK, p65, I κ B-DN and IKK β plasmids as well as for helpful discussions.

References

- [1] Black SM, Wolf CR. The role of glutathione-dependent enzymes in drug resistance. *Pharmacol Ther* 1991;51:139-54.
- [2] Coles B, Ketterer B. The role of glutathione and glutathione transferases in chemical carcinogenesis. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1990;25:47-70.
- [3] 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.
- [4] Mannervik B, Danielson UH. Glutathione transferases--structure and catalytic activity. *CRC Crit Rev Biochem* 1988;23:283-337.
- [5] Morrow CS, Cowan KH. Glutathione S-transferases and drug resistance. *Cancer Cells* 1990;2:15-22.
- [6] Tew KD. Glutathione-associated enzymes in anticancer drug resistance. *Cancer Res* 1994;54:4313-20.
- [7] Henderson CJ, McLaren AW, Moffat GJ, Bacon EJ, Wolf CR. Pi-class glutathione S-transferase: regulation and function. *Chem Biol Interact* 1998;111-112:69-82.
- [8] 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.
- [9] Wang L, Groves MJ, Hepburn MD, Bowen DT. Glutathione S-transferase enzyme expression in hematopoietic cell lines implies a differential protective role for T1 and A1 isoenzymes in erythroid and for M1 in lymphoid lineages. *Haematologica* 2000;85:573-9.
- [10] Kodate C, Fukushi A, Narita T, Kudo H, Soma Y, Sato K. Human placental form of glutathione S-transferase (GST-pi) as a new immunohistochemical marker for human colonic carcinoma. *Jpn J Cancer Res* 1986;77:226-9.
- [11] Carmichael J, Forrester LM, Lewis AD, Hayes JD, Hayes PC, Wolf CR. Glutathione S-transferase isoenzymes and glutathione peroxidase activity in normal and tumour samples from human lung. *Carcinogenesis* 1988;9:1617-21.

- [12] Peters WH, Nagengast FM, Wobbes T. Glutathione S-transferases in normal and cancerous human colon tissue. *Carcinogenesis* 1989;10:2371-4.
- [13] Moscow JA, Townsend AJ, Cowan KH. Elevation of pi class glutathione S-transferase activity in human breast cancer cells by transfection of the GST pi gene and its effect on sensitivity to toxins. *Mol Pharmacol* 1989;36:22-8.
- [14] Toffoli G, Viel A, Tumiotto L, Giannini F, Volpe R, Quaia M, Boiocchi M. Expression of glutathione-S-transferase-pi in human tumours. *Eur J Cancer* 1992;28A:1441-6.
- [15] Batist G, Tulpule A, Sinha BK, Katki AG, Myers CE, Cowan KH. Overexpression of a novel anionic glutathione transferase in multidrug-resistant human breast cancer cells. *J Biol Chem* 1986;261:15544-9.
- [16] Cowan KH, Batist G, Tulpule A, Sinha BK, Myers CE. Similar biochemical changes associated with multidrug resistance in human breast cancer cells and carcinogen-induced resistance to xenobiotics in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83:9328-32.
- [17] Whelan RD, Hosking LK, Townsend AJ, Cowan KH, Hill BT. Differential increases in glutathione S-transferase activities in a range of multidrug-resistant human tumor cell lines. *Cancer Commun* 1989;1:359-65.
- [18] Hao XY, Bergh J, Brodin O, Hellman U, Mannervik B. Acquired resistance to cisplatin and doxorubicin in a small cell lung cancer cell line is correlated to elevated expression of glutathione-linked detoxification enzymes. *Carcinogenesis* 1994;15:1167-73.
- [19] Cumming RC, Lightfoot J, Beard K, Youssoufian H, O'Brien PJ, Buchwald M. Fanconi anemia group C protein prevents apoptosis in hematopoietic cells through redox regulation of GSTP1. *Nat Med* 2001;7:814-20.
- [20] Yin Z, Ivanov VN, Habelhah H, Tew K, Ronai Z. Glutathione S-transferase p elicits protection against H₂O₂-induced cell death via coordinated regulation of stress kinases. *Cancer Res* 2000;60:4053-7.

- [21] Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *Embo J* 1991;10:2247-58.
- [22] Mihm S, Ennen J, Pessara U, Kurth R, Droge W. Inhibition of HIV-1 replication and NF-kappa B activity by cysteine and cysteine derivatives. *Aids* 1991;5:497-503.
- [23] Schulze-Osthoff K, Beyaert R, Vandevoorde V, Haegeman G, Fiers W. Depletion of the mitochondrial electron transport abrogates the cytotoxic and gene-inductive effects of TNF. *Embo J* 1993;12:3095-104.
- [24] Pinkus R, Weiner LM, Daniel V. Role of quinone-mediated generation of hydroxyl radicals in the induction of glutathione S-transferase gene expression. *Biochemistry* 1995;34:81-8.
- [25] Bergelson S, Pinkus R, Daniel V. Intracellular glutathione levels regulate Fos/Jun induction and activation of glutathione S-transferase gene expression. *Cancer Res* 1994;54:36-40.
- [26] 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;88:215-25.
- [27] 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 Commun* 1991;176:233-40.
- [28] Morrow CS, Cowan KH, Goldsmith ME. Structure of the human genomic glutathione S-transferase-pi gene. *Gene* 1989;75:3-11.
- [29] Moffat GJ, McLaren AW, Wolf CR. 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.
- [30] Borde-Chiche P, Diederich M, Morceau F, Wellman M, Dicato M. Phorbol ester responsiveness of the glutathione S-transferase P1 gene promoter involves an inducible c-jun binding in human K562 leukemia cells. *Leuk Res* 2001;25:241-7.

- [31] Moffat GJ, McLaren AW, Wolf CR. Sp1-mediated transcriptional activation of the human Pi class glutathione S-transferase promoter. *J Biol Chem* 1996;271:1054-60.
- [32] Moffat GJ, McLaren AW, Wolf CR. Functional characterization of the transcription silencer element located within the human Pi class glutathione S-transferase promoter. *J Biol Chem* 1996;271:20740-7.
- [33] Moffat GJ, McLaren AW, Wolf CR. Transcriptional and post-transcriptional mechanisms can regulate cell-specific expression of the human Pi-class glutathione S-transferase gene. *Biochem J* 1997;324 (Pt 1):91-5.
- [34] Droge W, Schulze-Osthoff K, Mihm S, Galter D, Schenk H, Eck HP, Roth S, Gmunder H. Functions of glutathione and glutathione disulfide in immunology and immunopathology. *Faseb J* 1994;8:1131-8.
- [35] Hall AG. Review: The role of glutathione in the regulation of apoptosis. *Eur J Clin Invest* 1999;29:238-45.
- [36] Aggarwal BB. Tumour necrosis factors receptor associated signalling molecules and their role in activation of apoptosis, JNK and NF-kappaB. *Ann Rheum Dis* 2000;59 Suppl 1:i6-16.
- [37] Darnay BG, Ni J, Moore PA, Aggarwal BB. Activation of NF-kappaB by RANK requires tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 6 and NF-kappaB-inducing kinase. Identification of a novel TRAF6 interaction motif. *J Biol Chem* 1999;274:7724-31.
- [38] Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 2001;104:487-501.
- [39] Inoue J, Ishida T, Tsukamoto N, Kobayashi N, Naito A, Azuma S, Yamamoto T. Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) family: adapter proteins that mediate cytokine signaling. *Exp Cell Res* 2000;254:14-24.
- [40] MacEwan DJ. TNF receptor subtype signalling: differences and cellular consequences. *Cell Signal* 2002;14:477-92.
- [41] Finco TS, Beg AA, Baldwin AS, Jr. Inducible phosphorylation of I kappa B alpha is not sufficient for its dissociation from NF-kappa B and is inhibited by protease inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:11884-8.

