



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>



FACULTE DES SCIENCES & TECHNIQUES
Ecole Doctorale Biologie - Santé - Environnement
UFR Sciences et Techniques Biologiques

Thèse

présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy-I

Mention Biologie Cellulaire et Nutrition

par **Simone REUTER**

Etude de l'effet de la cytokine $TNF\alpha$ sur la régulation de l'expression de la γ -glutamyltransférase humaine

Soutenance publique le 13 Novembre 2008

Président du jury :	M. Philippe BECUWE	Professeur, Université de Nancy I, France
Rapporteurs :	M. Jacques PIETTE M. Alfonso POMPELLA	Professeur, Université de Liège, Belgique Professeur, Université de Pise, Italie
Examineurs :	M. Mario DICATO M. Marc DIEDERICH Mme. Lina GHIBELLI M. Nils-Erik HUSEBY M. Athanase VISVIKIS	Professeur, Centre Hospitalier de Luxembourg Docteur, Hôpital Kirchberg, Luxembourg Professeur, Université Tor Vergata, Rome, Italie Professeur, Université de Tromsø, Norvège Professeur, Université de Nancy I, France

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés
au « Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer »
à l'Hôpital Kirchberg, Luxembourg

Ce travail n'aurait pu aboutir sans le soutien financier :
du « Télévie Luxembourg » (bourse de formation-recherche Télévie),
de la Fondation « Recherche Cancer et Sang (FRCS) »
de l'Association « Recherche Scientifiques Luxembourg (RSL),
de l'Association «Action Lions “Vaincre le Cancer”»
et
de l'Association « Een Häerz fir kriibskrank Kanner
(Un cœur pour les enfants atteints d'un cancer) »

Remerciements

Après ces 3 années de thèse, il est maintenant temps de remercier les gens qui m'ont soutenue durant ces longues années d'études et ceux qui ont participé à l'aboutissement de ce travail.

En premier lieu, je tiens à remercier le Docteur Marc Diederich sans lequel ce travail n'aurait pas été possible. Je le remercie de m'avoir acceptée dans son laboratoire, de m'avoir soutenue tout au long de cette thèse et surtout d'avoir toujours été à mon écoute lors des moments les plus difficiles.

Je remercie le Professeur Mario Dicato, le président de la Fondation Recherche Cancer et Sang, de m'avoir donné la possibilité de réaliser ce travail au sein de sa fondation.

Je remercie le Professeur Athanase Visvikis pour ses conseils scientifiques et ses connaissances de la GGT qui ont particulièrement aidé à améliorer ce travail.

Je remercie le Professeur Alfonso Pompella pour m'avoir accueillie dans son laboratoire à Pise et de m'avoir laissée entrer brièvement dans le monde de la GGT.

J'adresse aussi mes remerciements au Professeur Alfonso Pompella ainsi qu'au Professeur Jacques Piette d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse.

Je tiens également à remercier Mme. le Professeur Lina Ghibelli, M. le Professeur Nils Huseby et M. le Professeur Philippe Bécuwe d'avoir accepté de juger mon travail de thèse.

Ensuite, je veux remercier les personnes du laboratoire, notamment, Isabelle, Estelle, Marie-Hélène, Tom, Christiane, Cyril, Claudia, Franck, Sébastien, Michael et Serge, ainsi que les autres personnes du laboratoire, pour leur encouragement et les discussions scientifiques et non scientifiques qu'on a pu avoir ensemble. Je remercie en particulier Marie-Hélène pour la relecture de ce manuscrit!

Et les meilleurs pour la fin :-), je remercie de tout mon coeur ma famille et mon copain Vincent pour leur immense patience et leur soutien important durant la thèse! Merci.

Publications liées à cette thèse :

Travaux originaux

a) Tumor necrosis factor α induces γ -glutamyltransferase expression via Nuclear factor- κ B in cooperation with Sp1.

Reuter Simone, Schnekenburger Michael, Cristofanon Silvia, Buck Isabelle, Teiten Marie-Hélène, Daubeuf Sandrine, Eifes Serge, Dicato Mario, Aggarwal Bharat B, Visvikis Athanase and Diederich Marc. Biochem Pharmacol. ACCEPTE.

b) Effect of curcumin on NF- κ B signaling pathways in human chronic myelogenous K562 leukemia cells.

Reuter Simone, Charlet Jessica, Juncker Tom, Teiten Marie-Hélène, Dicato Mario and Diederich Marc. Ann N Y Acad Sci. ACCEPTE.

c) Gene expression profiling related to anti-inflammatory properties of curcumin in K562 leukemia cells.

Teiten Marie-Hélène, Eifes Serge, **Reuter Simone**, Duvoix Annelise, Dicato Mario and Diederich Marc. Ann N Y Acad Sci. ACCEPTE.

d) Curcumin regulates signal transducer and activator of transcription (STAT) expression in K562 cells.

Blasius Romain, **Reuter Simone**, Henry Estelle, Dicato Mario, and Diederich Marc. Biochem Pharmacol. 2006 Nov 30;72(11):1547-54. Epub 2006 Sep 7.

e) Induction of Heat Shock Response by Curcumin in human leukemia cells.

Teiten Marie-Hélène, **Reuter Simone**, Schmucker Stéphan, Dicato Mario and Diederich Marc. Cancer Lett. SOUMIS.

Revue

Modulation of anti-apoptotic and survival pathways by curcumin as a strategy to induce apoptosis in cancer cells.

Reuter Simone, Eifes Serge, Dicato Mario, Aggarwal Bharat B and Diederich Marc. Biochem. Pharmacol. 2008 Aug 3. Revue.

La candidate a participé aux publications suivantes :

a) Tumor necrosis factor α inhibits erythroid differentiation in human Erythropoietin-dependent cells involving p38 MAPK pathway, GATA-1 and FOG-1 downregulation and GATA-2 upregulation

Buck Isabelle, Morceau Franck, Cristofanon Silvia, Heintz Caroline, Chateauvieux Sébastien, **Reuter Simone**, Dicato Mario and Diederich Marc
Biochem. Pharmacol. ACCEPTE.

b) The inhibitory effect of the proinflammatory cytokine TNF α on erythroid differentiation involves erythroid transcription factor modulation

Buck Isabelle, Morceau Franck, Cristofanon Silvia, **Reuter Simone**, Dicato Mario and Diederich Marc
Int J Oncol, SOUMIS

Autres publications :

Editorial

Buck Isabelle, Cerella Claudia, Cristofanon Silvia, **Reuter Simone**, Diederich Marc
Novel job opportunities in cell death!
Biochem Pharmacol. 2008 Jun 26

Activités scientifiques :

Présentations orales :

a) Régulation de la γ -glutamyltransférase par la voie de transduction du signal NF- κ B dans les cellules leucémiques humaines.

Rencontre franco-luxembourgeoise au Centre Alexis Vautrin, Nancy, France (16 juin 2005)

b) Regulation of the γ -glutamyltransferase by the NF- κ B signaling pathway in human leukemia cells

Séminaire sur la γ -glutamyltransférase à l'«University of Pisa Medical School», Pise, Italie (09-11 décembre 2005)

c) Regulation of γ -glutamyltransferase expression via NF- κ B signaling pathway. Impact of curcumin

Séminaire sur la γ -glutamyltransférase au «Consiglio Nazionale delle Ricerche», Pise, Italie (04-06 mars 2007)

d) Curcumin inhibits TNF α -induced γ -glutamyltransferase via Jak2 and NF- κ B cell signaling pathways in human leukemia cells

2nd International Symposium on Translational Research, Natural Products and Cancer, Lonavala, Mumbai, India (09-12 décembre 2007)

Communications par affiche :

a) Régulation de la γ -glutamyltransférase par la voie de transduction du signal NF- κ B dans la lignée leucémique humaine K562

Reuter Simone, Teiten Marie-Hélène, Visvikis Athanase, Dicato Mario and Diederich Marc.
Congrès annuel de la SFBBM (Société française de Biochimie et Biologie Moléculaire) et 32^e Forum des jeunes chercheurs, Nantes, France (24-26 octobre 2005)

b) Régulation de la γ -glutamyltransférase par la voie de transduction du signal NF- κ B dans la lignée leucémique humaine K562 (nouvelle version)

Reuter Simone, Teiten M-H, Visvikis A, Dicato M and Diederich M
Séminaire de la Recherche, Télévie 2007, Bruxelles, Belgique (6 décembre 2006)

c) Regulation of γ -glutamyltransferase expression by tumor necrosis factor α in human leukemia

Reuter Simone, Visvikis A, Dicato M and Diederich M

Séminaire de la Recherche, Télémie 2008, Gosselies, Belgique (5 décembre 2007)

d) Novel peptides from *Nodularia Spumigena* Kac 66

Schumacher M, Wilson N, Tabudravu J, Buck I, Henry E, **Reuter Simone**, Edwards C, Lawton L, Motti C, Wright T, Diederich M and Jaspars M

Symposium on Chemistry and Biology of Bioactive Natural Products TU Kaiserslautern, Germany (19 à 21 septembre 2007)

Sommaire

I. - INTRODUCTION	1
I. 1. - La γ-glutamyltransférase	1
I. 1. 1. - Structure de la γ -glutamyltransférase	1
I. 1. 2. - Fonctions de la γ -glutamyltransférase	3
I. 1. 3. - La famille multigénique de la γ -glutamyltransférase	8
I. 2. - La γ-glutamyltransférase et la résistance aux médicaments anticancéreux	12
I. 2. 1. - Relation entre la γ -glutamyltransférase et le cancer	12
I. 2. 2. - La γ -glutamyltransférase et la résistance aux médicaments anti-cancéreux	13
I. 3. - La γ-glutamyltransférase et le stress oxydant.....	15
I. 3. 1. - Potentiel antioxydant de la γ -glutamyltransférase.....	15
I. 3. 2. - Effet prooxydant de la γ -glutamyltransférase	16
I. 4. - La γ-glutamyltransférase et l'inflammation.....	18
I. 4. 1. - La γ -glutamyltransférase et les leukotriènes	18
I. 4. 2. - La γ -glutamyltransférase et le $\text{TNF}\alpha$	20
I. 4. 3. - L'inflammation et le facteur de transcription NF- κ B.....	21
I. 5. - La curcumine.....	25
I. 6. - Objectifs	28
 II. - MATERIELS ET METHODES	 31
II. 1. - Lignées cellulaires et réactifs.....	31
II. 2. - Transfections transitoires	33
II. 3. - Plasmides utilisés pour les transfections	34
II. 4. - Technique d'immunofluorescence.....	35
II. 5. - Mutagenèse des plasmides p536-Luc et p875-Luc	35
II. 6. - Mutagenèse systématique du plasmide p536-Luc.....	37
II. 7. - Extractions des facteurs nucléaires.....	37
II. 8. - Gel retard	37
II. 9. - Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP)	43
II. 10. - Extraction d'ARN total.....	44

II. 11. - PCR semi-quantitative	45
II. 12. - Extraction des protéines totales.....	46
II. 13. - Western blot.....	46
II. 14. - Mesure de l'activité enzymatique de la γ-glutamyltransférase	47
II. 15. - Etude de la γ-glutamyltransférase et du cytosquelette d'actine par microscopie à fluorescence	48
II. 16. - Détermination de la production du peroxyde d'hydrogène	48
II. 17. - Détermination des groupements thiols des protéines de la surface cellulaire.....	49
II. 18. - Dosage des récepteurs au TNF par liaison avec du TNFα radioactif	49
II. 19. - Dosage des récepteurs TNFR-1 par cytométrie en flux	50
II. 20. - Détermination par Scatchard plot de l'affinité du récepteur TNFR-1 pour le TNFα	50
II. 21. - Analyse des voies NF-κB par Superarray.....	50
II. 22. - Test ELISA.....	51
II. 23. - Analyse statistique	51
 III. - RESULTATS	 52
III. 1. - Etude de l'effet du TNFα sur l'expression de la γ-glutamyltransférase humaine.....	52
III. 1. 1. - Etude des promoteurs de la γ -glutamyltransférase dans les cellules K562.....	52
III. 1. 2. - Etude de l'effet du TNF α et de la curcumine sur les trois ARNm de la γ -glutamyltransférase.	90
III. 1. 3. - Etude de l'effet du TNF α sur l'expression de la protéine γ -glutamyltransférase dans différentes lignées.....	90
III. 2. - Etude de l'effet du TNFα sur l'activité enzymatique et la localisation cellulaire de la γ-glutamyltransférase dans les cellules K562.....	97
III. 2. 1. - Etude de l'effet du TNF α sur l'activité enzymatique de la γ -glutamyltransférase dans les cellules K562.	97
III. 2. 2. - Etude de l'effet du TNF α sur la localisation cellulaire de la γ -glutamyltransférase dans les cellules K562.	99
III. 3. - Etude des phénomènes redox, produits au cours du catabolisme du glutathion par la γ-glutamyltransférase, dans les cellules K562	107
III. 3. 1. - Mesure de la production d'H ₂ O ₂ dans les cellules K562.....	107
III. 3. 2. - Etude de l'état redox des protéines de surface des cellules K562 traitées ou non au TNF α	108
III. 3. 3. - Etude de l'activité liante des récepteurs au TNF à l' ¹²⁵ I-TNF α dans les cellules K562 traitées ou non au TNF α	111
III. 3. 4. - Analyse du nombre de récepteurs TNFR-1 présents sur les cellules K562 traitées ou non au TNF α par cytométrie en flux.....	111

III. 3. 5. - Etude de l'affinité du récepteur TNFR-1 pour le TNF α dans les cellules K562 traitées ou non au TNF α par Scatchard plot.	114
III. 4. - Etude de l'effet de la curcumine sur l'expression de différents gènes impliqués dans les multiples voies de signalisation NF-κB	116
III. 4. 1. - Etude de l'effet de la curcumine sur l'expression de 84 gènes impliqués dans les différentes voies NF- κ B par PCR en temps réel.	116
III. 4. 2. - Etude de l'effet du TNF α et de la curcumine sur l'expression des protéines CD40, p50, RelB, I κ B α et IL-10 par WB.	121
III. 4. 3. - Etude de l'effet du TNF α et de la curcumine sur la sécrétion de l'IL-8 par les cellules K562.	121
IV. - DISCUSSION	124
IV. 1. - Le TNF α induit l'expression de la γ -glutamyltransférase <i>via</i> NF- κ B en coopération avec Sp1	124
IV. 2. - Le TNF α induit l'activité enzymatique de la γ -glutamyltransférase et la dirige dans des domaines constitués d'actine dans les cellules K562	128
IV. 3. - Etude préliminaire d'une boucle physiologique TNF α $\rightarrow$ γ -glutamyltransférase $\rightarrow$ TNFR-1 dans les cellules K562	130
IV. 4. - Détermination de nouvelles cibles de la curcumine dans les voies NF- κ B.	131
V. - CONCLUSION ET PERSPECTIVES	135
V. 1. - Conclusion	135
V. 2. - Perspectives	135
VI. - BIBLIOGRAPHIE	138

Liste des abréviations

AC	anticorps
AP-1	activator protein-1
COX-2	cyclooxygénase 2
Cys	cystéine
CysGly	cystéinylglycine
ERO	espèces réactives de l'oxygène
γ GCL	gamma-glutamylcystéine ligase
γ GCS	gamma-glutamylcystéine synthétase
GCLC	sous-unité catalytique de la γ GCL (GCLC)
GCLM	sous-unité « modifiée » de la γ GCL (GCLM)
GGT	gamma-glutamyltransférase
Gly	glycine
Glu	acide gamma-glutamique ou gamma-glutamate
GS	glutathion synthétase
GSH	glutathion
GSSG	glutathion disulfide
GST	glutathion S-transférase
HBSS	Hank's balanced salt solution
HNE	aldéhyde 4-hydroxynonenal
HRP	horseradish peroxidase
IAB	N-(Biotinoyl)-N'-(iodoacetyl)ethylenediamine
IFN	interféron
I κ B	inhibiteur de kappa B
IKK	I κ B kinase
IL	interleukine
iNOS	oxyde nitrique synthétase inductible
LPS	lipopolysaccharide
LT	leukotriène
NF- κ B	nuclear factor-kappa B
NT	(région) non traduite
PARP	poly(ADP-ribose) polymérase

siRNA	small interfering RNA (petits ARN interférents)
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
SVF	sérum de veau fœtal
TLR	Toll-like récepteur
TNF α	tumor necrosis factor alpha
TNFR1	TNF receptor 1
TPA	12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate
TRADD	TNFR-Associated Death Domain
TRAF2	TNF receptor associated factor 2

I. - Introduction

I. 1. - La γ -glutamyltransférase

I. 1. 1. - Structure de la γ -glutamyltransférase

La γ -glutamyltransférase (GGT) est une enzyme (EC 2.3.2.2) membranaire dimérique, amphiphile et fortement glycosylée (Meister *et al.*, 1981). Elle est composée de deux chaînes polypeptidiques formant une sous-unité lourde et une sous-unité légère (Figure 1). La GGT est ancrée à la surface externe des membranes cellulaires par un seul segment hydrophobe situé à l'extrémité N-terminale de la sous-unité lourde (Matsuda *et al.*, 1983). Les deux sous-unités sont associées par des liaisons non-covalentes et sont issues d'un précurseur qui va subir un clivage protéolytique pour aboutir à la forme mature de la protéine.

Le clivage protéolytique du précurseur de la GGT est activé dans le réticulum endoplasmique, et l'addition de galactose, de glucose et d'acide sialique se fait dans l'appareil de Golgi. La glycosylation de l'enzyme est un élément déterminant pour son transfert intracellulaire (Barouki *et al.*, 1984), mais elle n'est pas nécessaire à la protéolyse spécifique du précurseur (Nash and Tate 1984). Smith et Meister ont démontré que les formes déglycosylées de la GGT de foie de rat et de porc montrent les mêmes activités catalytiques que l'enzyme native (Smith and Meister 1994). Elles sont cependant plus sensibles à l'action de protéases.

La structure cristallographique de la GGT d'*Escherichia coli* (*E. coli*) a récemment été déterminée (Okada *et al.*, 2006) (Figure 1). La GGT d'*E. coli* possède une structure primaire et des caractéristiques enzymatiques similaires à la GGT des mammifères (Suzuki *et al.*, 1986b ; Suzuki *et al.*, 1989). Il y a cependant deux principales différences entre la GGT de mammifère et la GGT d'*E. coli*. Premièrement, le précurseur de la GGT d'*E. coli* possède un peptide signal (Suzuki *et al.*, 1989) dirigeant son export vers l'espace périplasmique où elle reste (Suzuki *et al.*, 1986a), alors que la GGT des mammifères est transmembranaire et est ancrée à la membrane cellulaire (Hughey and Curthoys 1976). Deuxièmement, la GGT des mammifères est glycosylée de manière hétérogène, alors que la GGT d'*E. coli* n'est pas glycosylée (Taniguchi and Ikeda 1998).



Figure 1 : Structure cristallographique de la γ -glutamyltransférase d'*E. coli*.

La GGT est un hétérodimère composé de deux chaînes polypeptidiques formant une sous-unité lourde (en bleu) et une sous-unité légère (en vert). Un côté de la sous-unité légère est entouré par la sous-unité lourde. L'hétérodimère a un noyau composé d'un empilement de brins β et d'hélices α . Les brins β des sous-unités lourdes et légères forment les deux feuillets β centraux, qui sont entourés par les hélices α (Okada *et al.*, 2006).

I. 1. 2. - Fonctions de la γ -glutamyltransférase

La GGT est une enzyme de grande importance dans le diagnostic médicale. Les essais biochimiques, qui mesurent l'activité GGT dans le sang sont souvent utilisés pour mesurer les dégâts du foie, comme par exemple ceux trouvés dans le carcinome hépatocellulaire ou dans le foie alcoolique. Une augmentation de la GGT est trouvée dans la circulation quand le foie est endommagé (Whitfield 2001).

En 1996, l'équipe de Lieberman développe un modèle de souris transgéniques déficientes en GGT (souris « knock out ») (Lieberman *et al.*, 1996). Ces souris présentent une concentration de glutathion élevée (en anglais glutathionuria), un retard de croissance, sont sexuellement immatures et meurent prématurément (Harding *et al.*, 1997 ; Lieberman *et al.*, 1996). Chez les humains, 7 patients avec une déficience en GGT ont été reportés jusqu'à aujourd'hui (Goodman *et al.*, 1971 ; Hammond *et al.*, 1995 ; Wright *et al.*, 1980). Ces patients sont mentalement retardés et montrent des concentrations de glutathion, de γ -glutamylcystéine et de cystéine (Cys) élevées dans l'urine.

La fonction principale de la GGT est de catalyser le transfert d'un groupement γ -glutamyl d'un composé donneur, tel que le glutathion (GSH) ou le leukotriène (LT) C₄ (LTC₄), à des accepteurs comme des acides aminés (Figure 2).

Le glutathion, un antioxydant ubiquitaire, formé de glycine (Gly), de Cys et de glutamate (Glu), ne peut pas entrer dans la cellule sans être métabolisé par la GGT. En dehors de l'hydrolyse du glutathion extracellulaire et donc de l'approvisionnement des cellules en précurseurs du glutathion, notamment en Cys, la GGT intervient également dans la voie des acides mercapturiques et dans la conversion du leukotriène LTC₄ en LTD₄ (Lash 1994 ; Orning *et al.*, 1980 ; Shaw and Newman 1979) et participe probablement au transport transmembranaire des acides aminés (Orlowski and Meister 1970).

I. 1. 2. 1. - Le glutathion

Le glutathion (GSH) est un tripeptide comprenant un groupement carboxylique en position γ

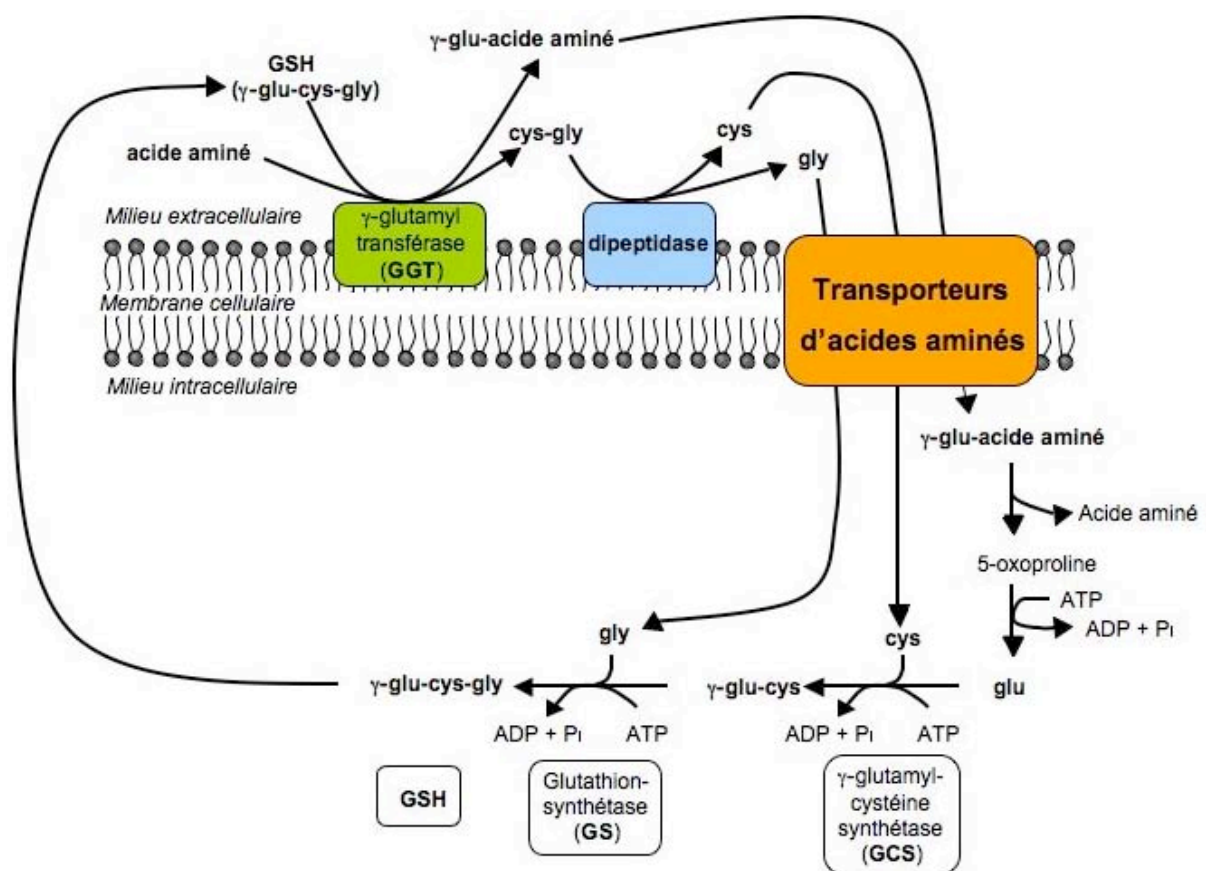


Figure 2 : Cycle du glutathion ou cycle de Meister (Meister and Anderson 1983).

Le cycle de Meister ou cycle du glutathion (GSH) est constitué de six réactions enzymatiques responsables de la synthèse et de la dégradation du glutathion.

de la chaîne latérale du Glu qui établit la liaison peptidique avec la Cys (Figure 3). Il s'agit du N-(N-L-gamma-glutamyl-L-cystéinyl)-glycine, décrit pour la première fois par de Rey-Pailhade en 1888.

La synthèse et la dégradation du glutathion (Meister and Anderson 1983) sont régulées par 6 réactions enzymatiques constituant le cycle du glutathion ou cycle de Meister (Figure 2) :

- La synthèse du glutathion intracellulaire requiert la présence de deux enzymes et de trois acides aminés, la Gly, le Glu et la Cys. Ce dernier étant le substrat limitant de la réaction. Le glutathion est synthétisé par l'action consécutive de deux enzymes : la γ -glutamylcystéine synthétase (γ GCS, EC 6.3.2.2) et la glutathion synthétase (GS, EC 6.3.2.3). L'activité γ GCS détermine le taux de synthèse du glutathion ; elle catalyse la formation du dipeptide γ -glutamylcystéine à partir du Glu et de la Cys. Cette réaction est inhibée par un rétrocontrôle négatif du glutathion sur la γ GCS. La GS quant à elle catalyse la fixation d'une molécule de Gly sur le groupement γ -glutamylcystéine.
- La dégradation du glutathion extracellulaire est initiée par la GGT, seule enzyme capable de cliver la liaison γ -glutamyl du tripeptide. Cette réaction libère le résidu γ -glutamyl et le dipeptide cystéinylglycine (CysGly).

Le CysGly synthétisé peut être clivé par une dipeptidase membranaire en Cys et en Gly. Ces acides aminés peuvent alors être transportés dans la cellule et servir à la synthèse *de novo* du glutathion. Le résidu γ -glutamyl est transféré sur un acide aminé accepteur ce qui conduit à un acide aminé γ -glutamylé pouvant être transporté dans la cellule puis transformé par la γ -glutamylcyclotransférase en l'acide aminé correspondant et en 5-oxoproline. La 5-oxoproline, sous l'action de la 5-oxoprolinase (EC 3.5.2), est décyclisée et génère le Glu.

Le glutathion est l'antioxydant le plus important de notre corps grâce à son groupement thiol (-SH) très réactif. Il existe dans une forme réduite (GSH) et dans une forme oxydée (GSSG), les deux étant en équilibre l'une avec l'autre (Figure 4). Lors d'un stress oxydant (par exemple l' H_2O_2), deux molécules de glutathion réduit (GSH) sont oxydées en glutathion oxydé (GSSG) par la glutathion peroxydase tandis qu'une molécule de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est réduite en eau. La forme oxydée du glutathion (GSSG), qui correspond à

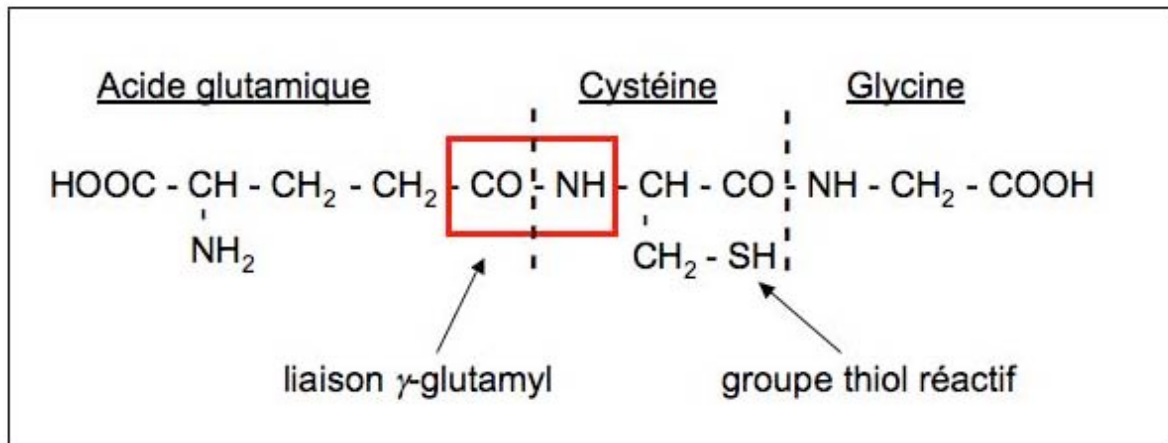


Figure 3 : Structure du glutathion.

Le glutathion (L-γ-glutamyl-L-cystéinyglycine ; GSH) est caractérisé par la liaison γ-glutamyl entre le COOH en position γ du Glu et le NH₂ de la Cys. Le troisième acide aminé constituant le tripeptide est la Gly. Le GSH joue un rôle vital dans les mécanismes antioxydants grâce à son groupement SH.

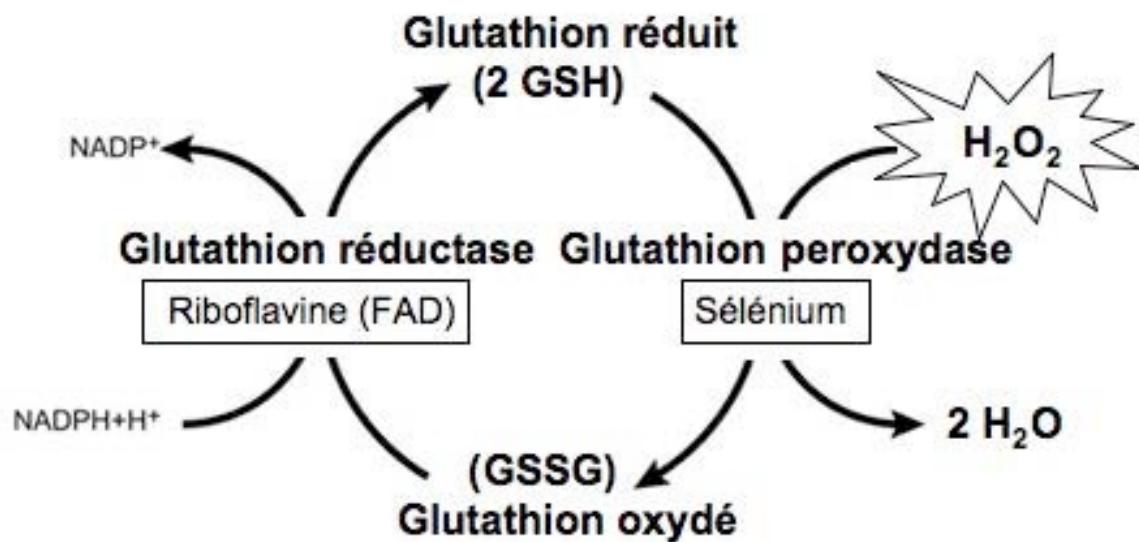


Figure 4 : Le cycle d'oxydo-réduction du glutathion.

Une molécule de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) est réduite en deux molécules d'eau tandis que deux molécules de glutathion (GSH) sont oxydées dans une réaction de catalyse par la glutathion peroxydase, une sélénoenzyme. Le glutathion oxydé (GSSG) peut être réduit par une autre enzyme, la glutathion réductase.

l'association de deux molécules de glutathion reliées par un pont disulfure, est ensuite rapidement réduit en GSH par la glutathion réductase en présence de NADPH (Filomeni *et al.*, 2002) maintenant une proportion GSH : GSSG de 99 : 1 (Tew 1994).

A côté de sa fonction détoxifiante du peroxyde d'hydrogène, la conjugaison du glutathion par la glutathion S-transférase (GST) aux composés électrophiles, telles que la doxorubicine, le cisplatine, le chlorambucil et le melphalan, des composés utilisés dans les chimiothérapies (Schroder *et al.*, 1996) ainsi qu'aux métaux lourds, aux solvants et aux pesticides, permet de les transformer en composés hydrosolubles (p.ex en acides mercapturiques), susceptibles d'être facilement éliminés dans la bile et les urines. Le glutathion conjugué à ces nombreux composés électrophiles (X) est éliminé des cellules par transport actif grâce à la pompe GS-X.

I. 1. 3. - La famille multigénique de la γ -glutamyltransférase

La GGT humaine appartient à une famille multigénique composée de treize gènes dont six ne semblent pas être actifs (Heisterkamp *et al.*, 2008) et seulement deux, les gènes GGT1 et GGT5, aboutissent à l'expression d'une enzyme fonctionnelle (Figure 5).

Des analyses réalisées sur des souris déficientes pour le gène GGT1 montrent que ces souris sont capables de synthétiser le LTD₄ (Carter *et al.*, 1997 ; Shi *et al.*, 2001), alors que des souris déficientes pour les gènes GGT1 et GGT5 sont incapables de le synthétiser (Han, B. *et al.*, 2002 ; Shi *et al.*, 2001). Ceci met en évidence que chez la souris, le gène GGT5 est l'enzyme principale impliquée dans la synthèse du LTD₄. L'enzyme codée par le gène GGT1 chez la souris est responsable du métabolisme du glutathion.

Par contre, chez l'homme, les patients présentant une déficience du gène GGT1, ont une concentration de glutathion élevée et sont incapables de synthétiser le LTD₄. Ceci suggère que chez l'homme, ces deux défauts biochimiques sont dus à une mutation homozygote des deux allèles du gène GGT1 (Heisterkamp *et al.*, 2008).

Les autres gènes actifs pourraient coder pour des protéines dont le rôle physiologique n'est pas encore élucidé.

Les régions codantes du gène GGT1 humain s'étendent sur une vaste région de 16 kb sur le chromosome 22. La GGT humaine est ainsi codée par 12 exons, les exons 1 à 7 codant pour la sous-unité lourde, et les exons 8 à 12 pour la sous-unité légère. Le premier exon codant

Symbole du gène	Nom du gène	Localisation chromosomale	Protéine fonctionnelle possible? ^a
(Potentielles) Protéines entières			
GGT1	Gamma-glutamyltransférase 1	Chr 22: 23.3	Protéine fonctionnelle
GGT2	Gamma-glutamyltransférase 2 (putatif)	Chr 22: 19.89	Possible. Hautement homologue avec GGT1
GGT3P	Gamma-glutamyltransférase 3 pseudogène	Chr 22: 17.15	Non
GGT4P	Gamma-glutamyltransférase 4 pseudogène	Chr 13: pas encore déterminé	Non
GGT5	Gamma-glutamyltransférase 5	Chr 22: 22.95	Protéine fonctionnelle
GGT6	Gamma-glutamyltransférase 6 (putatif)	Chr 17: 4.4	Possible
GGT7	Gamma-glutamyltransférase 7 (putatif)	Chr 20: 32.9	Protéine
GGT8P	Gamma-glutamyltransférase 8 pseudogène	Chr 2: 91.3	Non
Gènes codant pour la sous-unité légère seulement			
GGTLC1	Gamma-glutamyltransférase sous-unité légère 1	Chr 20: 23.92	Possible. Sous-unité légère uniquement
GGTLC2	Gamma-glutamyltransférase sous-unité légère 2	Chr 22: 21.31	Possible. Sous-unité légère uniquement
GGTLC3	Gamma-glutamyltransférase sous-unité légère 3; GeneCard LOC728226	Chr 22: 18.75	Possible. Sous-unité légère uniquement
GGTLC4P	Gamma-glutamyltransférase sous-unité légère 4 pseudogène	Chr 22: 22.97	Non
GGTLC5P	Gamma-glutamyltransférase sous-unité légère 5 pseudogène	Chr 22: 18.95	Non

Figure 5 : Organisation génomique de la GGT humaine selon (Heisterkamp *et al.*, 2008).

Cette figure résume l'organisation génomique de la GGT telle que nous la connaissons aujourd'hui. Treize gènes de la GGT ont été décrits jusqu'à présent (GGT1, 2, 3P, 4P, 5, 6, 7, 8P, LC1, LC2, LC3, LC4P et LC5P) dont 8 codent pour la protéine entière (GGT1-8P) et 5 ne codent uniquement pour la sous-unité légère (GGTLC1-5P). Parmi les treize gènes, seuls les gènes GGT1 et GGT5, aboutissent à l'expression d'une enzyme fonctionnelle.

^a basé sur des données expérimentales et l'identité d'acides aminés par rapport à GGT1.

contient le codon initiateur, les 54 premiers codons, ainsi que les 7 premières bases des régions 5' non traduites (NT).

Les gènes qui codent pour la GGT sont transcrits en plusieurs ARNm différents et montrent une spécificité tissulaire pour leur expression.

- Il existe plusieurs ARNm issus du gène GGT1 (Courtay *et al.*, 1994).
 - o Quatre sous-types d'ARNm du gène GGT1 montrent la même phase de lecture ouverte mais sont transcrits à partir de trois promoteurs différents, le A (NM_001032365), le B (NM_013430) et le C (NM_001032364 et NM_005265) (Figure 6) et donc diffèrent dans leur région 5'NT. L'ARNm de type A a été isolé à partir du foie fœtal, l'ARNm de type B a été isolé à partir d'un hépatome HepG2 et l'ARNm de type C est originaire du placenta.
 - o Un autre ARNm du gène GGT1 contenant une insertion de 22 pb (JO5235) et codant pour une protéine inactive correspondant à la sous-unité lourde de la GGT est retrouvé dans plusieurs tissus.
 - o Des ARNm tronqués du gène GGT1 sont retrouvés dans le poumon et le rein. Ils sont issus d'un promoteur intronique particulier sur le gène GGT1, qui se trouve entre l'exon VII et l'exon VIII. Cet ARNm code potentiellement pour la sous-unité légère de la GGT (Leh *et al.*, 1998 ; Wetmore *et al.*, 1993).
- Les ARNm du gène GGT2 apparaissent dans la thyroïde, la sigmoïde, le rein et le placenta (Courtay *et al.*, 1994).
- Les ARNm du gène GGTL2 sont tronqués et apparaissent dans la thyroïde, la sigmoïde, le poumon et le placenta (Courtay *et al.*, 1994).

La GGT humaine possède donc une organisation génomique et un profil d'expression des différents ARNm particulièrement complexe. Des études génétiques supplémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre l'utilité d'une famille multigénique de la GGT tellement complexe.

Chez le rat, par contre, la GGT est codée par un seul gène de 34 kb avec 12 exons couvrant un fragment génomique de 12 kb (Pawlak *et al.*, 1988 ; Rajagopalan *et al.*, 1990 ; Shi *et al.*, 1995). La transcription de la GGT de rat peut être contrôlée par cinq promoteurs distincts (P1-P5) et ces promoteurs peuvent générer au moins sept ARNm distincts qui diffèrent dans leurs régions 5'NT. Les deux promoteurs P4 et P5 génèrent deux transcrits

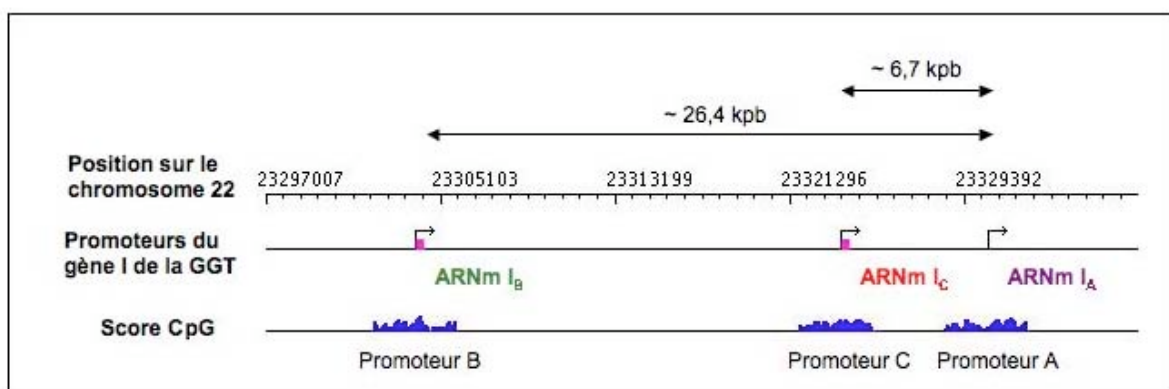


Figure 6 : Localisation des trois promoteurs A, B et C sur le gène GGT1 humain sur le chromosome 22.

Les promoteurs A, B et C de la GGT ont été localisés par la base de données **Mammalian Promoter Database (MPromDb)**. Les trois sites d'initiation de la transcription, indiqués par des flèches, correspondent aux sites d'initiation pour les trois ARNm A, B et C de la GGT humaine. Les sites d'initiation pour les ARNm A et B sont éloignés d'environ 26,4 kb et ceux pour les ARNm A et C d'environ 6,7 kb.

primaires dû à un épissage alternatif, alors que la transcription des autres promoteurs génère des transcrits uniques (Holic *et al.*, 2000 ; Lahuna *et al.*, 1992 ; Nomura *et al.*, 1997).

Tout comme chez l'homme, chaque promoteur de la GGT semble être activé différemment selon le type cellulaire. A part quelques stimuli connus pour induire l'expression de la GGT, tels le butyrate, la ménadione, le TPA (12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate), le TNF α et le cisplatine (Borud *et al.*, 2000 ; Daubeuf *et al.*, 2001 ; Mikkelsen *et al.*, 2002b), les connaissances actuelles concernant les éléments régulateurs des promoteurs de la GGT sont limitées.

I. 2. - La γ -glutamyltransférase et la résistance aux médicaments anticancéreux

I. 2. 1. - Relation entre la γ -glutamyltransférase et le cancer

De nombreuses études ont montré que les hépatocytes de rat traités par un carcinogène présentent une activité GGT accrue et possèdent un avantage prolifératif par rapport à des hépatocytes exprimant moins de GGT (Hendrich and Pitot 1987 ; Xu *et al.*, 1988). La GGT est d'ailleurs utilisée en tant que marqueur de lésions néoplasiques dans le foie lors de la cancérogenèse (Hendrich and Pitot 1987). De plus, certaines études suggèrent l'utilisation de différents sous-types de la GGT comme marqueurs précoces et spécifiques de certaines pathologies. En effet, Leh *et al.* ont montré que l'ARNm codé par le gène GGTL2 est exprimé dans 50% de leucémies lymphoblastiques aiguës mais jamais dans les tissus sains (Leh *et al.*, 1996). De même, Tsutsumi *et al.* suggèrent l'utilisation de la détection de l'ARNm de type B pour détecter un stade précoce du carcinome hépatique (Tsutsumi *et al.*, 1996).