- [42] Verma IM, Stevenson JK, Schwarz EM, Van Antwerp D, Miyamoto S. Rel/NF-kappa B/I kappa B family: intimate tales of association and dissociation. *Genes Dev* 1995;9:2723-35.
- [43] Huang TT, Kudo N, Yoshida M, Miyamoto S. A nuclear export signal in the N-terminal regulatory domain of I kappa B alpha controls cytoplasmic localization of inactive NF-kappa B/I kappa B alpha complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:1014-9.
- [44] Carlotti F, Dower SK, Qvarnstrom EE. Dynamic shuttling of nuclear factor kappa B between the nucleus and cytoplasm as a consequence of inhibitor dissociation. *J Biol Chem* 2000;275:41028-34.
- [45] Lakshminarayanan V, Drab-Weiss EA, Roebuck KA. H₂O₂ and tumor necrosis factor-alpha induce differential binding of the redox-responsive transcription factors AP-1 and NF-kappa B to the interleukin-8 promoter in endothelial and epithelial cells. *J Biol Chem* 1998;273:32670-8.
- [46] Saccani A, Saccani S, Orlando S, Sironi M, Bernasconi S, Ghezzi P, Mantovani A, Sica A. Redox regulation of chemokine receptor expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:2761-6.
- [47] Yamada N, Yamaya M, Okinaga S, Lie R, Suzuki T, Nakayama K, Takeda A, Yamaguchi T, Itoyama Y, Sekizawa K, Sasaki H. Protective effects of heme oxygenase-1 against oxidant-induced injury in the cultured human tracheal epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999;21:428-35.
- [48] Rahman I, MacNee W. Role of transcription factors in inflammatory lung diseases. *Thorax* 1998;53:601-12.
- [49] Mercurio F, Manning AM. NF-kappa B as a primary regulator of the stress response. *Oncogene* 1999;18:6163-71.
- [50] Bours V, Bonizzi G, Bentires-Alj M, Bureau F, Piette J, Lekeux P, Merville M. NF-kappa B activation in response to toxic and therapeutic agents: role in inflammation and cancer treatment. *Toxicology* 2000;153:27-38.
- [51] Martindale JL, Holbrook NJ. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol* 2002;192:1-15.

- [52] Heinemeyer T, Wingender E, Reuter I, Hermjakob H, Kel AE, Kel OV, Ignatieva EV, Ananko EA, Podkolodnaya OA, Kolpakov FA, Podkolodny NL, Kolchanov NA. Databases on transcriptional regulation: TRANSFAC, TRRD and COMPEL. *Nucleic Acids Res* 1998;26:362-7.
- [53] Schreiber E, Matthias P, Muller MM, Schaffner W. Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res* 1989;17:6419.
- [54] Mantovani R, Margaretti N, Giglioni B, Comi P, Cappellini N, Nicolis S, Ottolenghi S. A protein factor binding to an octamer motif in the gamma-globin promoter disappears upon induction of differentiation and hemoglobin synthesis in K562 cells. *Nucleic Acids Res* 1987;15:9349-64.
- [55] Schutze S, Machleidt T, Kronke M. Mechanisms of tumor necrosis factor action. *Semin Oncol* 1992;19:16-24.
- [56] Brach MA, Gruss HJ, Sott C, Herrmann F. The mitogenic response to tumor necrosis factor alpha requires c-Jun/AP-1. *Mol Cell Biol* 1993;13:4284-90.
- [57] Adamson GM, Billings RE. Tumor necrosis factor induced oxidative stress in isolated mouse hepatocytes. *Arch Biochem Biophys* 1992;294:223-9.
- [58] Goossens V, Grooten J, De Vos K, Fiers W. Direct evidence for tumor necrosis factor-induced mitochondrial reactive oxygen intermediates and their involvement in cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:8115-9.
- [59] Morales A, Garcia-Ruiz C, Miranda M, Mari M, Colell A, Ardite E, Fernandez-Checa JC. Tumor necrosis factor increases hepatocellular glutathione by transcriptional regulation of the heavy subunit chain of gamma-glutamylcysteine synthetase. *J Biol Chem* 1997;272:30371-9.
- [60] Desmots F, Rissel M, Gilot D, Lagadic-Gossmann D, Morel F, Guguen-Guillouzo C, Guillouzo A, Loyer P. Pro-inflammatory cytokines tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 and survival factor epidermal growth factor positively regulate the murine GSTA4 enzyme in hepatocytes. *J Biol Chem* 2002;277:17892-900.

- [61] Pierce JW, Schoenleber R, Jesmok G, Best J, Moore SA, Collins T, Gerritsen ME. Novel inhibitors of cytokine-induced IkappaBalpha phosphorylation and endothelial cell adhesion molecule expression show anti-inflammatory effects in vivo. *J Biol Chem* 1997;272:21096-103.
- [62] Mori N, Yamada Y, Ikeda S, Yamasaki Y, Tsukasaki K, Tanaka Y, Tomonaga M, Yamamoto N, Fujii M. Bay 11-7082 inhibits transcription factor NF-kappaB and induces apoptosis of HTLV-I-infected T-cell lines and primary adult T-cell leukemia cells. *Blood* 2002;100:1828-34.
- [63] Thevenod F, Friedmann JM, Katsen AD, Hauser IA. Up-regulation of multidrug resistance P-glycoprotein via nuclear factor-kappaB activation protects kidney proximal tubule cells from cadmium- and reactive oxygen species-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2000;275:1887-96.
- [64] Hideshima T, Chauhan D, Richardson P, Mitsiades C, Mitsiades N, Hayashi T, Munshi N, Dang L, Castro A, Palombella V, Adams J, Anderson KC. NF-kappa B as a therapeutic target in multiple myeloma. *J Biol Chem* 2002;277:16639-47.
- [65] Zhang Y, Gonzalez V, Xu MJ. Expression and regulation of glutathione S-transferase P1-1 in cultured human epidermal cells. *J Dermatol Sci* 2002;30:205-14.
- [66] 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 (Pt 1):155-61.
- [67] Borde-Chiche P, Diederichs M, Morceau F, Puga A, Wellman M, Dicato M. Regulation of transcription of the glutathione S-transferase P1 gene by methylation of the minimal promoter in human leukemia cells. *Biochem Pharmacol* 2001;61:605-12.
- [68] Fiedler MA, Wernke-Dollries K, Stark JM. Inhibition of TNF-alpha-induced NF-kappaB activation and IL-8 release in A549 cells with the proteasome inhibitor MG-132. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998;19:259-68.
- [69] Bentires-Alj M, Barbu V, Fillet M, Chariot A, Relic B, Jacobs N, Gielen J, Merville MP, Bours V. NF-kappaB transcription factor induces drug resistance through MDR1 expression in cancer cells. *Oncogene* 2003;22:90-7.

- [70] Foo SY, Nolan GP. NF-kappaB to the rescue: RELs, apoptosis and cellular transformation. *Trends Genet* 1999;15:229-35.
- [71] Munzert G, Kirchner D, Stobbe H, Bergmann L, Schmid RM, Dohner H, Heimpel H. Tumor necrosis factor receptor-associated factor 1 gene overexpression in B-cell chronic lymphocytic leukemia: analysis of NF-kappa B/Rel-regulated inhibitors of apoptosis. *Blood* 2002;100:3749-56.
- [72] Bargou RC, Emmerich F, Krappmann D, Bommert K, Mapara MY, Arnold W, Royer HD, Grinstein E, Greiner A, Scheiderei C, Dorken B. Constitutive nuclear factor-kappaB-RelA activation is required for proliferation and survival of Hodgkin's disease tumor cells. *J Clin Invest* 1997;100:2961-9.
- [73] Schiff PB, Horwitz SB. Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980;77:1561-5.
- [74] Jordan A, Hadfield JA, Lawrence NJ, McGown AT. Tubulin as a target for anticancer drugs: agents which interact with the mitotic spindle. *Med Res Rev* 1998;18:259-96.
- [75] Pinedo HM, Peters GF. Fluorouracil: biochemistry and pharmacology. *J Clin Oncol* 1988;6:1653-64.
- [76] Gewirtz DA. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol* 1999;57:727-41.
- [77] Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 1999;18:6853-66.
- [78] Wang W, McLeod HL, Cassidy J. Disulfiram-mediated inhibition of NF-kappaB activity enhances cytotoxicity of 5-fluorouracil in human colorectal cancer cell lines. *Int J Cancer* 2003;104:504-11.
- [79] Bottero V, Busuttill V, Loubat A, Magne N, Fischel JL, Milano G, Peyron JF. Activation of nuclear factor kappaB through the IKK complex by the topoisomerase poisons SN38 and doxorubicin: a brake to apoptosis in HeLa human carcinoma cells. *Cancer Res* 2001;61:7785-91.
- [80] Wu D, Marko M, Claycombe K, Paulson KE, Meydani SN. Ceramide-induced and age-associated increase in macrophage COX-2 expression is mediated through up-regulation of NF-kappa B activity. *J Biol Chem* 2003;278:10983-92.

- [81] Arakawa T, Nakamura M, Yoshimoto T, Yamamoto S. The transcriptional regulation of human arachidonate 12-lipoxygenase gene by NF kappa B/Rel. *FEBS Lett* 1995;363:105-10.
- [82] Bernard D, Quatannens B, Begue A, Vandebunder B, Abbadie C. Antiproliferative and antiapoptotic effects of crel may occur within the same cells via the up-regulation of manganese superoxide dismutase. *Cancer Res* 2001;61:2656-64.
- [83] Gilot D, Loyer P, Corlu A, Glaise D, Lagadic-Gossmann D, Atfi A, Morel F, Ichijo H, Guguen-Guillouzo C. Liver protection from apoptosis requires both blockage of initiator caspase activities and inhibition of ASK1/JNK pathway via glutathione S-transferase regulation. *J Biol Chem* 2002;277:49220-9.
- [84] Elsby R, Kitteringham NR, Goldring CE, Lovatt CA, Chamberlain M, Henderson CJ, Wolf CR, Park BK. Increased constitutive c-Jun N-terminal kinase signaling in mice lacking glutathione S-transferase Pi. *J Biol Chem* 2003;278:22243-9.
- [85] Schisselbauer JC, Silber R, Papadopoulos E, Abrams K, LaCreta FP, Tew KD. Characterization of glutathione S-transferase expression in lymphocytes from chronic lymphocytic leukemia patients. *Cancer Res* 1990;50:3562-8.
- [86] Ribrag V, Koscielny S, Carpiuc I, Cebotaru C, Vande Walle H, Talbot M, Fenaux P, Bosq J. Prognostic value of GST-pi expression in diffuse large B-cell lymphomas. *Leukemia* 2003;17:972-7.

Figure legends

Fig. 1. *GSTP1-1* gene promoter representation. Transcription factor binding sites within the *GSTP1-1* promoter gene are described according to [28, 29, 31, 32, 52, 66]. Indicated positions along the gene are relative to the transcription initiation site. Putative NF- κ B binding sites are represented with their DNA sequences.

Fig. 2. Effect of TNF α and NF- κ B inhibition on the *GSTP1-1* mRNA expression. *A.* K562 cells were treated with various TNF α concentrations as indicated for 15 hours. Expression of *GSTP1-1* mRNA was monitored by Northern Blot analysis using *GSTP1-1* cDNA as a probe. Human GAPDH mRNA expression was used as an internal control. *B.* The effect of 20 ng/ml TNF α alone (T) or with BAY11-7082 (T+B) for 15 hours on the *GSTP1-1* mRNA level was compared to untreated extracts (C) and quantified using a phosphor imager Cyclone (Perkin-Elmer). Results are representative of three independent experiments \pm SD ($p < 0.05$). *C.* K562 cells were treated for 15 hours with 20 ng/ml TNF α alone or following a 2 hours preincubation with 10 ng/ml BAY11-7082. Expression of *GSTP1-1* mRNA was monitored by Northern Blot analysis using *GSTP1-1* cDNA as a probe. Human GAPDH mRNA expression was used as an internal control.

Fig. 3. Effect of TNF α on the *GSTP1-1* promoter activity. K562 cells were transiently co-transfected with 5 μ g of the luciferase reporter -396pGSTP plasmid and 5 μ g of Renilla plasmid. Transfected cells were treated with 20 ng/ml TNF α for 8 hours. Luciferase activity was measured using Promega's Dual-GloTM Luciferase Assay system and Berthold Luminometer. Data shown are relative values of firefly luciferase normalized to renilla luciferase. Each bar represents the average of triplicate determinations \pm SD.

Fig. 4. Binding activity of both putative κ B sites. EMSA experiments were performed by incubating 10 μ g nuclear extracts from untreated or TNF α -treated K562 cells for 4 hours with oligonucleotide probes containing: *A.* the consensus NF- κ B binding site C- κ B, *B.* the NF- κ B like site from GSTP1 promoter gene in -98 (-98 κ B), *C.* the putative NF- κ B site in -323 from the GSTP1 promoter gene (-323 κ B). C1 and C2 indicate TNF α -induced binding complexes, *D.* the mutated -323 κ B probe in the putative NF- κ B site (-323 κ BM). Lanes 1: untreated nuclear extracts, Lanes 2, 3, 4: TNF α -treated K562 cells with 0.5, 5 and 20 ng/ml respectively. Results are representative of at least three independent experiments.