Une explication de l'expression accrue de la GGT dans les cellules tumorales pourrait être que les cellules néoplasiques sont exposées à différents types de stress qui influenceraient les niveaux du GSH et de la GGT et confèreraient ainsi un avantage sélectif aux cellules néoplasiques pendant la progression tumorale.

Or l'expression accrue de la GGT n'est pas déterminante pour le processus carcinogène en lui-même. En effet, l'enzyme ne contribuerait qu'au développement des tumeurs en fournissant aux cellules les acides aminés nécessaires pour la synthèse *de novo* du GSH et confèrerait ainsi à ces cellules un avantage prolifératif par rapport aux cellules exprimant plus faiblement la GGT (Hanigan and Pitot 1985).

Le niveau d'expression de la GGT dans les tissus cancéreux est variable (Hanigan *et al.*, 1999a). Une analyse par immunomarquage révèle la présence de la GGT dans 22 des 44 carcinomes de poumon et dans 16 des 22 carcinomes de la surface épithéliale ovarienne, alors que l'épithélium normal pulmonaire et ovarien est GGT-négatif (Hanigan *et al.*, 1999a).

Des taux élevés de GGT ont été détectés dans la leucémie aiguë myéloblastique, dans la leucémie myéloïde chronique et dans les lymphomes non hodgkiniens (Antczak *et al.*, 2001a ; Antczak *et al.*, 2001b) alors que dans les leucémies aiguës lymphoblastiques à cellules T et dans les leucémies lymphoïdes chroniques à cellules T et B, une diminution de 30 % de l'activité de la GGT membranaire par rapport aux cellules normales, a été détectée (Antczak *et al.*, 2001b ; Woodlock *et al.*, 1990).

I. 2. 2. - La γ -glutamyltransférase et la résistance aux médicaments anti-cancéreux

Une autre explication possible des niveaux d'expression élevés de la GGT dans les tumeurs consisterait en l'implication de la GGT dans le développement de la résistance des cellules transformées contre un dommage oxydatif lors de la chimiothérapie ou radiothérapie (Chang *et al.*, 1992 ; Hanigan and Pitot 1985).

Les recherches sur les résistances vis-à-vis des substances anticancéreuses montrent que les cellules cancéreuses peuvent résister de plusieurs façons, (1) en activant des protéines transmembranaires qui rejettent des substances chimiques en dehors de la cellule (la P-glycoprotéine est la mieux connue des pompes d'éjection), (2) en altérant des gènes et des protéines impliqués dans le contrôle de l'apoptose (en particulier p53 et Bcl-2) et (3) en augmentant les processus de détoxification, en particulier celui du système GSH impliquant les enzymes GGT, GST et γ -glutamylcystéine ligase (γ GCL) (Stavrovskaya 2000).

Les GST constituent une remarquable famille d'enzymes impliquées dans la détoxification cellulaire des xénobiotiques. Ces enzymes catalysent la conjugaison du GSH aux composés électrophiles cytotoxiques, telles que la doxorubicine, le cisplatine, le chlorambucil, le

cyclophosphamide, les chloroéthylnitrosourées et le melphalan, des composés utilisés dans les chimiothérapies (Schroder *et al.*, 1996).

Ces composés ainsi conjugués au GSH sont souvent moins toxiques, plus hydrosolubles et sont donc plus facilement excrétés hors des cellules (Salinas and Wong 1999). En détoxifiant la cellule et en facilitant l'élimination de ces médicaments, le système du glutathion pourrait être à l'origine de certaines résistances.

En effet, il a été montré qu'une résistance au chlorambucil est liée à un taux plus élevé des enzymes intervenant dans le système du glutathion (GGT, γ GCS et GST) ainsi que du GSH dans des cellules de carcinome ovarien de hamster chinois (Lewis, A. D. *et al.*, 1988). Il apparaît donc que les cellules cancéreuses peuvent utiliser ces enzymes pour se protéger contre des agents cytotoxiques, comme les anticancéreux, en les inactivant rapidement (Hayes and Strange 1995).

Puisque la GGT favorise la reconstitution du GSH intracellulaire, Hanigan *et al.* ont proposé que l'expression de la GGT pourrait participer, dans des cellules tumorales, à des mécanismes de résistance contre des médicaments anticancéreux (Hanigan and Pitot 1985).

En effet, il a été montré qu'une exposition de cellules ovariennes cancéreuses au cisplatine (cis-diamminodichloroplatinum II (CDDP)) mène à l'apparition de cellules résistantes au CDDP et que le degré de cette résistance est étroitement corrélé à une expression accrue d'ARNm de la GGT et à des niveaux de glutathion plus élevés (Godwin *et al.*, 1992). De plus il a été montré que la GGT est induite dans certaines lignées cancéreuses, notamment dans les lignées résistantes au cisplatine.

Daubeuf *et al.* ont notamment montré que les cellules HeLa acquièrent une résistance accrue au cisplatine après surexpression de la GGT (Daubeuf *et al.*, 2002). Ahmad *et al.* ont, quant à eux, trouvé que des cellules leucémiques de souris résistantes au melphalan expriment des activités GGT deux à trois fois plus élevées et présentent des niveaux de GSH plus élevés comparé aux cellules sensibles au melphalan (Ahmad *et al.*, 1987).

Hanigan *et al.* ont mis en évidence que les cellules PC3 transfectées avec un ADNc codant la GGT et injectées dans des souris nues montrent un développement tumoral moins sensible au cisplatine que les cellules contrôles non transfectés avec la GGT (Hanigan *et al.*, 1999b).

I. 3. - La γ -glutamyltransférase et le stress oxydant

Le stress oxydant correspond à une perturbation de l'homéostasie du potentiel redox cellulaire. Cette perturbation est due soit à une surproduction d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), soit à la défaillance des systèmes de défense cellulaire, qui font appel, lors d'un stress oxydant, à des enzymes antioxydantes, comme la superoxyde dismutase, la catalase ou la glutathion peroxydase, qui convertissent respectivement l'O_2^- en H_2O_2 et H_2O_2 en H_2O (Franco *et al.*, 1999).

Le stress oxydant est à l'origine de nombreuses pathologies comme le cancer, la maladie d'Alzheimer, les maladies cardio-vasculaires, les accidents cérébro-vasculaires, l'arthrite rhumatoïde ou les cataractes.

I. 3. 1. - Potentiel antioxydant de la γ -glutamyltransférase

De nombreuses études ont montré que des substances générant des ERO ou des espèces réactives du nitrogène peuvent induire la GGT. Il s'agit par exemple du NO_2 (Takahashi *et al.*, 1997), de l'aflatoxine B1 (Griffiths *et al.*, 1995), des quinones (Kugelman *et al.*, 1994 ; Liu *et al.*, 1996a ; Liu *et al.*, 1996b ; Liu *et al.*, 1998), des conditions d'hyperoxie (Knickelbein *et al.*, 1996), du butyrate et de la ménadione (Mikkelsen *et al.*, 2002b) ainsi que de substances générant de l'oxyde nitrique (NO), telles la spermineNONOate et le nitrosogluthation (Huseby *et al.*, 2003).

Cette induction de la GGT par le stress oxydant facilite le métabolisme du GSH, la synthèse *de novo* du GSH et la détoxification des conjugués du GSH ce qui rend les cellules plus résistantes contre un prochain défi oxydatif. Il s'agit donc d'une réponse adaptative importante qui protège les cellules des dommages oxydatifs et xénobiotiques.

Les mécanismes impliqués dans l'induction de la GGT par un stress oxydant ont été étudiés par plusieurs équipes. Zhang *et al.*, ont montré que la GGT est induite dans les cellules alvéolaires de type II de rat, par l'aldéhyde 4-hydroxynonenal (HNE), un produit de la peroxydation lipidique, et que cette induction est médiée par l'activation des voies de signalisation ERK et p38MAPK (Zhang, H. *et al.*, 2005). De plus, ils ont trouvé qu'un élément de réponse électrophile (electrophile-response element, EpRE), situé dans la région proximale du promoteur 5 de la GGT (GP5) de rongeur, est responsable de l'activité

promotrice basale et de l'activité induite par le HNE. Ils rajoutent qu'après traitement au HNE, les protéines Nrf2 (NF-E2-related factor 2) sont recrutées vers l'élément de réponse EpRE (Zhang, H. *et al.*, 2006).

Par contre, Pankiv *et al.* ont trouvé que l'induction des protéines et de l'activité de la GGT après exposition des cellules de carcinome de côlon à des rayonnements γ passe par la voie de transduction Ras (Pankiv *et al.*, 2006).

I. 3. 2. - Effet prooxydant de la γ -glutamyltransférase

Alors que plusieurs études montrent que la GGT est induite par un grand nombre de substances générant un stress oxydant, Stark *et al.* ont montré pour la première fois en 1993, que la GGT elle-même peut générer des ERO (Stark *et al.*, 1993).

Cet effet prooxydant de la GGT est dû à la génération de CysGly, un métabolite redox labile, pendant le métabolisme du glutathion (Drozd *et al.*, 1998). L'autooxydation de CysGly en présence de métaux de transition (fer, cuivre ou transferrine) mène à des espèces prooxydantes en réagissant avec le Fe^{3+} et l' O_2 (Figure 7). Les ERO produites sont majoritairement l' H_2O_2 , l'anion superoxyde, le radical hydroxyde et des radicaux thiyl ($\text{RS}^\bullet$).

Cette production d'ERO peut entraîner un changement de l'équilibre redox des cellules et de leur environnement, induire la peroxydation des lipides (Glass and Stark 1997), promouvoir l'oxydation et la S-thiolation des groupements $-\text{SH}$ des protéines, notamment les protéines de surface (Dominici *et al.*, 1999 ; Maellaro *et al.*, 2000), et ainsi affecter des fonctions cellulaires importantes.

Afin de détecter des cibles moléculaires affectées par cet effet prooxydant de la GGT, Accaoui *et al.*, ont vérifié l'hypothèse selon laquelle le stress oxydant produit par la GGT peut moduler des facteurs de transcription intracellulaires (Accaoui *et al.*, 2000). En effet, leurs résultats montrent pour la première fois, que les ERO générées par la GGT induisent la liaison et l'activité de transactivation du facteur de transcription NF- κ B.

Une autre protéine cible de ce stress oxydant est la caspase 3. Les changements oxydatifs des groupements thiols ($-\text{SH}$) peuvent changer l'activité d'une protéine, comme celle de la caspase 3 (Iciek *et al.*, 2007), et donc affecter les processus cellulaires les plus importants, la

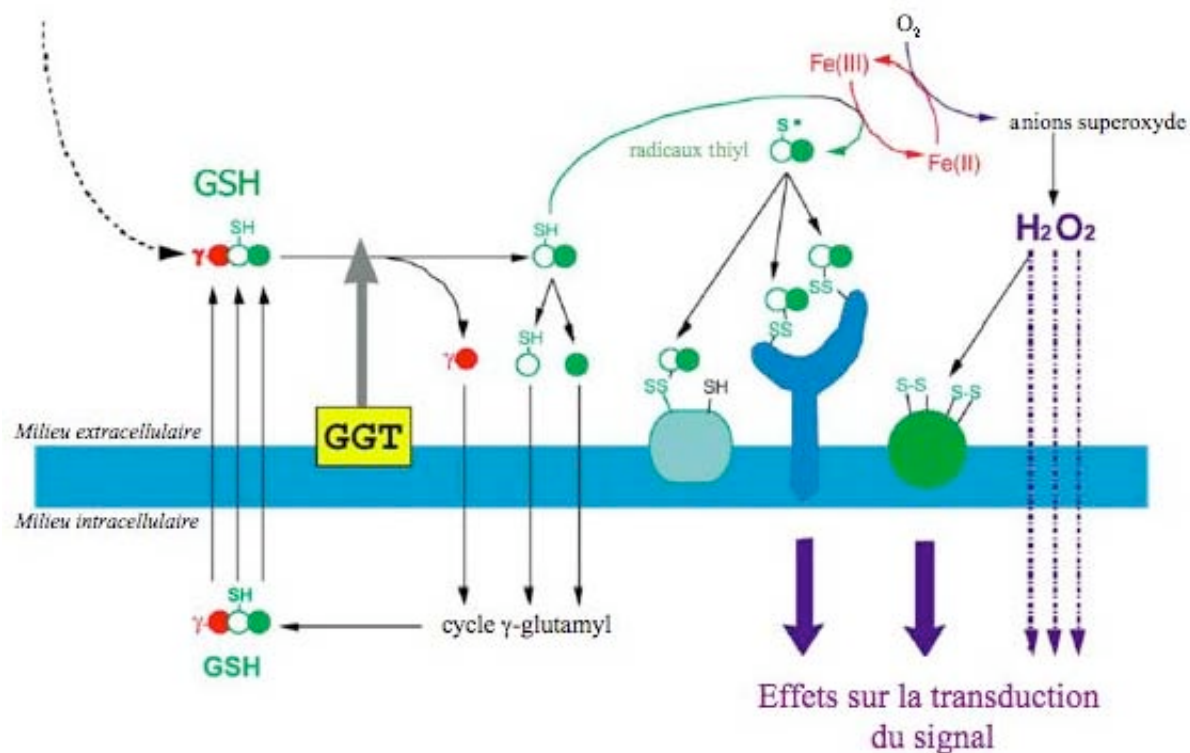


Figure 7 : Schéma résumant les réactions prooxydantes dérivant du catabolisme du glutathion extracellulaire et les cibles moléculaires potentielles impliquées selon (Paolicchi *et al.*, 2002).

Le catabolisme du glutathion (GSH), clivé en Glu (cercle rouge) et en Cysgly (cercles blancs-verts) par la GGT, permet d'approvisionner les cellules en précurseurs du GSH et donc de servir à la synthèse *de novo* du GSH. En devenant hautement réactif en présence de fer, le dipeptide Cysgly peut former des ponts dissulfures avec les thiols présents sur certaines protéines de surface. En présence de fer et d'oxygène, ce dipeptide peut également générer des espèces réactives de l'oxygène (tel le H₂O₂), oxyder des protéines de surface et avoir des effets sur les voies de signalisation.

prolifération cellulaire et l'apoptose (Iciek *et al.*, 2007). Les résultats de del Bello *et al.* vont dans le même sens puisqu'ils supposent que les niveaux faibles d'H₂O₂ générées par la GGT peuvent agir comme un "signal de survie", qui protégerait les cellules contre l'apoptose, probablement à travers une sur-régulation de l'activité de la poly(ADP-ribose) polymérase (PARP) (del Bello *et al.*, 1999).

Par ailleurs, il a été montré que ces altérations oxydatives peuvent affecter des récepteurs de surface, comme l'EGFR (Clark and Konstantopoulos 1993 ; Huang, R. P. *et al.*, 1996), le β -FGFR (Herbert *et al.*, 1996), le récepteur à l'insuline (Schmid *et al.*, 1998) ou le récepteur au TNF α (De Tata *et al.*, résultats non publiés), en altérant le statut d'activation du récepteur ou l'affinité pour le ligand.

Ce rôle prooxydant de la GGT, qui peut produire des dégâts génétiques aux cellules (Imlay and Linn 1988 ; Vaca and Harms-Ringdahl 1989 ; Weitberg and Corvese 1989) et activer des protéines et des facteurs de transcription, peut être à l'origine de plusieurs pathologies, comme le cancer (Graff *et al.*, 1978 ; O'Brian *et al.*, 1988 ; Vesely *et al.*, 1979).

I. 4. - La γ -glutamyltransférase et l'inflammation

I. 4. 1. - La γ -glutamyltransférase et les leukotriènes

La GGT intervient également dans la synthèse des leukotriènes (Orning *et al.*, 1980). Les leukotriènes (LT) sont un groupe de métabolites de l'acide arachidonique biologiquement actifs impliqués dans la pathophysiologie de nombreuses maladies inflammatoires, comprenant l'asthme, l'arthrite, le psoriasis et les maladies inflammatoires de l'intestin (Devillier *et al.*, 1999 ; Henderson 1994 ; Horwitz *et al.*, 1998). La biosynthèse des LT est limitée à un petit nombre de types cellulaires humains, à savoir les mastocytes, les éosinophiles, les basophiles et les macrophages.

Le clivage de la membrane nucléaire de l'acide arachidonique par la phospholipase A₂ (PLA₂) initie la synthèse des leukotriènes (Drazen *et al.*, 1999). L'interaction subséquente de l'acide arachidonique avec les protéines 5-lipoxygénase (5-LO) et la protéine activatrice de la 5-lipoxygénase (FLAP) produit l'acide 5-hydroperoxyeicosatétraénoïque (5-HPETE), qui est rapidement converti en leukotriène A₄ (LTA₄) (Figure 8). Le LTA₄ peut être converti en LTB₄

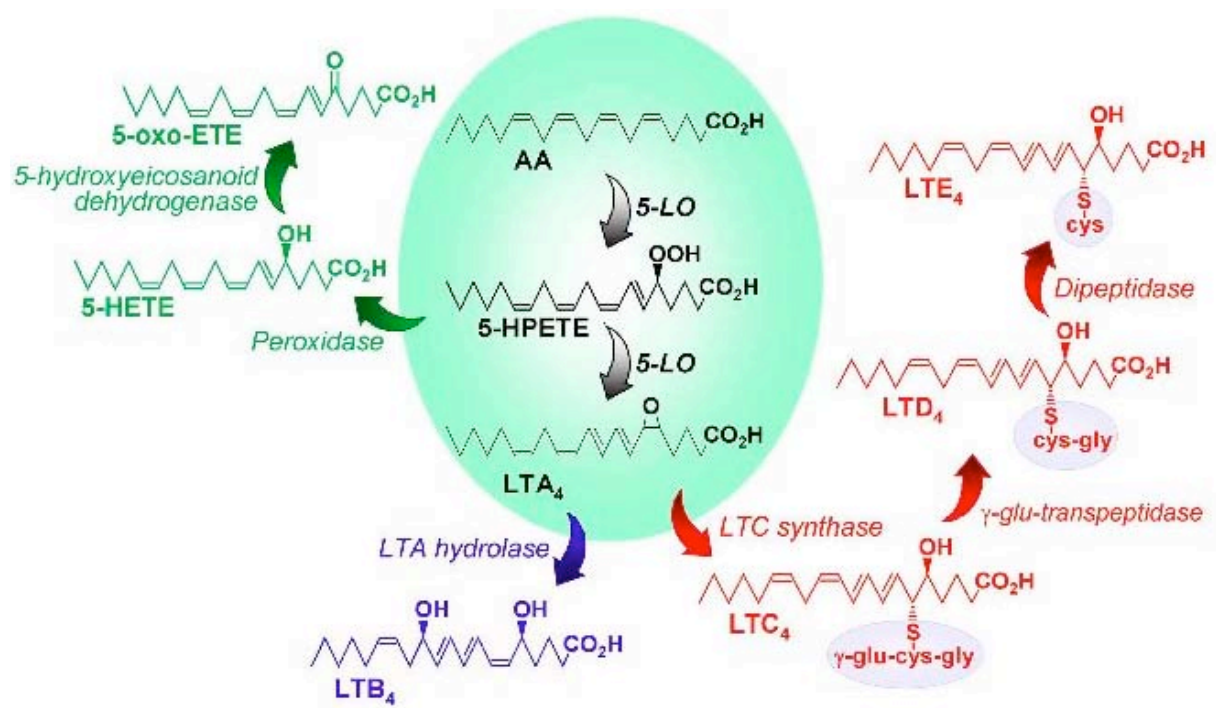


Figure 8 : Synthèse des leukotriènes

L'enzyme 5-lipoxygénase (5-LO) initie la synthèse des leukotriènes (LT) à partir de l'acide arachidonique (AA). L'AA est ensuite transformé en acide 5-hydroxyperoxy-eicosatétraénoïque ou 5-HPETE, lui-même transformé en acide 5,6-époxyeicosatétraénoïque nommé leukotriène A₄ ou LTA₄. Sous l'influence de la glutathion peroxydase, le 5-HPETE peut être réduit en acide 5-hydroxyeicosatétraénoïque ou 5-HETE. Les autres LT vont être synthétisés à partir du LTA₄ par deux voies distinctes. La LTA₄ hydrolase transforme le LTA₄ en acide 5,12-dihydroxyeicosatétraénoïque ou LTB₄. La leukotriène C₄ synthétase, qui est une glutathion-S-transférase, transforme le LTA₄ en acide 5-hydroxy-6-glutathionyl-eicosatétraénoïque ou LTC₄. Le LTC₄ est ensuite clivé par la γ-glu-transpeptidase ou GGT en LTD₄ en éliminant le résidu γ-glutamyl du LTC₄ et le clivage de la glycine du LTD₄ par une dipeptidase mène au LTE₄.

par la LTA₄ hydrolase ou en LTC₄ par la LTC₄ synthase. Le LTC₄ est ensuite clivé par la GGT, qui enlève le groupement γ -glutamyl du LTC₄, pour former le LTD₄ (Lewis, R. A. *et al.*, 1990). Le groupement Gly est ensuite enlevé du LTD₄ par une dipeptidase pour former le LTE₄.

Le LTD₄ est un médiateur pro-inflammatoire qui médie ses effets par l'intermédiaire des récepteurs CysLT₁ (Lynch *et al.*, 1999). Il est impliqué dans la pathogenèse de plusieurs maladies inflammatoires, comme l'asthme et les maladies inflammatoires de l'intestin (Samuelsson 1983).

La conversion du LTC₄ en LTD₄ a longtemps été considérée comme étant uniquement médiée par la GGT mais depuis quelques années, un gène humain qui a 40% d'identité avec le gène GGT1, le gène GGT5, a été cloné (Heisterkamp *et al.*, 1991 ; Heisterkamp *et al.*, 2008). L'enzyme codée par ce gène, nommée γ -glutamyltranspeptidase-related (GGT-rel) est capable de cliver le résidu γ -glutamyl du LTC₄, mais est incapable d'hydrolyser les substrats synthétiques de la GGT qui sont habituellement utilisés pour analyser la GGT. La GGT-rel n'est pas exprimée chez la souris (Heisterkamp *et al.*, 1991), mais par contre, des analyses effectuées avec des souris déficientes en GGT ont révélé une nouvelle isoforme de la GGT dans la souris, la γ -glutamylleukotriénase (GGL), qui est capable de métaboliser le LTC₄ (Carter *et al.*, 1997 ; Harding *et al.*, 1997 ; Lieberman *et al.*, 1996).

Une analyse de patients avec une déficience génétique en GGT montre pourtant que l'absence du gène GGT1 mène à une déficience complète de la biosynthèse du LTD₄ (Mayatepek *et al.*, 2004), indiquant que chez l'humain l'isoforme GGT normale, codée par le gène GGT1, est suffisante pour convertir le LTC₄ en LTD₄. Le plasma de ces patients révèle un profil anormal avec une concentration élevée en LTC₄ et une absence en LTD₄ ainsi qu'en LTE₄, alors que la synthèse du LTB₄ n'est pas affectée.

I. 4. 2. - La γ -glutamyltransférase et le TNF α

Le facteur nécrosant des tumeurs alpha (en anglais tumor necrosis factor alpha (TNF α)) est une importante cytokine impliquée dans l'inflammation systémique et dans la réaction de phase aiguë. Le TNF α a été isolé en 1975 sous forme d'un facteur soluble libéré par les cellules de l'hôte ayant provoqué la nécrose d'une tumeur transplantée, la "sarcome Meth A"

(Carswell *et al.*, 1975). Bien que le $\text{TNF}\alpha$ ne provoque pas la nécrose de certaines tumeurs, il peut stimuler la croissance d'autres. Dans ce sens, son nom est quelque peu abusif.

Depuis sa découverte, 18 homologues différents du $\text{TNF}\alpha$ avec 15-20% d'identité entre eux ont été reportés (Aggarwal *et al.*, 2002). A côté des ligands, les récepteurs pour la plupart de ces cytokines ont été identifiés et appartiennent à la superfamille des récepteurs au TNF avec une homologie maximale dans leur domaine extracellulaire (Aggarwal *et al.*, 2002). Tous les membres de la superfamille du TNF activent le facteur de transcription Nuclear Factor-kappa B (NF- κ B), mais pas tous de la même façon (Aggarwal 2000).

Quelques études ont montré que des cytokines peuvent induire l'activité enzymatique et l'expression de la GGT. En effet, le $\text{TNF}\alpha$, les interférons (IFN) α et β ainsi que l'interleukine (IL) 1β peuvent stimuler l'activité enzymatique de la GGT (Bouman *et al.*, 2002 ; Meroni *et al.*, 2000 ; Ruedig and Dringen 2004). Par ailleurs, le sous-type A de l'ARNm de la GGT peut être induit par le $\text{TNF}\alpha$ et les IFN α et IFN β alors que le sous-type B de l'ARNm de la GGT n'est induit qu'avec l'IFN β (Bouman *et al.*, 2002 ; Daubeuf *et al.*, 2001). Le mécanisme responsable de la modulation de la GGT par les cytokines n'est cependant pas encore élucidé.

I. 4. 3. - L'inflammation et le facteur de transcription NF- κ B

Le facteur de transcription NF- κ B est ubiquitaire et peut être détecté sous sa forme inactive dans le cytoplasme de quasiment tous les types cellulaires (Baldwin 1996). NF- κ B est composé d'homo- et d'hétérodimères comprenant un groupe de cinq protéines, appelé NF- κ B1 (p50 et son précurseur p105), NF- κ B2 (p52 et son précurseur p100), p65/RelA, c-Rel et RelB (Hayden and Ghosh 2004). L'hétérodimère p50/p65 étant le plus représenté. p65/RelA, c-Rel et RelB contiennent un domaine de transactivation, alors que p50 et p52 pas. NF- κ B est maintenu sous sa forme inactive grâce à la famille des protéines inhibiteurs appelée inhibiteurs de kappa B (I κ B), comme l'I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ , p100, p105 et Bcl-3. L'I κ B α étant la mieux caractérisée de cette famille. Un grand nombre de signaux externes (cytokines, stress oxydant, agents endommageant l'ADN, agents infectieux et polluants) peuvent activer le facteur de transcription NF- κ B (Figure 9).

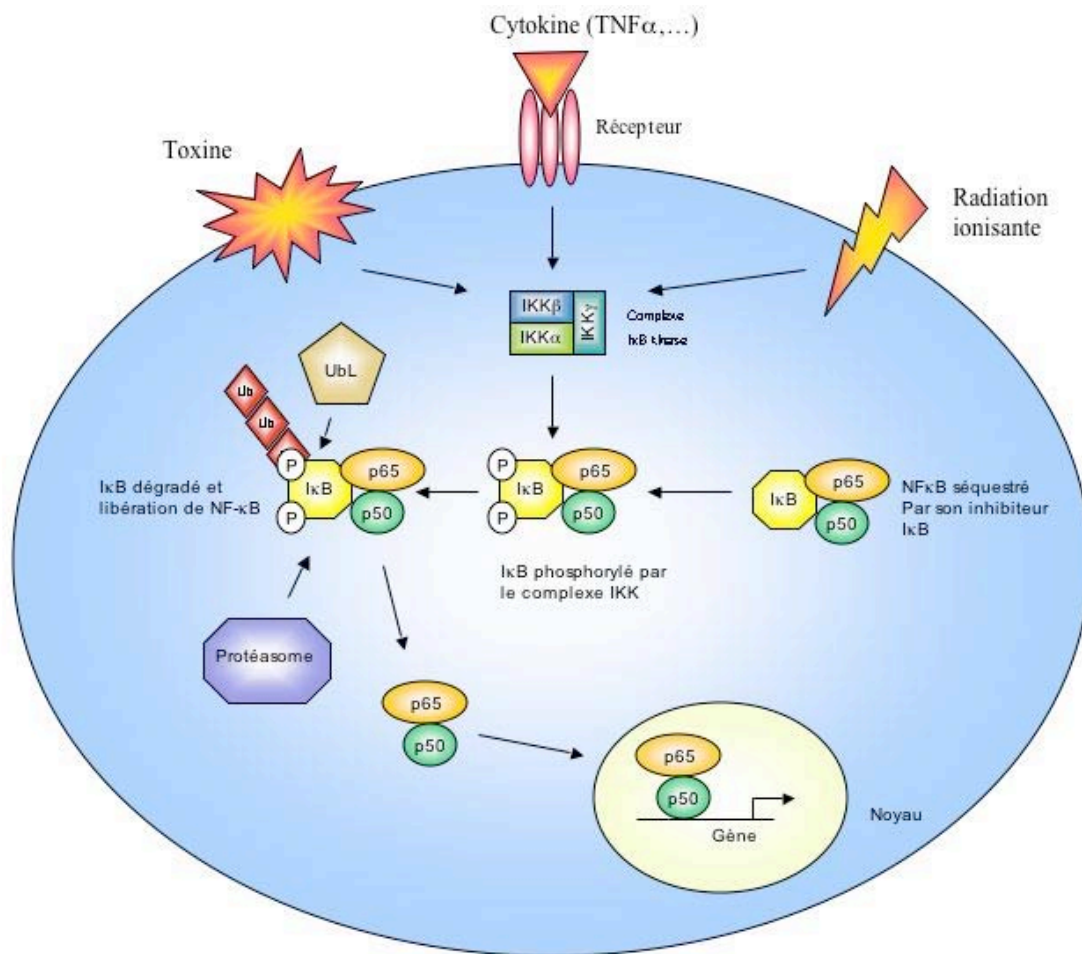


Figure 9 : Régulation de NF-κB selon (Haefner 2002).

Différents inducteurs comme les toxines, les cytokines (TNFα,...) ou des radiations ionisantes permettent d'activer NF-κB. Une cascade de signalisation active le complexe IKK qui comprend les trois 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. (NF-κB : nuclear factor-κB, IKK : IκB kinase, IκB : Inhibiteur de κB, Ub : ubiquitine, UbL : Ub ligase). De nombreux stimuli activent NF-κB y compris les cytokines pro-inflammatoires comme le TNFα ou l'IL-1β, certaines bactéries et produits bactériens (lipopolysaccharides (LPS)), des virus (HIV-1, CMV), ainsi que des stress chimiques (stress oxydant ou agents thérapeutiques) ou physiques (UV ou rayons γ) (Pahl 1999).

Après stimulation de NF- κ B, les protéines I κ B sont rapidement phosphorylées et dégradées par le protéasome et les protéines NF- κ B libérées peuvent alors transloquer dans le noyau et réguler l'expression de multiples gènes cibles (Hayden and Ghosh 2004).

Il existe trois voies de signalisation NF- κ B (Beinke and Ley 2004). La première voie, appelée voie canonique est induite par des cytokines pro-inflammatoires (Devin *et al.*, 2000 ; Martin, M. U. and Wesche 2002), des récepteurs Toll-like (TLR) (O'Neill 2006) et dans certains types cellulaires par un stress oxydant ou génotoxique (Gloire *et al.*, 2006a ; Gloire *et al.*, 2006b ; Janssens and Tschopp 2006).

Dans le cas du TNF α comme activateur, celui-ci se lie à son récepteur, le TNFR-1 (TNF receptor 1), qui initie la cascade de signalisation NF- κ B. L'interaction entre le TNF α et son récepteur mène à l'aggrégation du récepteur et à la dissociation de la protéine SODD (Silencer Of Death Domain), un inhibiteur de l'activité du TNFR-1. Cette dissociation de SODD permet l'association de TRADD (TNFR-Associated Death Domain) (Jiang *et al.*, 1999) qui recrute des protéines adaptatrices comme les protéines TRAF2 et TRAF5 (TNF-Receptor-Associated Factor) (Dempsey *et al.*, 2003 ; Tada *et al.*, 2001). La protéine RIP1 (Receptor Interacting Protein 1) joue aussi un rôle crucial dans l'activation de NF- κ B par le TNF α (Hsu *et al.*, 1996a). Elle fonctionne comme une protéine d'échafaudage notamment par sa liaison directe à NEMO, qui permet le recrutement du complexe I κ B-Kinase (IKK) (Zhang, S. Q. *et al.*, 2000). Le complexe IKK contient les trois kinases IKK α , IKK β et IKK γ ou NEMO et une fois activé par phosphorylation, ce complexe phosphoryle l'I κ B au niveau des sérines Ser32 et Ser36.

A côté de cette activation classique, une deuxième voie, appelée voie p105, existe. Cette voie est spécifiquement impliquée dans les réponses immunitaires et inflammatoires (Beinke and Ley 2004). L'activation de cette voie par des ligands, tels que le TNF α , l'IL-1 ou le lipopolysaccharide (LPS) induit la phosphorylation du précurseur p105 par le complexe IKK classique. Cette phosphorylation initie l'ubiquitination et la dégradation de p105, libérant ainsi les homodimères p50/p50 qui peuvent stimuler ou inhiber la transcription des gènes. La troisième voie, appelée voie alternative, est indépendante de la sous-unité NEMO et régule les gènes sous forme d'un hétérodimère p52/RelB (Beinke and Ley 2004).

Le facteur de transcription NF- κ B est constitutivement exprimé dans un grand nombre de cancers humains, dont le cancer du sein, les leucémies des lymphocytes B et T, le cancer de la

thyroïde, les mélanomes ou encore le cancer du colon et l'inhibition de ce facteur annule la prolifération tumorale des cellules (Bharti and Aggarwal 2002 ; Younes *et al.*, 2003).

A côté de son implication dans le cancer, NF- κ B est associé à de nombreuses autres maladies comme le SIDA, l'athérosclérose, l'asthme, le diabète et les maladies inflammatoires chroniques comme la maladie de Crohn et l'arthrite rhumatoïde.

En effet, son rôle dans l'inflammation est largement établie puisque le facteur NF- κ B est le régulateur principal des gènes pro-inflammatoires comme le TNF α (Collart *et al.*, 1990 ; Shakhov *et al.*, 1990), d'où appelé aussi facteur de transcription pro-inflammatoire, de chemokines, de molécules d'adhésion, des métalloprotéinases de matrice (MMP), de la cyclooxygénase 2 (COX2) et de l'oxyde nitrique synthétase inductible (iNOS) (Baeuerle and Baichwal 1997 ; Tak and Firestein 2001).

La démonstration clé du rôle de NF- κ B dans l'inflammation vient de diverses approches expérimentales (Baeuerle and Baichwal 1997 ; Barnes and Karin 1997). Premièrement, un tel rôle a été supposé par l'observation que NF- κ B peut être activé par un grand nombre d'activateurs pro-inflammatoires (des cytokines, comme le TNF α et l'IL-1, le stress oxydant et des agents infectieux) et cette activation peut en retour activer l'expression de nombreux médiateurs de l'inflammation, tel que les cytokines (TNF α , IL-1, IL-6), des chémokines (RANTES, IL-8), des enzymes inflammatoires (iNOS, COX-2, lipoxycgénase) et des molécules d'adhésion (ICAM-1 etc). Deuxièmement, l'activation de NF- κ B a été observée dans des modèles animaux ainsi que dans des maladies inflammatoires humaines (Barnes and Adcock 1997 ; Brand *et al.*, 1996 ; Hart *et al.*, 1998 ; Marok *et al.*, 1996 ; Miagkov *et al.*, 1998). Troisièmement, des souris déficientes pour le gène RelB ou le gène NF- κ B1 ont diverses formes d'immunodéficiences et de maladies inflammatoires (Ishikawa *et al.*, 1998 ; Weih *et al.*, 1995 ; Weih *et al.*, 1997), alors que des animaux knock-out pour le gène I κ B α produisent un excès de granulocytes (Beg *et al.*, 1995 ; Klement *et al.*, 1996). Finalement, le transfert d'un gène muté d'I κ B α dans des cellules endothéliales ou des cellules épithéliales de l'intestin par un adénovirus résulte dans l'inhibition de l'expression des gènes inflammatoires médiée par NF- κ B en réponse au LPS et l'IL-1 (Jobin *et al.*, 1998 ; Wrighton *et al.*, 1996) et les petits ARN interférants (ou en anglais small interfering RNA, siRNA) p65 empêchent des lésions inflammatoires digestives expérimentales (Neurath *et al.*, 1996).

I. 5. - La curcumine

La curcumine est une substance naturelle isolée à partir de la plante *Curcuma longa* L., qui est une plante herbacée rhizomateuse vivace de la famille des Zingibéracées originaire du sud de l'Asie (Figure 10). Le rhizome de cette plante peut être séché et réduit en poudre, appelée tumeric. Le tumeric est utilisé comme épice dans les mélanges d'épices de la cuisine indienne, en particulier dans le curry.

Les ingrédients actifs du tumeric sont des substances appelées curcuminoïdes. Les curcuminoïdes constituent un groupe de trois composés phénoliques, la curcumine (diferuloylmethane), la déméthoxycurcumine et la bisdéméthoxycurcumine. La curcumine constitue environ 90 % des curcuminoïdes.

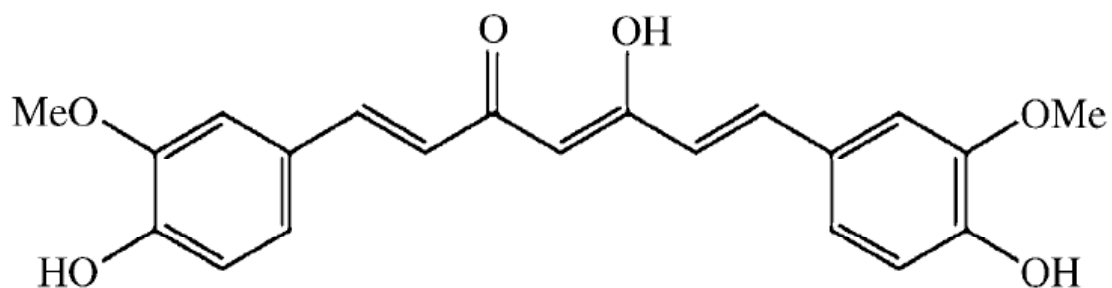
La curcumine a été utilisée pendant des milliers d'années dans la médecine traditionnelle indienne en tant que traitement contre des problèmes biliaires, l'anorexie, la coryza, la toux, ou des blessures diabétiques (Ammon *et al.*, 1992). Aujourd'hui, la curcumine est connue pour ses fortes propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et antivirales (Hergenhahn *et al.*, 2002).

Plusieurs études effectuées durant la dernière décennie ont montré que la curcumine est aussi un puissant agent anticancéreux (Aggarwal). En effet, la curcumine peut supprimer la tumorigenèse de la peau, de la glande mammaire, de la cavité orale, de l'œsophage, de l'estomac, de l'intestin, du colon, du poumon et du foie.

De plus cette substance naturelle inhibe la prolifération d'une grande variété de cellules tumorales, comme celles impliquées dans la leucémie à cellules B et T (Han, S. S. *et al.*, 1999 ; Kuo *et al.*, 1996 ; Piwocka *et al.*, 1999 ; Ranjan *et al.*, 1999), le carcinome de côlon (Chen *et al.*, 1999), le carcinome épidermoïde (Korutla and Kumar 1994), le carcinome cellulaire squameux de la tête et du cou (Aggarwal *et al.*, 2004), le myélome multiple (Bharti *et al.*, 2003) ainsi que le lymphome cellulaire du manteau (Shishodia *et al.*, 2005).

Plusieurs études cliniques de phase II ont été effectuées récemment et douze sont encore en cours (Goel *et al.*, 2008). Les résultats obtenus jusque-là ont déjà largement dépassé les attentes des chercheurs, et ce n'est probablement qu'une question de temps jusqu'à ce qu'on puisse apprécier le vrai potentiel de la curcumine comme « boule magique » pour la gestion de diverses maladies humaines.

(A)



(B)



Figure 10 : La curcumine

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

(Chuang *et al.*, 2000 ; Deshpande *et al.*, 1998 ; Huang, M. T. *et al.*, 1988 ; Kuttan *et al.*, 1985 ; Kuttan *et al.*, 1987 ; Lee, S. L. *et al.*, 2005 ; Limtrakul *et al.*, 1997 ; Piper *et al.*, 1998 ; Rao *et al.*, 1984 ; Ushida *et al.*, 2000).

La curcumine régule de nombreuses cibles moléculaires, dont des facteurs de croissance, des récepteurs aux facteurs de croissance, des facteurs de transcription, des cytokines, des enzymes et des gènes régulant l'apoptose (Aggarwal).

Il a par exemple été découvert que la curcumine inhibe l'activation du facteur de transcription NF- κ B en inactivant le complexe IKK et en bloquant la phosphorylation de I κ B α et la translocation de p65 (Bharti *et al.*, 2003). La curcumine peut alors être utilisée comme inhibiteur de NF- κ B.

Un autre rôle important de la curcumine est d'induire l'apoptose des cellules cancéreuses. Il est supposé que l'effet chemopréventif de la curcumine vient de sa capacité à induire l'apoptose de nombreuses cellules tumorales (Reuter *et al.*, 2008). En effet, la curcumine induit des protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2, comme Bax, Bim, Bak, Puma et Noxa et inhibe les deux protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL. A côté de sa capacité à induire l'apoptose des cellules cancéreuses, elle peut aussi bien inhiber les voies de survie NF- κ B et Akt, ainsi que d'induire la sensibilité des cellules à l'apoptose induite par des agents anticancéreux déjà utilisés en clinique (Reuter *et al.*, 2008).

I. 6. - Objectifs

Les données bibliographiques présentées ci-dessus suggèrent que la GGT est impliquée dans le développement des cancers, dans l'acquisition des résistances aux traitements anticancéreux ainsi que dans la synthèse des leukotriènes.

Notre travail s'inscrit dans la thématique du laboratoire dont l'objectif est de mieux comprendre les mécanismes transcriptionnels qui régulent l'expression des gènes impliqués dans la résistance des cellules aux traitements anti-cancéreux.

Plus particulièrement, nous avons voulu étudier la régulation de la GGT, une enzyme impliquée dans le métabolisme du glutathion, dans différentes lignées cellulaires issus de cancers du sang (K562, Raji, U937, Hel, HL-60, JVM-2, Molt3, THP1, TF1, Meg01 et Jurkat) après traitements par deux agents : l'ester de phorbol TPA et la cytokine pro-inflammatoire $\text{TNF}\alpha$.

- a) Les deux traitements induisent les facteurs de transcription, AP-1 (activator protein-1) et $\text{NF-}\kappa\text{B}$, qui sont connus pour réguler des gènes impliqués dans le développement des chimiorésistances ;
- b) En effet, l'expression de la GGT est induite par le traitement au TPA, probablement *via* une voie impliquant le facteur AP-1 (Daubeuf *et al.*, 2004) et l'expression du sous-type A de l'ARNm de la GGT peut être induite par le $\text{TNF}\alpha$ (Daubeuf *et al.*, 2001) ;
- c) notre laboratoire, ainsi que d'autres équipes ont montré que ces traitements régulaient l'expression d'autres enzymes impliquées dans la synthèse (la γGCL) ou le métabolisme du GSH (la GSTP1-1 , une isoforme de la famille des GST) (Morceau *et al.*, 2004), enzymes connues pour participer au développement des chimiorésistances ;
- d) Une analyse *in silico* nous a préalablement révélé deux sites $\text{NF-}\kappa\text{B}$ putatifs sur le promoteur de l'ARNm de type C.

- Notre premier objectif spécifique sera donc d'étudier la régulation des promoteur de la GGT par les agents activateurs de la voie $\text{NF-}\kappa\text{B}$, le TPA et le $\text{TNF}\alpha$.

Pour atteindre cet objectif, nous utilisons plusieurs approches complémentaires et notamment :

- une approche qui consistera à inhiber l'effet inducteur observé. Nous traiterons les cellules avec un anticorps (AC) anti-TNF α ou avec un inhibiteur de la voie NF- κ B, la curcumine, et nous étudierons leur effet sur des constructions plasmidiques associant les promoteurs B et C de la GGT à un gène luciférase, transfectées dans les cellules K562. Nous élargirons cette approche en utilisant des siRNA ciblant les formes p50 et p65 de NF- κ B.
 - une approche qui visera à mettre en évidence les intermédiaires de la voie de transduction NF- κ B impliqués dans la régulation de l'expression du promoteur C de la GGT.
 - une approche par mutation qui déterminera les sites NF- κ B importants pour la régulation de l'expression du promoteur C de la GGT.
 - enfin, une approche par gel-retard et une approche par ChIP afin d'identifier les complexes protéiques importants pour la régulation de l'expression du promoteur C de la GGT.
- Notre deuxième objectif spécifique sera d'étudier l'expression et l'activité de la GGT après traitement au TNF α dans une des lignées cellulaires issues de cancers du sang et de caractériser l'expression et la modulation des différents sous-types d'ARNm de la GGT par la technique de RT-PCR dans cette lignée avant et après traitement par le TNF α .
- Notre troisième objectif spécifique sera d'étudier la localisation cellulaire de la GGT après traitement au TNF α .

Dans la mesure où la GGT joue un rôle pro-oxydant sous certaines conditions, nous allons étudier ce rôle dans les cellules K562. Nous allons tout d'abord :

- vérifier la production d'H₂O₂ dans les cellules K562 après traitement au TNF α en utilisant une technique basée sur la scopoletine, un donneur d'hydrogène fluorescent.
- nous allons ensuite étudier l'effet des réactions pro-oxydantes sur les protéines de surface des cellules K562 par western blots.

Puisqu'il est connu que les réactions pro-oxydantes dérivant du catabolisme du GSH par la GGT peuvent oxyder et par conséquent changer la structure des protéines de surface,

- nous étudierons l'effet de ces réactions sur la capacité de liaison du récepteur TNFR-1 pour son ligand TNF α ainsi que sur le nombre des récepteurs après traitement au TNF α par une technique basée sur du TNF α radioactif et par cytométrie en flux.
- enfin, nous analyserons les possibles changements de l'affinité du récepteur TNFR-1 après traitement au TNF α par une représentation de Scatchard.

Finalement, nous analyserons l'expression de gènes de la famille NF- κ B traités au TNF α et à la curcumine par PCR en temps réel (Superarray).

II. - Matériels et méthodes

II. 1. - Lignées cellulaires et réactifs

- La lignée K562 est une lignée continue établie à partir de cellules issues d'une leucémie myéloïde chronique en phase blastique terminale, prélevées dans le liquide pleural d'une patiente de 53 ans (Lozzio and Lozzio 1975). Les K562 expriment le chromosome Philadelphie qui résulte de la translocation réciproque entre les chromosomes 9 et 22. Au cours de cette translocation, le protooncogène c-ABL normalement présent sur le chromosome 9 est fusionné au gène BCR situé sur le chromosome 22 (Woessmann and Mivechi 2001). Le gène hybride résultant de cette translocation conduit à la synthèse d'une protéine de fusion BCR-ABL à forte activité tyrosine kinase (McGahon *et al.*, 1994).
- La lignée JVM-2 a été établie à partir du sang périphérique d'une femme âgée de 63 ans atteinte d'une leucémie proliférante à cellules B (Melo *et al.*, 1986).
- La lignée Raji a été établie à partir de cellules provenant de la glande maxillaire d'un patient africain de 11 ans atteint d'un lymphome de Burkitt (Pulvertaft 1964).
- La lignée Jurkat a été établie à partir de cellules périphériques d'un patient de 14 ans atteint d'une leucémie aiguë à cellules T (Schneider *et al.*, 1977).
- La lignée U937 a été établie à partir de cellules malignes prélevées dans l'épanchement pleural d'un homme de 37 ans atteint d'un lymphome histiocytique diffus (Sundstrom and Nilsson 1976).
- La lignée HEL a été établie à partir du sang périphérique d'un homme âgé de 30 ans atteint d'une érythroleucémie (Martin, P. and Papayannopoulou 1982).
- La lignée HL-60 a été établie à partir du sang périphérique d'une femme âgée de 35 ans atteinte d'une leucémie myéloïde aiguë (Collins *et al.*, 1977).
- La lignée 22RV1, androgéno-sensible, dérive d'une xénogreffe de carcinome humain de prostate implantée dans des souris athymiques castrées (Sramkoski *et al.*, 1999).
- La lignée DU-145, androgéno-indépendante, est issue d'un tissu métastatique cérébral d'un patient de 69 ans atteint d'un cancer de la prostate (Stone *et al.*, 1978).
- La lignée MOLT-3 a été établie à partir du sang périphérique d'un jeune homme âgé de 19 ans atteint d'une leucémie lymphoblastique aiguë (Minowada *et al.*, 1972).

- La lignée THP-1 a été établie à partir du sang périphérique d'un enfant de 1 ans atteint d'une leucémie monocytique aiguë (Tsuchiya *et al.*, 1980).
- La lignée MEG-01 a été établie à partir de la moelle osseuse d'un homme de 55 ans atteint d'une leucémie myéloïde chronique (Ogura *et al.*, 1985).
- La lignée TF-1 a été établie à partir de la moelle osseuse d'un homme de 35 ans atteint d'une érythroleucémie (Kitamura *et al.*, 1989).

Toutes les lignées cellulaires ont été fournies par DSMZ Germany, et cultivées dans du milieu RPMI 1640 (Lonza, Verviers, Belgium), additionné de 10% de sérum de veau foetal (SVF) (Hyclone, Perbio, Erembodegem, Belgium) et de 1% (v/v) d'antibiotique-antimycotique (BioWhittakerTM), à 37°C et avec 5% de CO₂.

Les réactifs utilisés pour le traitement des cellules sont présentés dans le tableau I.

Tableau I : Composés utilisés pour le traitement des cellules.

Nom du composé	Fournisseur	Manipulation	Temps de traitement	Concentration finale
TNF α	Sigma	transcription	4 à 6 h	20 ng/ml
TNF α	Sigma	ARNm	6 h	0,5 et 20 ng/ml
TNF α	Sigma	Gel retard	1 h	20 ng/ml
TPA	MP-Biomedicals	transcription	4 h	100 nM
Curcumine	Sigma	transcription	2 h de prétraitement avant le TNF α	20 μ M
Curcumine	Sigma	ARNm	2 h de prétraitement avant le TNF α	20 μ M
Remicade® (Infliximab)	Centocor	transcription	30 min de prétraitement avant le TNF α	1 mg/ml

II. 2. - Transfections transitoires

Les transfections transitoires des cellules K562 ont été effectuées par électroporation en utilisant le BioRad gene Pulser. L'électroporation est une technique de perméabilisation de la membrane cellulaire par application directe d'une décharge électrique dans les conditions suivantes : 250 V et 500 μ F.

Pour chaque transfection, 250 μ l de cellules ($3,75 \times 10^6$ cellules, $1,5 \times 10^7$ cellules/ml), ont été combinées avec 5 μ g du plasmide Renilla ph-RG-tk (Promega, Leiden, The Netherlands), 5 μ g d'un plasmide rapporteur, placé sous le contrôle des éléments régulateurs du gène de la GGT (p536-Luc et p875-Luc), sous le contrôle de 5 sites NF- κ B consensus (pNF- κ B)(Stratagene) ou sous le contrôle de 7 sites AP-1 consensus (pAP-1)(Stratagene).

Pour les co-transfections, 5 μ g des plasmides d'expression codant pour des protéines de la voie NF- κ B, de la voie AP-1 ou de la famille des facteurs de transcription ETS ont été ajoutés au mélange d'électroporation.

Les expériences avec les siRNA (Dharmacon) ont été effectuées avec les duplexes 1, 2, 3 et 5 pour p50 (NF κ B1 : MU-003520-01) et avec les duplexes 1, 3, 4 et 5 pour p65 (RELA : MU-003533-02). 100 μ l du tampon 1X siRNA ont été ajoutés à 2 nmol de siRNA afin d'obtenir une concentration de 20 μ M et 0,25 nmol des siRNA sont utilisés par transfection. Les siRNA ont été ajoutés au mélange d'électroporation contenant des cellules et des plasmides. Après la transfection, les cuvettes d'électroporation ont été placées pendant 10 min sur glace.

24h après l'électroporation, les cellules transfectées ont été remises en suspension dans du milieu RPMI 1640 à une concentration de 10^6 cellules/ml avec ou sans traitement (Tableau I).

Afin de mesurer l'activité Renilla, 75 μ l du réactif Dual-GloTM Luciferase Reagent (Promega) ont été ajoutés aux cellules et le mélange a été incubé pendant 10 minutes à 22°C. L'activité luciférase a ensuite été mesurée après ajout de 75 μ l du réactif Dual-GloTM Stop & Glo[®] Reagent (Promega) au mélange pendant 10 min. Les activités Renilla et luciférase ont été mesurées avec un luminomètre (Berthold) et les résultats sont exprimés en unités arbitraires de lumière et correspondent à l'activité luciférase rapportée à l'activité Renilla.

II. 3. - Plasmides utilisés pour les transfections

- pGL3-Enhancer (Promega) : ce plasmide a servi de base pour la construction des plasmides rapporteurs p536-Luc et p875-Luc, qui contiennent chacun une partie de l'exon 1 (Rajpert-De Meyts *et al.*, 1988) et soit 536 bp (p536-Luc) soit 835 bp (p875-Luc) de la séquence du promoteur C de la GGT humaine, clonée à partir du cosmide c507 (Visvikis *et al.*, 2001) (Figure 11). Ces constructions nous ont été gracieusement fournies par le Pr. Athanase Visvikis et le Dr. Sandrine Daubeuf (Université de Nancy I, France).
- pGL3 (Promega) : ce plasmide contient différents fragments du promoteur B de la GGT (Figure 12). Les plasmides rapporteurs p244-Luc, p348-Luc, p560-Luc et p778-Luc contiennent différents fragments du promoteur B en amont du gène de la luciférase (Visvikis *et al.*, 2001). Ces constructions nous ont été gracieusement fournies par le Pr. Athanase Visvikis et le Dr. Sandrine Daubeuf (Université de Nancy I, France).
- phRG-TK (Promega) : ce plasmide exprime la Renilla servant de contrôle de transfection.
- pNF- κ B (Stratagene) : plasmide contenant 5 répétitions d'un site NF κ B consensus.
- pAP-1 (Stratagene) : plasmide contenant 7 répétitions d'un site AP-1 consensus.
- Les plasmides de la voie NF- κ B :
 - TNFR1 : plasmide exprimant le récepteur au TNF α
 - TRAF2 : plasmide exprimant la protéine TRAF2
 - TRADD : plasmide exprimant la protéine TRADD
 - I κ B α DN : plasmide exprimant la forme dominante négative de I κ B α
 - p65 : plasmide exprimant la sous-unité protéique p65 de NF- κ B

Ces constructions nous ont été gracieusement fournies par le Pr. Bharat Aggarwal (Anderson Cancer Center, Houston, USA).

- Les plasmides de la voie AP-1 :
 - c-Jun : plasmide exprimant la sous-unité protéique c-Jun de AP-1
 - c-Fos : plasmide exprimant la sous-unité protéique c-Fos de AP-1
- Les plasmides de la famille des facteurs de transcription ETS :
 - PEA : plasmide exprimant la protéine PEA
 - ETV : plasmide exprimant la protéine ETV
 - ERM : plasmide exprimant la protéine ERM

II. 4. - Technique d'immunofluorescence

Cette technique a été utilisée pour contrôler le niveau d'expression des protéines surexprimées. 24h après transfection avec 5 µg de plasmide d'expression, les cellules K562 ont été marquées avec des anticorps (AC) fluorescents spécifiques.

Pour les protéines cytoplasmiques TRAF2, TRADD, IκBαDN et p65, 10 x 10⁶ de cellules transfectées ont été fixées avec 200 µl de paraformaldéhyde (PFA) à 2% et incubées à l'obscurité à température ambiante pendant 15 min. Après lavage au PBS 1X, les membranes ont été perméabilisées par ajout de 100 µl de triton 0,1 % pendant 8 min à température ambiante. Puis lavées au PBS 1X, suivi d'une incubation avec l'AC primaire, dilué au 1:20^e dans du PBS 1X-BSA 0,5% pendant 1h à température ambiante sous agitation. Les cellules ont ensuite été lavées et incubées avec l'AC secondaire, dilué au 1:40^e dans du PBS 1X-BSA 0,5%, pendant 30 min à l'obscurité sous agitation. Après un nouveau lavage au PBS 1X, le culot a été suspendu dans 1 ml de PBS 1X. Afin de visualiser les noyaux des cellules, les cellules ont été incubées avec 1µl /ml de Hoechst pendant 15 min à 37°C. Un aliquot a ensuite été centrifugé par cytopspin et observé sous un microscope fluorescent inversé DMIRB (Leica), équipé avec des filtres appropriés, une caméra Leica DFC 350 FX et un logiciel d'images Firecam 3.0 (Leica Microsystems). L'analyse des images a été réalisée avec le logiciel Image J 1.b (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

Pour la protéine membranaire TNFR-1, 10 x 10⁶ de cellules transfectées ont été incubées pendant 40 min sur glace avec l'AC primaire, dilué au 1 :40^e dans du PBS 1X-BSA 0,5%. Les cellules ont ensuite été lavées et incubées avec l'AC secondaire, dilué au 1 :100^e dans du PBS 1X-BSA 0,5%, pendant 40 min à l'obscurité sur glace. Les cellules ont été lavées au PBS 1X, puis le culot a été suspendu dans 1 ml PBS 1X et marqué avec 2µl/ml de Hoechst pendant 30 min sur glace puis centrifugées par cytopspin et observées sous le microscope.

II. 5. - Mutagenèse des plasmides p536-Luc et p875-Luc

Les deux sites NF-κB, se trouvant dans les plasmides p536-Luc et p875-Luc, ont été mutés par PCR en utilisant la Platinum ® Pfx DNA polymérase (Invitrogen) et des amorces spécifiques contenant une mutation dans les sites NF-κB (tableau II). Un site pour les enzymes de restriction *Xba*I ou *Bgl*II a été introduit dans la séquence à muter. Le plasmide p536-Luc est muté dans le site NF-κB 2 et le plasmide p875-Luc est muté, soit dans le site

NF- κ B 2, soit dans le site NF- κ B 3. La réaction de PCR a été réalisée avec un mix contenant 1 μ l d'ADN (p536-Luc ou p875-Luc) (50 ng), 5 μ l de tampon Pfx Amplification 10X, 1,5 μ l d'amorces sens (0,3 μ M) et 1,5 μ l d'amorces antisens (0,3 μ M), 1,5 μ l du mélange dNTP (0,3 mM), 1 μ l de MgSO₄ (1 mM) et 0,4 μ l de la Platinum ® Pfx ADN polymérase (1 unité). L'amplification a été réalisée à l'aide d'un thermocycleur (Eppendorf) dans les conditions suivantes : 2 min de dénaturation initiale à 94°C, 25 cycles de 15 sec à 94°C, 30 sec à 55°C suivies de 6 min à 68°C.

Pour la mutation simultanée des deux sites NF- κ B dans le plasmide p875-Luc, la deuxième mutation a été introduite dans le plasmide p875-Luc déjà muté pour le premier site.

Après vérification des produits PCR par migration sur gel d'agarose 1,4%, les produits positifs ont été digérés par l'enzyme *DpnI* qui coupe l'ADN méthylé (la matrice) et pas l'ADN non méthylé (le produit PCR). La digestion a été réalisée pendant 2 h à 37°C. Les plasmides digérés ont ensuite été purifiés sur colonne (Qiagen) et 2 μ l (environ 3 ng) de chaque produit PCR a été utilisé pour la transformation des bactéries XL1-blue (Stratagene). Trois à six clones positifs par site muté ont été choisis et pré-cultivés dans du milieu LB. Une mini-préparation des clones positifs, suivie d'une digestion par les enzymes de restriction *XbaI*, qui coupe entre le T et le C de la séquence (T|CTAG A) et *BglII*, qui coupe entre le A et le G de la séquence (A|GATC T) ont été réalisés afin de contrôler si la mutation avait été intégrée à l'endroit désiré. Finalement, les produits ainsi sélectionnés ont été séquencés (<http://www.gatc-biotech.com/de/index.php>).

Tableau II : Séquences des amorces utilisées pour la mutagenèse des plasmides p536-Luc et p875-Luc

Les séquences mutées sont soulignées, le site pour l'enzyme de restriction *BglII* est surligné en jaune et le site pour l'enzyme *XbaI* en gris.

Site	Séquences	pb
NF- κ B 2	(S) :5'-GAGAGGGCCTGTTAGGAGAGGCATCCCCTGCCCTGGGGTTGTA-3' (AS) :5'-TACAACCCAGGGCAGGGGATGCCTCTCCTAACAGGCCCTCTC-3'	43 43
NF- κ B 2 muté	(S): 5'-GAGAGGGCCTGTTAGGAGCGAGATCTGGTGCCCTGGGGTTGTA-3' (AS): 5'-TACAACCCAGGGCACAGATCTCGCTCCTAACAGGCCCTCTC-3'	43 43
NF- κ B	(S): 5'-GAAATTGGGGGTCAAGGAAGGACCCTCCTGGATTATGTGA-3'	40

NF-κB 3	(S) : 5'-GAAATTGGGGGTCAAGGAAGGACCTCCTGGATTATGTGA-3'	40
	(AS) : 5'-TCACATAATCCAGGAGGGTCCTTCCTTGACCCCCAATTTTC-3'	40
NF-κB 3	(S) : 5'-GAAATTGGGGGTCAACTCTAGACGGTCCTGGATTATGTGA-3'	40
	(AS) : 5'-TCACATAATCCAGGACCGTCTAGAGTTGACCCCCAATTTTC-3'	40

II. 6. - Mutagenèse systématique du plasmide p536-Luc

Le plasmide p536-Luc a été muté systématiquement par PCR en utilisant la Platinum® Pfx DNA Polymerase (Invitrogen). 53 oligonucléotides différents ont été dessinés afin de couvrir tout le promoteur C de la GGT, qui représente une séquence totale de 536 pb (tableaux III et IV). Les 53 oligonucléotides différents contiennent tous 40 pb différentes du promoteur C de la GGT (vers la direction du +1) mais les 10 pb au milieu contiennent toujours la même séquence TGTCTAGAGT. La séquence TGTCTAGAGT contient un site pour l'enzyme de restriction *Xba*I. La PCR a été réalisée selon les conditions décrite dans le paragraphe II.4.

II. 7. - Extractions des facteurs nucléaires

Les facteurs nucléaires ont été extraits à partir de 10×10^6 cellules selon la méthode décrite par Schreiber *et al.* (Schreiber *et al.*, 1989). Les membranes plasmiques et nucléaires ont été lysées dans un milieu hypertonique en présence de détergent dans des solutions salines contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases. Les facteurs nucléaires ont été dosés selon la méthode de Bradford (Bradford 1976).

II. 8. - Gel retard

Des sondes radioactives (0,2 ng) ont été incubées avec 5-10 µg de facteurs nucléaires, 2 µg/ml de poly-dIdC (oligonucléotide synthétique qui permet par compétition d'éliminer les fixations non spécifiques des protéines

GACTCCCTTCAGTCCAGGTGACCAGGGTCCTTGAGTGACAGCTCCTAGAGCCCCACCTGTAGTCCTGCA
 TGTCTAGAGT
 Oligo 1 2 3 4 5 6 7
 AGCTGGGGAGAGGGCCTGTTAGGAGAGGCATCCCCTGCCCTGGGGTTGTAGAGGTGAAGTACTAGGCTCCTCA
 8 9 10 11 12 13
 GACCTTGTGGGGCCTCAGATGCTTACATCTCCAGCCCTCCTGGCGTGGGCATCTGGCTGCAGCCCAGCT
 14 15 16 17 18 19 20
 CTGTGGCCCATCTCCAGGGAACCTTTGGTCTAATCTGCTCCCGTGAAACCCAGCCTCATTGAGCCC
 21 22 23 24 25 26 27
 CACCGAGGCTTTTCAAGTTTCAGGTCTCTCATTGAGGGTTTGGAGCCCAACCGGGCTCAGAGACACCTGCA
 28 29 30 31 32 33 34
 GCCTGCAGCGGTCCAGATCACAGCCTCAGGGATGGGACCAGGAGCCAGCCACATCCACCTGCAGCAG
 35 36 37 38 39 40 41
 TTCCTGTGCTTTAAAGCCTCCCTCCCGCCCGCCCGCCAGGCCACTAGGGGAGGGAAGGAGGAGCT
 42 43 44 45 46 47 48
 GGGTCACAGCAGGGAATCTTAGCTTGGTTTTGGTGTGCTGCTGGATgaccagaccgggcgtcgggtgagc
 49 50 51 52 53
 ccagaagttagagagcagttggctgtgccccagtgctgtgtgacccagag

Tableau III : Représentation des 53 oligonucléotides utilisés pour la mutagenèse systématique réalisée dans le plasmide p536-Luc.

Les 536 pb du promoteur C de la GGT ont été mutées systématiquement dans le plasmide p536-Luc par séquences de 10 pb successives. Ces 53 séquences sont toujours remplacées par la même séquence TGTCTAGAGT surlignée en vert. Le site d'initiation +1 est encadré en noir et la région transcrite est écrite en minuscules.

Tableau IV : Séquences des 53 oligonucléotides utilisés pour la mutagenèse systématique du plasmide p536-Luc.

Les séquences mutées sont soulignées et le site pour l'enzyme de restriction *XbaI* est surligné en gris.

Oligonucléotides	Séquences	Taille (pb)
Oligonucléotides 1	S: 5' TAGCCCGGGCTCGAGT <u>GTCTAGAG</u> TAGTCCAGGTGACCAG 3' AS: 5' CTGGTCACCTGGACT <u>ACTCTAGACA</u> CTCGAGCCCGGGCTA 3'	40
Oligonucléotides 2	S: 5' TCGAGGACTCCCTTCT <u>GTCTAGAG</u> TACCAGGGTCCTTGA 3' AS: 5' TCCAAGGACCCTGGT <u>ACTCTAGACA</u> GAAGGGAGTCCTCGA 3'	40
Oligonucléotides 3	S: 5' CCTTCAGTCCAGGTG <u>GTCTAGAG</u> TTGGAGTGACAGTC 3' AS: 5' GAGCTGTCACTCCAA <u>ACTCTAGACA</u> CACCTGGACTGAAGG 3'	40
Oligonucléotides 4	S: 5' AGGTGACCAGGGTCCT <u>GTCTAGAG</u> TAGCTCCTAGAGCCCC 3' AS: 5' GGGGCTCTAGGAGCT <u>ACTCTAGACA</u> GGACCCTGGTCACCT 3'	40
Oligonucléotides 5	S: 5' GGTCTTGAGTGACTG <u>GTCTAGAG</u> TGCCCCACCTGTAGTC 3' AS: 5' GACTACAGGTGGGGC <u>ACTCTAGACA</u> GTCACTCCAAGGACC 3'	40
Oligonucléotides 6	S: 5' GTGACAGCTCCTAGATG <u>GTCTAGAG</u> TAGTCTGCAAGCTG 3' AS: 5' CAGCTTGCAAGGACTA <u>ACTCTAGACA</u> TCTAGGAGCTGTCAC 3'	40
Oligonucléotides 7	S: 5' CTAGAGCCCCACCTG <u>GTCTAGAG</u> TAGTGGGAGAGGGC 3' AS: 5' GCCCTCTCCCCAGCT <u>ACTCTAGACA</u> CAGGTGGGGCTCTAG 3'	40
Oligonucléotides 8	S: 5' ACCTGTAGTCTGTCATG <u>GTCTAGAG</u> TAGGGCCTGTTAGGAG 3' AS: 5' CTCCTAACAGGCCCT <u>ACTCTAGACA</u> TGCAGGACTACAGGT 5'	40
Oligonucléotides 9	S: 5' CTGCAAGCTGGGGAGT <u>GTCTAGAG</u> TAGGAGAGGCATCCCC 3' AS: 5' GGGGATGCCTCTCTC <u>ACTCTAGACA</u> CTCCCCAGCTTGACAG 3'	40
Oligonucléotides 10	S: 5' GGGAGAGGGCCTGTTG <u>GTCTAGAG</u> TCCCTGCCCTGGGG 3' AS: 5' CCCCAGGGCAGGGGA <u>ACTCTAGACA</u> AAACAGGCCCTCTCCC 3'	40
Oligonucléotides 11	S: 5' GGGAGAGGGCCTGTTG <u>GTCTAGAG</u> TCCCTGCCCTGGGG 3' AS: 5' CTAGTTCACCTCTAC <u>ACTCTAGACA</u> CAGGGGATGCCTCTC 3'	40
Oligonucléotides 12	S: 5' CCCTGCCCTGGGGTTG <u>GTCTAGAG</u> TACTAGGCTCCTCAGA 3' AS: 5' TCTGAGGAGCCTAGT <u>ACTCTAGACA</u> AAACCCAGGGCAGGG 3'	40
Oligonucléotides 13	S: 5' GGGTGTAGAGGTGATG <u>GTCTAGAG</u> TTCAGACCTTGTTGGG 3' AS: 5' CCCCACAAGGTCTGA <u>ACTCTAGACA</u> TACCTCTACAACCC 3'	40
Oligonucléotides 14	S: 5' GGTGAAGTAGGCTCCG <u>GTCTAGAG</u> TGGGGCCTCAGATGC 3' AS: 5' GCATCTGAGGCCCA <u>ACTCTAGACA</u> AGGAGCCTAGTTCACC 3'	40
Oligonucléotides 15	S: 5' GCTCCTCAGACCTTG <u>GTCTAGAG</u> TGATGCTTACATCTCC 3' AS: 5' GGAGATGTAAGCATC <u>ACTCTAGACA</u> CAAGGTCTGAGGAGC 3'	40
Oligonucléotides 16	S: 5' CCTTGTGGGGCCTCATG <u>GTCTAGAG</u> TCTCCAGCCCTCCT 3' AS: 5' AGGAGGGGCTGGAGA <u>ACTCTAGACA</u> TGAGGCCCAAGG 3'	40
Oligonucléotides 17	S: 5' CCTCAGATGCTTACATG <u>GTCTAGAG</u> TCTCCTGGCGTGGGCA 3' AS: 5' TGCCACGCCAGGAG <u>ACTCTAGACA</u> TGTAAGCATCTGAGG 3'	40
Oligonucléotides 18	S: 5' TTACATCTCCAGCCCTG <u>GTCTAGAG</u> TGGGCATCTGGCTGCA 3' AS: 5' TGCAGCCAGATGCCA <u>ACTCTAGACA</u> AGGGCTGGAGATGTAA 3'	40
Oligonucléotides 19	S: 5' AGCCCTCCTGGCGTTG <u>GTCTAGAG</u> TCTGCAGCCAGCTCT 3' AS: 5' AGAGCTGGGCTGCAG <u>ACTCTAGACA</u> AACGCCAGGAGGGGCT 3'	40

Oligonucléotides 20	S: 5' GCGTGGGCATCTGGT <u>GTCTAGAGT</u> GCTCTGTGGCCCAT 3' AS: 5' ATGGGGCCACAGAGCACTCTAGACACCAGATGCCACGCC 3'	40
Oligonucléotides 21	S: 5' TCTGGCTGCAGCCCAT <u>GTCTAGAGT</u> CCCATCTCCAGGGA 3' AS: 5' TCCCTGGGAGATGGGACTCTAGACATGGGCTGCAGCCAGA 3'	40
Oligonucléotides 22	S: 5' GCCAGCTCTGTGGCT <u>GTCTAGAGT</u> AGGGAACCTTTGGTC 3' AS: 5' GACCAAAGTTCCCTACTCTAGACAGCCACAGAGCTGGGC 3'	40
Oligonucléotides 23	S: 5' GTGGCCCATCTCCC <u>GTCTAGAGT</u> TGGTCTAATCTGCCT 3' AS: 5' AGGCAGATTAGACCAACTCTAGACAGGGAGATGGGGCCAC 3'	40
Oligonucléotides 24	S: 5' CTCCAGGGAACCTT <u>GTCTAGAGT</u> GCCTCCCGCTGAAA 3' AS: 5' TTTCAGCGGGAGGCAACTCTAGACAAAGTTCCCTGGGAG 5'	40
Oligonucléotides 25	S: 5' ACCTTTGGTCTAATCT <u>GTCTAGAGT</u> TGAAACCCAGCCTCA 3' AS: 5' TGAGGCTGGGTTTCAACTCTAGACAGATTAGACCAAAGGT 3'	40
Oligonucléotides 26	S: 5' TAATCTGCCTCCCGCT <u>GTCTAGAGT</u> CCTATTAGCCCCA 3' AS: 5' TGGGGCTGAATGAGGACTCTAGACAGCGGAGGCAGATTA 3'	40
Oligonucléotides 27	S: 5' CCCGCTGAAACCCAGT <u>GTCTAGAGT</u> CCCCACCGAGGCTTT 3' AS: 5' AAAGCCTCGGTGGGGACTCTAGACACTGGGTTTCAGCGGG 3'	40
Oligonucléotides 28	S: 5' CCCAGCCTCATTAGT <u>GTCTAGAGT</u> GCTTTAGAGTTCAG 3' AS: 5' CTGAACTCTGAAAGCACTCTAGACACTGAATGAGGCTGGG 3'	40
Oligonucléotides 29	S: 5' TTCAGCCCCACCGAGT <u>GTCTAGAGT</u> TTAGGTCTCTCATT 3' AS: 5' AATGAGAGACCTGAAACTCTAGACACTCGGTGGGGCTGAA 3'	40
Oligonucléotides 30	S: 5' CCGAGGCTTTAGAGT <u>GTCTAGAGT</u> CATTAGGGTTTGA 3' AS: 5' TCAAACCTGAATGA <u>ACTCTAGACA</u> CTCTGAAAGCCTCGG 3'	40
Oligonucléotides 31	S: 5' CAGAGTTCAGGTCTCT <u>GTCTAGAGT</u> TTTGAGACCCACCG 3' AS: 5' CGGTGGGGTCTCAAA <u>ACTCTAGACA</u> GAGACCTGAACTCTG 3'	40
Oligonucléotides 32	S: 5' GTCTCTATTAGGGT <u>GTCTAGAGT</u> CACCGGGCTCAGAGA 3' AS: 5' TCTCTGAGCCCGGTACTCTAGACACCTGAATGAGAGAC 3'	40
Oligonucléotides 33	S: 5' CAGGGTTTGAGACCCT <u>GTCTAGAGT</u> AGAGACACCTGCAGC 3' AS: 5' GCTGCAGGTGTCTCTACTCTAGACAGGGTCTCAAACCTG 3'	40
Oligonucléotides 34	S: 5' GACCCACCGGGCTCT <u>GTCTAGAGT</u> GCAGCCTGCAGCGGT 3' AS: 5' ACCGCTGCAGGCTGC <u>ACTCTAGACA</u> GAGCCCGGTGGGGTC 3'	40
Oligonucléotides 35	S: 5' GGCTCAGAGACACCT <u>GTCTAGAGT</u> GCGGTCCCAGATCAC 3' AS: 5' GTGATCTGGGACCGCACTCTAGACAAGGTGTCTCTGAGCC 3'	40
Oligonucléotides 36	S: 5' CACCTGCAGCCTGCAT <u>GTCTAGAGT</u> ATCACAGCCTCAGGG 3' AS: 5' CCCTGAGGCTGTGATACTCTAGACATGCAGGCTGCAGGTG 3'	40
Oligonucléotides 37	S: 5' CTGCAGCGTCCCAGT <u>GTCTAGAGT</u> CAGGGATGGGACCAG 3' AS: 5' CTGGTCCCATCCCTGACTCTAGACACTGGGACCGCTGCAG 3'	40
Oligonucléotides 38	S: 5' CCCAGATCACAGCCT <u>GTCTAGAGT</u> ACCAGGAGCCAGCCC 3' AS: 5' GGGCTGGCTCCTGGTACTCTAGACAAGGCTGTGATCTGGG 3'	40
Oligonucléotides 39	S: 5' AGCCTCAGGGATGGGT <u>GTCTAGAGT</u> AGCCCACATCCCACC 3' AS: 5' GGTGGGATGTGGGCTACTCTAGACACCCATCCCTGAGGCT 3'	40
Oligonucléotides 40	S: 5' ATGGGACCAGGAGCCT <u>GTCTAGAGT</u> CCACTGCAGCAGTT 3' AS: 5' AACTGCTGCAGGTGGACTCTAGACAAGGCTCCTGGTCCCAT 3'	40
Oligonucléotides 41	S: 5' GAGCCAGCCACATCT <u>GTCTAGAGT</u> CAGTTCCTGTGCCTT 3' AS: 5' AAGGCACAGGAAGTACTCTAGACAGATGTGGGCTGGCTC 3'	40
Oligonucléotides 42	S: 5' ACATCCACCTGCAGT <u>GTCTAGAGT</u> GCCTTTAAAGCCTCC 3' AS: 5' GGAGGCTTTAAAGGCACTCTAGACACTGCAGGTGGGATGT 3'	40
Oligonucléotides 43	S: 5' TGCAGCAGTTCCTGT <u>GTCTAGAGT</u> CCTCCCCTCCCCCG 3' AS: 5' CGGGGGGAGGGGAGGACTCTAGACAACAGGAAGTCTGCA 3'	40

Oligonucléotides 44	S: 5' CCTGTGCCTTTAAAGTGTCTAGAGTCCCCGCCCCGCCCC 3' AS: 5' GGGGGCGGGGCGGGGACTCTAGACACTTTAAAGGCACAGG 3'	40
Oligonucléotides 45	S: 5' TAAAGCCTCCCCTCTGTCTAGAGTCCCCAGGCCACTAG 3' AS: 5' CTAGTGGCTGGGGGACTCTAGACAGGAGGGGAGGCTTTA 3'	40
Oligonucléotides 46	S: 5' CCTCCCCCGCCCCGTGTCTAGAGTACTAGGGGAGGGAAG 3' AS: 5' CTTCCCTCCCCTAGTACTCTAGACACGGGGCGGGGGGAGG 3'	40
Oligonucléotides 47	S: 5' CCCC GCCCCAGGCCGTGTCTAGAGTGAAGGAGGAGCTGG 3' AS: 5' CCAGCTCCTCCTCCACTCTAGACAGGCCTGGGGCGGGG 3'	40
Oligonucléotides 48	S: 5' AGGCCACTAGGGGAGTGTCTAGAGTGTGGGTCACAGCAG 3' AS: 5' CTGCTGTGACCCAGCACTCTAGACACTCCCCTAGTGGCCT 3'	40
Oligonucléotides 49	S: 5' GGGAGGGAAGGAGGATGTCTAGAGTAGCAGGGAATCTTAG 3' AS: 5' CTAAGATCCCTGCTACTCTAGACATCCTCCTTCCCTCCC 3'	40
Oligonucléotides 50	S: 5' GAGGAGCTGGGTCACGTGTCTAGAGTCTTAGCTTGTTTTG 3' AS: 5' CAAACCAAGCTAAGACTCTAGACAGTGACCCAGCTCCTC 3'	40
Oligonucléotides 51	S: 5' GTCACAGCAGGGAATTGTCTAGAGTTTTTGGTGTGCTGCT 3' AS: 5' AGCAGCACACCAAAAACCTCTAGACAATCCCTGCTGTGAC 3'	40
Oligonucléotides 52	S: 5' GGAATCTTAGCTTGGTGTGTCTAGAGTCTGCTGGATGACCAG 3' AS: 5' CTGGTCATCCAGCAGACTCTAGACACCAAGCTAAGATTCC 3'	40
Oligonucléotides 53	S: 5' CTTGGTTTTGGTGTGTGTCTAGAGTACCAGACCGGGCGTC 3' AS: 5' GACGCCCGGTCTGGTACTCTAGACACACCAAAACCAAG 3'	40

à l'ADN cible), 2 mg/ml d'albumine de sérum de veau (favorise la formation du complexe) et 80 mM de spermidine (polyamine qui se lie à l'ADN et stimule l'activité de la Polynucléotide kinase T4).

Après 30 à 45 min d'incubation à 4°C, les mélanges ont été déposés sur un gel de polyacrylamide à 5%. Les complexes protéines/ADN formés ont alors été séparés par électrophorèse pendant 2 à 3 h à 16 mA dans le tampon TBE 0,5X. Le gel a été séché par aspiration sous vide, puis révélé par autoradiographie à l'aide d'un film Kodak X-Omat.

Les sondes ont été formées par hybridation des brins sens et antisens (Tableau V).

Les oligonucléotides simple brin lyophilisés ont été repris dans de l'eau ultrapure, puis 1500 ng du brin sens (+) et 1500 ng du brin antisens (-) ont été mélangés à 12 µl de tampon d'hybridation 5X puis hybridés dans un thermocycleur selon les conditions suivantes : 90°C pendant 5 min, 65°C pendant 10 min, 37°C pendant 10 min, 20°C pendant 10 min et 4°C jusqu'au moment de la précipitation.

Tableau V : Séquences des sondes utilisées pour les expériences de gel retard.

Les noms des sondes, les séquences sens (s) et antisens (as), la position des oligonucléotides dans les promoteurs GGT ainsi que la taille des oligonucléotides sont indiqués. Les sites de

fixation des facteurs sont soulignés et en gras. La séquence NF-κB consensus est issue du promoteur de la chaîne légère κ des immunoglobulines.

Sondes	Séquence	Position (promoteur GGT)	Taille (pb)
NF-κB consensus	(s) : 5'-AGTTGA <u>GGGGACTTTCCC</u> AGGC-3' (as) : 5'-GCCTGGGAAAGTCCCCTCAACT-3'		22
Séquence 42	(s): 5'-TGTCTAGAGT <u>CAGTTCCTGT</u> TGTCTAGAGT-3' (as): 5'-ACTCTAGACAACAGGAACTGACTCTAGACA	-111 à -123	30

Les sondes ADN double brin ont ensuite été précipitées avec 0,1 volume d'acétate de Na (3 M) et 3 volumes d'éthanol à 100 % à -20°C. Après une nuit, ce mélange a été centrifugé à 14.000 g pendant 15 min. à 4°C. Le surnageant a été éliminé, puis le culot a été lavé avec 200 µl d'éthanol à 75 %. Après une centrifugation à 14.000 g (4°C) pendant 10 min, le culot a été séché et repris dans 15 µl H₂O (approx. 200 ng/µl).

Le marquage des sondes a été réalisé avec la polynucléotide kinase T4 (Roche), qui catalyse le transfert d'un groupement phosphate en position γ de l'ATP ([γ-³²P]-ATP (ICN) sur la terminaison 5' hydroxylée de l'ADN. Le marquage a été réalisé dans un mélange constitué de 2 µl d'oligonucléotides double brins, de 2 µl [γ-³²P]-ATP (activité spécifique : 7.000 Ci/mmol), de 1 µl Polynucléotide kinase T4, de 2 µl de tampon Kinase 10X et de 13 µl H₂O. Ce mélange a été incubé pendant 30 min à 37°C et l'ADN double brin marqué a été purifié sur colonne (Qiaquick Removal Nucleotide, Qiagen), puis élué.

Les expériences de compétition, ayant pour but de déterminer la spécificité des complexes obtenus, ont été réalisées avec un excès de sonde froide non marquée par rapport à la sonde marquée. Les facteurs nucléaires ont été incubés avec les deux sondes pendant 45 min à 4°C et les échantillons ont ensuite été déposés sur gel.

Les expériences de supershift, permettant d'identifier la protéine formant le complexe retardé, ont été réalisées en incubant les facteurs nucléaires ainsi que les sondes avec des AC spécifiques utilisés à une concentration de 200 µg d'IgG/0,1 ml (tableau VI). Si un complexe est formé, il migrera plus lentement à cause de son poids moléculaire plus élevé (supershift). Il est cependant à noter que l'épitope reconnu par l'AC peut se situer au niveau du site de

liaison à l'ADN et une disparition du complexe protéine-ADN peut donc être observée. Il s'agit alors d'une immunodéplétion.

Tableau VI : Anticorps utilisés pour les expériences de supershifts.

Anticorps	Spécificité
p50 (TransAM)	Pas fourni.
p65 (sc-109)	AC polyclonal de lapin dirigé contre un domaine amino-terminal de la protéine NF- κ B p65.

II. 9. - Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP)

20 x 10⁶ cellules K562 ont été fixées avec le formaldéhyde 1% pendant 10 min à température ambiante puis incubées avec la glycine (0,125 M) pendant également 10 min à température ambiante. Les cellules ont ensuite été lavées au PBS 1X, centrifugées et le culot a été resuspendu dans le tampon de lyse (5 mM PIPES pH8, 85 mM KCl, 0,5% NP-40 plus un cocktail d'inhibiteur de protéases (Complete minus EDTA, Roche)) pendant 10 min. Après la lyse des cellules, les noyaux ont été collectés par centrifugation, lavés au tampon de digestion (5 mM Hepes pH7,5, 60 mM KCl, 15 mM NaCl, 0,34 mM sucrose, 0,15 mM mercaptoéthanol, 0,5 mM spermidine plus un cocktail d'inhibiteur des protéases), et resuspendus dans le tampon de digestion, additionné de 3 mM CaCl₂.

Cette suspension a été incubée pendant 10 min avec la nucléase micrococcale (Mnase, Worthington) afin de couper la chromatine en petits fragments d'une taille moyenne de 600pb. Après les 10 min, la réaction a été bloquée avec le tampon Stop (90 mM Hepes pH7,9, 10 mM EDTA, 220 mM NaCl, 2% Triton X 100, 0,2% Na-deoxycholate, 0,2% SDS plus un cocktail d'inhibiteur de protéases).

La chromatine, séparée des débris cellulaires par centrifugation, a ensuite été incubée avec des billes d'agarose de type A (Upstate) pendant 1h à 4°C afin de la débarrasser des AC non spécifiques.

Après cette incubation, l'ADN a été dilué avec le tampon de dilution IP (16,7 mM Tris-Cl pH8,1, 167 mM NaCl, 1,2 mM EDTA, 1,1 % Triton X-100, 0,01% SDS et cocktail d'inhibiteur de protéases), et 10% de cette solution a été utilisée comme input pour l'analyse des résultats.