Fig. 5. Specificity of C1 and C2 TNF α induced binding complexes to the -323 κ B probe. *A.* K562 cells were left untreated (lane 5) or were treated with 0.5ng/ml TNF α (lanes 1-4 and 6-8) during 4 hours alone or in the presence of NF- κ B inhibitors MG132 (lane 7) and BAY11-7082 (lane 8). Nuclear extracts (10 μ g) were incubated in the presence of the -323 κ B labeled probe (lane 1) with a 50 fold molar excess of the similar cold probe (lane 2), the -323 κ BM cold probe (lane 3) or the C- κ B cold probe (lane 4). TNF α induced binding complexes are indicated as C1 and C2. *B.* Human recombinant NF- κ B P50 protein (hrP50) subunit was incubated with the -323 κ B probe (lane 1) or with the -98 κ B probe (lane 2).

Fig. 6. Identification of TNF α -induced C1 and C2 binding complexes. Nuclear extracts (10 μ g) from untreated (lane 1) or TNF α -treated K562 cells (0.5 ng/ml) (lanes 2-10), were incubated in the presence of labeled -323 κ B or -98 κ B probes as indicated, with antibodies directed against NF- κ B subunits P50 (lane 3), P52 (lane 4), P65 (lane 5), RelB (lane 6), C-Rel (lane 7), and Bcl3 (lane 8). Composition of C1 and C2 binding NF- κ B dimers forming complexes on the -323 κ B probe are indicated.

Fig. 7. Effect of TNF α signaling pathway on the 5X κ B-323 reporter plasmid. *A*, K562 cells were transfected with 5X κ B-323 (black histogram) or 5X κ B-C (grey histogram) reporter plasmids and then treated with 20 ng/ml TNF α for 8 hours. *B*, Expression vectors of the TNF α pathway intermediates (TNFR1, TRAF2, NIK, IKK β , I κ B-DN, NF- κ B p65) were co-transfected with the 5X κ B-323 reporter plasmid into K562 cells and promoter activity was determined following 8 hours culture. Luciferase activity was measured using Promega's Dual-GloTM Luciferase Assay system and Berthold Luminometer. Data shown are relative values of firefly luciferase normalized to renilla luciferase. Each bar represents the average of triplicate determinations \pm SD.

Fig. 8. Effect of TNF α signaling pathway on the mutated -396pGSTP reporter plasmid. K562 cells were co-transfected with expression vectors of the TNF α pathway intermediates (TNFR1, TRAF2, NIK, IKK β , I κ B-DN, NF- κ B p65) and -396pGSTP or pGST-Mut-NF κ B reporter plasmids as indicated. Promoter activities were determined following 8 hours culture. Luciferase activity was measured using Promega's Dual-GloTM Luciferase Assay system and Berthold Luminometer. Data shown are relative values of firefly luciferase normalized to renilla luciferase. Each bar represents the average of triplicate determinations \pm SD.

Figure 1

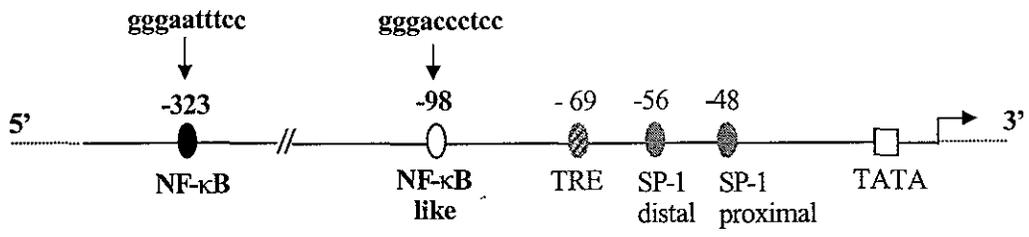


Figure 2

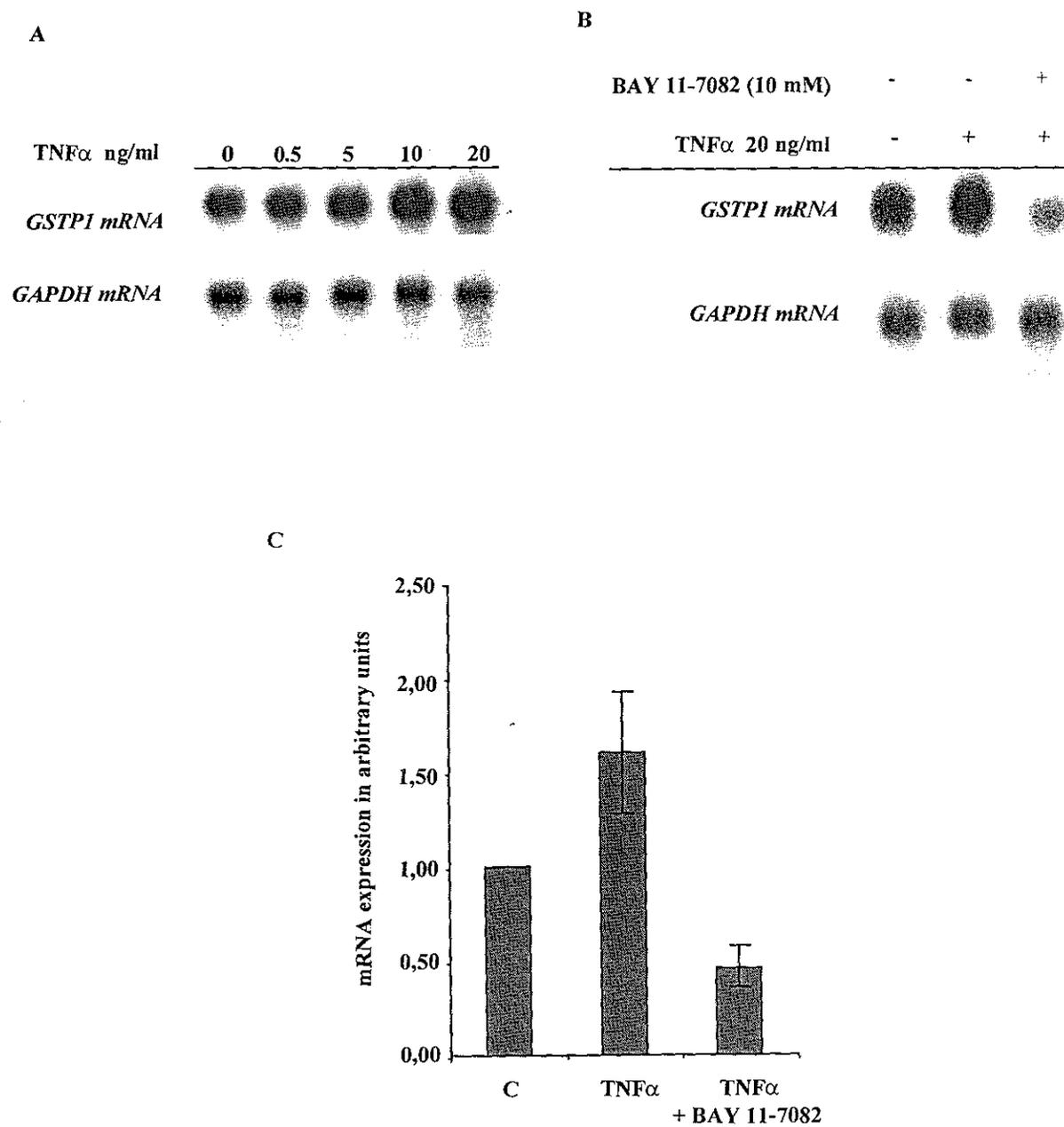


Figure 3

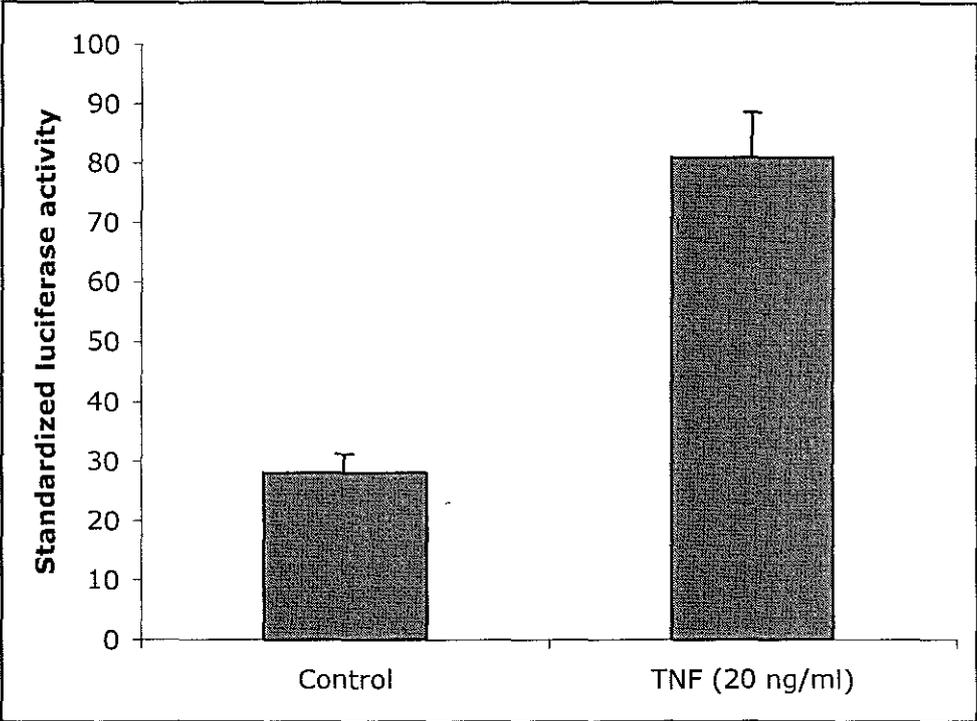
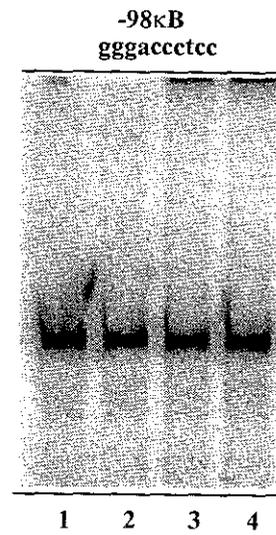


Figure 4

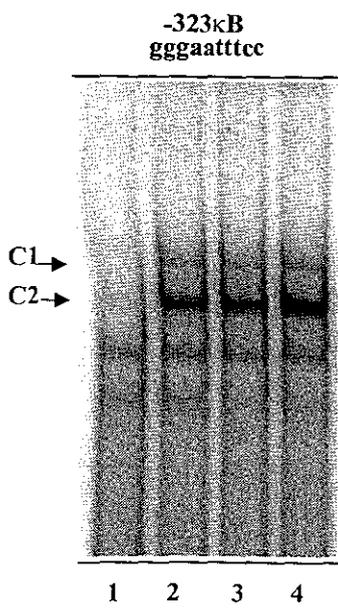
A



B



C



D

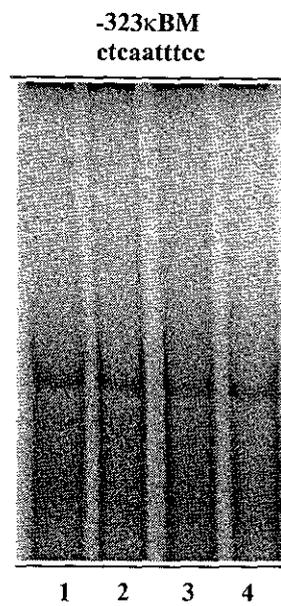
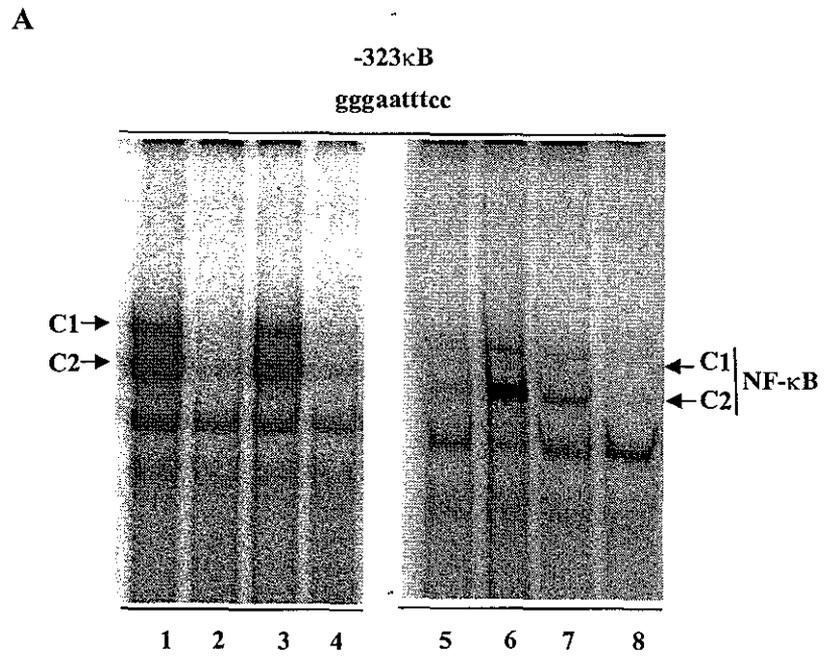