La chromatine ainsi diluée a ensuite été incubée avec les AC p50 (sc-7178X), p65 (sc-8008), Sp1 (sc-420X), ARN polymérase II (05-623, Upstate) et l'IgG non spécifique (Santa Cruz) pendant la nuit sous agitation à 4°C. Les complexes ADN-protéines-AC formés ont ensuite été incubés avec des billes d'agarose de type A ou G (dépend de la spécificité de l'AC) (Upstate) pendant 1h à 4°C, puis lavées 2 fois avec du tampon de dialyse 1X (50 mM Tris-HCl pH8, 2 mM EDTA, 0,2% sarkosyl plus cocktail d'inhibiteur des protéases) et 4 fois avec du tampon de lavage IP (100 mM Tris-HCl pH9, 500 mM LiCl, 1% NP-40, et 1% acide déoxycholique).

Les complexes ADN-protéines précipités ont été détachés des billes par incubation avec du tampon d'élution (50 mM NaHCO₃, 1% SDS) et par agitation légère au vortex.

Le cross-linking a ensuite été réversé en ajoutant du NaCl (0,3 M) et en incubant la chromatine avec la RNase A pendant la nuit à 65°C.

Après les échantillons ont été digérés avec la protéinase K pendant 1h30 à 45°C et l'ADN a été purifié sur colonne (PCR purification kit, Qiagen).

Un aliquot a ensuite été amplifié par PCR en temps réel en utilisant le mix « 1X Power SYBR® Green PCR Master Mix » (Applied Biosystems), et 0,1 µM de chaque brin de l'amorce GGT (s : 5'- GTGAGCCCAGAAGTGAGA-3', as : 5'- TGGACTCGAAGGGGTGGATA-3'). L'amorce choisie cible la région du promoteur C de la GGT contenant les sites NF-κB1 et Sp1. Les amplifications ont été réalisées avec un appareil ABI 7300 real-time PCR system (Applied Biosystems) dans les conditions suivantes : 10 min à 95°C, 40 cycles de 15 sec à 95°C et 60 sec à 60°C.

Les différences relatives entre les échantillons ont été déterminées par la méthode du $\Delta\Delta C_T$. La valeur du ΔC_T reflète la différence de la quantité d'ADN immunoprécipité par rapport à l'input. Le $\Delta\Delta C_T$ a été calculé en soustrayant le ΔC_T de l'IgG du ΔC_T de l'échantillon testé. Les valeurs résultant ont été converties en taux de variation par rapport au contrôle en utilisant le $2^{-\Delta\Delta C_T}$.

II. 10. - Extraction d'ARN total

Les ARN totaux ont été extraits à partir de 10×10^6 cellules traitées ou non. Les cellules ont été lavées au PBS 1X, centrifugées à 350 g pendant 7 min puis lysées avec le réactif TRIzol® (Invitrogen, Merelbeke, Belgium). Les ARN totaux purs ont finalement été élués avec de l'eau et quantifiés au spectrophotomètre (Nanodrop).

II. 11. - PCR semi-quantitative

5 µg d'ARN totaux ont été soumis à la transcription inverse en utilisant le kit « SuperScript™ First-strand Synthesis System for RT-PCR » (Invitrogen). Les ADNc obtenus ont été amplifiés par PCR à l'aide du kit « Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity ». Les amorces utilisées sont présentées dans le tableau VII.

L'amplification a été réalisée dans un thermocycleur (Eppendorf). Après une phase de dénaturation initiale et d'activation de l'enzyme pendant 5 min à 94°C, les ADNc ont subi 35 répétitions du cycle suivant : 94°C pendant 30 sec. (dénaturation), 54°C pendant 30 sec. (hybridation) et 72°C pendant 45 sec. (élongation). Les produits de PCR ont ensuite été soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose à 1,4 %, contenant du bromure d'éthidium dans du tampon Tris Borate EDTA (TBE) 1X et quantifiés. Pour chaque amplification, nous avons réalisé parallèlement une amplification du gène S14 afin de standardiser la quantité d'ARN utilisée.

Tableau VII : Séquences des oligonucléotides utilisés pour les expériences d'amplification par PCR.

Le nom et la séquence ((s) sens et (as) antisens) de l'oligonucléotide, le nom de l'ARNm ciblé ainsi que la taille amplifiée sont indiqués.

Oligonucléotides	Séquences	ARNm	Taille (pb)
Type A s	5'-CACAGGGGACATACAGTGAG-3'	GGT type I	308 pb
Type A as	5'-GAAATAGCTGAAGCACGCGC-3'	Sous type A	
Type B s	5'-GGATTCTCCCAGAGATTGCC-3'	GGT type I	300 pb
Type B as	5'-GAAGGTCAAGGGAGGTTACC-3'	Sous type B	
Type C s	5'-GCCCAGAAGTGAGAGCAGTT-3'	GGT type I	386 pb
Type C as	5'-TCCAGAAAGCAGCTAGAGGG-3'	Sous type C	
S14 s	5'-GGCAGACCGAGATGAATCCTC-3'	Contrôle	144 pb
S14 as	5'-CAGGTCCAGGGGTCTTGGTCC-3'		

II. 12. - Extraction des protéines totales

L'extraction des protéines totales a été réalisée en utilisant le kit « M-PER » (Mammalian Protein Extraction Reagent) (Pierce, Belgique). Un culot de 10×10^6 de cellules a été remis en suspension avec la solution M-PER additionnée de 40 μ l/ml de "complete", un mélange d'antiprotéases, à raison de 1 ml pour 100 mg de culot cellulaire. La lyse des cellules a été effectuée sous agitation pendant 10 min à température ambiante. Les débris cellulaires ont été éliminés par centrifugation à 4°C pendant 15 min à 14.000g. La quantification des protéines contenues dans le surnageant a été réalisée par la méthode de Bradford (Bradford 1976).

II. 13. - Western blot

Un volume correspondant à 5-10 μ g de protéines (protéines totales ou facteurs nucléaires) a été mélangé à un volume équivalent de tampon échantillon dénaturant 2X, et dénaturé à 100°C au bain-marie pendant 5 min. L'électrophorèse des échantillons a été effectuée à 10 mA pour le gel de concentration (4% de polyacrylamide), puis à 20 mA pour le gel de séparation (10% de polyacrylamide) dans du tampon d'électrophorèse.

Après séparation, les protéines ont été transférées sur une membrane de PolyVinylideneDiFluoride (PVDF) (GE Healthcare, Pays-Bas) activée à une intensité de 200 mA pendant 2h à 4°C dans du tampon de transfert.

Après transfert, la membrane a été saturée dans du tampon contenant du PBS 1X, additionné de 0,1% Tween 20 (PBS-T) et 5% de lait écrémé, sous agitation pendant une nuit à 4°C.

Après saturation, la membrane a été incubée avec l'AC primaire dans du PBS-T additionné de 5% de lait pendant 1h sous agitation à température ambiante. La membrane a ensuite été lavée dans du PBS-T, puis incubée avec l'AC secondaire pendant 1h sous agitation à température ambiante. Après un dernier lavage au PBS-T, la membrane a été incubée avec le réactif chimioluminescent ECL (Pierce, Belgique) et les protéines ont été visualisées sur un film d'autoradiographie (HyperfilmTM, GE Healthcare, Pays-Bas).

Les AC et les dilutions utilisés pour nos expériences sont précisés dans le tableau VIII. L'AC anti-GGT a été développé par Hanigan et Frierson (Hanigan and Frierson 1996) et a gracieusement été fourni par le Pr. Alfonso Pompella (Department of Experimental Pathology

BMIE, University of Pisa Medical School, Italy). Les AC secondaires utilisés sont couplés à la peroxydase de raifort (en anglais horseradish peroxidase (HRP)).

Tableau VIII : Anticorps primaires et secondaires utilisés pour les western blots

Protéine cible	AC primaire	AC secondaire
GGT	Monoclonal de lapin, dilué au 1/10.000 ^e	AC d'âne anti-lapin (Santa Cruz Biotechnology) dilué au 1/10.000 ^e
p50	sc-7178, dilué au 1/2.500 ^e	AC d'âne anti-lapin (Santa Cruz Biotechnology) dilué au 1/4.000 ^e
p65	sc-372, dilué au 1/2.000 ^e	AC d'âne anti-lapin (Santa Cruz Biotechnology) dilué au 1/4.000 ^e
Grp78	sc-13968, dilué au 1/200 ^e	AC d'âne anti-lapin (Santa Cruz Biotechnology) dilué au 1/50.000 ^e
CD40	sc-975, dilué au 1/1.000 ^e	AC d'âne anti-lapin (Santa Cruz Biotechnology) dilué au 1/10.000 ^e
RelB	sc-226, dilué au 1/5.000 ^e	AC d'âne anti-lapin (Santa Cruz Biotechnology) dilué au 1/5.000 ^e
IL-10	sc-8438, dilué au 1/1000 ^e	AC de chèvre anti-souris (Santa Cruz Biotechnology), dilué au 1/2000 ^e
I κ B α	sc-203, dilué au 1/400 ^e	AC d'âne anti-lapin (Santa Cruz Biotechnology) dilué au 1/2000 ^e
β actine	AC anti- β actine (Sigma) monoclonal de souris, dilué au 1/5.000 ^e	AC de chèvre anti-souris (Santa Cruz Biotechnology), dilué au 1/10.000 ^e

II. 14. - Mesure de l'activité enzymatique de la γ -glutamyltransférase

L'activité enzymatique de la GGT a été mesurée selon la méthode de Sze *et al.* (Sze *et al.*, 1993). L'hydrolyse du substrat synthétique, le γ -glutamyl-*p*-nitroanilide (γ -GPNA ; Sigma) par la GGT, génère la *p*-nitroaniline, colorée en jaune et présentant un pic d'absorbance

autour de 380 nm pouvait être mesuré par spectrophotométrie. Une unité de l'activité GGT est définie comme la quantité de l'enzyme capable de libérer 1 mmol de *p*-nitroaniline par minute (Huseby and Stromme 1974).

II. 15. - Etude de la γ -glutamyltransférase et du cytosquelette d'actine par microscopie à fluorescence

Après traitement, 10×10^6 cellules ont été lavées au PBS 1X et incubées pendant 40 min sur glace avec l'AC primaire de la GGT, dilué au 1:100^e dans du PBS 1X-BSA 0,5%. Les cellules ont ensuite été lavées au PBS 1X et incubées avec l'AC secondaire (Alexa Red 568), dilué au 1:100^e dans du PBS 1X-BSA 0,5% sur glace et à l'obscurité pendant 40 min. Après un dernier lavage, le culot cellulaire a été resuspendu avec 1 ml de PBS 1X additionné de 2 μ l/ml de Hoechst. Le mélange a été incubé pendant 30 min sur glace et un aliquot a été centrifugé par cytospin et observé sous le microscope.

Le cytosquelette d'actine peut être observé par marquage des cellules à la phalloïdine (Invitrogen). 10×10^6 cellules ont été lavées au PBS 1X et incubées avec la phalloïdine pendant 15 min à température ambiante. La phalloïdine a été diluée au 1:40^e dans du PBS 1X. Les cellules ont ensuite été lavées au PBS 1X et le culot cellulaire a été resuspendu avec 1 ml de PBS 1X additionné de 2 μ l/ml de Hoechst.

L'expérience de co-localisation entre la GGT et l'actine a été réalisée en incubant tout d'abord les cellules pendant 15 min à la phalloïdine puis avec l'AC primaire de la GGT pendant 40 min sur glace. L'AC secondaire et le Hoechst ont ensuite été ajoutés.

II. 16. - Détermination de la production du peroxyde d'hydrogène

La méthode fluorimétrique pour mesurer la production du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est basée sur la peroxydase de raifort de type II (horseradish peroxidase (HRP)). L' H_2O_2 , si présent dans le milieu, est spécifiquement réduit par cette enzyme, tandis que la scopoletine, un donneur d'hydrogène fluorescent, est quant à elle oxydée (Dominici *et al.*, 1999 ; Maellaro *et al.*, 2000). La production d' H_2O_2 a été mesurée en suivant la décroissance de la fluorescence de la scopoletine lors de son oxydation catalysée par la peroxydase de raifort (Root *et al.*, 1975). Les courbes de calibration ont été obtenues en ajoutant entre 0,1-5 μ M

d'H₂O₂ standard au milieu d'incubation sans cellules. Pour les déterminations en temps réel, 3 x 10⁶ cellules par condition ont été reprises dans le tampon Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) sans Ca²⁺ et Mg²⁺, en présence de 2 µM de scopoletine (Sigma) et 50 nM HRP (Sigma). Les cellules ont ensuite été incubées et agitées et les mesures ont été réalisées pendant au moins 30 min avec un fluorimètre.

II. 17. - Détermination des groupements thiols des protéines de la surface cellulaire

3 x 10⁶ cellules ont été lavées, puis diluées dans 3 ml de HBSS et ensuite incubées avec 100 µM du marqueur de thiol non cellulaire N-(Biotinoyl)-N'-(iodoacetyl)ethylenediamine (BIA ou IAB) pendant 15 min à 37°C. Les cellules ont ensuite été lavées avec du HBSS et lysées avec du tampon de lyse pendant 45 min à 4°C. Le tampon de lyse contient 0,5% (v/v) de Triton X-100, 5 mM de Tris, 20 mM d'EDTA et 50 mM de NEM (pH 8.0). Les lysats cellulaires ont ensuite été centrifugés pendant 15 min à 17.000g. Les protéines contenues dans le surnageant ont été dosées par la méthode de Bradford (Bradford 1976).

Des aliquots protéiques ont été chargés sur un gel 10% SDS-PAGE, et après séparation, les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose (Sartorius, FRG) tronquée dans du tampon de transfert (48 mM Tris, 39 mM glycine, 0,04 %, w/V, SDS et 20 %, v/v, méthanol). Les protéines ont été révélées en exposant la membrane à l'avidine peroxydase pendant 30 min et le résultat a été obtenu en développant la membrane avec un appareil BioRadChemiDoc.

II. 18. - Dosage des récepteurs au TNF par liaison avec du TNFα radioactif

2 x 10⁶ cellules ont été lavées avec du tampon HBSS et mises en présence pendant 1h avec le TNFα marqué à l'isotope ¹²⁵I (¹²⁵I- TNFα). Pendant cette incubation, le ¹²⁵I- TNFα peut se fixer sur ses récepteurs présents à la surface cellulaire. Les cellules ont ensuite été centrifugées et le surnageant éliminé. Les culots contenant les récepteurs au TNF, ont été lavés avec du PBS 1X et la capacité de liaison totale a finalement été mesurée en comptant les coups de radioactivité émis par le ¹²⁵I- TNFα par minute (cpm).

II. 19. - Dosage des récepteurs TNFR-1 par cytométrie en flux

2×10^6 cellules ont été lavées avec du PBS 1X et fixées avec 1 ml de paraformaldéhyde 2%. Après 15 min à 4°C, les cellules ont été lavées au PBS 1X et l'anticorps anti-TNFR-1, couplé à une fluorescéine, a été ajouté aux culots. Les suspensions cellulaires ont été placées à 4°C pendant 30 min puis lavées avec du PBS 1X. Les culots ont ensuite été repris par 500 µl de PBS 1X et analysés par cytométrie en flux.

II. 20. - Détermination par Scatchard plot de l'affinité du récepteur TNFR-1 pour le TNF α

Après traitement, les cellules ont été lavées et incubées avec des concentrations croissantes de l'isotope ^{125}I - TNF α pendant 1h à 4°C. La radioactivité liée à la cellule a été déterminée avec un compteur γ . Les Scatchard plots, déterminant l'affinité de liaison du ^{125}I - TNF α pour le récepteur TNFR-1, ont été réalisés avec le logiciel GraphPad Prism®.

II. 21. - Analyse des voies NF- κ B par Superarray

5 µg des ARN totaux ont été soumis à la transcription inverse en utilisant le kit « ReactionReady™ First Strand cDNA Synthesis Kit (C-01) » (Superarray, Tebu-bio). Les ADNc issus de la transcription inverse ont été mélangés au mix « RT² Real-Time™ SYBR Green / ROX PCR Master Mix » (Superarray, Tebu-bio), contenant le tampon real-time PCR, l'ADN Taq polymérase HotStart hautement performante, des nucléotides, le colorant SYBR® Green et le colorant de référence ROX, qui est nécessaire pour normaliser les optiques de l'instrument. Ce mélange a ensuite été aliquoté dans les puits d'une plaque à 96 puits, dans lesquels des amorces pour 84 gènes NF- κ B, 5 gènes de ménage et 2 contrôles négatifs (RT² Profiler™ PCR Array, Superarray, Tebu-bio) ont été préfixées. La PCR en temps réel a été réalisée dans un appareil 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems). Finalement, les données ont été analysées par la méthode du $\Delta\Delta C_T$ et les valeurs brutes ont été normalisées par rapport à la moyenne des 5 gènes de référence.

II. 22. - Test ELISA

La concentration de l'interleukine 8 (IL-8) humaine a été déterminée avec le kit « Quantikine Human CXCL8/IL-8 colorimetric sandwich ELISA» (R&D Systems).

10×10^6 cellules ont été centrifugées et le surnageant a été aliquoté dans des puits couverts avec des AC anti-IL8. Après plusieurs lavages, l'AC secondaire, couplé à une enzyme, a été ajouté aux puits. Après d'autres lavages, le substrat pour l'enzyme a été ajouté et la couleur émise a été mesurée avec un spectrophotomètre.

II. 23. - Analyse statistique

Le test statistique utilisé pour l'analyse de nos expériences (au moins 3 expériences indépendantes) est le test paramétrique t de Student.

III. - Résultats

Comme présenté lors de l'introduction bibliographique, la GGT est associée à la cancérogenèse et à la résistance aux médicaments anticancéreux puisqu'elle est surexprimée dans la plupart des cellules cancéreuses et participe activement à la détoxification des cellules. De plus, elle est impliquée dans plusieurs phénomènes importants liés au stress oxydant par ses rôles anti et prooxydants et joue un rôle important dans la synthèse des leukotriènes, donc dans l'inflammation.

La GGT pourrait donc constituer une bonne cible supplémentaire en thérapie anticancéreuse ou dans des pathologies liées au stress oxydant ou à l'inflammation. L'étude de sa régulation par différents stimuli est une base essentielle pour pouvoir mener au mieux une stratégie thérapeutique efficace.

III. 1. - Etude de l'effet du $\text{TNF}\alpha$ sur l'expression de la γ -glutamyl-transférase humaine

III. 1. 1. - Etude des promoteurs de la γ -glutamyltransférase dans les cellules K562

III. 1. 1. 1. - Etude de régulation des promoteurs B et C en réponse aux traitements par le TPA et le $\text{TNF}\alpha$.

A ce jour, peu d'études ont été consacrées à l'identification et à l'étude de la régulation des promoteurs du gène de la GGT humaine. Seul le promoteur, qui contrôle la transcription des ARNm de type B a été décrit jusqu'à présent (Daubeuf *et al.*, 2004). Ce promoteur est régulé par le facteur AP-1 dans les cellules HeLa et HepG2. Le promoteur de l'ARNm de type A est actuellement inconnu mais le promoteur de l'ARNm de type C, le promoteur C, a récemment été cloné et mis à notre disposition par le Pr. Athanase Visvikis. Une analyse *in silico* de la séquence du promoteur C a révélé l'existence de multiples sites putatifs de fixation de facteurs de transcription y compris deux sites NF- κ B (Tableau IX).

Tableau IX : Résultats de la recherche *in silicio* de sites de fixation de facteurs de transcription dans le promoteur C de la GGT.

La séquence promotrice C du gène de la GGT comprise entre -875 à +72 pb, a été soumise à une analyse assistée par ordinateur grâce au logiciel MatInspector de Genomatix (<http://www.genomatix.de>), qui permet une recherche automatique, par comparaison de séquences, de sites potentiels de liaison de facteurs de transcription. Les sites NF-κB identifiés sont colorés en jaune.

Nom du facteur de transcription	Seuil	Début	Fin	Brin	Similarité	Séquence
MYC-associated zinc finger protein related transcription factor	0.88	25	37	+	0.890	tctggaGGGcca
HMG box-containing protein 1	0.86	45	57	+	0.892	atgggagAATGaa
HMG box-containing protein 1	0.86	49	61	+	0.949	gagaatgAATGat
HMG box-containing protein 1	0.86	57	69	+	0.921	atgatggAATGaa
Pax-6 paired domain binding site	0.75	73	91	-	0.802	ggctcACGcttacgttct
Ribonucleoprotein associated zinc finger protein MOK-2 (human)	0.98	77	97	+	0.990	acgtaagcgtgagCCTTgcta
Sox-5	0.87	100	112	+	0.870	agtgaCAATactg
MIT (microphthalmia transcription factor) and TFE3	0.81	119	137	+	0.839	tgcagacCATGgtggacc
Serum responsive factor	0.79	120	138	-	0.827	aggtccacacATGGtctgc
Pituitary Homeobox 1 (Ptx1, Pitx-1)	0.94	143	159	-	0.970	agcctCTAAGccctcag
Muscle Initiator Sequence	0.86	167	185	-	0.892	gtgcccCCACagcgctggc
EGR1, early growth response 1	0.86	172	188	+	0.874	cgctgtggGGGCaccca
Wilms Tumor Suppressor	0.88	177	193	-	0.930	tggggTGGGtgcccca
Hypermethylated in cancer 1	0.93	177	189	-	0.970	gtgggTGCCcca
TGFbeta-inducible early gene (TIEG) / Early growth response gene alpha (EGRalpha)	0.83	181	195	-	0.878	gatGGGGtggtgcc
HMG box-containing protein 1	0.86	195	207	+	0.914	ctcattgAATGgg
Zinc finger protein insulinoma-associated 1 (IA-1) functions as a transcriptional repressor	0.90	200	212	+	0.918	tgaatGGGGcaga
MyoD/E47 and MyoD/E12 dimers	0.92	210	224	+	0.921	agaGCAGgtgagggc
Basonuclin, cooperates with USF1 in rDNA PolI transcription)	0.85	228	246	-	0.915	gaggcccatcTGTCcatct
Tal-1alpha/E47 heterodimer	0.87	230	246	+	0.911	atggaCAGAtgggcctc
Neurogenin 1 and 3 (ngn1/3) binding sites	0.92	232	244	-	0.981	ggcCCATctgtcc
VDR/RXR Vitamin D receptor RXR heterodimer site	0.85	238	254	-	0.868	agggggatGAGGcccat
MEL1 (MDS1/EVI1-like gene 1) DNA-binding domain 2	0.99	242	260	-	0.994	ggaagcaggggGATGaggc
Elk-1	0.92	250	266	-	0.941	ggcaacGGAAGcagggg
v-Myb	0.90	256	266	-	0.973	ggcAACGgaag
X-box binding protein RFX1	0.89	257	275	-	0.916	aggaccccagGCAAcggaa
Zinc finger protein insulinoma-associated 1 (IA-1) functions as a transcriptional repressor	0.90	263	275	+	0.966	tgctGGGGtct

Nom du facteur de transcription	Seuil	Début	Fin	Brin	Similarité	Séquence
v-Maf	0.82	266	290	-	0.863	caaacaggcTGACcgaggacccag
Zinc finger protein insulinoma-associated 1 (IA-1) functions as a transcriptional repressor	0.90	293	305	-	0.922	tttcaGGGgtctg
Avian C-type LTR CCAAT box	0.83	303	313	-	0.844	accCCAAtt
c-Rel	0.91	314	328	-	0.933	gagggtccTTCCttg
Erythroid krueppel like factor (EKLF)	0.89	321	333	-	0.907	tccaggaGGGTcc
Albumin D-box binding protein	0.84	329	343	+	0.877	ctggaTTATgtgact
Ribonucleoprotein associated zinc finger protein MOK-2 (human)	0.98	355	375	+	0.980	agggtaccagggtCCTTggag
Alpha (1)-fetoprotein transcription factor (FTF), liver receptor homologue-1 (LRH-1)	0.94	364	376	-	0.948	actcCAAGgaccc
Binding site for a Pbx1/Meis1 heterodimer	0.76	368	384	+	0.797	ccttgagTGACagctc
Binding site for monomeric Meis1 homeodomain protein	0.95	373	383	-	1.000	agcTGTCactc
Meis1a and Hoxa9 form heterodimeric binding complexes on target DNA	0.77	376	390	+	0.842	TGACagctcctagag
Zinc finger with interaction domain	0.85	381	393	-	0.883	ggGCTCtaggagc
Myoblast determination gene product	0.91	389	403	-	0.923	actaCAGGtggggct
Se-Cys tRNA gene transcription activating factor	0.84	398	420	-	0.843	tctcCCCAgcttgaggactaca
Downstream Immunoglobulin Control Element, interacting factor	0.80	411	425	-	0.831	ggccCTCTccccagc
NF-kappaB (p50)	0.83	432	446	-	0.863	caGGGgatgcctctc
Monomers of the nur subfamily of nuclear receptors (nur77, nur1, nor-1)	0.89	472	490	-	0.895	cccacAAGGtctgaggagc
Tal-1beta/E47 heterodimer	0.87	490	506	+	0.883	ggcctCAGAtgcttaca
PAR-type chicken vitellogenin promoter-binding protein	0.86	501	511	+	0.867	cTTACatctcc
Aryl hydrocarbon / dioxin receptor	0.80	513	535	+	0.863	gccccctctgGCGTgggcatctg
Early growth response gene 3 product	0.77	519	535	+	0.856	cctgGCGTgggcatctg
Transcription factor with 8 central zinc fingers and an N-terminal KRAB domain	0.77	524	548	-	0.779	gctgggctGCAGccagatgccacg
DNA binding site for NEUROD1 (BETA-2 / E47 dimer)	0.83	526	538	+	0.884	tgggCATCtggt
Thing1/E47 heterodimer, TH1 bHLH member specific expression in a variety of embryonic tissues	0.93	527	543	-	0.933	gctgcagCCAGatgccc
Autoimmune regulator	0.86	560	586	+	0.879	atctcccagggaaccttTGGTctaact
Ribonucleoprotein associated zinc finger protein MOK-2 (human)	0.98	560	580	+	0.985	atctcccagggaCCTTtgg
ZNF143 is the human ortholog of Xenopus Staf	0.76	560	582	+	0.788	atctCCCagggaaccttggctct
Hepatic nuclear factor 4	0.82	565	585	-	0.829	attagacCAAagggtccctgg
PPAR/RXR heterodimers	0.70	569	589	-	0.711	gcagattagaccAAAGgttcc
Cone-rod homeobox-containing transcription factor / otx-like homeobox gene	0.94	576	592	+	0.955	ttggctTAATctgcctc
Zebrafish PAX2 paired domain protein	0.78	582	604	+	0.803	taatctgcctcccgtgAAACcc
SZF1, hematopoietic progenitor-restricted KRAB-zinc finger protein	0.82	583	607	-	0.866	gctGGGTttcagcgggaggcagatt
Collagen krox protein (zinc finger protein 67 - zfp67)	0.88	584	600	-	0.897	ttcagcGGGAggcagat
HMG box-containing protein 1	0.86	608	620	-	0.918	ggggctgAATGag
Zebrafish PAX9 binding sites	0.78	612	640	+	0.794	ttcagcccCACCgaggttcagattca
Halfsite of PXR (pregnane X receptor)/RXR resp. CAR	0.98	632	642	-	0.987	ccTGAActctg

Nom du facteur de transcription	Seuil	Début	Fin	Brin	Similarité	Séquence
HMG box-containing protein 1	0.86	646	658	-	0.895	aacctgAATGag
SZF1, hematopoietic progenitor-restricted KRAB-zinc finger protein	0.82	651	675	+	0.829	tcaGGGTttgagacccacccgggct
Erythroid krueppel like factor (EKLF)	0.89	661	673	-	0.915	cccggtgGGGTct
MyoD/E47 and MyoD/E12 dimers	0.92	677	691	-	0.976	gctGCAGgtgtctct
B-cell-specific activating protein	0.75	682	710	+	0.778	cacctgcagcctgcAGCGgtcccagatca
Pleomorphic adenoma gene (PLAG) 1, a developmentally regulated C2H2 zinc finger protein	0.88	697	717	-	0.898	GAGGctgtgatctggaccgc
MyoD/E47 and MyoD/E12 dimers	0.92	743	757	-	0.947	gctGCAGgtgggatg
c-Ets-1 binding site	0.92	753	769	-	0.931	ggcacAGGAactgctgc
Ribonucleoprotein associated zinc finger protein MOK-2 (human)	0.98	755	775	+	0.991	agcagttcctgtgCCTTtaaa
Gut-enriched Krueppel-like factor	0.96	762	776	-	0.964	cttAAAGgcacagg
Muscle TATA box	0.84	762	778	-	0.848	ggcttTAAAggcacagg
Muscle TATA box	0.84	767	783	+	0.911	gccttTAAAgctctccc
Zinc finger transcription factor ZBP-89	0.93	775	797	+	0.989	agcctcccctCCCCccgccccgc
Collagen krox protein (zinc finger protein 67 - zfp67)	0.88	777	793	-	0.961	ggcgggGGGAggggagg
Myc associated zinc finger protein (MAZ)	0.90	777	789	-	1.000	ggggGAGGggagg
Myeloid zinc finger protein MZF1	0.98	779	785	-	0.985	gaGGGGa
Core promoter-binding protein (CPBP) with 3 Krueppel-type zinc fingers	0.87	782	804	+	0.885	cctcccCCGCcccgcaccag
MYC-associated zinc finger protein related transcription factor	0.88	784	796	-	0.892	cggggcGGGGgga
Myeloid zinc finger protein MZF1	0.98	784	790	-	0.990	ggGGGGa
Stimulating protein 1 SP1, ubiquitous zinc finger transcription factor	0.89	784	798	-	0.963	ggcggGGCGggggga
EGR1, early growth response 1	0.86	786	802	-	0.900	tgggggCGGGCggggg
Zinc finger transcription factor ZBP-89	0.93	787	809	+	0.958	ccccccccCCCCcaggccact
MYC-associated zinc finger protein related transcription factor	0.88	789	801	-	0.916	gggggcGGGGcgg
Stimulating protein 1 SP1, ubiquitous zinc finger transcription factor	0.89	789	803	-	0.993	ctgggGGCGgggcgg
EGR1, early growth response 1	0.86	791	807	-	0.874	tggcctggGGGCggggc
Collagen krox protein (zinc finger protein 67 - zfp67)	0.88	806	822	+	0.885	cactagGGGAgggaagg
Myc associated zinc finger protein (MAZ)	0.90	810	822	+	0.940	agggGAGGgaagg
Tax/CREB complex	0.71	821	841	-	0.780	ctgctgTGACccagctcctcc
RAR-related orphan receptor alpha2	0.82	824	842	+	0.881	ggagctgGGTCacagcagg
SZF1, hematopoietic progenitor-restricted KRAB-zinc finger protein	0.82	827	851	+	0.827	gctGGGTcacagcagggaatcttag
Smad3 transcription factor involved in TGF-beta signaling	0.99	875	883	-	0.993	GTCTggtca
Sterol regulatory element binding protein	0.80	886	900	-	0.849	ggcTCACccgacgcc
PAX5 paired domain protein	0.80	905	933	-	0.837	gcactgggGCACagccaactgtctcact
c-Myb, important in hematopoiesis, cellular equivalent to avian myoblastosis virus oncogene v-myb	0.90	908	920	-	0.920	gcCAACTgtctctc
Nuclear factor 1	0.94	914	932	+	0.951	agtTGGCtgtgccccagtg
Estrogen receptor	0.90	927	945	-	0.923	ctggGTCAcacagcactgg

En premier lieu, nous nous sommes intéressés à la régulation des promoteurs B et C de la GGT dans les cellules K562 en réponse à deux composés connus pour activer les voies de signalisation AP-1 et NF- κ B. Nous avons utilisé d'une part l'ester de phorbol (TPA), qui est un activateur des facteurs de transcription AP-1 et NF- κ B, et le TNF α , qui est une cytokine multifonctionnelle activant le facteur de transcription NF- κ B.

Pour répondre à cet objectif, nous avons réalisé des transfections transitoires dans les cellules K562 avec des vecteurs contenant des fragments de la séquence du promoteur C (Figure 11) ou du promoteur B (Figure 12).

Après la transfection, les cellules K562 ont été traitées au TPA (100 nM, 4h) et au TNF α (20 ng/ml, 4h) et les activités luciférase ont été mesurées (Figure 13).

Les résultats obtenus montrent que le traitement au TPA n'a pas d'effet significatif sur les deux plasmides p536-Luc et p875-Luc comprenant le promoteur C de la GGT (Figure 13A), alors qu'il induit de 6,1 fois le plasmide contrôle AP-1 qui contient dans sa région promotrice sept sites de fixation pour le facteur AP-1. De plus, les co-transfections avec les vecteurs d'expression c-Jun et c-Fos (Figure 14), qui sont des facteurs de transcription capables de se lier aux sites AP-1, n'ont pas d'effet majeur sur la transcription du promoteur C dans les cellules K562, cultivées soit avec 10% de SVF (Figure 14A), soit avec 0,1% de SVF (Figure 14B). Nous avons utilisé deux pourcentages différents de sérum puisque les promoteurs des facteurs de transcription de la famille AP-1, donc c-Jun et c-Fos, contiennent des éléments de réponse au SVF, qui sont en présence de sérum, constitutivement activés. Or comme dans les deux cas, en présence ou absence de sérum, nous n'observons pas de différence majeure par rapport au contrôle p875-Luc seul, nous pouvons conclure que le promoteur C n'est pas régulé par le TPA dans les cellules K562.

Par contre, le traitement au TNF α conduit à une induction de 2 fois de l'activité promotrice des deux plasmides p536-Luc et p875-Luc après 4h (Figure 13A). Nous avons utilisé le plasmide pNF- κ B, qui contient cinq sites de fixation NF- κ B, comme contrôle positif. Le

```

-100 | -90 | -80 | -70 | -60 | -50 | -40 | -30 | -20 | -10 |
-1981 T GGGCCAGGCA CCGCTTGCAT CTGGACCGAT CCGCATTGTT CGATCATTGT GAGCCTCATG ATGGCAGTTC GGGATGTCAT -1901
-1900 GCCCCCATGC GGGCCCAAC CCCACCCGC CATGGCCCTC ACCATGGCCC ACTCAGGGCA TGAGGCTTTC TGGGTGATTG CTGGTATTCA GTGTTGTCAG -1801
-1800 CTTCTTGAC CTGTCACTGG GGGTGGGGCT GCAATGAGAT GCCAGTTGCA GGAAGTGGTT TGCACAGCCT TCCTGGTGTG ATGGGTCACT CTCTTGCCGA -1701
-1700 GTGGCTTTGG GCAGGTCCCT TCCCCTCTCA GGCTGCAGGT TCCTATGCCA GGAGCTCCCT TCTTGCCCCA CCAGGGCCTT GTTTTCCCAG ATACAGAGGT -1601
-1600 GGGGCAGATC CCAGCCCGTC TGTGTGGCTG GATGCTGAGC CAGGCACTGG ACTGGCCCTT TGAGCCTCCT GTCTGGCCAA GGCCCTGAG GCACTGTGGG -1501
-1500 CTGCTGGTGC CAGCACACAA GGGTGATAAG GAGATGAAAG TCACTAGGAT GGTGGGGCGG CACCCGCCCC GGGCTGTGTT GGCAGCTGCC CCTGGCTGGA -1401
-1400 GGCCAGCTTG GCCCTGGAAC CCTCCTCAAG GAACAAGGAC ACAAAGAGC CAGCTCAGCC AGCCTCTACC TAGCACCCA ATCAGCACTC CCTTCTTCCC -1301
-1300 ATGACCCCTA CCCTCTGCC AGCTCCTGTA ACTGGCCAAG GAGCTAATGG ACACCCACCA GGGTCTTAAT GAGTGAGCCA GGGTTAATGG GTTACTGGGC -1201
-1200 CCGGTGACAC ATTCACCAGC CTCCAGGGC TCTCAAAGTC CAACTGGCC TGGCCTTGAA CGTCTTAGCT CGGCCACCTC CTTTCCAGC TTTGACACT -1101
-1100 CGGGGCTCAG GACGGGCTA GGGTGGTCAA GAGGTCCCCT GCAGCCCTCA CTTCTTGAA AAGGCTCCAT TTCCTGGCCT TCAGGCTCAG GTGGTTCCTT -1001
-1000 CCGCCTGGCA GGTCTCCCC AAATCCAATC CCAGCTCGGG CTGGATTCCC AAGGCCCTA TTCTGGTGTG TGCCCTTCC CTAGGGCTCT TCCCCCTGGG -901
-900 GTGACCATAC TCTCATGCC AGCCAGGTCA GGGCTCCTTG AGAGAAGAAT CTGGAGGGGC CAGGATTGA TGGGAGAATG AATGATGGAA TGAAAGAAGG -801
-800 AACGTAAGCG TGAGCCTTGC TAAGAGTGAC AATACTGGCA GGCTGCAGAC CATGTGTGGA CCTCGATCTG AGGGCTTAGA GGCTTCGGCC TGCCAGCGCT -701
-700 GTGGGGGCAC CCACCCATC TCATTGAATG GGGCAGAGCA GGTGAGGGCA TGAGATGGAC AGATGGGCCT CATCCCCCTG CTTCCGTTGC CTGGGGTCTT -601
-600 CGGTGAGCCT GTTTGCTCAG ACCCTGAAA TTGGGGGTCA AGGAAGGACC CTCCTGGATT ATGTGACTCC CTTCACTCCA GGTGACCAGG GTCCTTGGAG -501
-500 TGACAGCTCC TAGAGCCCCA CCTGTAGTCC TGCAAGCTGG GGAGAGGGCC TGTTAGGAGA GGCATCCCCT GCCCTGGGGT TGTAGAGGTG AACTAGGCTC -401
-400 CTCAGACCTT GTGGGGCCTC AGATGCTTAC ATCTCCAGCC CCTCTGGCG TGGGCATCTG GCTGCAGCCC AGCTCTGTGG CCCCATCTCC CAGGGAACCT -301
-300 TTGGTCTAAT CTGCCTCCCG CTGAAACCCA GCCTCATTCA GCCCCACCGA GGCTTTTCTG GTTCAGGTCT CTCATTGAGG GTTTGAGACC CCACGGGCT -201
-200 CAGAGACACC TGCAGCCTGC AGCGGTCCCA GATCACAGCC TCAGGGATGG GACCAGGAGC CAGCCCACAT CCCACCTGCA GCAGTTCCTG TGCCTTTAAA -101
-100 GCCTCCCTC CCCCCGCCCC GCCCCAGGC CACTAGGGGA GGAAGGAGG AGCTGGGTCA CAGCAGGGA TCTTAGCTTG GTTTTGGTGT GCTGCTGGAT -1
+1 GACCAGACCG GGCCTCGGGT GAGCCAGAA GTGAGAGCAG TTGGCTGTGC CCCAGTGCTG TGTGACCCAG AGGCGCCGCT CACCCTCTCT GAGCTGGTGG 100
101 ACATCATAGC GGGTGCAGCC CA 122
| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80 | 90 | 100

```

Figure 11 : Séquence du promoteur C de la GGT.

La construction **p536-Luc** contient un fragment de 608 pb dont 72 pb de la région codante et 536 pb de la région promotrice. La construction **p875-Luc** contient un fragment de 947 pb dont 72 pb de la région codante et 875 pb de la région promotrice. Les deux fragments du promoteur C ont été insérés dans le plasmide pGL3-Enhancer en amont d'un gène luciférase et les plasmides p536-Luc et p875-Luc ont été utilisés pour nos expériences de transfection.

```

-100 | -90 | -80 | -70 | -60 | -50 | -40 | -30 | -20 | -10 |
-780          CTCCTGCCTC AGCCTCCCAA GTAGCTGGGA TTACAGGCAC CCACCACCAC GCCTGACTAA TTTTTTTTTT TTTTTTTTAG -701
-700 TAGAGATGGG GTTTTGCCAT GTTGGCCAGC CTGGTCTTGA ACTTCTGACC TCCACCCGCC TCGGCCTCCC AAAGTGCTGG GACTACAGGC ATGAGCCACG -601
-600 CCGCCTGGCC AACAAGTCCC CTTAACCTCT TTCTGCCTCA GTCGACTCAC CTGGAAAACA GAGCACCTAC CTCCTTCAA TGAGAAGAGA AGTAAAGGAG -501
-500 TATAAGGCCA TCAGAACAGT ACCTGGCCCA AGGGAGGCTA TGGAAGTGCT TGTGAATAA AAAAATGGCT TCATCTCTGG CCTAGCCCCA AAGGTTTGAG -401
-400 TTCCTGCCAT TGCCACCCAG ACAGCCCTGG GTGGAGGCC TGCTGACATT GAAGAGTGCC TGCCCTCCTC CCCTCAATGC GGTAGACACT TTCCAAAAC -301
-300 TACGTCATCC TACTCTCAC TCCAGTGGGA TAATGGGAGG CTTGGTGTAC CTCATTCCCA AGATGAGGGA ACAGGCTCTG AGAGGACCAC ATCGCCAGCA -201
-200 AGTGACAGGC TGGGACCAAG GCCAGGCCTG TCTGCCTCCT AGACTAGGCC TGAGTGAGGA CCGGCCTGAG TATGGCCCAC CTGCTTCCTC CTCCGTTTAG -101
-100 AGCTTGGGCT GGAGCTGTCC TGGCCAGTGC TCTCTGCCTC ACCAGGCTGC ATGAGCCACA AGCTGCCACT TGTGGAGCTC GGTGGCCCTG CCCTCGACAG -1
+1 CCTTGCTGGT GGTCTGAAG GCTCTAAACA CCTGCATGGC AATGAGGCCA ACCTTCTCCG 60
      | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80 | 90 | 100

```

Figure 12 : Séquence du promoteur B de la GGT.

La construction **p244-Luc** contient un fragment de 308 pb, la construction **p348-Luc** contient un fragment de 412 pb, la construction **p560-Luc** contient 624 pb et la construction **p784-Luc** contient 842 pb. Ces quatre fragments du promoteur B ont été insérés dans le plasmide pGL3 en amont d'un gène luciférase et les plasmides p244-Luc, p348-Luc, p560-Luc et p784-Luc ont été utilisés pour nos expériences de transfection.