Figure 5



B

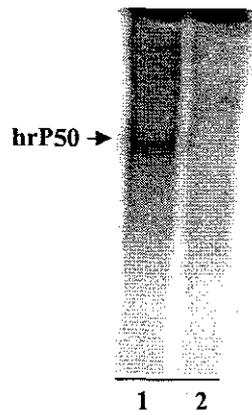


Figure 6

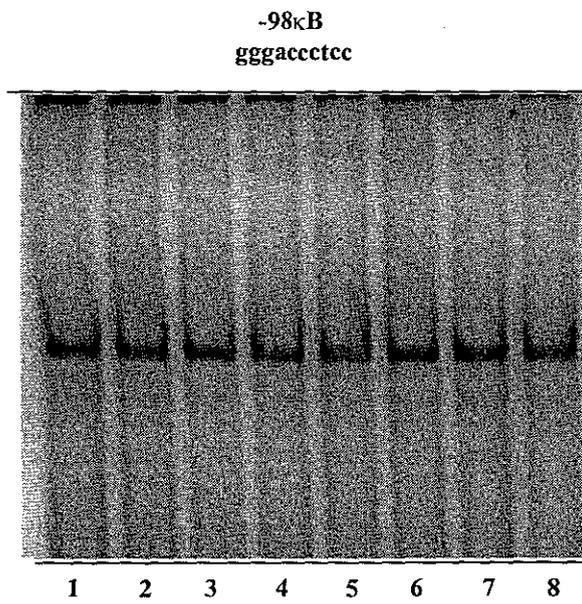
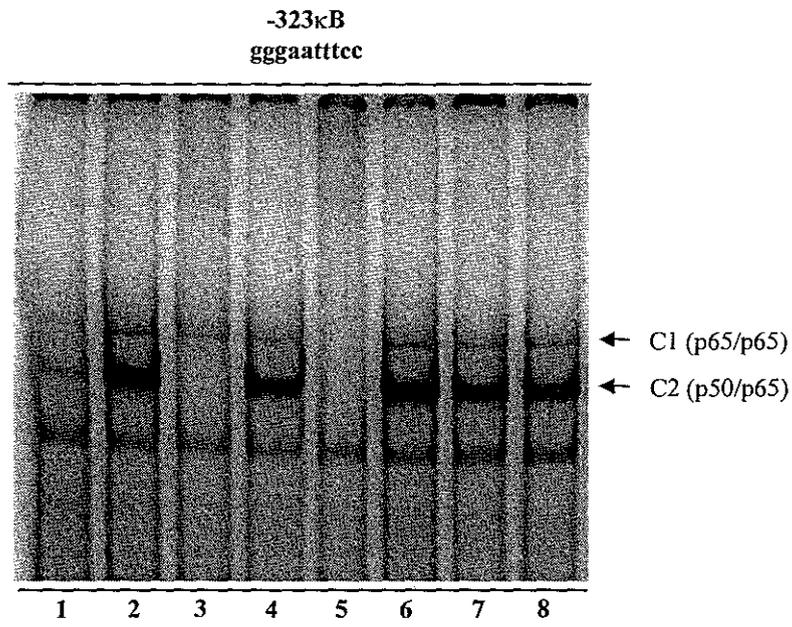


Figure 7

A.

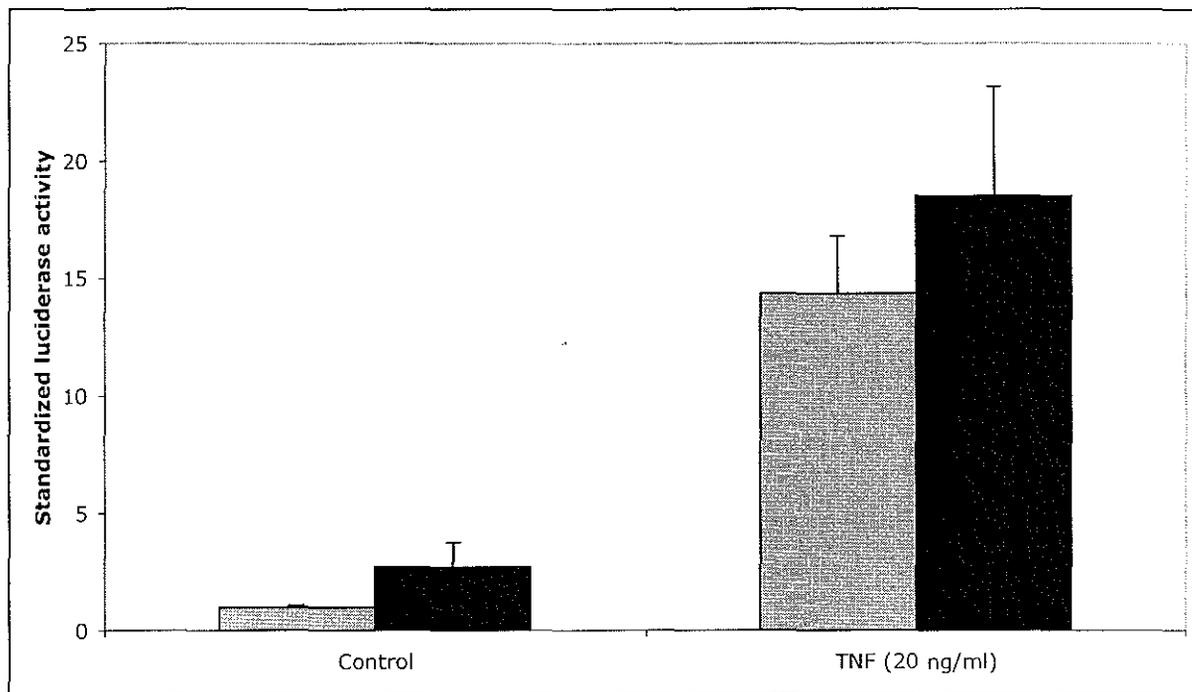




Figure 7

B.

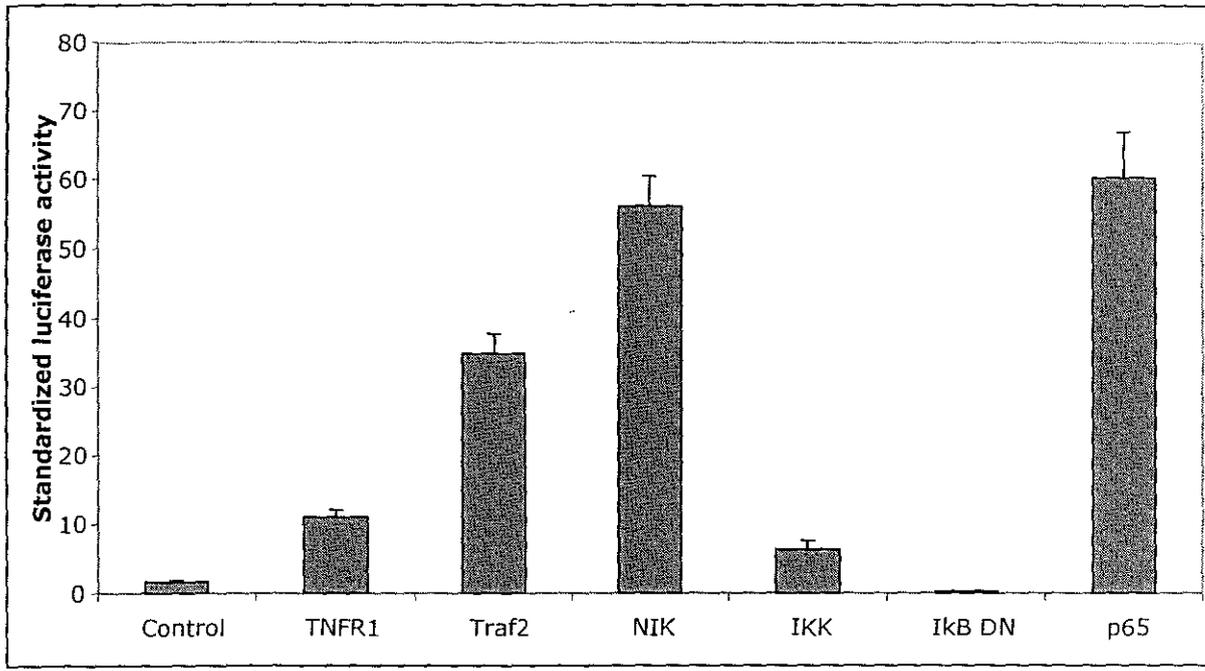


Figure 8

A.

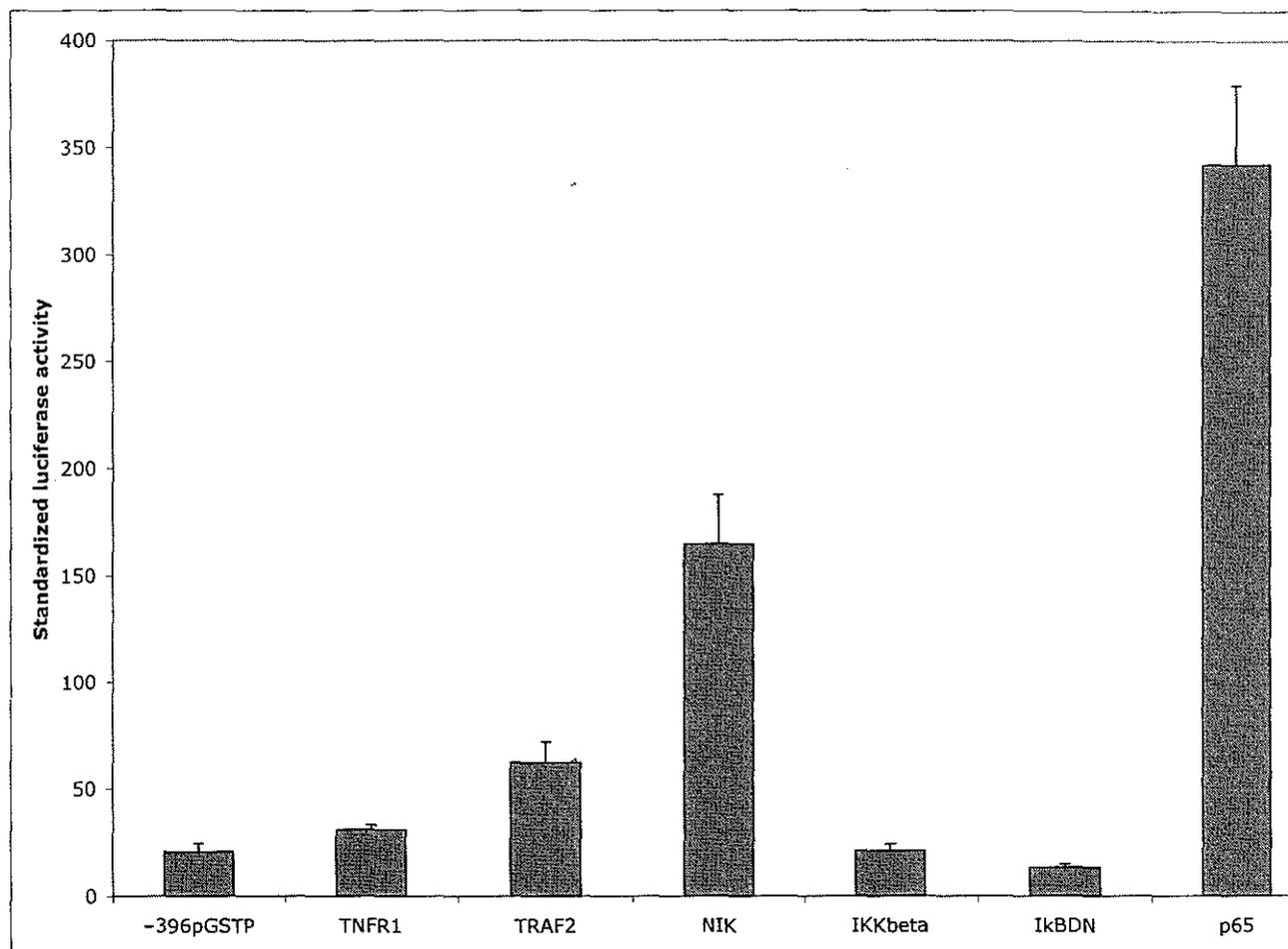
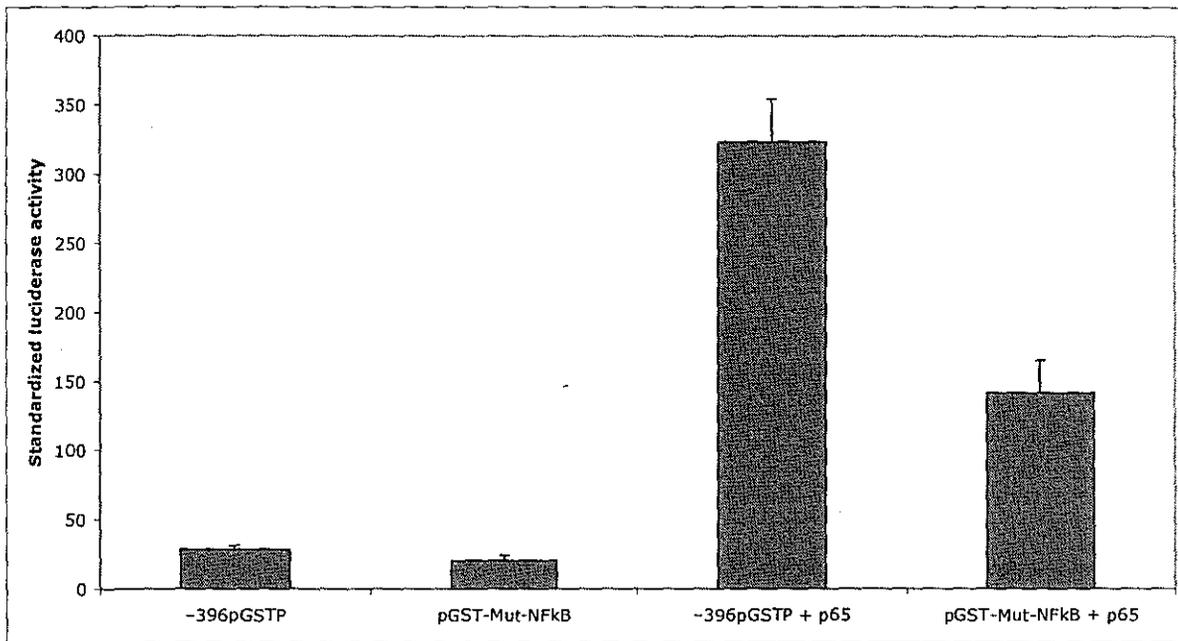
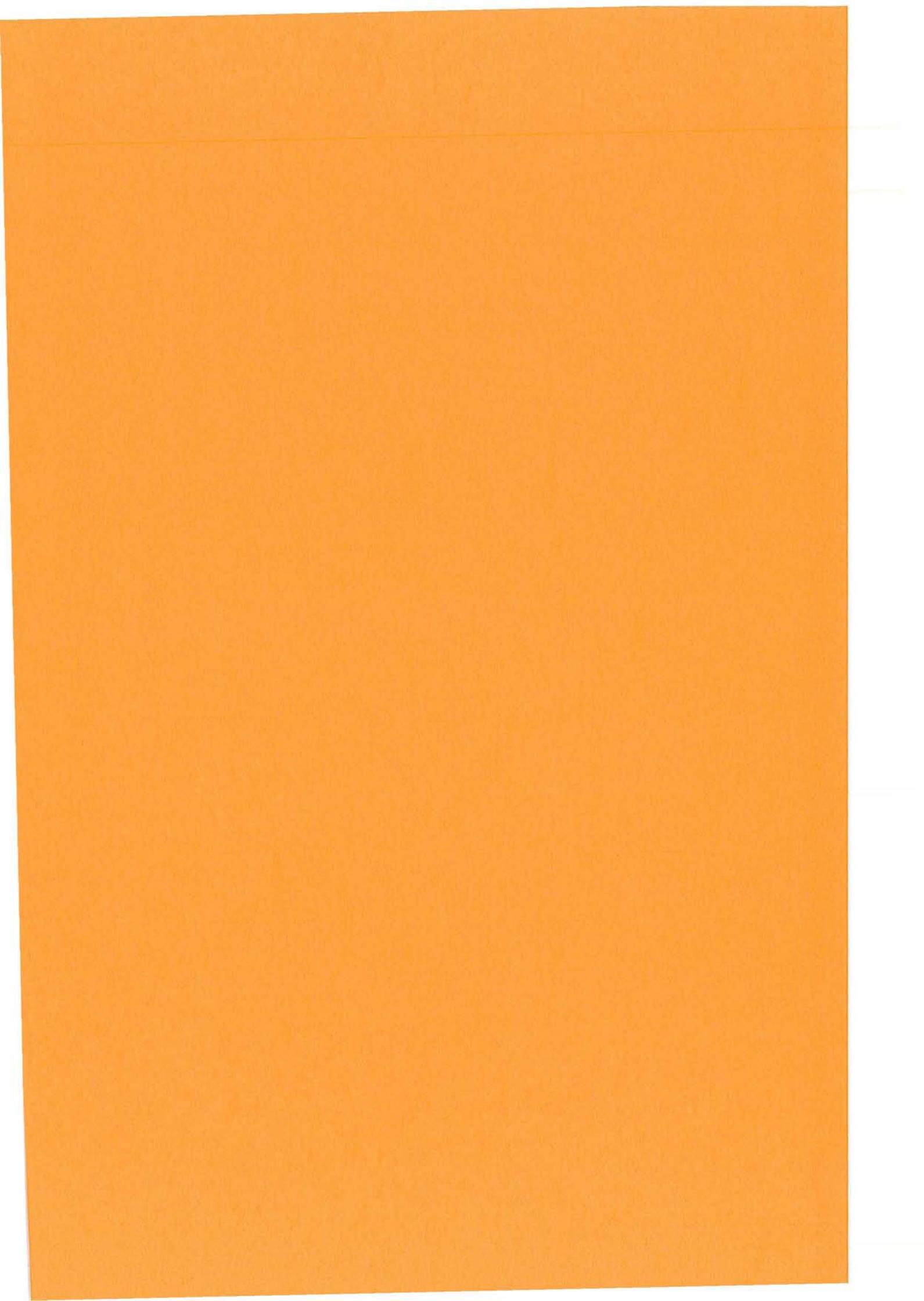