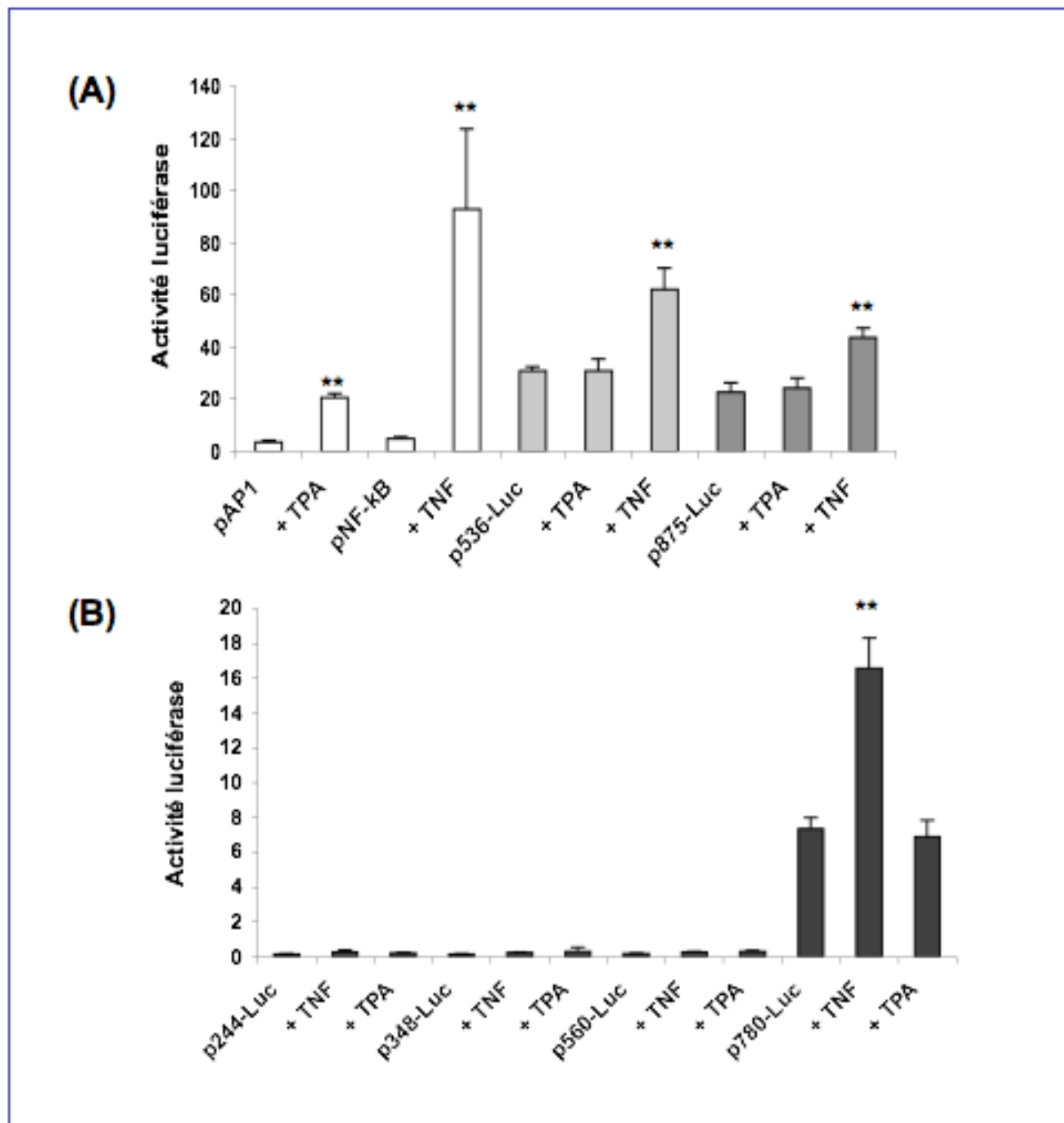


Figure 13 : Etude de l'activité transcriptionnelle des promoteurs B et C de la GGT après traitement des cellules K562 au TPA et au TNF α .

(A) Les cellules de la lignée K562 ont été transfectées avec les plasmides rapporteurs p536-Luc et p875-Luc (promoteur C), traitées au TPA 100 nM ou au TNF α 20 ng/ml pendant 4 heures et l'activité luciférase a été mesurée. Les vecteurs pAP-1 et pNF- κ B servant de contrôles positifs.

(B) Les cellules de la lignée K562 ont été transfectées avec les plasmides rapporteurs p244-Luc, p348-Luc, p560-Luc et p780-Luc (promoteur B), traitées au TPA 100 nM ou au TNF α 20 ng/ml pendant 4 heures et l'activité luciférase a été mesurée. Les cellules non traitées servant de contrôle. ** indique $p < 0,01$ par rapport au contrôle non traité.

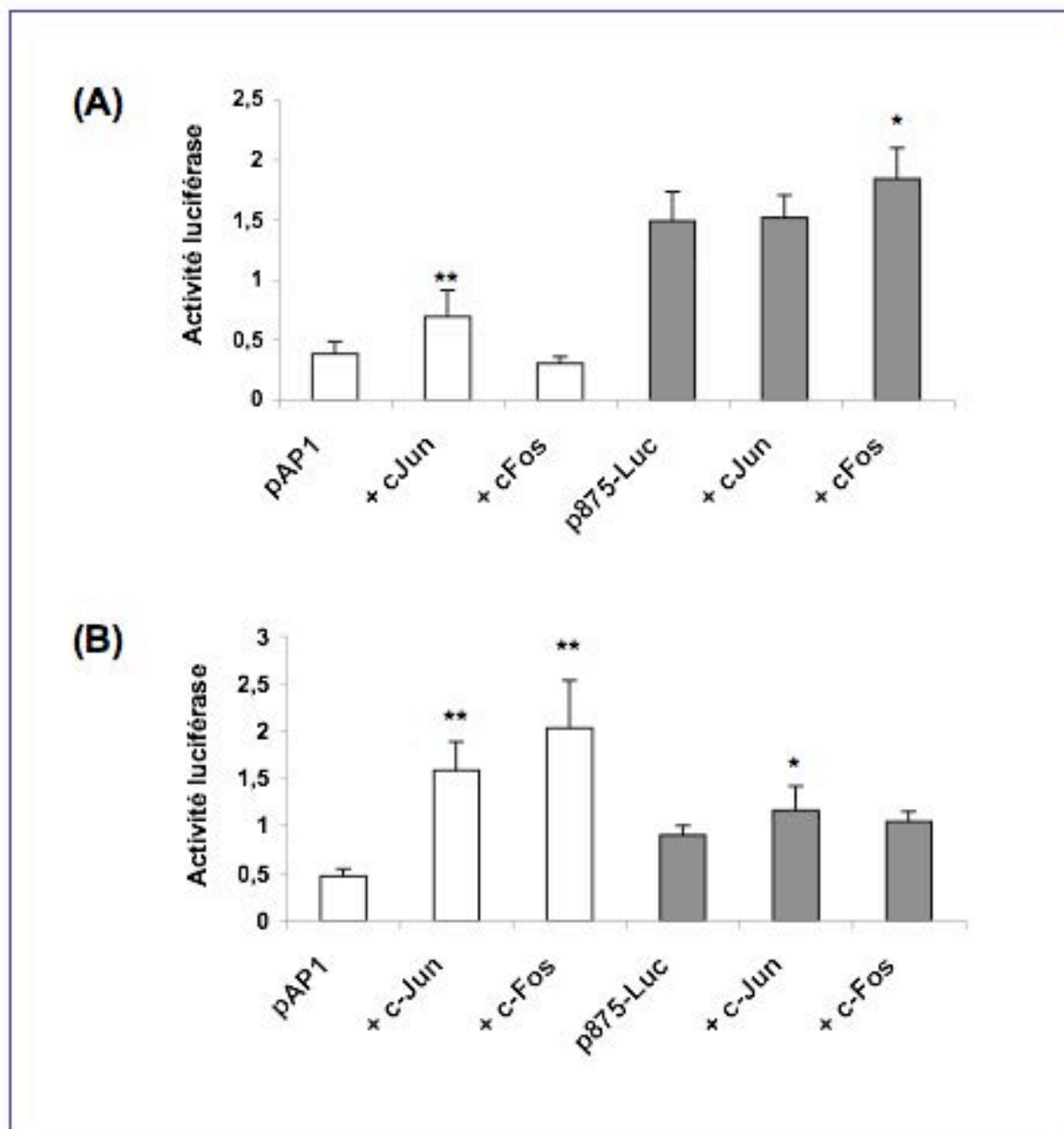


Figure 14 : Co-transfections avec le plasmide p875-Luc et les vecteurs d'expression c-Jun et c-Fos.

Les cellules K562 ont été transfectées avec les plasmides pAP-1 et p875-Luc seuls, ou co-transfectées avec les vecteurs d'expression c-Jun et c-Fos et l'activité luciférase a été mesurée. Les cellules transfectées seulement avec le plasmide pAP-1 ou p875-Luc servant de contrôle. (A) Cellules cultivées avec 10% de SVF. (B) Cellules cultivées avec 0,1% de SVF. * et ** indiquent $p < 0,05$ et $p < 0,01$, respectivement, par rapport au contrôle.

traitement au TNF α induit de 19,6 fois l'expression de la luciférase du plasmide contrôle pNF- κ B par rapport au témoin non traité.

Le promoteur B, découpé en plusieurs parties, montre une activité promotrice seulement pour la construction p784-Luc (Figure 13B) contenant en amont du gène luciférase le plus grand fragment du promoteur B (Figure 12). Les autres plasmides montrent des valeurs de luciférase non significatives (Figure 13 B). Le TNF α induit aussi le promoteur B (p784-Luc) et le TPA n'a pas d'effet.

En résumé, nous pouvons noter que le TNF α induit l'activité promotrice des plasmides p536-Luc, p875-Luc et p784-Luc, alors que le TPA n'a pas d'effet.

III. 1. 1. 2. - Effet du TNF α sur la transcription du promoteur C de la GGT après différents temps de traitement.

Dans la mesure où les résultats précédents ont montré que le TNF α induit l'activité des promoteurs B et C, nous avons voulu vérifier l'effet du TNF α sur le promoteur C après différents temps d'incubation. Ainsi, nous avons transfecté les cellules K562 avec le plasmide p875-Luc, qui répond de la même façon que le plasmide p536-Luc au TNF α , et nous avons traité les cellules pendant 2h, 4h, 6h et 8h au TNF α (Figure 15).

Les résultats obtenus montrent que l'activité du promoteur C est augmentée en fonction du temps. Plus le temps d'incubation est élevé, plus l'induction est forte. Nous avons choisi 6h de traitement (induction de 4,8 fois) pour nos expériences ultérieures.

III. 1. 1. 3. - Etude de l'effet d'un anticorps anti-TNF α sur la transcription du promoteur C de la GGT.

Afin de vérifier si l'effet du TNF α observé est réellement dû à l'action du TNF α , nous avons utilisé un AC anti-TNF α , le Remicade[®] ou Infliximab (Centocor), et évalué son effet sur l'activité promotrice du plasmide p875-Luc.

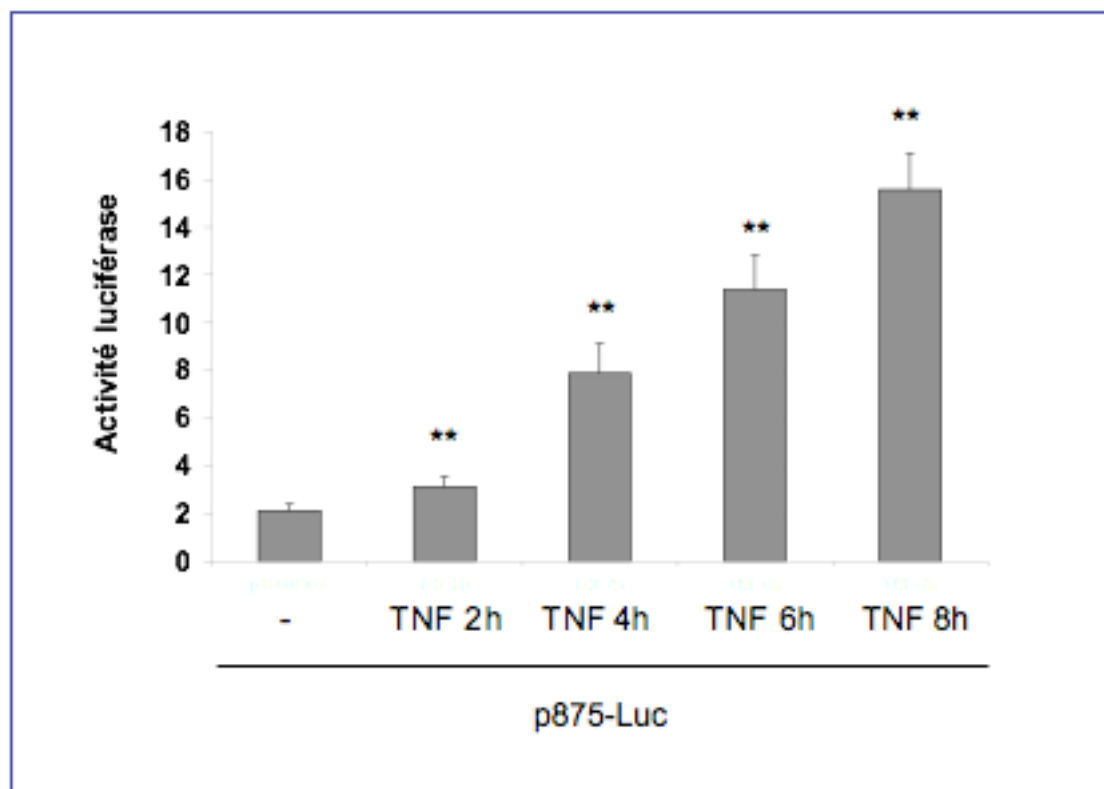


Figure 15 : Etude de l'effet du $\text{TNF}\alpha$ sur la transcription du promoteur C en fonction du temps de traitement.

Les cellules K562 ont été transfectées avec le plasmide p875-Luc, traitées ou non (-) au $\text{TNF}\alpha$ 20 ng/ml pendant 2, 4, 6 et 8 heures (h) et l'activité luciférase a été mesurée. Les cellules non traitées (-) servant de contrôle. ** indique $p < 0,01$ par rapport au contrôle non traité.

Les cellules K562 ont alors été transfectées avec le plasmide p875-Luc, prétraitées pendant 30 min avec l'AC anti-TNF α à différentes concentrations allant de 20 μ g/ml à 1000 μ g/ml et ensuite traitées au TNF α (20 ng/ml, 6h) (Figure 16). Les résultats obtenus montrent également une induction de l'activité luciférase avec le TNF α seul, mais en présence de Remicade, l'induction est diminuée par rapport au TNF α seul. Cette diminution est dépendante de la concentration de l'AC et plus la concentration de l'AC est élevée plus la diminution est forte. A la concentration de 1000 μ g/ml, l'induction par le TNF α est presque complètement inhibée.

En conclusion de cette première partie, nous pouvons noter que les deux promoteurs B et C de la GGT sont induits par le TNF α dans les cellules K562. Cette induction est proportionnelle au temps de traitement et inhibée avec le Remicade, démontrant l'implication du TNF α dans la régulation de la GGT.

III. 1. 1. 4. - Etude de l'effet de la curcumine, un inhibiteur du facteur de transcription NF- κ B, sur la transcription du promoteur C de la GGT.

La curcumine est connue pour être un inhibiteur de la voie de signalisation NF- κ B activée par le TNF α . Puisque le promoteur C est inductible par le TNF α et que l'analyse par MatInspector a révélée la présence de deux sites NF- κ B dans le promoteur C de la GGT, nous avons voulu étudier l'effet de la curcumine sur l'activité du promoteur C.

Nous avons donc transfecté les deux plasmides p536-Luc et p875-Luc dans les cellules K562, traitées au TNF α , à la curcumine et au TNF α plus curcumine (Figure 17).

Les résultats obtenus montrent que l'induction des deux plasmides p536-Luc et p875-Luc par le TNF α (+TNF) est fortement diminuée avec la curcumine (+TNF+Cu). La curcumine seule (+Cu) n'a pas d'effet majeur sur la transcription des deux plasmides.

Ces résultats nous permettent d'émettre une première hypothèse selon laquelle le facteur de transcription NF- κ B serait impliqué dans la régulation du promoteur C de la GGT dans les cellules K562. Nous avons donc décidé de vérifier cette hypothèse en approfondissant le mécanisme moléculaire responsable de l'induction de la GGT dans ces cellules par le TNF α .

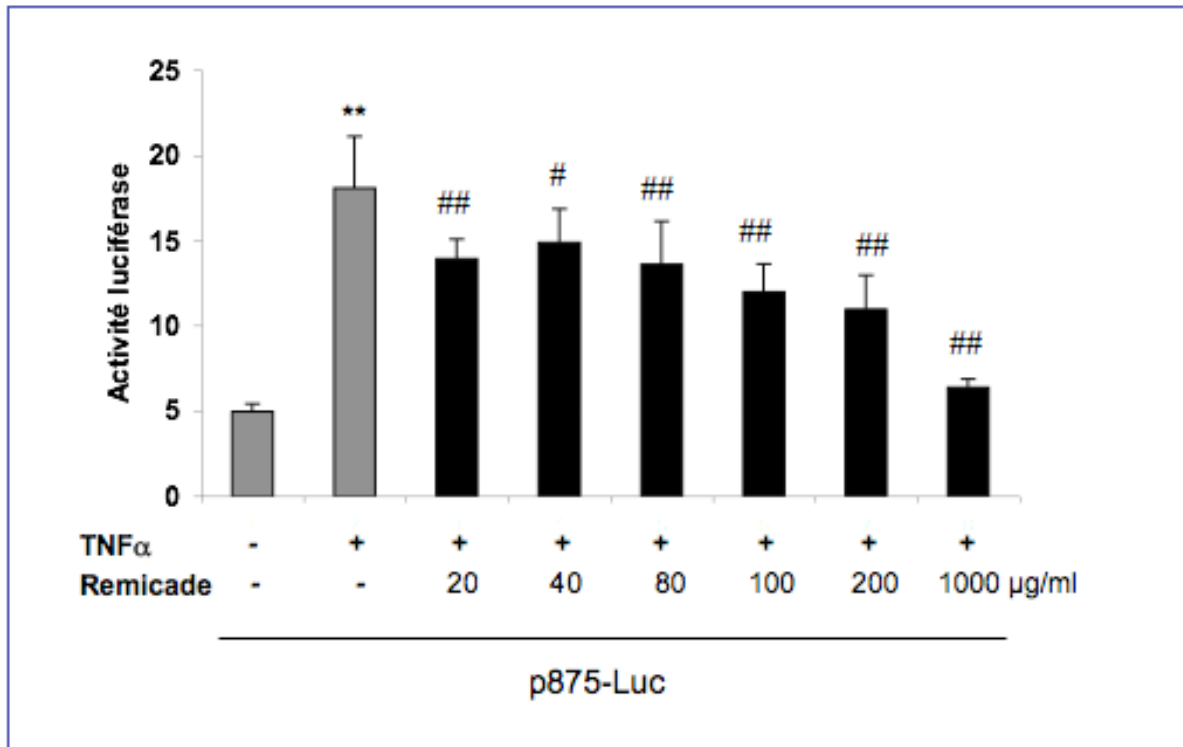


Figure 16 : Etude de l'effet de l'AC anti-TNFα Remicade® sur la transcription du promoteur C de la GGT.

Les cellules K562 ont été transfectées avec le plasmide p875-Luc puis prétraitées au Remicade aux concentrations 20, 40, 80, 100, 200 et 1000 µg/ml pendant 30 minutes. Les cellules ont ensuite été traitées (+) ou non (-) au TNFα (20 ng/ml, 6h) et l'activité luciférase a été mesurée. L'activité luciférase des échantillons traités au Remicade plus TNFα est comparée par rapport à l'activité luciférase des échantillons seulement traités au TNFα. ** indique $p < 0,01$ par rapport au contrôle non traité et # et ## indiquent $p < 0,05$ et $p < 0,01$, respectivement, par rapport à l'échantillon traité au TNFα.

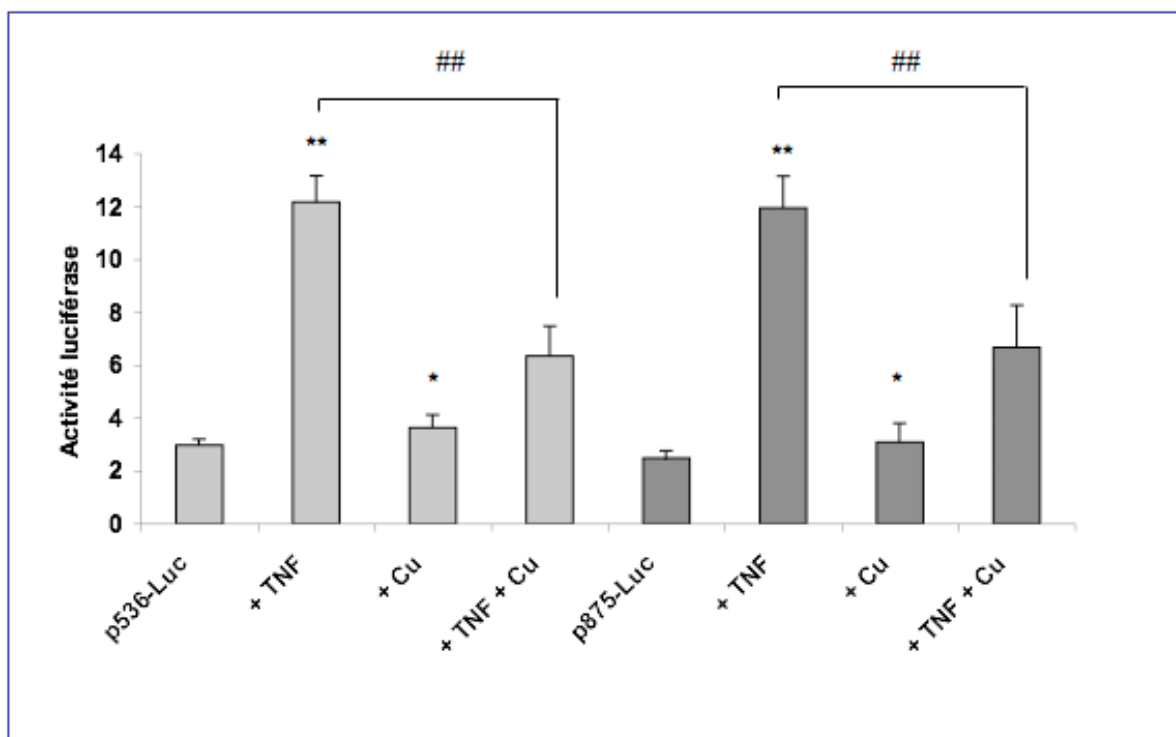


Figure 17 : Etude de l'effet de la curcumine sur le promoteur C de la GGT.

Les cellules K562 ont été transfectées avec les plasmides p536-Luc et p875-Luc, traitées au TNF α (20 ng/ml, 6h) (+ TNF), à la curcumine (+ Cu) (20 μ M, 2h) ou au TNF α plus curcumine (8h) (+ TNF + Cu) et l'activité luciférase a été mesurée. L'activité luciférase des échantillons traités au TNF α plus curcumine est comparée par rapport à l'activité luciférase des échantillons seulement traités au TNF α . * et ** indiquent $p < 0,05$ et $p < 0,01$, respectivement, par rapport au contrôle non traité et ## indique $p < 0,01$ par rapport à l'échantillon traité au TNF α .

III. 1. 1. 5. - Etude de l'effet des siRNA anti-p50 et anti-p65 sur la transcription du promoteur C de la GGT.

Afin de prouver notre hypothèse, nous avons transfecté les cellules K562 d'une part avec les plasmides p875-Luc et pNF- κ B, et d'autre part avec des siRNA ciblant spécifiquement les deux sous-unités les plus représentées de NF- κ B, p50 et p65. Nous avons ensuite traité les cellules aux TNF α (20 ng/ml, 6h) et mesuré l'activité luciférase (Figures 18 et 19).

Les résultats obtenus montrent que l'induction du plasmide p875-Luc par le TNF α est diminuée avec les quatre siRNA anti-p50 choisis (siRNA p50 1, 2, 3 et 5) (Figure 18A) ainsi qu'avec les siRNA anti-p65 (siRNA p65 1, 3, 4 et 5) (Figure 19A). Les différents siRNA choisis pour nos expériences sont des siRNA individuels ciblant tous soit l'ARNm p50 soit l'ARNm p65 et inhibant ainsi leur synthèse. Cependant tous ces siRNA présentent chacun une spécificité de séquence.

La réalisation de WB avec les facteurs nucléaires extraits des cellules transfectées avec les siRNA (Figures 18C et 19C) confirme l'effet inhibiteur des quatre siRNA sur les protéines p65 et p50 nucléaires.

Des expériences réalisées avec le plasmide contrôle pNF- κ B ont été effectuées afin de vérifier nos conditions expérimentales (Figures 18B et 19B).

En conclusion, ces résultats montrent que l'induction du promoteur C de la GGT par le TNF α est inhibée par les siRNA anti-p50 et anti-p65. Ceci suggère fortement que les deux protéines p50 et p65 de NF- κ B sont au moins en partie responsables de l'induction du promoteur C de la GGT par le TNF α dans les cellules K562.

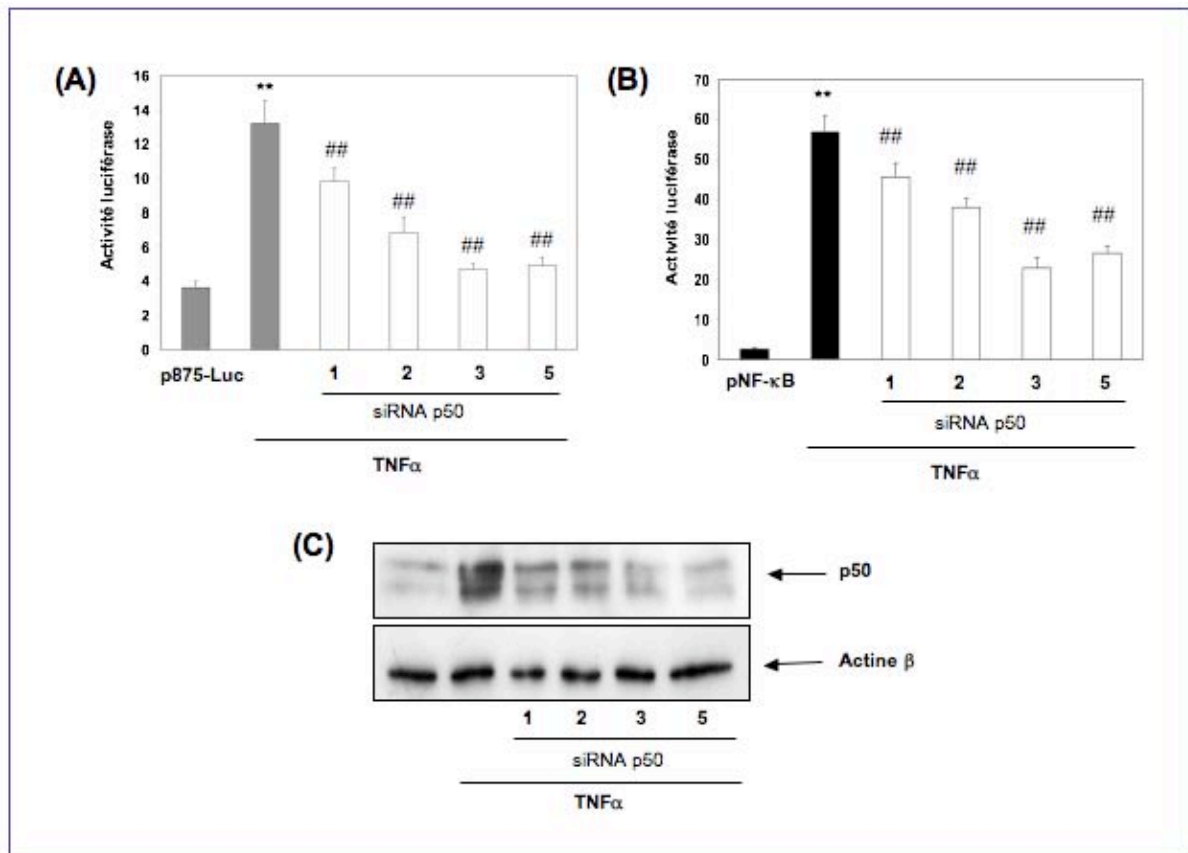


Figure 18 : Etude de l'effet des siRNA anti-p50 sur l'activité promotrice des plasmides p875-Luc et pNF-κB induite par le TNFα.

Les cellules K562 ont été transfectées avec les plasmides p875-Luc (A) et pNF-κB (B) ainsi qu'avec quatre siRNA anti-p50 individuels (1, 2, 3 et 5). Les cellules ont ensuite été traitées ou non au TNFα (20 ng/ml, 6h) et l'activité luciférase a été mesurée. (C) WB avec les facteurs nucléaires extraits des cellules K562 transfectées avec les siRNA p50 et traitées au TNFα. ** indique $p < 0,01$ par rapport au contrôle non traité et ## indique $p < 0,01$ par rapport à l'échantillon traité au TNFα.

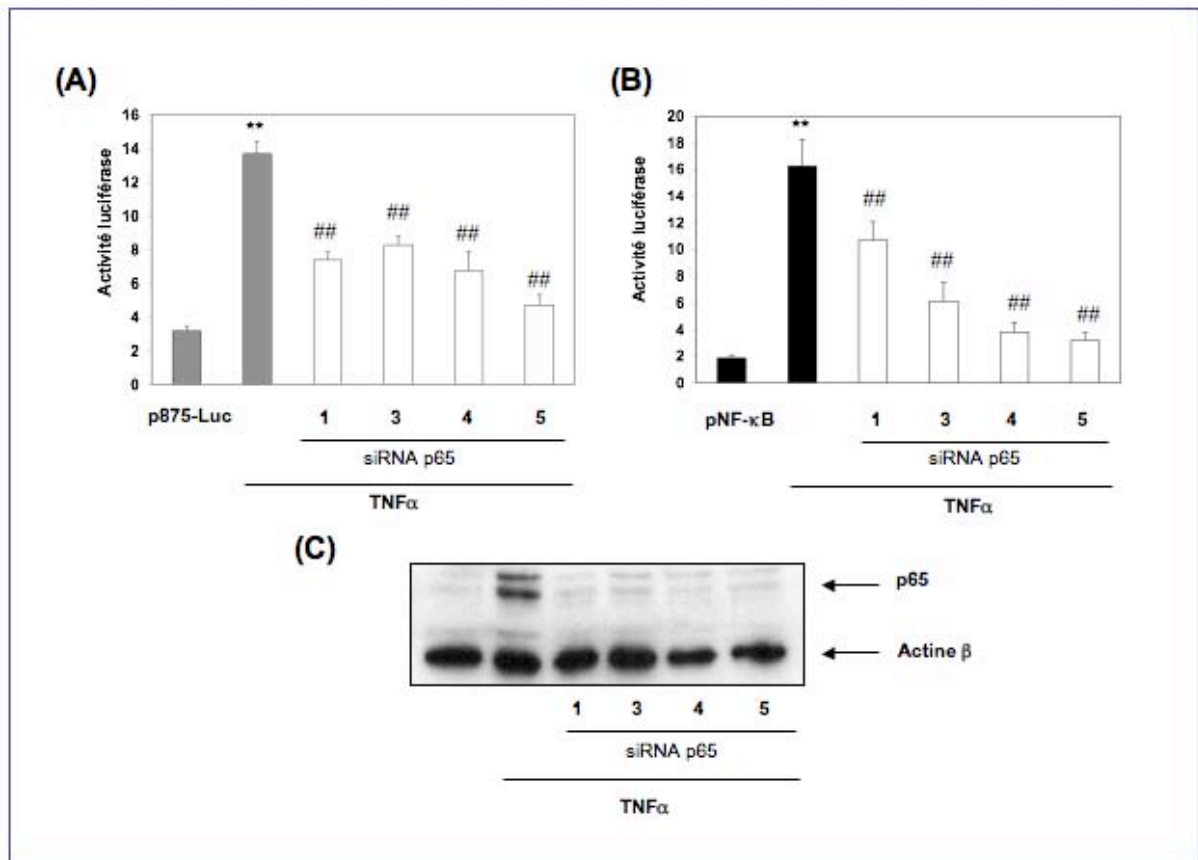


Figure 19 : Etude de l'effet des siRNA anti-p65 sur l'activité promotrice des plasmides p875-Luc et pNF-κB induite par le TNFα.

Les cellules K562 ont été transfectées avec les plasmides p875-Luc (A) et pNF-κB (B) ainsi qu'avec quatre siRNA anti-p65 individuels (1, 3, 4 et 5). Les cellules ont ensuite été traitées ou non au TNFα (20 ng/ml, 6h) et l'activité luciférase a été mesurée. (C) WB avec les facteurs nucléaires extraits des cellules K562 transfectées avec les siRNA p65 et traitées au TNFα. ** indique $p < 0,01$ par rapport au contrôle non traité et ## indique $p < 0,01$ par rapport à l'échantillon traité au TNFα.

III. 1. 1. 6. - Etude de l'effet de la voie de signalisation NF- κ B sur le promoteur C de la GGT.

Puisque les facteurs de transcription p50 et p65 sont impliqués dans l'induction du promoteur C de la GGT par le TNF α , nous avons ensuite voulu étudier si la voie NF- κ B canonique, qui est connue pour activer ces facteurs de transcription, est également impliquée dans la régulation du promoteur C de la GGT.

Nous avons ainsi réalisé des co-transfections avec des vecteurs d'expression codant pour différentes protéines de la voie de signalisation NF- κ B, et avec les plasmides p536-Luc, p875-Luc, et pNF- κ B dans les cellules K562, traitées ou non au TNF α , à la curcumine et au TNF α plus curcumine.

Les protéines choisies sont le TNFR-1, TRAF2, TRADD, l'I κ B α DN un mutant dominant de l'inhibiteur I κ B α , et la protéine p65 (Figures 20, 21 et 22).

Les résultats obtenus pour le plasmide p536-Luc (Figure 20) montrent que l'activité promotrice du plasmide p536-Luc est induite avec les protéines TNFR-1 (1,27 fois), TRAF2 (1,87 fois), TRADD (3,43 fois) et p65 (3,87 fois) (Figure 20A). Par contre, elle est diminuée avec le plasmide codant pour un dominant négatif de l'inhibiteur de NF- κ B, l'I κ B α (I κ BDN). Le traitement au TNF α amplifie davantage l'effet des protéines surexprimées TNFR-1, TRAF2, TRADD et p65 sur le plasmide p536-Luc. La curcumine seule n'induit pas le plasmide p536-Luc (Figure 20B) et n'amplifie pas l'effet des protéines d'expression mais, par contre, le co-traitement TNF α plus curcumine réduit efficacement l'effet du TNF α sur le plasmide p536-Luc (76%) et sur les co-transfections TNFR-1 (76 %), TRAF2 (60 %), TRADD (66 %), I κ B α DN (20 %) et p65 (54 %) (Figure 20B).

Les résultats obtenus pour le plasmide p875-Luc (Figure 21) sont comparables à ceux obtenus avec le plasmide p536-Luc. Le plasmide p875-Luc est induit par les protéines TNFR-1 (1,31 fois), TRAF2 (1,68 fois), TRADD (3,83 fois) et p65 (2,58 fois) mais est inhibé par l'inhibiteur de NF- κ B, I κ B α DN (Figure 21A). De même, un traitement au TNF α amplifie l'effet des protéines surexprimées TNFR-1 (1,53 fois), TRAF2 (1,27 fois), TRADD (2,63 fois) et p65 (1,31 fois) sur le plasmide p875-Luc.

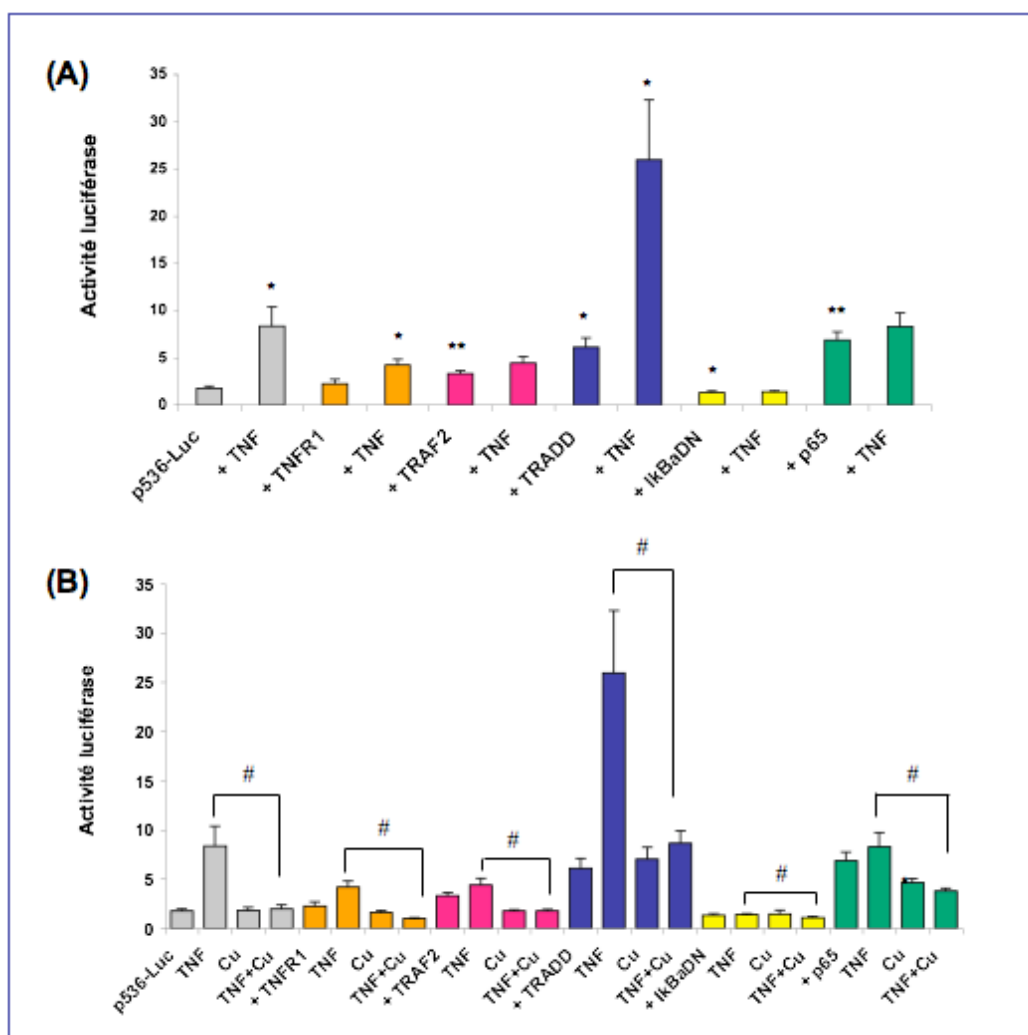


Figure 20: Etude par co-transfection de l'effet des vecteurs d'expression de la voie de signalisation NF- κ B sur le plasmide p536-Luc.

(A) Les cellules K562 ont été co-transfectées avec le plasmide p536-Luc et avec les vecteurs d'expression TNFR1, TRAF2, TRADD, IkB α dominant négatif (DN) et p65, puis traitées au TNF α (+TNF). Pour chaque co-transfection (p536-Luc + TNFR-1, + TRAF2, + TRADD, + IkB α DN, + p65), l'activité luciférase des cellules traitées et non traitées est comparée par rapport aux cellules non traitées et transfectées seulement avec le plasmide p536-Luc (première barre). (B) Les cellules K562 ont été co-transfectées avec le plasmide p536-Luc et avec les vecteurs d'expression TNFR1, TRAF2, TRADD, IkB α dominant négatif (DN) et p65, puis traitées au TNF α (TNF), à la curcumine (Cu) et au TNF α plus curcumine (TNF+Cu). Pour chaque co-transfection (p536-Luc + TNFR-1, + TRAF2, + TRADD, + IkB α DN, + p65), l'activité luciférase des cellules traitées au TNF α plus curcumine (TNF+Cu) est comparé par rapport aux cellules traitées au TNF α (TNF). * et ** indiquent $p < 0,05$ et $p < 0,01$, respectivement, par rapport au contrôle et # indique $p < 0,05$ par rapport à l'échantillon traité au TNF α de chaque co-transfection.

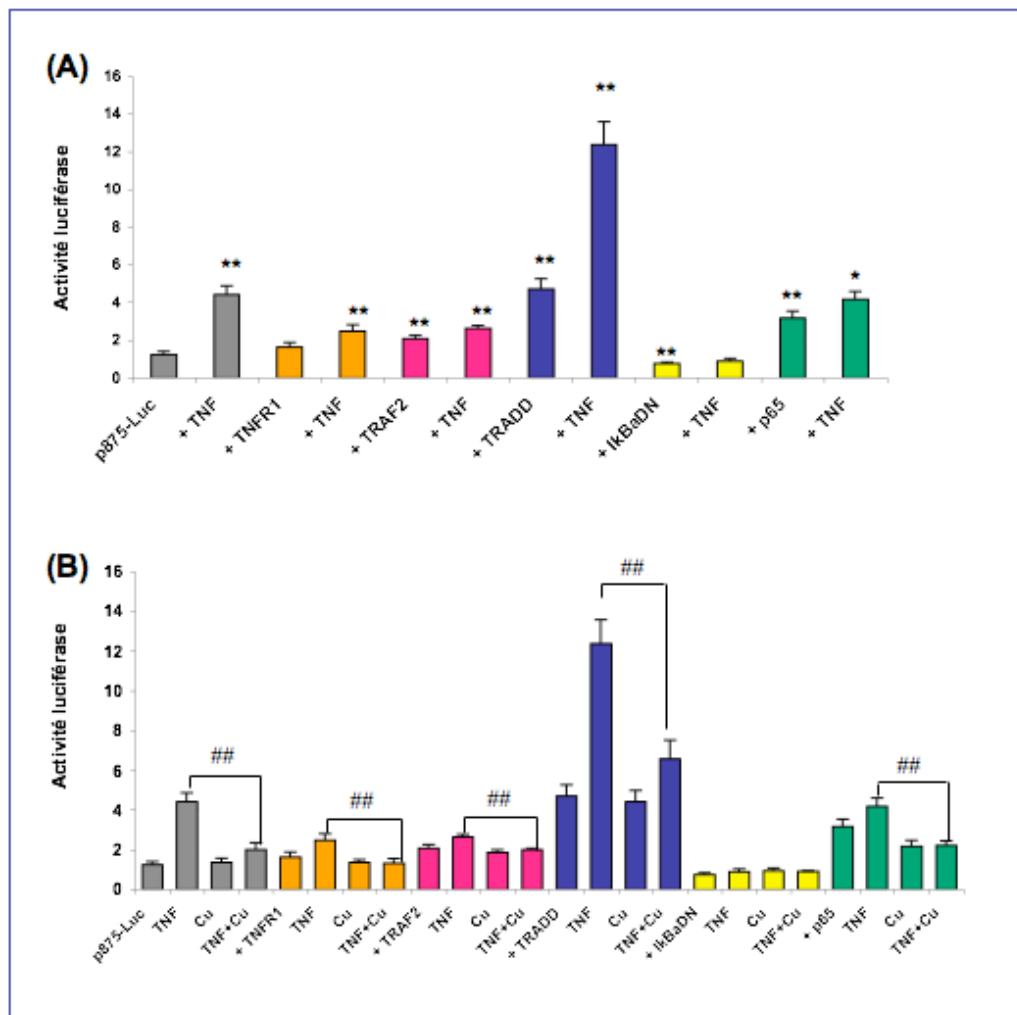


Figure 21: Etude par co-transfection de l'effet des vecteurs d'expression de la voie de signalisation NF-κB sur le plasmide p875-Luc.