Figure 8

B.





Prénom, Nom : **Annelise DUVOIX**

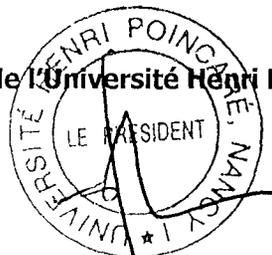
Nature de la thèse :

**Doctorat de l'Université Henri Poincaré, Nancy 1
en Biologie - Santé - Environnement**

VU, APPROUVE et PERMIS D'IMPRIMER n° 853

Nancy, le 27 Novembre 2003

Le Président de l'Université Henri Poincaré, Nancy I



Claude BURLET

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 en ce qui concerne l'expression du gène ainsi que des voies de transduction du signal impliquées. Dans une étude précédente, notre équipe a montré l'importance du site AP-1 en tant que régulateur du promoteur minimal de la GSTP1-1. Pour ce travail, nous montrons dans un premier temps que des inducteurs typiques d'AP-1 comme l'ester de phorbol TPA ou les métaux lourds n'induisent pas l'expression de l'ARNm de la GSTP1-1 dans la lignée leucémique K562. Par contre, nous confirmons l'importance de c-Jun, c-Fos et de la voie de signalisation menant à l'induction de AP-1 dans la régulation de l'expression de la GSTP1-1. La plupart des gènes régulés par AP-1 étant aussi régulés par NF- κ B, nous avons décidé de vérifier le rôle de ce facteur dans la régulation de la GSTP1-1 dont l'ARNm est inductible au TNF α . Grâce à un outil informatique, nous avons pu découvrir la présence d'un site NF- κ B qui fixe les sous-unités p50 et p65 de NF- κ B en réponse à un traitement au TNF α . Des expériences de co-transfections nous ont permis de compléter nos études en prouvant que la voie de signalisation NF- κ B est bien impliquée dans la régulation de la GSTP1-1. Finalement, nous avons démontré l'efficacité d'agents chimiopréventifs, grâce à l'utilisation de la curcumine dont nous démontrons ici la capacité d'inhiber l'expression de la GSTP1-1 en bloquant la fixation d'AP-1 et de NF- κ B tout en induisant l'apoptose dans les cellules leucémiques K562. Nous avons élargi nos résultats vers à l'utilisation d'autres agents chimiopréventifs dont la capsaïcine et l'émodin. En résumé, nos résultats montrent que la GSTP1-1 est régulée par les facteurs de transcription AP-1 et NF- κ B et inhibée par des agents chimiopréventifs qui présentent un intérêt potentiel pour de nouvelles thérapies anti-cancéreuses.

MOTS-CLÉ

Leucémie, transcription, glutathion *S*-transférase, AP-1, NF- κ B, chimioprévention