(A) Les cellules K562 ont été co-transfectées avec le plasmide p875-Luc et avec les vecteurs d'expression TNFR1, TRAF2, TRADD, IκBα dominant négatif (DN) et p65, puis traitées au TNFα (+TNF). Pour chaque co-transfection (p875-Luc + TNFR-1, + TRAF2, + TRADD, + IκBαDN, + p65), l'activité luciférase des cellules traitées et non traitées est comparée par rapport aux cellules non traitées et transfectées seulement avec le plasmide p875-Luc (première barre). (B) Les cellules K562 ont été co-transfectées avec le plasmide p875-Luc et avec les vecteurs d'expression TNFR1, TRAF2, TRADD, IκBα dominant négatif (DN) et p65, puis traitées au TNFα (TNF), à la curcumine (Cu) et au TNFα plus curcumine (TNF+Cu). Pour chaque co-transfection (p875-Luc + TNFR-1, + TRAF2, + TRADD, + IκBαDN, + p65), l'activité luciférase des cellules traitées au TNFα plus curcumine (TNF+Cu) est comparé par rapport aux cellules traitées au TNFα (TNF). * et ** indiquent $p < 0,05$ et $p < 0,01$, respectivement, par rapport au contrôle et ## indique $p < 0,01$ par rapport à l'échantillon traité au TNFα de chaque co-transfection.

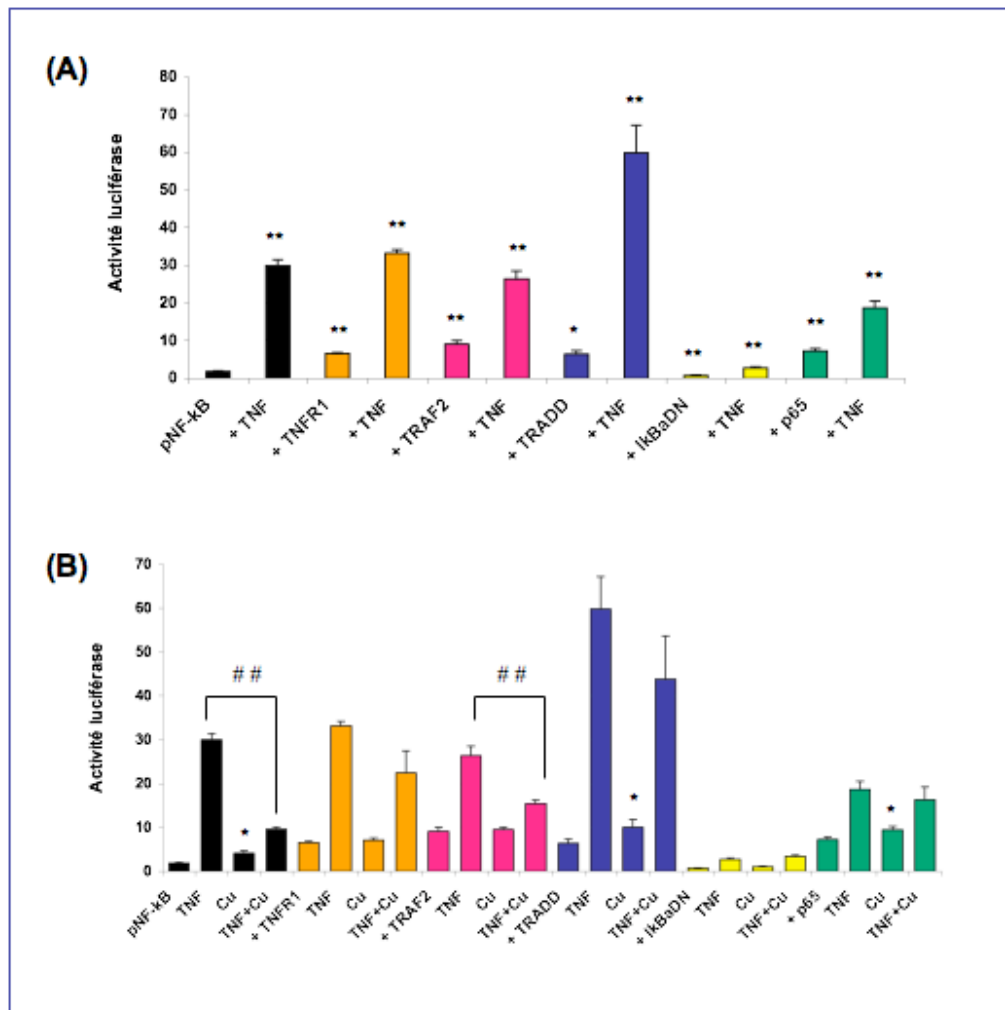


Figure 22: Etude par co-transfection de l'effet des vecteurs d'expression de la voie de signalisation NF-κB sur le plasmide pNF-κB.

(A) Les cellules K562 ont été co-transfectées avec le plasmide pNF-κB et avec les vecteurs d'expression TNFR1, TRAF2, TRADD, IκBα dominant négatif (DN) et p65, puis traitées au TNFα (+TNF). Pour chaque co-transfection (pNF-κB + TNFR-1, + TRAF2, + TRADD, + IκBαDN, + p65), l'activité luciférase des cellules traitées et non traitées est comparée par rapport aux cellules non traitées et transfectées seulement avec le plasmide pNF-κB (première barre). (B) Les cellules K562 ont été co-transfectées avec le plasmide pNF-κB et avec les vecteurs d'expression TNFR1, TRAF2, TRADD, IκBα dominant négatif (DN) et p65, puis traitées au TNFα (TNF), à la curcumine (Cu) et au TNFα plus curcumine (TNF+Cu). Pour chaque co-transfection (pNF-κB + TNFR-1, + TRAF2, + TRADD, + IκBαDN, + p65), l'activité luciférase des cellules traitées au TNFα plus curcumine (TNF+Cu) est comparé par rapport aux cellules traitées au TNFα (TNF). * et ** indiquent $p < 0,05$ et $p < 0,01$, respectivement, par rapport au contrôle et ### indique $p < 0,01$ par rapport à l'échantillon traité au TNFα de chaque co-transfection.

La curcumine seule n'a pas d'effet sur le plasmide p875-Luc, ni sur les co-transfections (Figure 21B). Le co-traitement TNF α plus curcumine, par contre, réduit de nouveau efficacement l'effet du TNF α sur le plasmide p875-Luc (55 %) et sur les co-transfections TNFR-1 (47 %), TRAF2 (24 %), TRADD (47 %) et p65 (47 %).

Des expériences réalisées avec le plasmide contrôle pNF- κ B ont été effectuées afin de vérifier nos conditions expérimentales (Figure 22).

En résumé, les résultats des co-transfections mettent en évidence que les protéines TRAF2, TRADD et p65 induisent l'activité promotrice des plasmides p536-Luc, p875-Luc et pNF- κ B, alors que l'inhibiteur I κ B α la diminue.

Comme contrôle des expériences de co-transfections, nous avons vérifié le niveau d'expression des plasmides d'expression NF- κ B avant et après transfections dans les cellules K562 (Figure 23). Les images obtenues confirment la surexpression de ces protéines dans les cellules après transfection.

Ainsi, nous pouvons conclure que les plasmides p536-Luc et p875-Luc, tout comme le plasmide contrôle pNF- κ B, sont activés par les protéines de la voie de signalisation NF- κ B et donc nous pouvons affirmer que le promoteur C de la GGT est régulé par la voie de signalisation NF- κ B dans les cellules K562.

III. 1. 1. 7. - Etude de l'effet des plasmides p536-Luc et p875-Luc mutés dans les sites NF- κ B sur la transcription du promoteur C de la GGT.

Dans la mesure où les résultats précédents indiquent que le promoteur C est régulé par la voie de signalisation NF- κ B dans les cellules K562, nous avons voulu muter les deux sites NF- κ B, identifiés comme p50 et cRel par MatInspector et que nous appellerons désormais site NF- κ B 2 et site NF- κ B 3 respectivement (Figure 24), sur l'activité promotrice du promoteur C de la GGT.

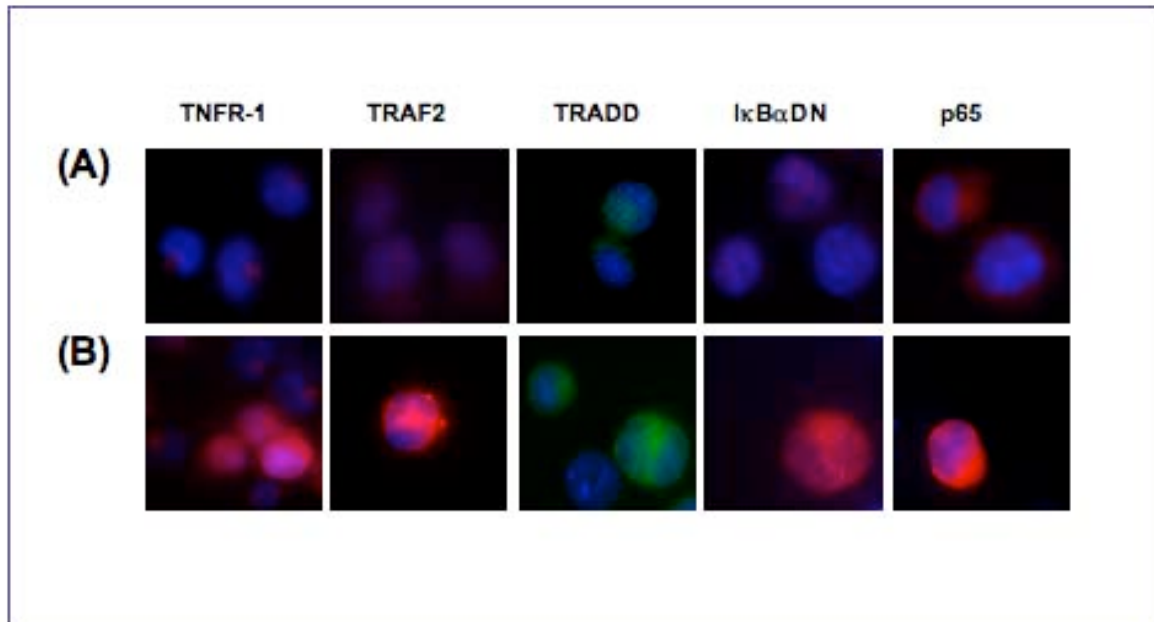


Figure 23: Contrôle par microscopie du niveau d'expression des protéines de la voie NF- κ B surexprimées par transfection dans les cellules K562.

Les cellules K562 ont été transfectées avec les plasmides d'expression TNFR-1, TRAF2, TRADD, I κ B α DN et p65 et le niveau d'expression est vérifié avant et après transfection par microscopie en utilisant les anticorps respectifs couplés à un fluorochrome émettant dans le rouge (Alexa Fluor 568) ou dans le vert (Alexa Fluor 488). Le noyau est coloré en bleu avec le Hoechst. (A) Avant transfection. (B) Après transfection. Magnification x40.

-100		-90		-80		-70		-60		-50		-40		-30		-20		-10		
-1981				T	GGGCCAGGCA	CCGCTTGCAT	CTGGACCGAT	CCGCATTGTT	CGATCATTGT	GAGCCTCATG	ATGGCAGTTC	GGGATGTCAT	-1901							
-1900	GCCCCCATGC	GCCCCCAAC	CCCACCCGC	CATGGCCCTC	ACCATGGCCC	ACTCAGGGCA	TGAGGCTTTC	TGGGTGATTG	CTGGTATTCA	GTGTTGTCAG		-1801								
-1800	CTTCTTGAC	CTGTCAGTGG	GGGTGGGGCT	GCAATGAGAT	GCCAGTTGCA	GGAAGTGGTT	TGCACAGCCT	TCCTGGTGTC	ATGGGTCACT	CTCTTGCCGA		-1701								
-1700	GTGGCTTTGG	GCAGGTCCCT	TCCCCTCTCA	GGCTGCAGGT	TCCTATGCCA	GGAGCTCCCT	TCTTGCCCCA	CCAGGGCCTT	GTTTTCCCAG	ATACAGAGGT		-1601								
-1600	GGGGCAGATC	CCAGCCCGTC	TGTGTGGCTG	GATGCTGAGC	CAGGCACTGG	ACTGGCCCTT	TGAGCCTCCT	GTCTGGCCAA	GGCCCCTGAG	GCACTGTGGG		-1501								
-1500	CTGCTGGTGC	CAGCACACAA	GGGTGATAAG	GAGATGAAAG	TCACTAGGAT	GGTGGGGCGG	CACCCGCCCC	GGGCTGTGTT	GGCAGCTGCC	CCTGGCTGGA		-1401								
-1400	GGCCAGCTTG	GCCCTGGAAC	CCTCCTCAAG	GAACAAGGAC	ACAAAAGAGC	CAGCTCAGCC	AGCCTCTACC	TAGCACCCCA	ATCAGCACTC	CCTTCTTCCC		-1301								
-1300	ATGACCCCTA	CCCTCTGCCC	AGCTCTGTGA	ACTGGCCAAG	GAGCTAATGG	ACACCCACCA	GGGTCTTAAT	GAGTGAGCCA	GGGTTAATGG	GTTACTGGGC		-1201								
-1200	CCGGTGACAC	ATTCAACAGC	CTCCCAGGGC	TCTCAAAGTC	CACACTGGCC	TGGCCTTGAA	CGTCTTAGCT	CGGCCACCTC	CTTTTCCAGC	TTTGACACCT		-1101								
-1100	CGGGGCTCAG	GACGGGCCTA	GGGTGGTCAA	GAGGTCCCCT	GCAGCCCTCA	CTTCTTGAA	AAGGCTCCAT	TTCCTGGCCT	TCAGGCTCAG	GTGGTTCCTT		-1001								
-1000	CCGCCTGGCA	GGTCTCCCC	AAATCCAATC	CCAGCTCGGG	CTGGATTCCC	AAGGCCCTA	TTCTGGTGTC	TGCCCTTCC	CTAGGGCTCT	TCCCCCTGGG		-901								
-900	GTGACCATAC	TCTCATGCCC	AGCCAGGTCA	GGGCTCCTTG	AGAGAAGAAT	CTGGAGGGGC	CAGGATTTGA	TGGGAGAATG	AATGATGGAA	TGAAAGAAGG		-801								
-800	AACGTAAGCG	TGAGCCTTGC	TAAGAGTGAC	AATACTGGCA	GGCTGCAGAC	CATGTGTGGA	CCTCGATCTG	AGGGCTTAGA	GGCTTCGGCC	TGCCAGCGCT		-701								
-700	GTGGGGGCAC	CCACCCCATC	TCATTGAATG	GGGCAGAGCA	GGTGAGGGCA	TGAGATGGAC	AGATGGGCCT	CATCCCCCTG	CTTCCGTTGC	CTGGGGTCTCT		-601								
-600	CGGTCAAGCT	GTTTGCTCAG	ACCCCTGAAA	TTGGGGGTCA	AGGAAGGACC	CTCCTGGATT	ATGTGACTCC	CTTCAGTCCA	GGTGACCAGG	GTCCTTGGAG		-501								
-500	TGACAGCTCC	TAGAGCCCCA	CCTGTAGTCC	TGCAAGCTGG	GGAGAGGGCC	TGTTAGGAGA	GGCATCCCCCT	GCCCTGGGGT	TGTAGAGGTG	AACTAGGCTC		-401								
-400	CTCAGACCTT	GTGGGGCCTC	AGATGCTTAC	ATCTCCAGCC	CCTCCTGGCG	TGGGCATCTG	GCTGCAGCCC	AGCTCTGTGG	CCCCATCTCC	CAGGGAACCT		-301								
-300	TTGGTCTAAT	CTGCCTCCCG	CTGAAACCCA	GCCTCATTCA	GCCCCACCGA	GGCTTTTCA	GTTTCAGTCT	CTCATTTCAGG	GTTTGAGACC	CCACCGGGCT		-201								
-200	CAGAGACACC	TGCAGCTGC	AGCGGTCCCA	GATCACAGCC	TCAGGGATGG	GACCAGGAGC	CAGCCCACAT	CCCACCTGCA	GCAGTTCCTG	TGCCTTTAAA		-101								
-100	GCCTCCCCTC	CCCCCGCCCC	GCCCCCAGGC	CACTAGGGGA	GGGAAGGAGG	AGCTGGGTCA	CAGCAGGGAA	TCTTAGCTTG	GTTTTGGTGT	GCTGCTGGAT		-1								
+1	GACCAGACCG	GGCGTCGGGT	GAGCCCAGAA	GTGAGAGCAG	TTGGCTGTGC	CCCAGTGCTG	TGTGACCCAG	AGGCGCCGCT	CACCCTCTCT	GAGCTGGTGG		100								
101	ACATCATAGC	GGGTGCAGCC	CA										122							
		10		20		30		40		50		60		70		80		90		100

Figure 24 : Localisation des sites NF-κB 2 et 3 sur le promoteur C de la GGT .

Le site d'initiation de la transcription est situé en +1. Le site **NF-κB 2**, identifié comme site p50 par Matinspector, est surligné en rose et le site **NF-κB 3**, identifié comme site cRel par Matinspector, est surligné en gris. Le site NF-κB 2 est situé de - 429 à - 444 et le site NF-κB 3 est situé de - 547 à -562 par rapport au site d'initiation de la transcription.

Nous avons alors muté le plasmide p536-Luc dans le site NF- κ B 2 et le plasmide p875-Luc dans les sites NF- κ B 2 et 3. Ces plasmides mutés ont ensuite été transfectés dans les cellules K562 traitées ou non au TNF α (20 ng/ml, 6h) et leur activité est comparée par rapport aux plasmides p536-Luc et p875-Luc non mutés, qui servent de contrôle (Figure 25).

Les résultats obtenus montrent que la mutation des deux sites NF- κ B 2 et 3, mutés dans le plasmide p536-Luc ou p875-Luc, ne change ni l'activité de base du promoteur C de la GGT, ni l'induction obtenue avec le TNF α .

Ceci montre donc que les deux sites NF- κ B 2 et 3, découverts par le logiciel MatInspector, ne sont pas fonctionnels dans les cellules K562 et donc pas responsables de l'induction du promoteur C de la GGT obtenue avec le TNF α .

III. 1. 1. 8. - Etude de l'effet du plasmide p875-Luc muté à la fois dans les sites NF- κ B 2 et 3 sur la transcription du promoteur C de la GGT.

Vu que la mutation des sites NF- κ B 2 et 3, mutés individuellement, ne diminue pas l'induction par le TNF α du promoteur C de la GGT, nous avons muté les deux sites NF- κ B 2 et 3 ensemble dans le promoteur C de la GGT (Figure 26). Il se pourrait que ces deux sites soient connectés et importants pour l'induction de la GGT par le TNF α .

Le résultat obtenu montre que l'induction obtenue avec le plasmide p875-Luc muté dans les deux sites NF- κ B 2 et 3 (NF- κ BMut2+3) (5,2 fois) est légèrement diminuée par rapport à l'induction obtenue avec le plasmide p875-Luc non muté, qui sert de contrôle (6,5 fois). Alors que la double mutation diminue légèrement l'induction du promoteur C de la GGT par le TNF α , la diminution est trop faible pour que seul ces deux sites-là soient responsables de l'induction du promoteur C de la GGT par le TNF α . Il doit donc exister un autre site NF- κ B plus important dans la séquence du promoteur C.

III. 1. 1. 9. - Mutagenèse systématique du promoteur C de la GGT.

Dans la mesure où les deux sites NF- κ B 2 et 3 ne sont pas fonctionnels dans les cellules K562, nous avons muté systématiquement le plasmide p536-Luc afin de trouver le site

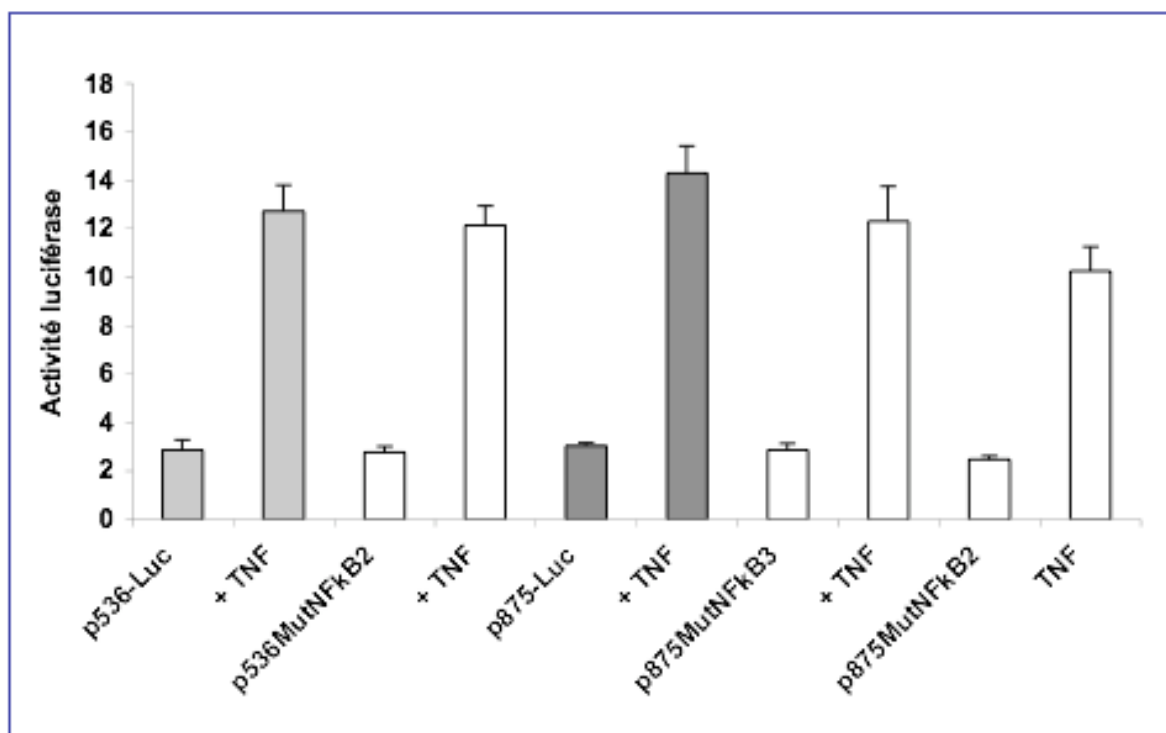


Figure 25 : Etude de l'effet des plasmides p536-Luc et p875-Luc mutés dans les sites NF- κ B 2 et 3 sur la transcription du promoteur C de la GGT.

Les cellules K562 ont été transfectées avec le plasmide p536-Luc muté dans le site NF- κ B 2 (p536MutNFkB2) ainsi qu'avec avec le plasmide p875-Luc muté soit dans le site NF- κ B 3 (p875MutNFkB3) soit dans le site NF- κ B 2 (p875MutNFkB2). Les cellules ont ensuite été traitées ou non au TNF α (20 ng/ml, 6h) (+ TNF) et l'activité luciférase a été mesurée. L'activité luciférase des plasmides p536-Luc et p875-Luc mutés est comparée par rapport aux plasmides p536-Luc et p875-Luc non mutés.

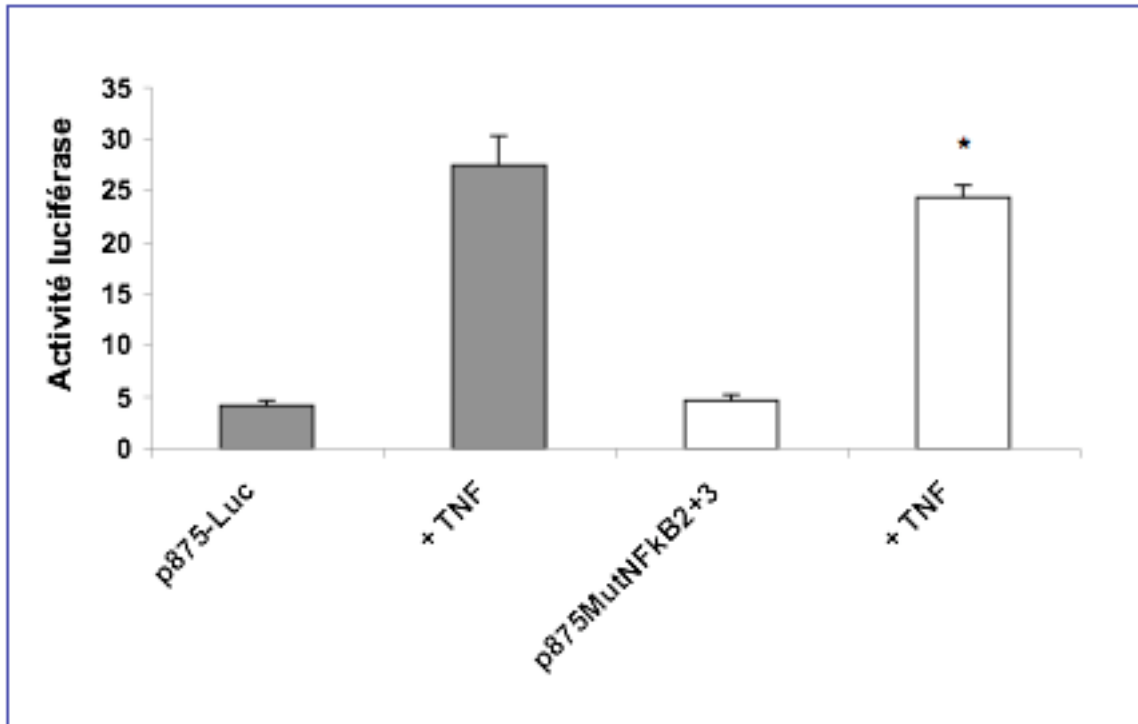


Figure 26 : Etude de l'effet du plasmide p875-Luc muté à la fois dans les sites NF- κ B 2 et 3 sur la transcription du promoteur C de la GGT.

Les cellules K562 ont été transfectées avec le plasmide p875-Luc muté à la fois dans les sites NF- κ B 2 et 3 (p875MutNFkB2+3). Les cellules ont ensuite été traitées ou non au TNF α (20 ng/ml, 6h) (+ TNF) et l'activité luciférase a été mesurée. L'activité luciférase du plasmide p875-Luc muté est comparée par rapport au plasmide p875-Luc non muté. * indique $p < 0,05$ par rapport au contrôle.

responsable de l'induction du promoteur C de la GGT par le $\text{TNF}\alpha$. Nous avons choisi le plasmide p536-Luc pour cette expérience puisque les deux plasmides p536-Luc et p875-Luc donnent toujours le même résultat avec le $\text{TNF}\alpha$. Nous pensons en effet que le site responsable de l'induction doit se trouver dans les 536 premières paires de base (pb).

Afin de ne pas manquer une séquence importante, nous avons muté des séquences de 10 en 10 pb le long des 536 pb du promoteur C de la GGT (Figure 27). Les différents plasmides mutés sont ensuite transfectés dans les cellules K562 et les cellules sont traitées au $\text{TNF}\alpha$ pendant 6h. Les résultats obtenus sont montrés sur les figures 28 et 29.

Les mutants 1, 2 et de 4 à 24 (Figure 28) montrent une activité de base et une induction par le $\text{TNF}\alpha$ comparable au plasmide p536-Luc non muté. Le mutant 3, par contre, montre une activité de base diminuée par rapport au contrôle or l'induction par le $\text{TNF}\alpha$ est conservée.

Les mutants 26 à 40 (Figure 29) montrent une activité de base et une induction par le $\text{TNF}\alpha$ comparable au plasmide contrôle p536-Luc. Le mutant 41 a une activité de base supérieure à l'activité de base contrôle mais l'induction est conservée. Le mutant 42, par contre, a perdu l'activité de base ainsi que l'induction par le $\text{TNF}\alpha$. Les mutants 43, 44 et de 50 à 53 montrent une activité de base et une induction par le $\text{TNF}\alpha$ comparable à celle du plasmide p536-Luc non muté. Les mutants 45, 46, 48 et 49, par contre, montrent une activité de base réduite alors que l'induction par le $\text{TNF}\alpha$ est conservée.

Les expériences de mutation mettent en évidence que certains mutants ont une activité de base réduite par rapport à l'activité de base du plasmide non muté mais ne montrent pas de réduction de l'induction par le $\text{TNF}\alpha$. Seul le mutant 42 a perdu l'activité de base et l'induction par le $\text{TNF}\alpha$. Nous pouvons donc conclure que la séquence 42 est responsable de l'induction du plasmide p536-Luc par le $\text{TNF}\alpha$ dans les cellules K562.

GACTCCCTTCAGTCCAGGTGACCAGGGTCCTTGAGTGACAGCTCCTAGAGCCCCACCTGTAGTCCTGCA
 1 2 3 4 5 6 7
 NF-KB 2
 AGCTGGGGAGAGGGCCTGTTAGGAGAGGCATCCCCTGCCCTGGGGTTGTAGAGGTGAAGTAGGCTCCTCA
 8 9 10 11 12 13
 GACCTTGTGGGGCCTCAGATGCTTACATCTCCAGCCCTCCTGGCGTGGGCATCTGGCTGCAGCCAGCT
 14 15 16 17 18 19 20
 CTGTGGCCCATCTCCCAGGGAACCTTTGGTCTAATCTGCCTCCCGCTGAAACCCAGCCTCATTGAGCCC
 21 22 23 24 25 26 27
 CACCGAGGCTTTAGAGTTAGGTCTCTATTAGGGTTTGAGACCCACCGGGCTCAGAGACACCTGCA
 28 29 30 31 32 33 34
 GCCTGCAGCGGTCCAGATCACAGCCTCAGGGATGGGACCAGGAGCCAGCCACATCCACCTGCAGCAG
 35 36 37 38 39 40 41
 TTCCTGTGCCTTTAAAGCCTCCCTCCCGCCCCGCCCCAGGCCACTAGGGGAGGGAAGGAGGAGCT
 42 43 44 45 46 47 48
 GGGTCACAGCAGGGAATCTTAGCTTGGTTTTGGTGTGCTGCTGGATgaccagaccggggtcgggtgagc
 49 50 51 52 53
 ccagaagtgagagcagttggctgtgccccagtgtgtgTgacccagag

Figure 27 : Représentation des séquences du promoteur C de la GGT utilisées pour la mutagenèse systématique réalisée dans le plasmide p536-Luc.

536 pb du promoteur C de la GGT ont été mutées systématiquement le long des 536 pb du promoteur C par séquences de 10 pb successives. Les différentes séquences mutées sont colorées différemment et numérotées de 1 à 53. Ces 53 séquences mutées représentent les 53 mutants transfectées dans les cellules K562. Le site NF-κB 2 est surligné en jaune, le site d'initiation +1 est encadré en noir et la région transcrite est écrite en minuscules.

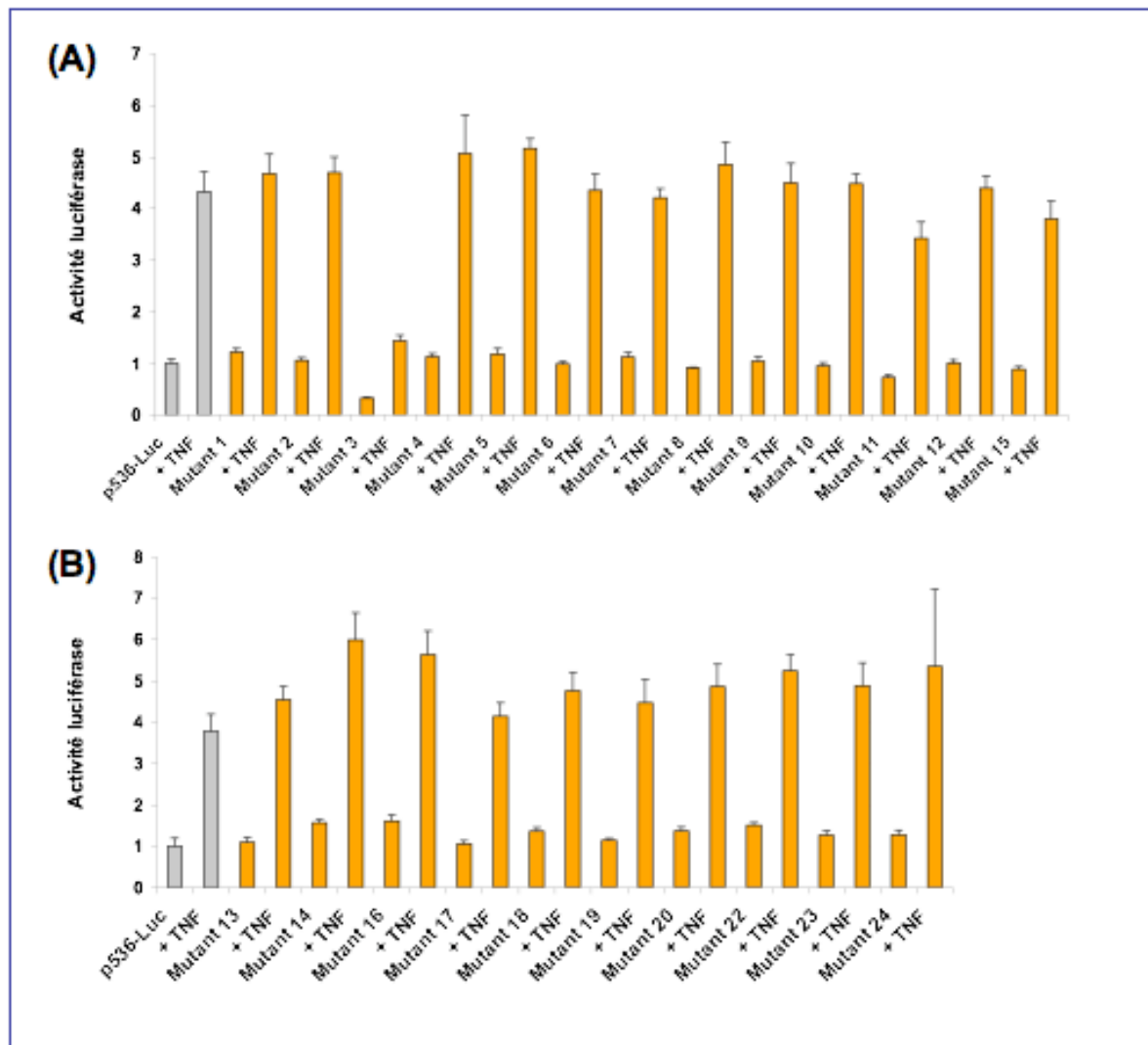


Figure 28 : Etude de l'activité promotrice avec ou sans traitement au $\text{TNF}\alpha$ des plasmides p536-Luc mutés dans les séquences de 1 à 24.

Les cellules K562 ont été transfectées avec les plasmides p536-Luc mutés dans les séquences de 1 à 24. Les cellules ont ensuite été traitées ou non au $\text{TNF}\alpha$ (20 ng/ml, 6h) (+ TNF) et l'activité luciférase a été mesurée. L'activité luciférase du plasmide p536-Luc muté (mutant) est comparée par rapport au plasmide p536-Luc non muté. (A) Mutants 1 à 12 et mutant 15. (B) Mutants 13, 14, 16 à 20 et 22 à 24.

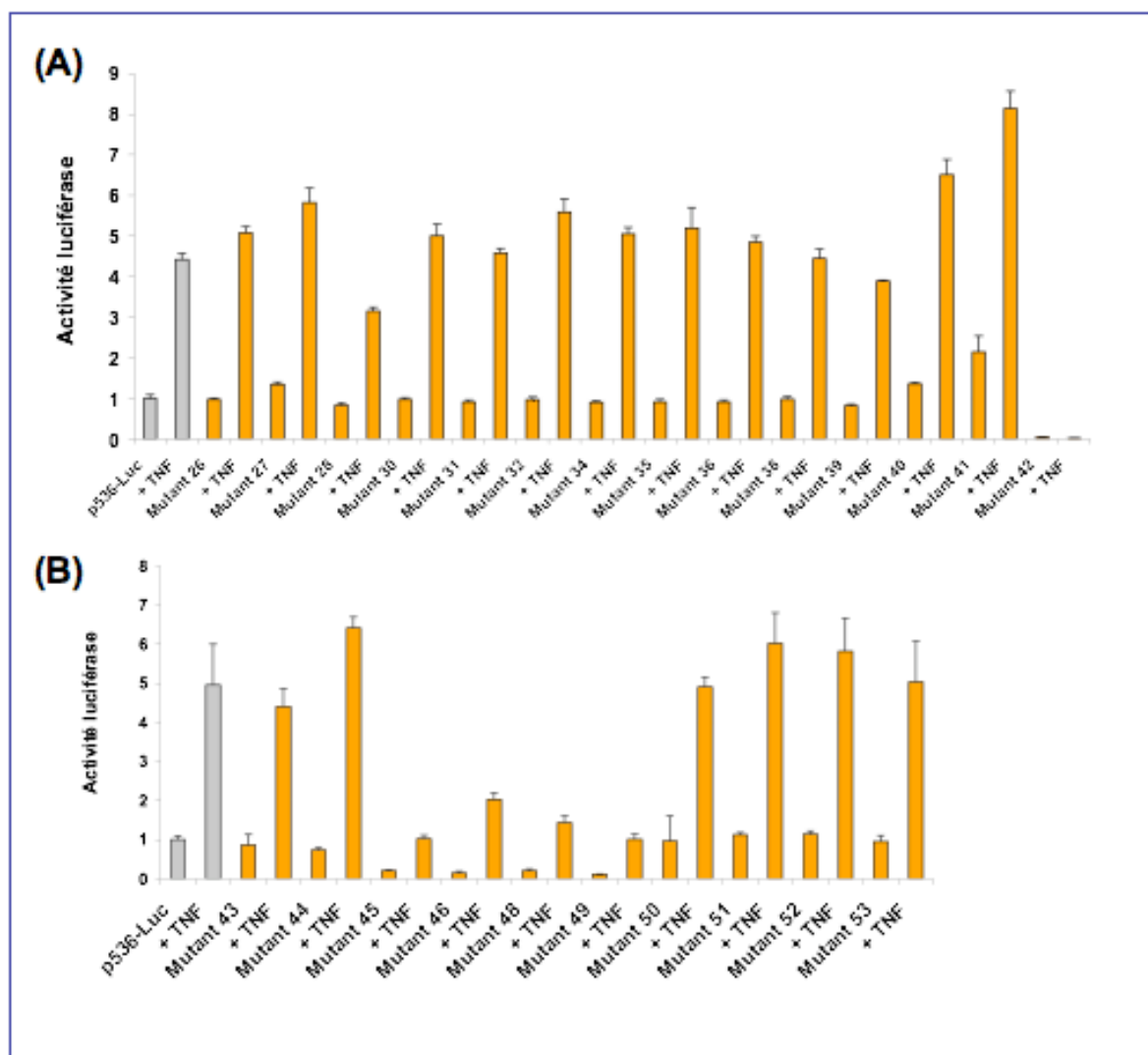


Figure 29 : Etude de l'activité promotrice avec ou sans traitement au TNF α des plasmides p536-Luc mutés dans les séquences de 26 à 60.

Les cellules K562 ont été transfectées avec les plasmides p536-Luc mutés dans les séquences de 26 à 60. Les cellules ont ensuite été traitées ou non au TNF α (20 ng/ml, 6h) (+ TNF) et l'activité luciférase a été mesurée. L'activité luciférase du plasmide p536-Luc muté (mutant) est comparée par rapport au plasmide p536-Luc non muté. (A) Mutants 26 à 28, 30 à 32, 34 à 36 et mutants 38 à 42. (B) Mutants 43 à 44, 46, 48, 49 à 55, 58 et 60.

III. 1. 1. 10. - La mutation du site Sp1, présent sur le plasmide p536-Luc, réduit l'activité de base du promoteur C de la GGT mais pas l'induction par le TNF α .

Comme la mutation systématique des 536 pb du promoteur C de la GGT a révélé, à part pour la séquence 42 (responsable de l'induction du TNF α), des mutants qui ont une activité de base modifiée par rapport à l'activité de base du plasmide p536-Luc non muté, nous avons analysé ces mutants par MatInspector. Cette analyse a découvert deux sites Sp1 putatifs. Ces sites Sp1 sont mutés dans les mutants 45 et 46 (figures 27 et 29).

Nous pouvons donc considérer que les séquences 45 et 46 contiennent des sites Sp1 fonctionnels, situées de - 73 à - 92 par rapport au site d'initiation de la transcription.

L'induction par le TNF α n'est cependant pas modifiée dans ces mutants, indiquant que le site Sp1 n'est pas responsable de l'induction observée par le TNF α mais est important pour l'activité de base de ce promoteur de la GGT.

III. 1. 1. 11. - Caractérisation de la séquence 42 par gel retard.

Dans la mesure où la mutation de la séquence 42 inhibe complètement l'induction du plasmide p536-Luc par le TNF α , nous avons voulu caractériser cette séquence par gel retard. Une nouvelle analyse par MatInspector de cette séquence avec cette fois-ci un taux de similarité plus bas, a détecté des sites putatifs pour le facteur de transcription NF- κ B et pour un facteur de transcription de la famille ETS.

Afin de vérifier si cette séquence est effectivement capable de lier des facteurs de transcription, nous avons réalisé des gelshifts (Figure 30). La figure 30A montre le gel retard réalisé avec la sonde 42 et avec la sonde NF- κ B consensus, utilisée comme contrôle. Si des facteurs nucléaires extraits de cellules K562 non traitées sont utilisés, la sonde NF- κ B consensus lie un seul complexe, le complexe C2. Par contre, lorsque les facteurs nucléaires traités au TNF α (20 ng/ml, 1h) sont utilisés, un deuxième complexe apparaît, le complexe C1.

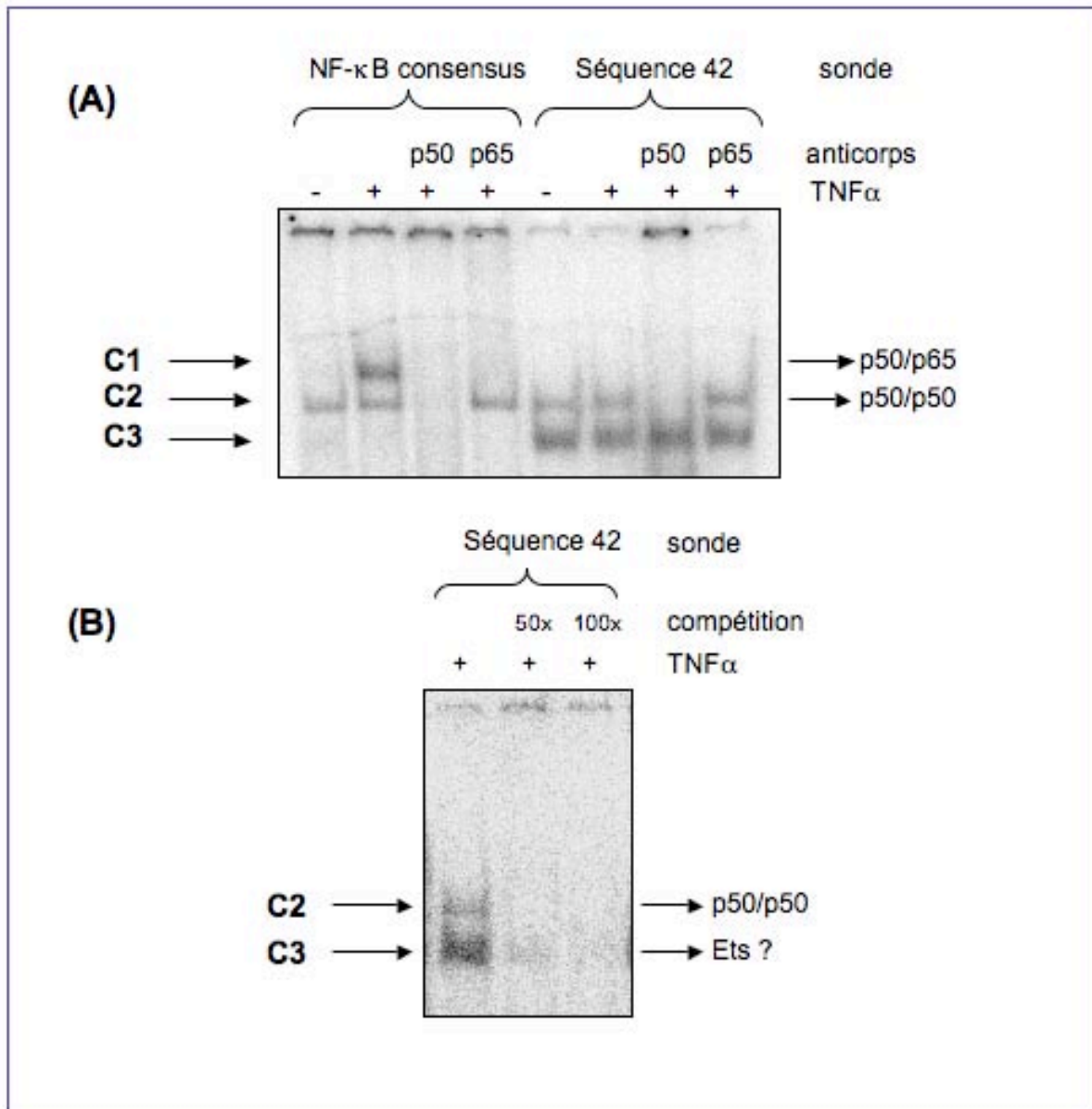


Figure 30 : Analyse de l'activité liante de la séquence 42 dans les cellules K562.

(A) Des extraits nucléaires de la lignée K562 traitée (+) ou non (-) au TNFα (20 ng/ml, 1h) ont été incubés avec la sonde NF-κB consensus et la sonde 42. Les supershifts ont été réalisés en incubant les anticorps p50 et p65 avec les sondes NF-κB consensus et 42. Les trois complexes obtenus entre la sonde et les extraits nucléaires sont appelés C1, C2 et C3. (B) Des extraits nucléaires de la lignée K562, traitée au TNFα (20 ng/ml, 1h) (+), ont été incubés avec la sonde 42. Les compétitions ont été réalisées avec un excès molaire de sonde 42 froide, de 50 fois (50x) ou de 100 fois (100x) par rapport à la sonde radiomarquée. Les deux complexes obtenus entre la sonde 42 et les extraits nucléaires sont appelés C2 et C3.

Afin de caractériser ces deux complexes, nous avons réalisé des expériences de supershifts en utilisant des AC, qui en se fixant à des protéines cibles dans le complexe, soit alourdissent le complexe et donc laissent migrer la bande plus lentement sur le gel, soit font disparaître la bande lorsqu'ils se fixent entre la protéine et la séquence d'ADN.

En utilisant l'AC p50, les deux complexes C1 et C2 disparaissent, alors qu'avec l'AC p65 seul le complexe C1 disparaît. Ceci indique que le complexe C2 est composé d'un homodimère p50/p50 NF- κ B et le complexe C1 est composé d'un hétérodimère p50/p65 NF- κ B.

En utilisant la sonde 42, on observe également deux complexes, le complexe C2 ainsi qu'un nouveau complexe, le complexe C3. Le complexe C2, tout comme pour la sonde NF- κ B, est composé d'un homodimère p50/p50 NF- κ B mais le complexe C3, qui est pourtant spécifique (Figure 30B), ne disparaît pas avec les deux AC. Il pourrait s'agir d'un membre de la famille ETS.

En résumé, nous pouvons noter que la séquence 42, appelée dorénavant site NF- κ B 1 (Figure 31) et située de -111 à -123 par rapport au site d'initiation de la transcription, est capable de fixer le facteur de transcription p50 NF- κ B ainsi qu'une autre protéine dont nous ignorons jusqu'à présent l'identité et le rôle.

III. 1. 1. 12. - Expérience d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) du promoteur C de la GGT dans les cellules K562.

Afin de confirmer les résultats des expériences de liaison obtenus *in vitro* par des expériences *in vivo*, nous avons réalisé des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (ou ChIP) en utilisant des amorces ciblant la région du promoteur C de la GGT contenant les sites NF- κ B 1 et Sp1.

Les résultats obtenus montrent que dans les cellules K562 non traitées, les facteurs de transcription p50, p65 et Sp1, ainsi que l'ARN polymérase II se lient à cette région spécifique du promoteur C de la GGT (Figure 32 A).

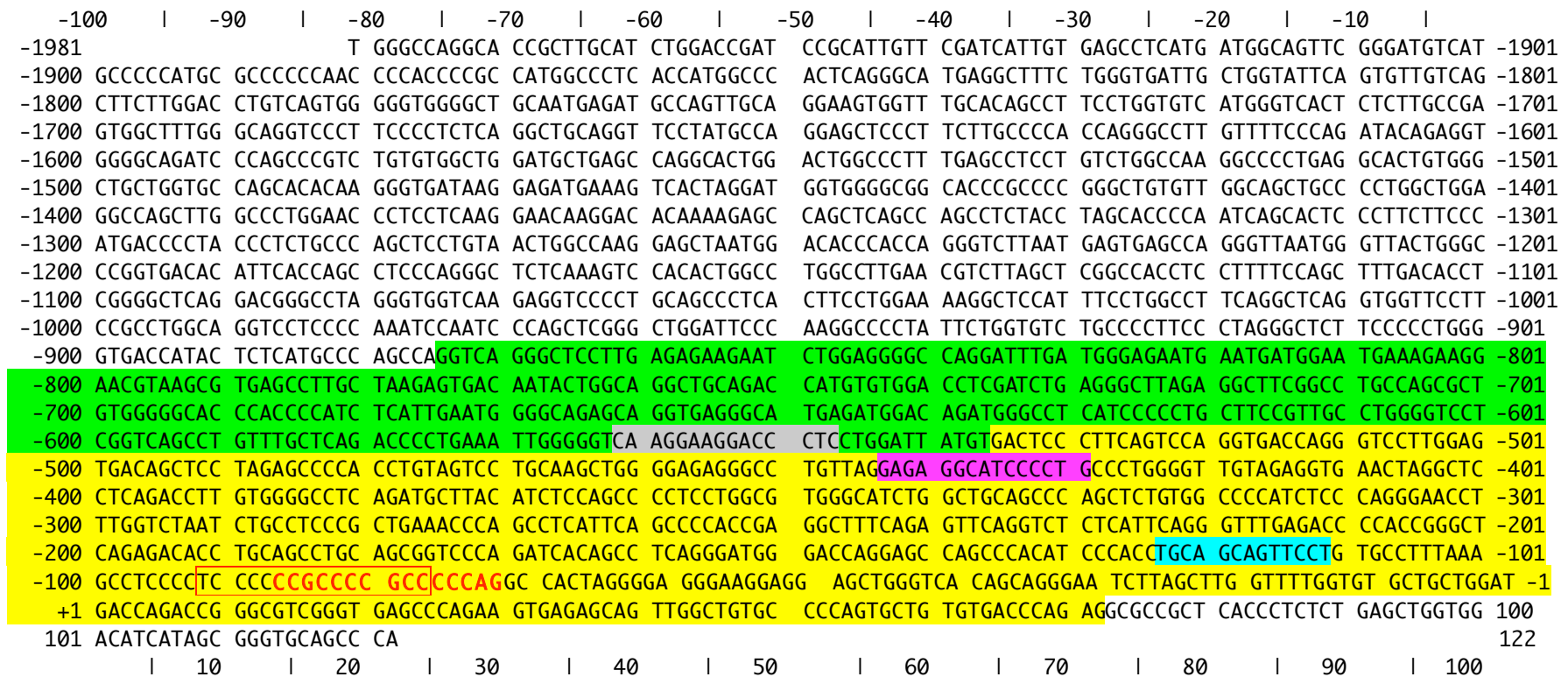


Figure 31 : Localisation des sites NF-κB 1, 2, 3 et Sp1 sur le promoteur C de la GGT .

Le site d'initiation de la transcription est situé en +1. Le site **NF-κB 1** est surligné en turquoise, le site **NF-κB 2** en rose, le site **NF-κB 3** en gris et les deux sites **Sp1** sont encadrés ou colorés en rouge. Le site NF-κB 1 est situé de - 111 à - 123, le site NF-κB 2 est situé de - 429 à - 443 et le site NF-κB 3 est situé de - 548 à -562 par rapport au site d'initiation de la transcription. Les sites Sp1 sont situés de - 73 à - 92 par rapport au site d'initiation de la transcription.

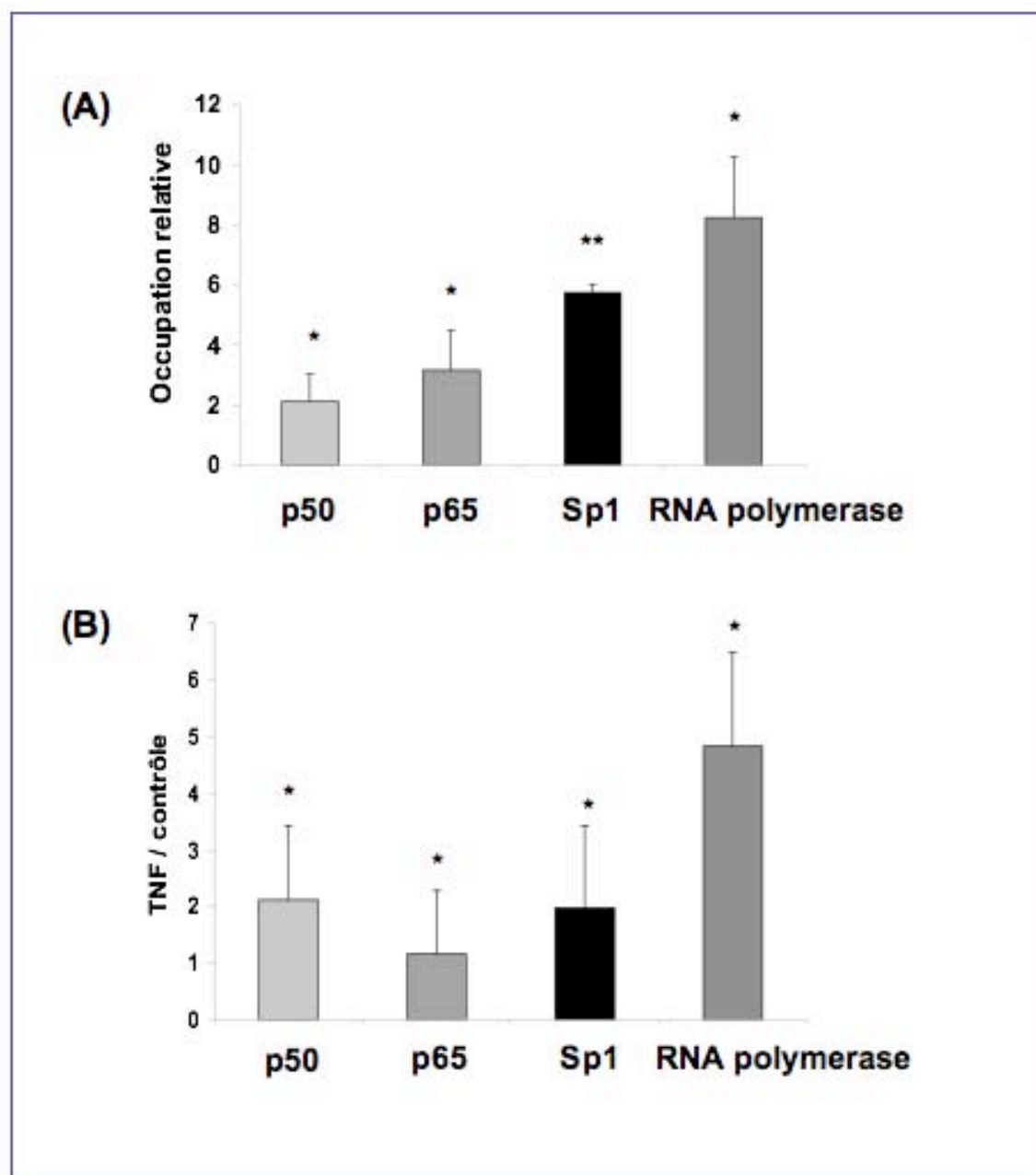


Figure 32 : Analyse par chromatine immunoprécipitation (ou ChIP) du promoteur C de la GGT.

(A) La chromatine extraite des cellules K562 non traitées est immunoprécipitée avec les AC p50, p65, Sp1 et RNA polymérase II. Les résultats du ChIP ont été divisés par la valeur de l'IgG et exprimés en occupation relative. (B) La chromatine extraite des cellules K562 traitées au TNF α (20 ng/ml, 1h) est immunoprécipitée avec les AC p50, p65, Sp1 et RNA polymérase II et les résultats sont exprimés en taux de variation des cellules traitées divisées par les cellules non traitées (contrôle). * et ** indiquent $p < 0,05$ et $p < 0,01$, respectivement, par rapport au contrôle.

Le traitement au TNF α induit la liaison des facteurs de transcription p50 et Sp1 au promoteur C de la GGT et induit également fortement le recrutement de l'ARN polymérase II au promoteur, expliquant l'induction du promoteur C de la GGT après traitement au TNF α (Figure 32 B).

En conclusion de cette partie, nous pouvons noter que les facteurs de transcription NF- κ B et Sp1 ainsi que l'ARN polymérase II sont liés au promoteur C de la GGT dans les cellules K562 contrôles et sont donc au moins en partie responsable de l'activité de base du promoteur C de la GGT. De plus, les résultats montrent que l'induction par le TNF α du promoteur C de la GGT est due en partie à une augmentation de la liaison des facteurs de transcription p50 NF- κ B et Sp1 au promoteur mais notamment à l'induction du recrutement de l'ARN polymérase II à cet endroit précis du promoteur C de la GGT.

III. 1. 1. 13. - Implication des facteurs de transcription de la famille ETS dans la régulation du promoteur C de la GGT.

Dans la mesure où l'analyse par MatInspector a détecté un site de fixation pour un facteur de transcription de la famille ETS sur la séquence 42, nous avons voulu vérifier si ces protéines jouent un rôle dans la régulation du promoteur C de la GGT dans les cellules K562. Nous avons donc co-transfecté des membres de la famille ETS, les protéines PEA, ETV et ERM et le plasmide p536-Luc dans les cellules K562 traitées ou non au TNF α (Figure 33).

Les résultats obtenus montrent que la protéine PEA mais pas les protéines ETV et ERM, diminue l'activité de base du plasmide p536-Luc. De plus, la protéine PEA diminue fortement l'induction de l'activité promotrice du plasmide p536-Luc obtenue avec le TNF α . Les protéines ETV et ERM ont un effet moindre.

Ces résultats indiquent donc que les facteurs de transcription ETS jouent un rôle dans l'activité de base du promoteur C de la GGT ainsi que dans l'induction du promoteur C par le TNF α . Le mécanisme responsable de l'implication des protéines ETS ou un éventuel lien avec le site NF- κ B 1 n'a cependant pas encore été élucidé.

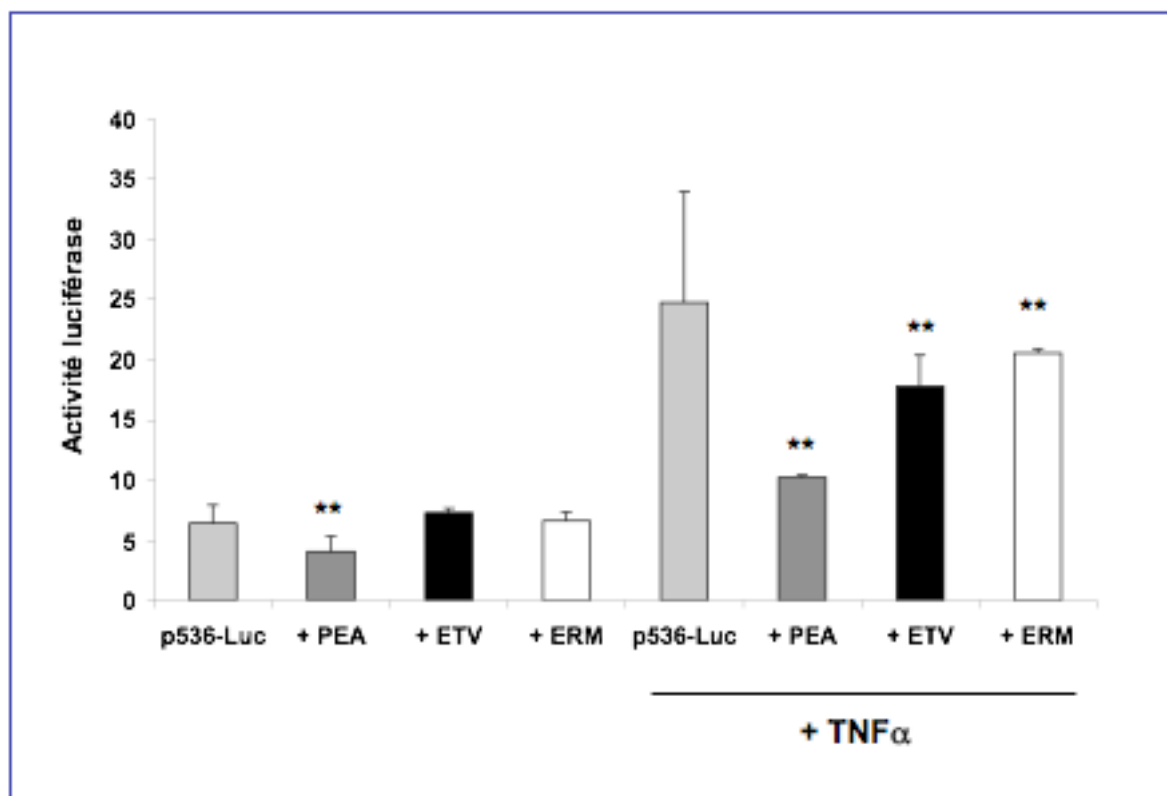


Figure 33: Etude par co-transfection de l'effet des vecteurs d'expression de la famille des facteurs de transcription ETS sur le plasmide p536-Luc.

Les cellules K562 ont été co-transfectées avec le plasmide p536-Luc et avec les vecteurs d'expression PEA, ETV, ERM, traitées ou non au TNFα (+ TNFα) et l'activité luciférase a été mesurée. L'activité luciférase de chaque co-transfection (p536-Luc + PEA, + ETV, + ERM), avec ou sans traitement au TNFα (+ TNFα), est comparée par rapport à l'activité luciférase des cellules seulement transfectées avec le plasmide p536-Luc (en gris clair). ** indique p<0,01 par rapport au contrôle.

III. 1. 2. - Etude de l'effet du TNF α et de la curcumine sur les trois ARNm de la γ -glutamyltransférase.

Comme les résultats précédents montrent un effet stimulateur du TNF α sur l'activité promotrice des promoteurs B et C de la GGT, nous avons ensuite voulu vérifier l'effet du TNF α sur l'expression des trois ARNm (ARNm de type A, B et C) codés par le gène GGT1 dans les cellules K562.

Les cellules K562 ont ainsi été traitées au TNF α , à la curcumine et au TNF α plus curcumine et analysées par PCR semi-quantitative en utilisant comme témoin interne l'ARN S14.

Les résultats obtenus montrent que l'expression des trois types d'ARNm de la GGT est induite par le traitement au TNF α . Néanmoins, l'ARNm de type B n'est induit que de 1,6 fois (Figure 35) alors que les ARNm de type A (Figure 34) et C (Figure 36) sont induits de 3 et 4 fois, respectivement. Le traitement par la curcumine seule diminue significativement l'expression du type A alors qu'il n'a pas d'effet sur l'expression des ARNm de type B et C.

Par contre, le co-traitement TNF α plus curcumine inhibe fortement l'induction obtenue avec le TNF α pour les 3 types d'ARNm de la GGT confirmant ainsi les résultats obtenus avec les promoteurs de la GGT.

III. 1. 3. - Etude de l'effet du TNF α sur l'expression de la protéine γ -glutamyltransférase dans différentes lignées.

Suite aux résultats obtenus pour l'activité promotrice et l'expression des trois ARNm codant pour la GGT dans les cellules K562, nous avons voulu vérifier si une induction de la quantité de protéines GGT est également observée après traitement au TNF α .

Nous avons alors réalisé des WB avec des extraits protéiques totaux de cellules K562 traitées ou non au TNF α (20 ng/ml, 6h) (Figure 37). Les résultats obtenus avec l'AC anti-GGT révèlent la présence d'une seule bande à 66 kDa. Cette taille correspond à la taille de la sous-unité lourde de la GGT (Hanigan and Frierson 1996).

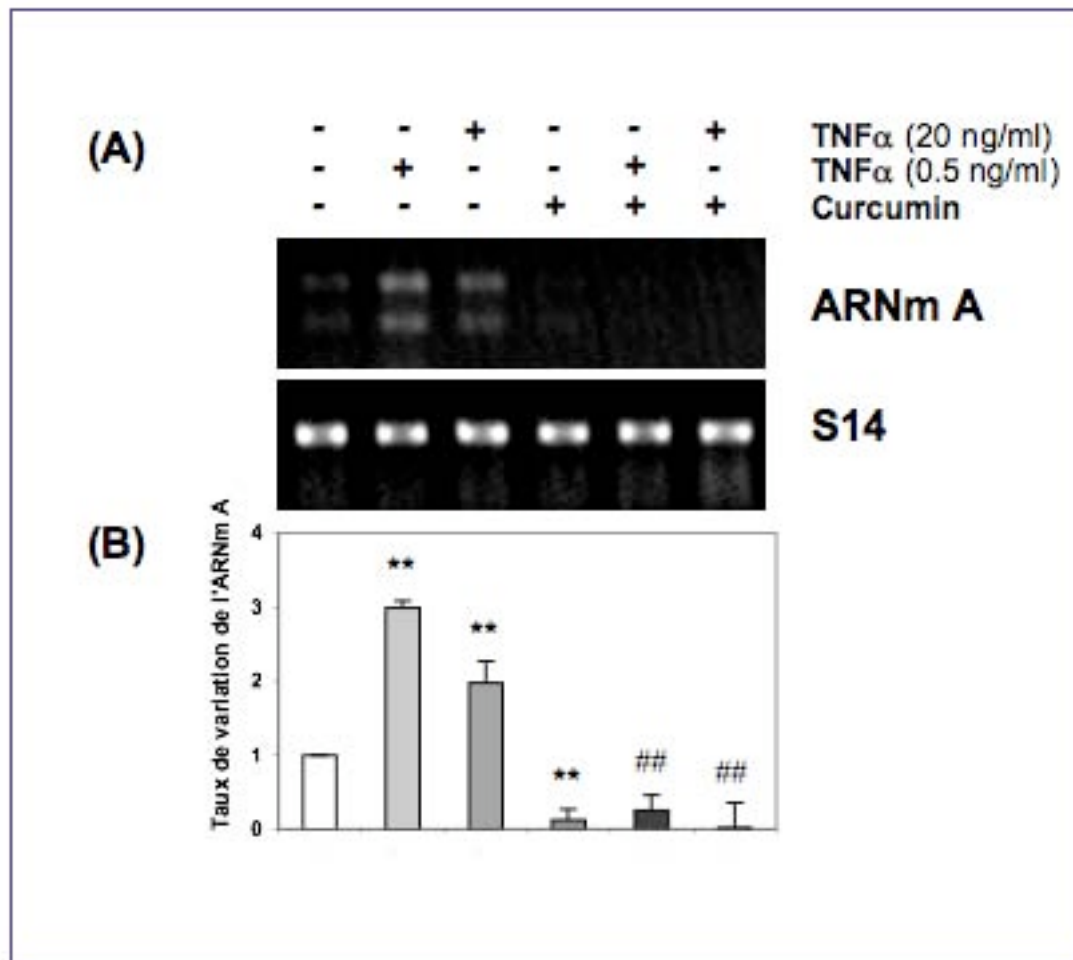


Figure 34 : Etude de l'effet du TNF α et de la curcumine sur l'ARNm de type A de la GGT par RT-PCR.

(A) Les ARN totaux extraits des cellules K562 traitées (+) ou non (-) au TNF α (0,5 et 20 ng/ml, 6h), à la curcumine (20 μ M, 2h) et au TNF α plus curcumine (8h), ont été soumis à une transcription inverse suivie d'une PCR en utilisant les amorces spécifiques de l'ARNm de type A de la GGT (tableau VII) et du S14. (B) Représentation du taux de variation de l'ARNm A de la GGT divisé par le S14 de trois expériences indépendantes. Les échantillons non traités servant de contrôle. ** indique $p < 0,01$ par rapport au contrôle et ## indique $p < 0,01$ par rapport à l'échantillon traité au TNF α .

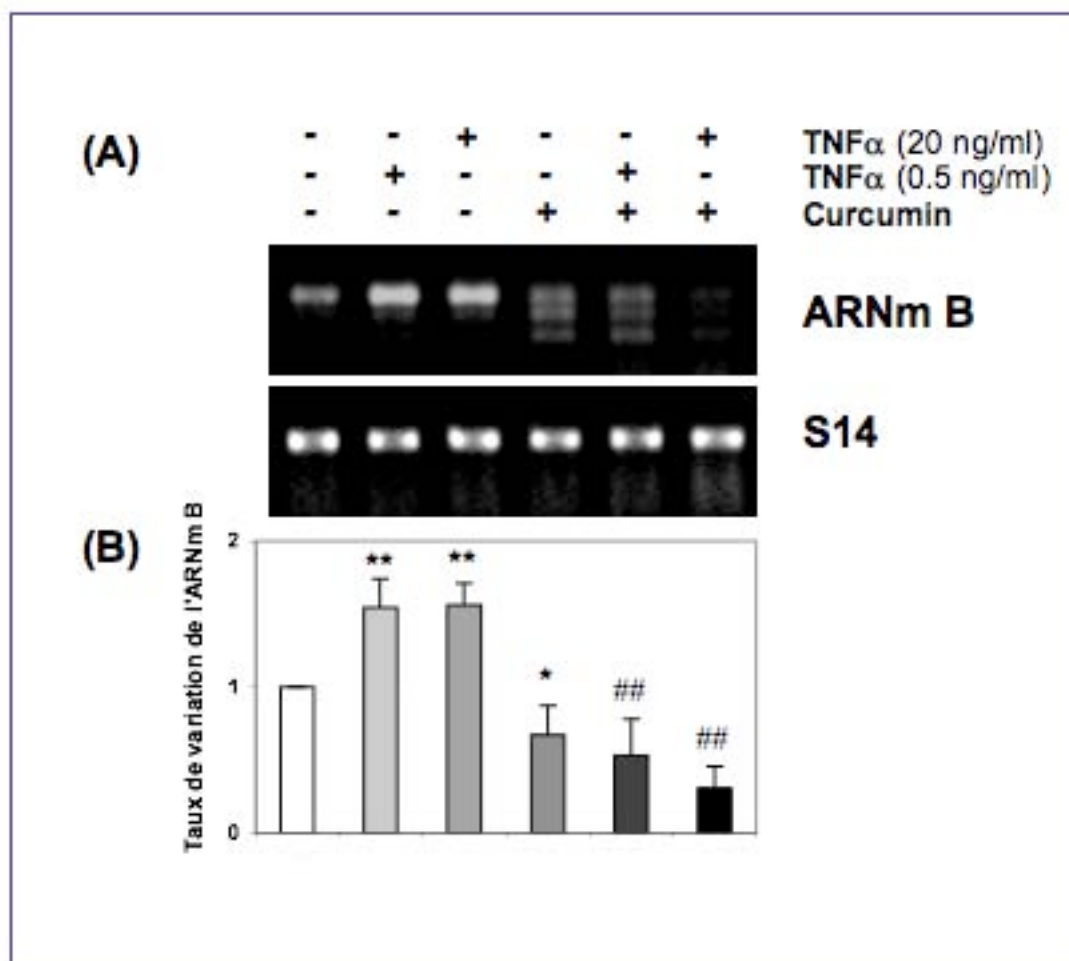


Figure 35 : Etude de l'effet du TNF α et de la curcumine sur l'ARNm de type B de la GGT par RT-PCR.

(A) Les ARN totaux extraits des cellules K562 traitées (+) ou non (-) au TNF α (0,5 et 20 ng/ml, 6h), à la curcumine (20 μ M, 2h) et au TNF α plus curcumine (8h), ont été soumis à une transcription inverse suivie d'une PCR en utilisant les amorces spécifiques de l'ARNm de type B de la GGT (tableau VII) et du S14. (B) Représentation du taux de variation de l'ARNm B de la GGT divisé par le S14 de trois expériences indépendantes. Les échantillons non traités servant de contrôle. * et ** indiquent $p < 0,05$ et $p < 0,01$, respectivement, par rapport au contrôle et ## indique $p < 0,01$ par rapport à l'échantillon traité au TNF α .

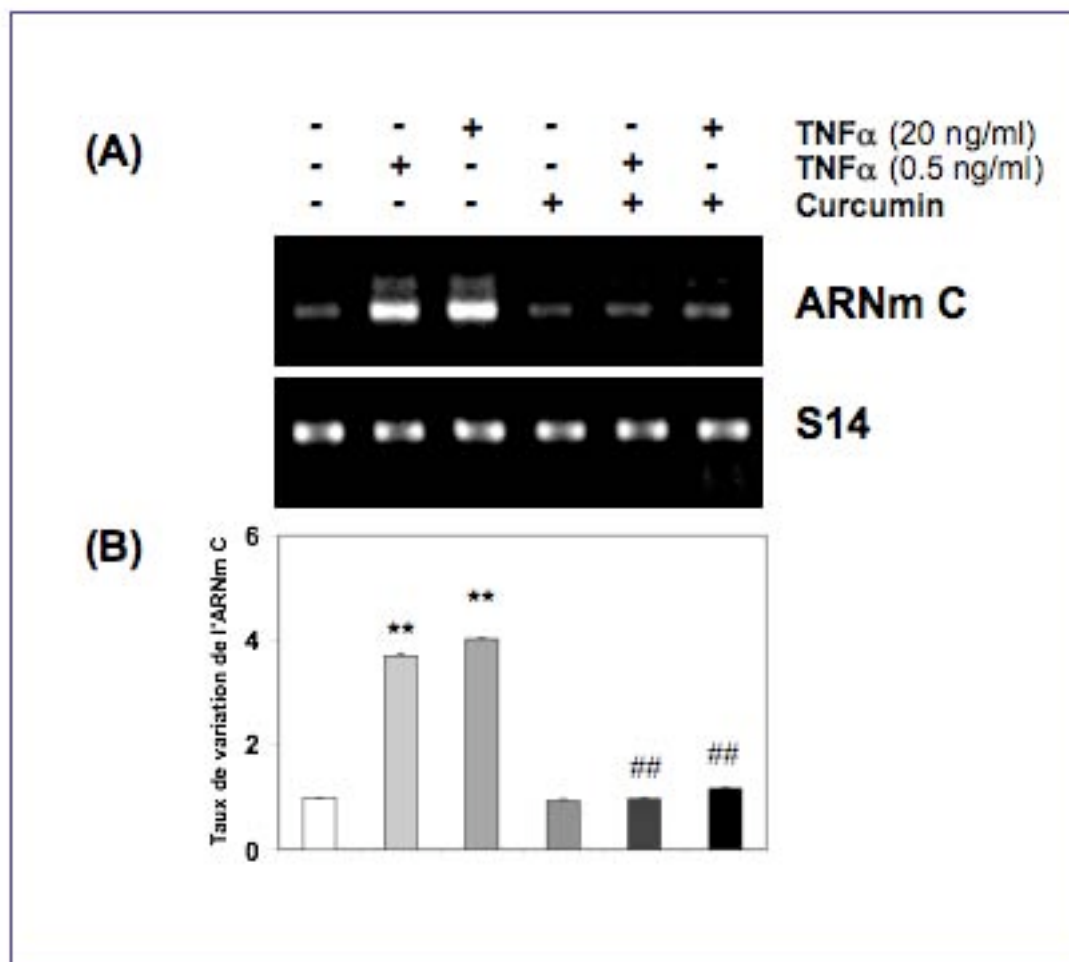


Figure 36 : Etude de l'effet du TNFα et de la curcumine sur l'ARNm de type A de la GGT par RT-PCR.

(A) Les ARN totaux extraits des cellules K562 traitées (+) ou non (-) au TNFα (0,5 et 20 ng/ml, 6h), à la curcumine (20 μM, 2h) et au TNFα plus curcumine (8h), ont été soumis à une transcription inverse suivie d'une PCR en utilisant les amorces spécifiques de l'ARNm de type A de la GGT (tableau VII) et du S14. (B) Représentation du taux de variation de l'ARNm C de la GGT divisé par le S14 de trois expériences indépendantes. Les échantillons non traités servant de contrôle. ** indique $p < 0,01$ par rapport au contrôle et ## indique $p < 0,01$ par rapport à l'échantillon traité au TNFα.

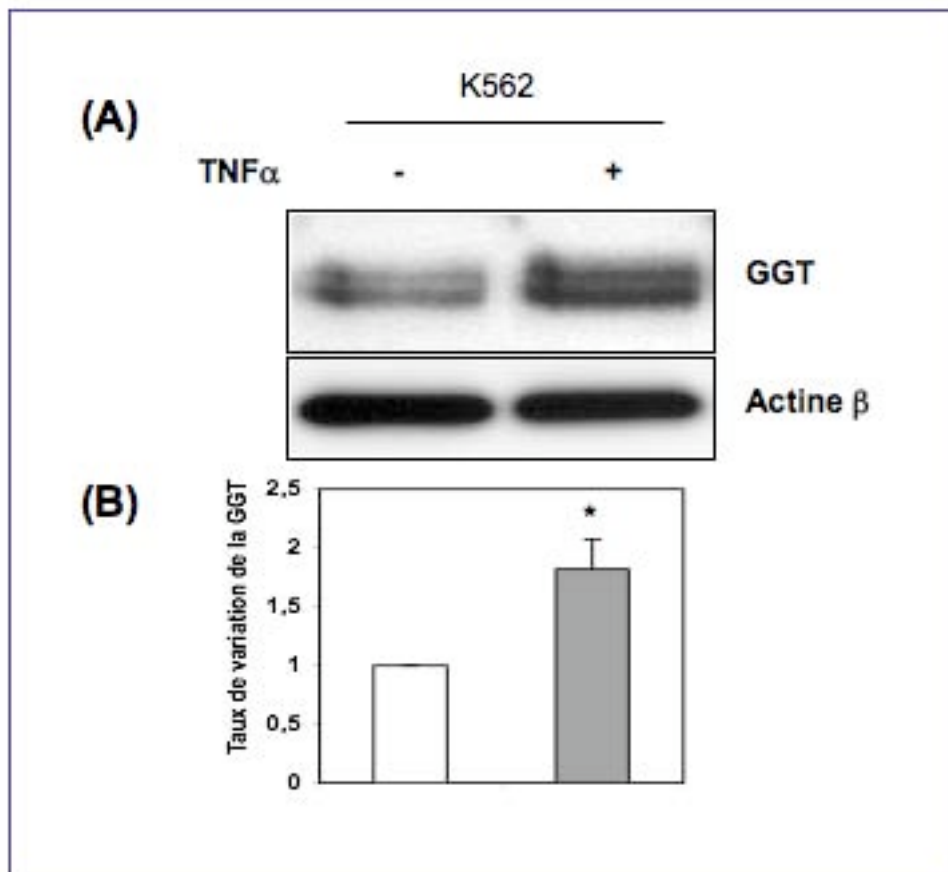


Figure 37 : Etude de l'effet du TNFα sur la GGT dans les cellules K562 par WB.

(A) Les protéines totales des cellules K562 traitées (+) ou non (-) au TNFα (20 ng/ml, 6h) ont été extraites et analysées par WB en utilisant des AC anti-GGT et anti-β-actine. (B) Représentation du taux de variation de la GGT divisé par l'actine de trois expériences indépendantes. L'échantillon non traité (-) sert de contrôle.* indique $p < 0,05$ par rapport au contrôle.

Après traitement au TNF α , cette bande est induite de 1,8 fois par rapport à la bande obtenue avec les cellules contrôles. Les résultats montrent donc qu'après traitement des cellules K562 au TNF α , la quantité de protéines GGT est également augmentée.

Afin de vérifier si cette induction est spécifique à la lignée cellulaire K562 étudiée ou si elle peut être généralisée, nous avons traité d'autres lignées cellulaires au TNF α et étudié l'expression de la GGT par WB (Figure 38). Les résultats obtenus montrent que parmi les douze lignées testées, la moitié n'exprime pas la GGT (les lignées Raji, Hel, DU145, HL60, Molt3 et Jurkat). Après traitement au TNF α , l'expression de la GGT est légèrement diminuée dans les lignées U937 et THP1, légèrement induite dans la lignée Meg01 mais ne varie pas dans les lignées 22RV1, JVM2 et TF1.

Nous pouvons donc conclure que la GGT est induite par le TNF α dans les cellules K562 et Meg01, deux lignées caractérisées par le chromosome de Philadelphie, diminuée dans les lignées U937 et THP1 et invariable dans les lignées 22RV1, JVM2 et TF1. Les lignées Raji, Hel, DU145, HL60, Molt3 et Jurkat, par contre, n'expriment pas la GGT. Ceci montre donc que la GGT est exprimée et régulée différemment selon la lignée cellulaire.

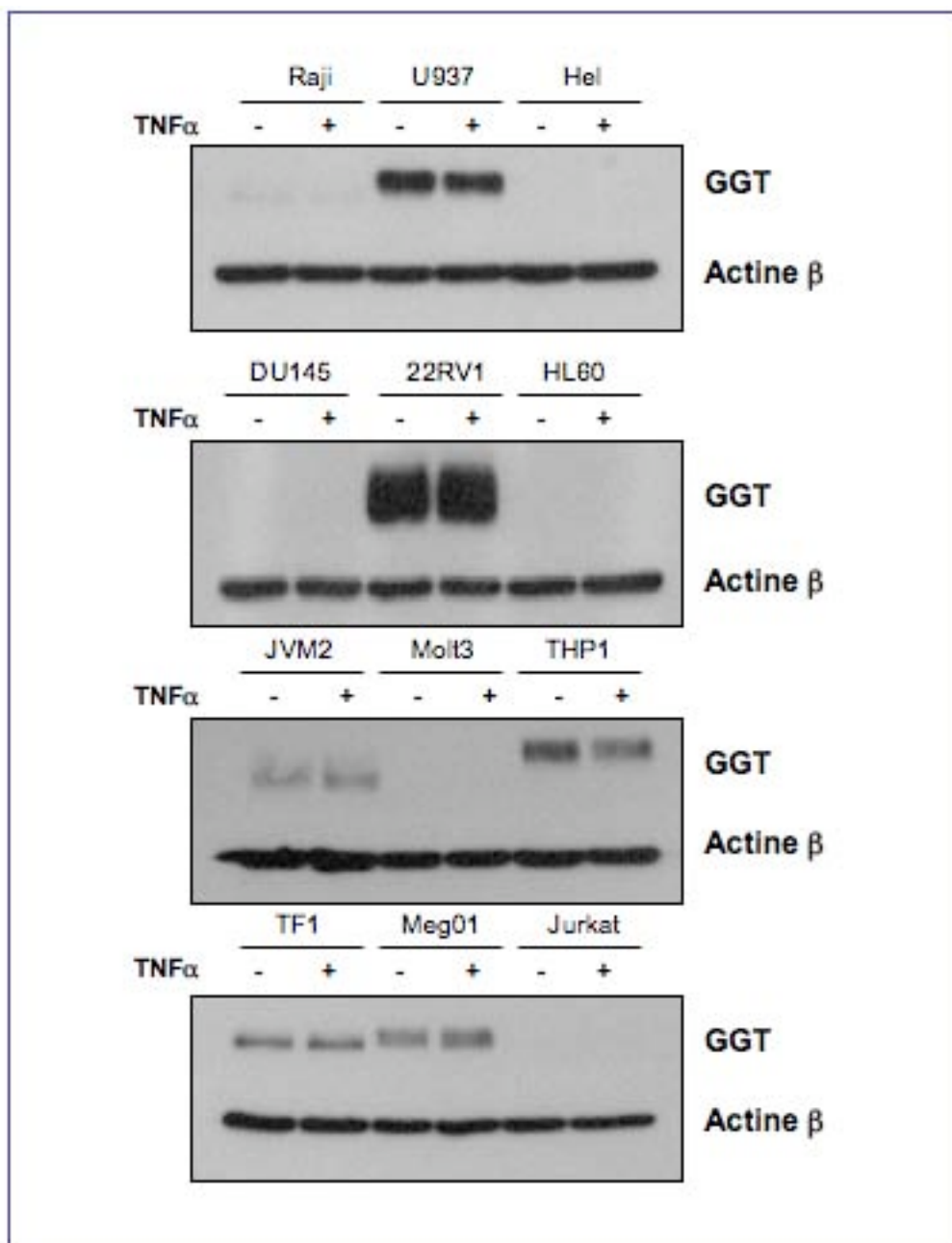


Figure 38 : Etude de l'effet du TNF α sur la GGT dans différentes lignées cellulaires par WB.

Les protéines totales de douze lignées différentes (Raji, U937, Hel, DU145, 22RV1, HL60, JVM2, Molt3, THP1, TF1, Meg01 et Jurkat) traitées (+) ou non (-) au TNF α (20 ng/ml, 6h) ont été extraites et analysées par WB en utilisant des AC anti-GGT et anti- β -actine. Les échantillons non traités servant de contrôle.

III. 2. - Etude de l'effet du $\text{TNF}\alpha$ sur l'activité enzymatique et la localisation cellulaire de la γ -glutamyltransférase dans les cellules K562

III. 2. 1. - Etude de l'effet du $\text{TNF}\alpha$ sur l'activité enzymatique de la γ -glutamyltransférase dans les cellules K562.

Nous avons ensuite étudié l'effet du $\text{TNF}\alpha$ sur l'activité enzymatique de la GGT dans les cellules K562. La GGT est une enzyme membranaire fortement glycosylée (Meister *et al.*, 1981). Elle est composée de deux chaînes polypeptidiques formant une sous-unité lourde et une sous-unité légère, issues d'un précurseur qui va subir un clivage protéolytique pour aboutir à la forme mature de la protéine.

Le clivage protéolytique du précurseur de la GGT est activé dans le réticulum endoplasmique. L'addition de galactose, de glucose et d'acide sialique se fait, quant à elle, dans l'appareil de Golgi. Le transfert de la GGT vers la membrane cellulaire, où elle exerce son activité, peut donc être un long voyage.

Ainsi nous avons choisi de traiter les cellules K562 pendant 9 jours et nous avons mesuré l'activité de la GGT pendant les 3 premiers jours, le 6^{ième} ainsi que le 9^{ième} jour (Figure 39).

Les résultats obtenus montrent que l'activité de la GGT augmente avec une induction de 1,4 fois après 3 jours, de 2,2 fois après 6 jours et de 2,5 fois après 9 jours de traitement au $\text{TNF}\alpha$. L'activité enzymatique n'est donc induite significativement qu'à partir de 3 jours de traitement au $\text{TNF}\alpha$. Or la synthèse de la GGT est déjà induite après 6h de traitement au $\text{TNF}\alpha$.

D'après les connaissances actuelles concernant la maturation de la GGT, nous supposons que ce long délai peut être dû soit à une maturation complexe de la GGT dans les cellules K562, soit à un blocage de la GGT quelque part dans le cytoplasme.

Afin de vérifier si le traitement au $\text{TNF}\alpha$ pouvait causer un blocage de la GGT dans le cytoplasme, nous avons analysé si le $\text{TNF}\alpha$ pouvait éventuellement induire un stress au niveau du réticulum endoplasmique. Ceci pourrait engendrer un retard de la maturation de la GGT et donc un délai dans le transfert de la GGT vers la membrane cellulaire.

Nous avons alors étudié l'effet du $\text{TNF}\alpha$ (20 ng/ml, 6h) sur une protéine connue pour être

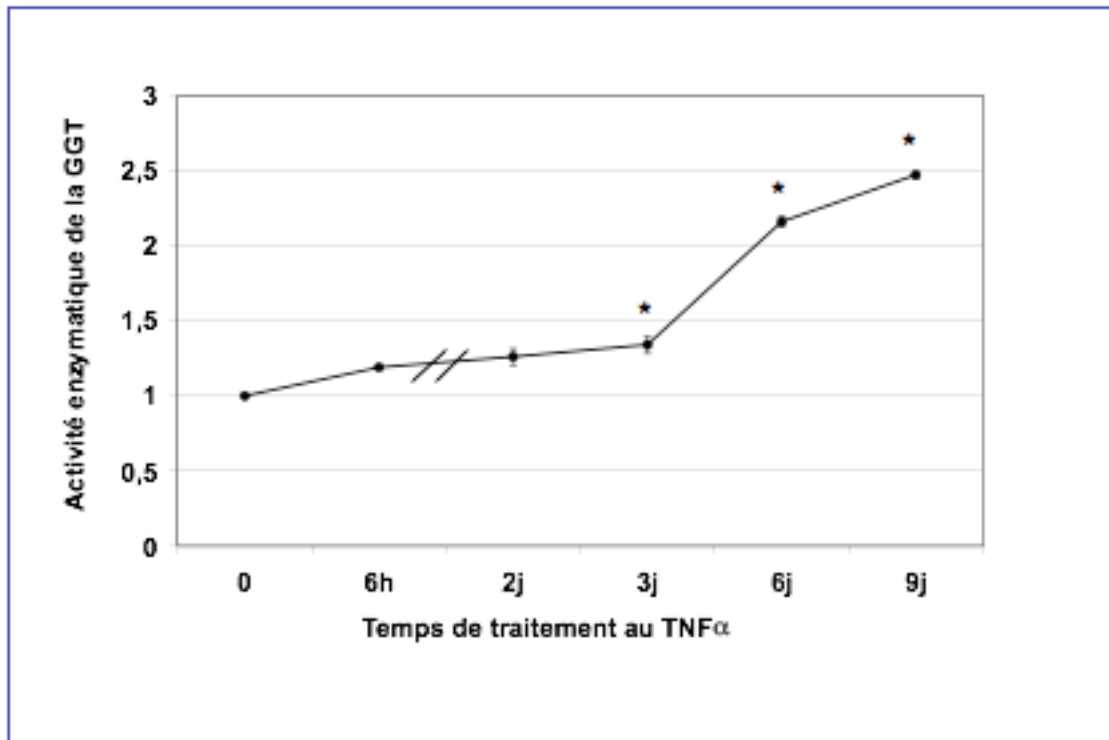


Figure 39 : Etude de l'effet du TNF α sur l'activité enzymatique de la GGT dans les cellules K562.

Les cellules K562 ont été traitées au TNF α (20 ng/ml) pendant 9 jours. Les mesures de l'activité enzymatique de la GGT ont été effectuées après 6 heures (6h), 2, 3, 6 et 9 jours (j) de traitement au TNF α . Les valeurs obtenues ont été normalisées et le taux de variation des cellules traitées au TNF α divisé par les cellules non traitées est représenté comme activité enzymatique de la GGT relative. * indique $p < 0,05$ par rapport au contrôle.

activée lors d'un stress endoplasmique, la protéine Grp78.

Le résultat obtenu montre que cette protéine est effectivement induite après traitement au TNF α (Figure 40), ce qui expliquerait probablement le long délai observé entre sa synthèse et l'induction de l'activité enzymatique.

III. 2. 2. - Etude de l'effet du TNF α sur la localisation cellulaire de la γ -glutamyl-transférase dans les cellules K562.

Vu que le traitement des cellules K562 au TNF α stimule l'activité de la GGT à partir de 3 jours, nous avons voulu vérifier par microscope de fluorescence si cette induction pouvait également être observée au niveau membranaire (Figures 41 à 44).

Ainsi nous avons traité les cellules K562 au TNF α pendant 3 et 6 jours à deux concentrations différentes, 20 ng/ml et 100 ng/ml, et nous avons marqué les cellules avec un protocole ne laissant pas entrer les anticorps dans la cellule.

Les résultats obtenus montrent étonnamment que le traitement au TNF α (20 ng/ml, 3 jours) provoque un changement de la distribution membranaire de la GGT (Figure 41). La GGT se concentre dans des domaines membranaires ou microdomaines au niveau de la membrane cellulaire. Après 6 jours de traitement au TNF α à 20 ng/ml, la concentration de la GGT au niveau de la membrane cellulaire est encore plus prononcée. Après 3 et 6 jours de traitement au TNF α à 100 ng/ml, le même résultat est observé.

Afin de trouver une explication concernant la concentration de la GGT à des endroits particuliers de la membrane, nous avons exploré l'organisation de l'actine dans ces cellules (Figure 45). Les résultats obtenus avec les cellules K562 contrôles non traitées montrent que ces cellules possèdent un domaine semblable constitué d'actine à la surface cellulaire.

Le double marquage de ces cellules avec la phalloïdine (marqueur spécifique de l'actine) et l'AC anti-GGT montre une co-localisation de ces 2 fluorochromes, traduisant ainsi l'accumulation de la GGT au niveau de ces domaines membranaires d'actine (Figure 46). Le traitement au TNF α dirige donc la GGT dans ce domaine constitué d'actine à la surface cellulaire des cellules K562.

A l'heure actuelle, nous ignorons malheureusement encore quelle est la fonction de ce domaine et pourquoi le traitement au TNF α dirige la GGT à cet endroit particulier de la cellule.

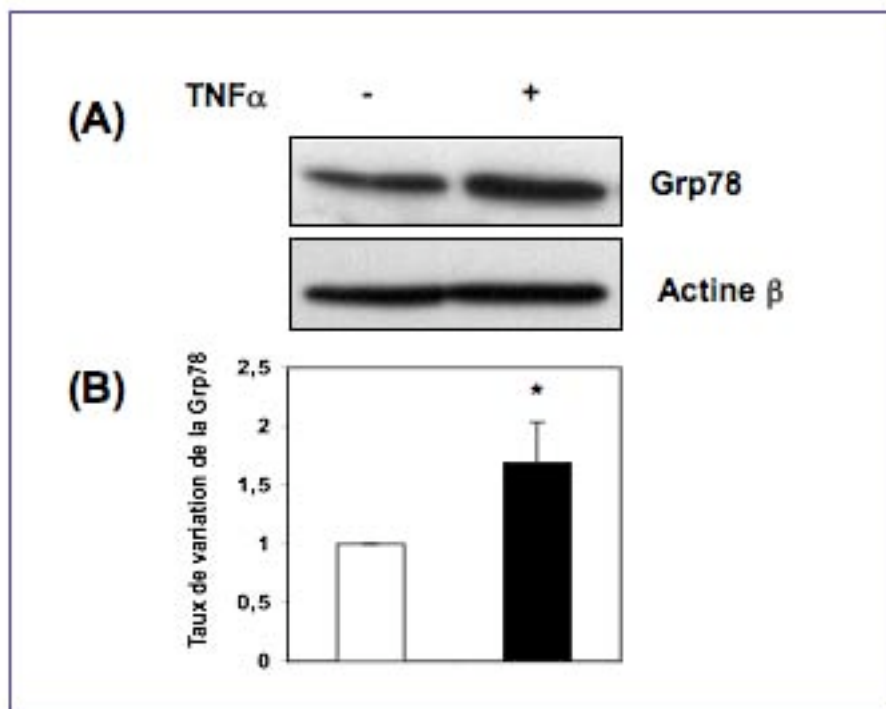


Figure 40 : Etude de l'effet du TNF α sur la protéine Grp78 dans les cellules K562 par WB.

(A) Les protéines totales des cellules K562 traitées (+) ou non (-) au TNF α (20 ng/ml, 6h) ont été extraites et analysées par WB en utilisant des AC anti-Grp78 et anti- β -actine. (B) Représentation du taux de variation de la Grp78 divisé par l'actine de trois expériences indépendantes. L'échantillon non traité servant de contrôle. * indique $p < 0,05$ par rapport au contrôle.

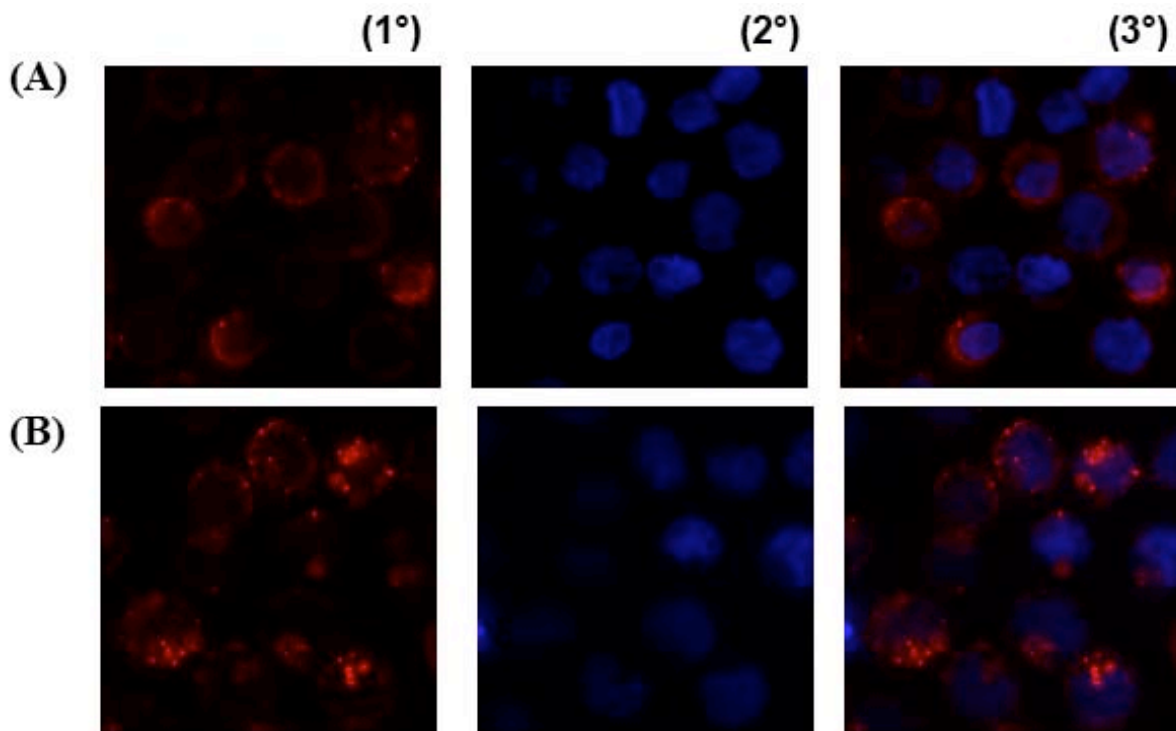


Figure 41 : Etude de l'effet du $\text{TNF}\alpha$ sur la GGT par microscopie à fluorescence dans les cellules K562 traitées avec 20 ng/ml de $\text{TNF}\alpha$ pendant 3 jours.

Les cellules K562 ont été traitées au $\text{TNF}\alpha$ (B) pendant 3 jours à une concentration de 20 ng/ml et comparées par rapport à des cellules non traitées (A). Les cellules ont été observées sous un microscope à fluorescence en utilisant un AC anti-GGT couplé à un fluorochrome émettant dans le rouge (Alexa Fluor 568) (1°A et 1°B). Le noyau est coloré avec le Hoechst (2°A et 2°B). Les images 3°A et 3°B montrent la superposition des images 1°A et 2°A et 1°B et 2°B, respectivement. Magnification x40.

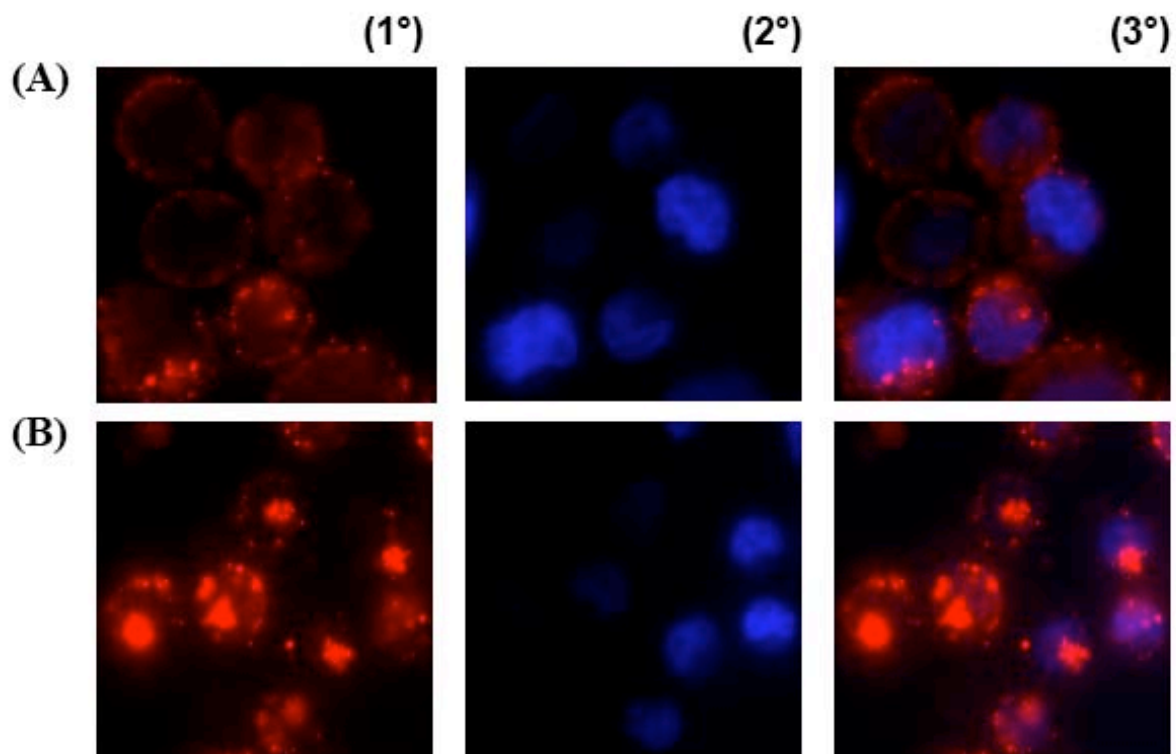


Figure 42 : Etude de l'effet du $\text{TNF}\alpha$ sur la GGT par microscopie à fluorescence dans les cellules K562 traitées avec 20 ng/ml de $\text{TNF}\alpha$ pendant 6 jours.

Les cellules K562 ont été traitées au $\text{TNF}\alpha$ (B) pendant 6 jours à une concentration de 20 ng/ml et comparées par rapport à des cellules non traitées (A). Les cellules ont été observées sous un microscope à fluorescence en utilisant un AC anti-GGT couplé à un fluorochrome émettant dans le rouge (Alexa Fluor 568) (1°A et 1°B). Le noyau est coloré avec le Hoechst (2°A et 2°B). Les images 3°A et 3°B montrent la superposition des images 1°A et 2°A et 1°B et 2°B, respectivement. Magnification x40.

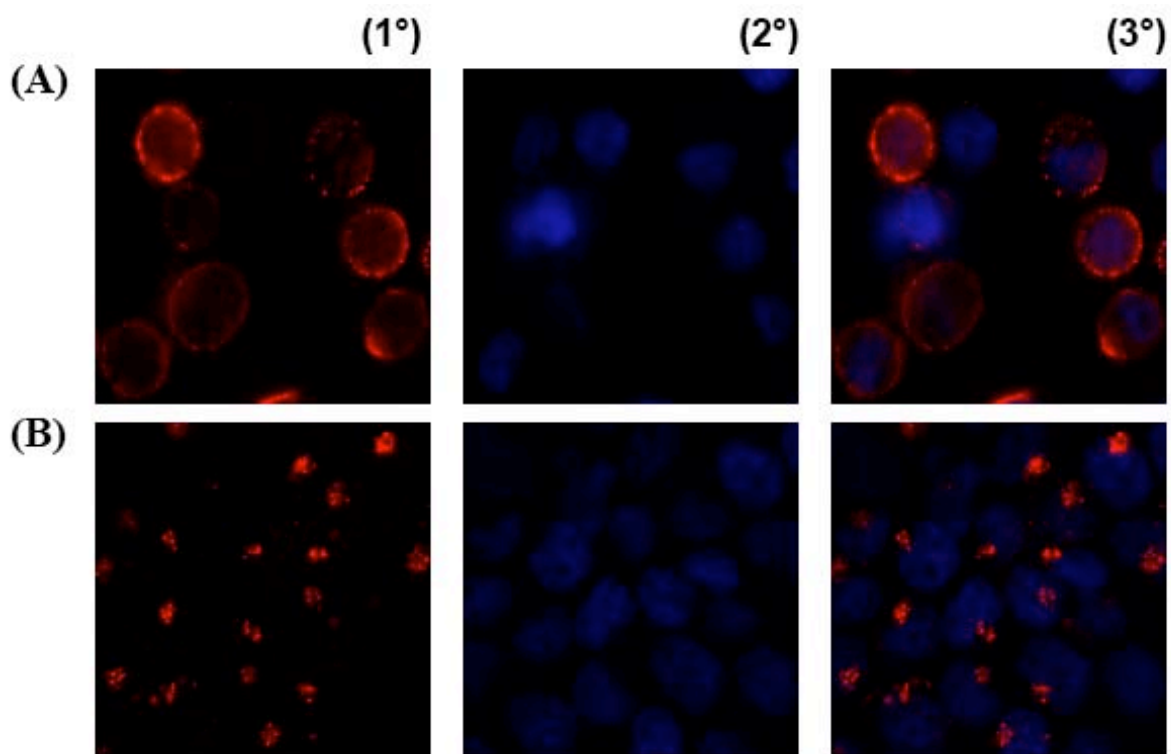


Figure 43 : Etude de l'effet du $\text{TNF}\alpha$ sur la GGT par microscopie à fluorescence dans les cellules K562 traitées avec 100 ng/ml de $\text{TNF}\alpha$ pendant 3 jours.

Les cellules K562 ont été traitées au $\text{TNF}\alpha$ (B) pendant 3 jours à une concentration de 100 ng/ml et comparées par rapport à des cellules non traitées (A). Les cellules ont été observées sous un microscope à fluorescence en utilisant un AC anti-GGT couplé à un fluorochrome émettant dans le rouge (Alexa Fluor 568) (1°A et 1°B). Le noyau est coloré avec le Hoechst (2°A et 2°B). Les images 3°A et 3°B montrent la superposition des images 1°A et 2°A et 1°B et 2°B, respectivement. Magnification x40.

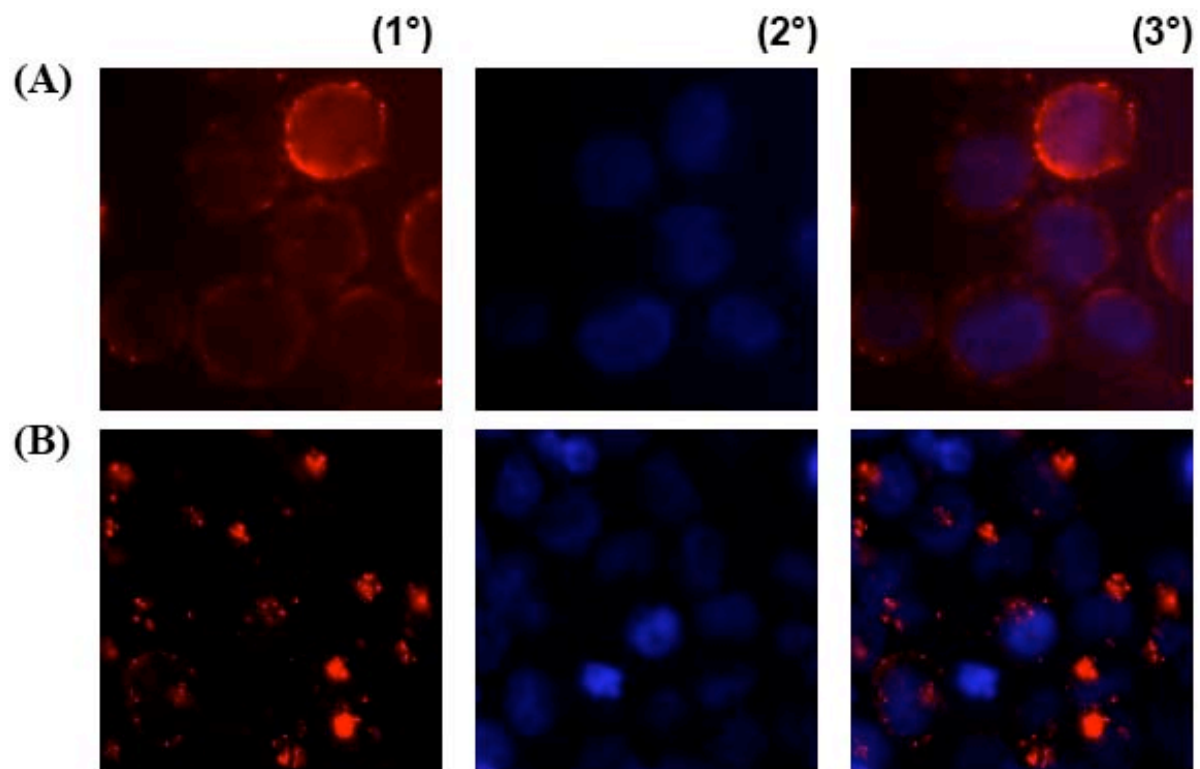


Figure 44 : Etude de l'effet du $\text{TNF}\alpha$ sur la GGT par microscopie à fluorescence dans les cellules K562 traitées avec 100 ng/ml de $\text{TNF}\alpha$ pendant 6 jours.

Les cellules K562 ont été traitées au $\text{TNF}\alpha$ (B) pendant 6 jours à une concentration de 100 ng/ml et comparées par rapport à des cellules non traitées (A). Les cellules ont été observées sous un microscope à fluorescence en utilisant un AC anti-GGT couplé à un fluorochrome émettant dans le rouge (Alexa Fluor 568) (1°A et 1°B). Le noyau est coloré avec le Hoechst (2°A et 2°B). Les images 3°A et 3°B montrent la superposition des images 1°A et 2°A et 1°B et 2°B, respectivement. Magnification x40.

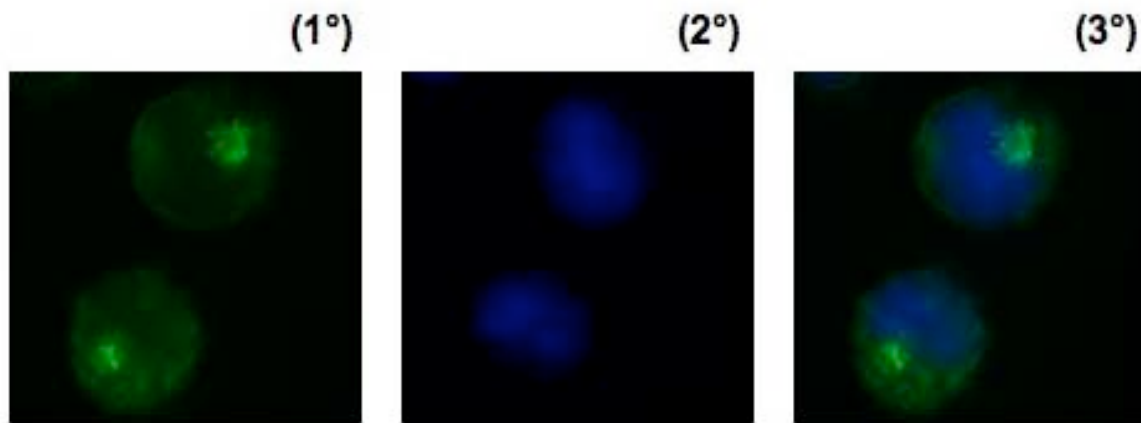


Figure 45 : Observation de l'organisation de l'actine dans les cellules K562.

Les cellules K562 ont été marquées à la phalloïdine couplée à un fluorochrome émettant dans le vert (1°). Le noyau est coloré avec le Hoechst (2°). (3°) Superposition des images (1°) et (2°). Magnification x40.

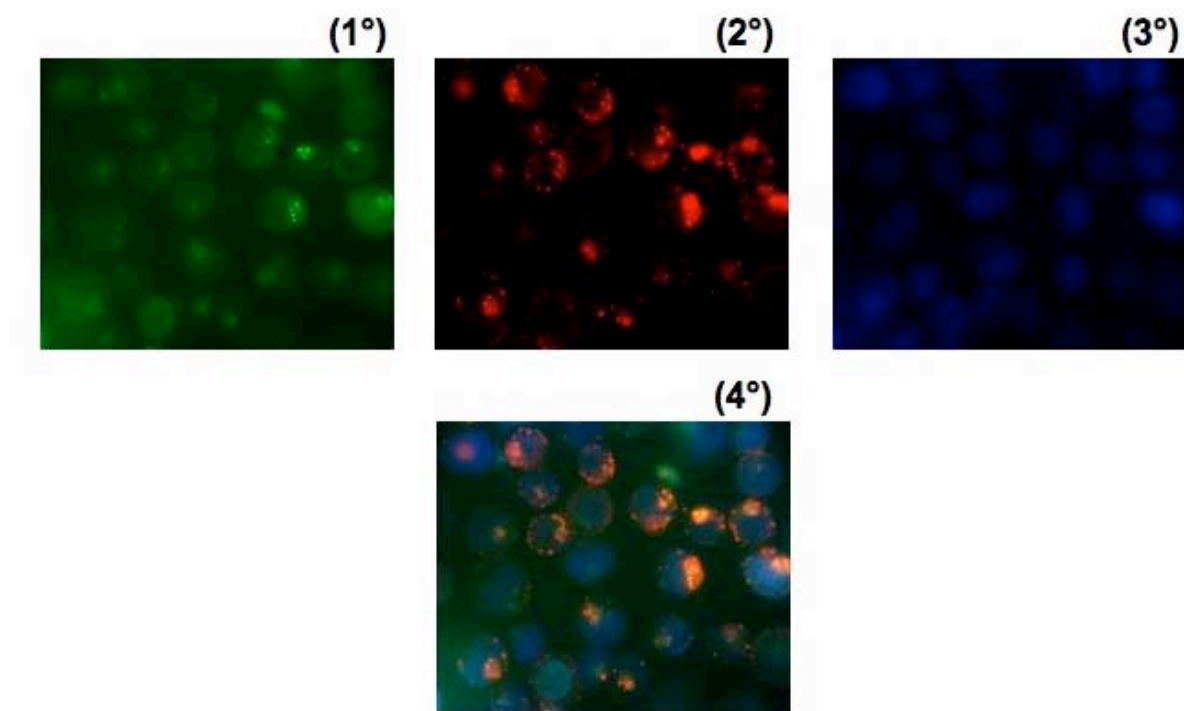


Figure 46 : Co-localisation entre l'actine et la GGT dans les cellules K562 traitées avec 20ng/ml de TNF α pendant 3 jours.

Les cellules K562 ont été traitées au TNF α pendant 3 jours à une concentration de 20 ng/ml et observées ensuite sous un microscope à fluorescence en utilisant la phalloïdine émettant dans le vert (1°) et un AC anti-GGT couplé à un fluorochrome rouge (Alexa Fluor 568) (2°). Le noyau est coloré en bleu avec le Hoechst (3°). L'image 4° montre la superposition des images 1°, 2° et 3°. Magnification x40.

En conclusion, le TNF α n'induit l'activité de la GGT qu'à partir de 3 jours, alors que sa synthèse est stimulée dès 6h de traitement. Ce long délai est probablement dû à un stress du réticulum endoplasmique causé par le TNF α . De plus, le TNF α dirige la GGT dans un domaine particulier à la surface cellulaire constitué d'actine.

III. 3. - Etude des phénomènes redox, produits au cours du catabolisme du glutathion par la γ -glutamyltransférase, dans les cellules K562

En 1993, Stark *et al.* ont proposé pour la première fois que le catabolisme du glutathion par la GGT pouvait avoir un rôle prooxydant sous certaines conditions (Stark *et al.*, 1993).

De nombreuses publications ont confirmé cet effet prooxydant de la GGT et les conséquences résultant de ce phénomène oxydatif sont nombreuses. Les ERO produits peuvent avoir des cibles diverses, dont notamment et en premier lieu l'oxydation et/ou la S-thiolation des groupements thiols des protéines (Figure 7).

Comme le site actif de la GGT est localisé à la partie externe de la membrane cellulaire, les protéines situées dans la membrane plasmique sont potentiellement les premières cibles des ERO produites lors de l'action prooxydante de la GGT.

Dominici *et al.* ont en effet montré que dans des cellules de mélanome les réactions prooxydantes produites par la GGT au cours du catabolisme du glutathion, induisent des changements redox des cystéines du récepteur TNFR-1, un récepteur stimulé par des signaux apoptotiques ainsi qu'anti-apoptotiques (Dominici *et al.*, 2004).

Afin de vérifier si ces phénomènes redox sont également observés dans les cellules K562, nous avons entrepris différentes expériences.

III. 3. 1. - Mesure de la production d'H₂O₂ dans les cellules K562.

En premier lieu, nous avons mesuré la production du peroxyde d'hydrogène (ou H₂O₂) dans les cellules K562 traitées ou non au TNF α . Le peroxyde d'hydrogène est la principale ERO produite lors des réactions prooxydantes dérivant du catabolisme du GSH par la GGT.

Comme les résultats précédents montrent que le $\text{TNF}\alpha$ stimule l'activité de la GGT, nous avons voulu vérifier si cette stimulation augmente aussi la production d' H_2O_2 .

La production d' H_2O_2 est mesurée en suivant la décroissance de la fluorescence de la scopoletine, un donneur d'hydrogène fluorescent, au cours du temps (Figure 47).

Nous avons alors traité les cellules pendant 3 et 6 jours au $\text{TNF}\alpha$ et comparé les cellules traitées (TNF) par rapport aux cellules non traitées servant de témoin. Nous avons également mesuré la production d' H_2O_2 dans des cellules K562 stimulées avec des substrats de la GGT (GGT stim.), le GSH et la glycyl-glycine.

Les résultats obtenus montrent qu'il n'y a pas de production d' H_2O_2 après 3 jours de traitement au $\text{TNF}\alpha$. Après 6 jours, une faible production d' H_2O_2 est observée après 20 minutes pour les cellules témoins non traitées (stimulées ou non) et une plus forte pour les cellules traitées (stimulées ou non). Ce résultat n'a été obtenu malheureusement qu'une seule fois.

III. 3. 2. - Etude de l'état redox des protéines de surface des cellules K562 traitées ou non au $\text{TNF}\alpha$.

Nous avons également étudié un autre phénomène résultant de la production des ERO par le catabolisme du GSH, à savoir l'oxydation des protéines de surface après stimulation de la GGT avec le $\text{TNF}\alpha$. Les cellules K562 ont été traitées au $\text{TNF}\alpha$ (100ng/ml) pendant 6 jours. Les cellules ont ensuite été marquées avec le marqueur thiol IAB, qui reconnaît les groupements thiols réduits présents sur la surface cellulaire (Figure 48).

Le résultat obtenu montre que le signal obtenu pour les protéines de surface traitées au $\text{TNF}\alpha$ est beaucoup plus faible que celui des protéines contrôles non traitées, ce qui traduit une induction de l'oxydation des protéines de surface par le $\text{TNF}\alpha$. Ce résultat n'a été obtenu malheureusement qu'une seule fois.

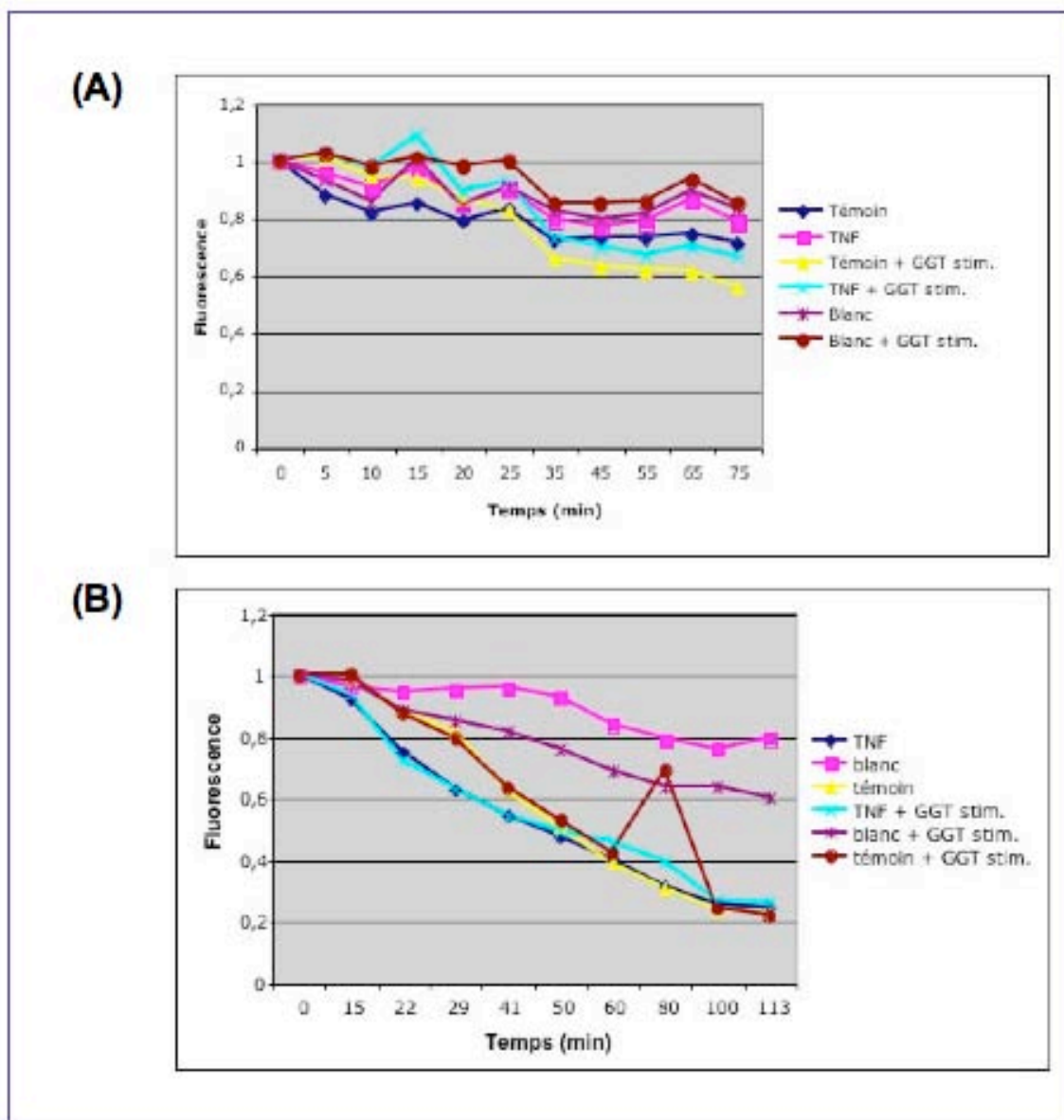


Figure 47 : Mesure de la production d'H₂O₂ dans les cellules K562 traitées ou non au TNF α .

Les cellules K562 ont été traitées au TNF α pendant 3 (A) et 6 jours (B). Une production d'H₂O₂ est observée lorsque la fluorescence de la scopoletine, un donneur d'hydrogène oxydé en présence d'H₂O₂, décroît en fonction du temps. Les échantillons suivants ont été analysés: le blanc représente une mesure sans cellules, le témoin représente des cellules non traitées, le TNF correspond aux cellules traitées au TNF α et les échantillons blanc, témoin ou TNF + GGT stim. représentent des échantillons où la GGT a été stimulée (= addition de GSH et de glycine-glycine).

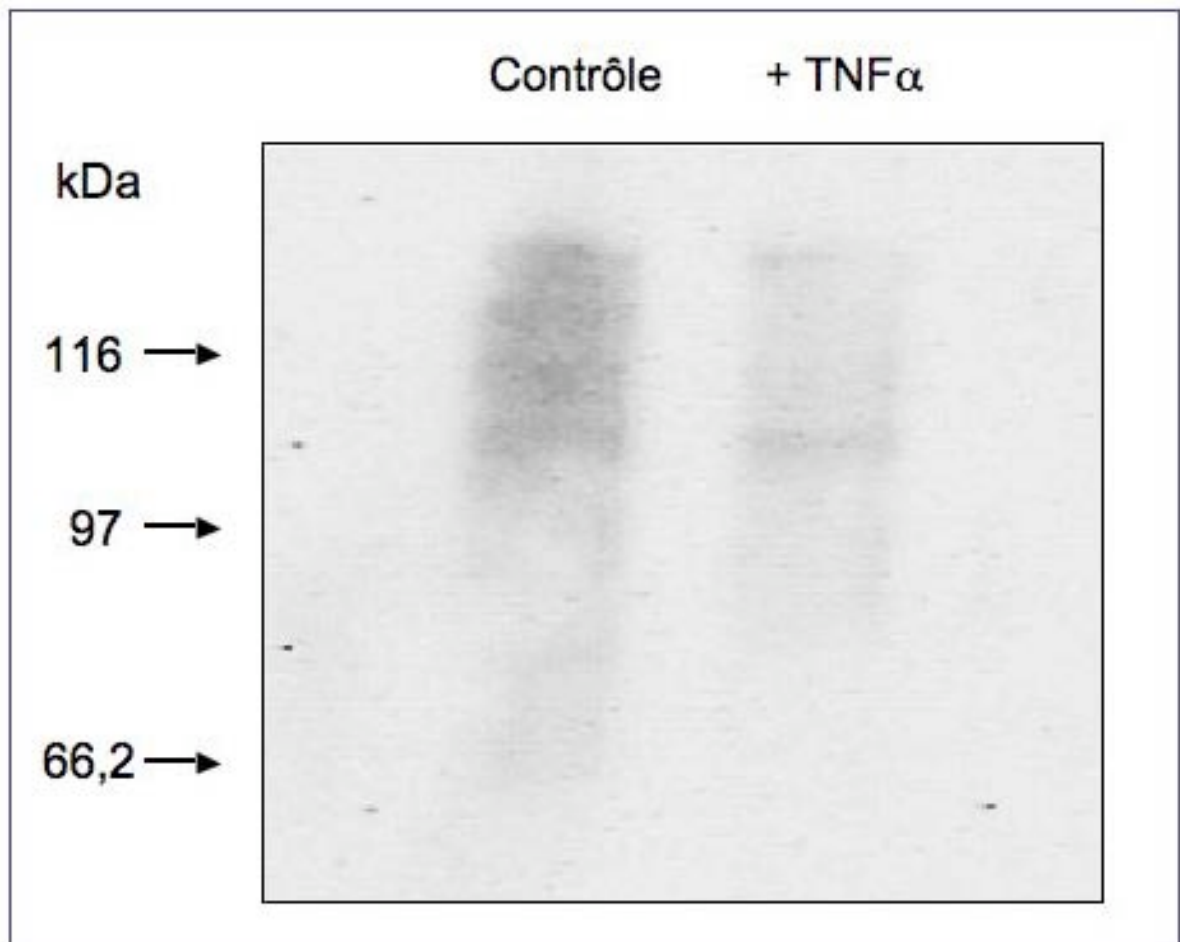


Figure 48 : Etude de l'état redox des protéines de surface des cellules K562 traitées ou non au TNF α .

Les cellules K562 ont été traitées au TNF α pendant 6 jours, puis marquées au marqueur de thiols N-(biotinoyl)-N'-(iodoacetyl)ethylenediamine (BIA ou IAB), qui reconnaît les groupements réduits présents sur les protéines de surface. Ensuite les cellules ont été lysées et les protéines ont été analysées par WB en exposant les blots à l'avidine peroxydase et en utilisant un marqueur de taille de 66,2 à 116 kDa. L'échantillon non traité servant de contrôle.

III. 3. 3. - Etude de l'activité liante des récepteurs au TNF à l' ^{125}I -TNF α dans les cellules K562 traitées ou non au TNF α .

Puisque les expériences précédentes ne nous permettent pas d'établir de réelles conclusions, nous avons ensuite étudié l'activité liante des récepteurs au TNF pour leur ligand, le TNF α .

Les récepteurs au TNF possèdent un grand nombre de thiols dans leurs domaines extracellulaires, ce qui les rend sensibles à des modulations redox par des agents ou des processus prooxydants. Dominici *et al.* ont constaté que les réactions prooxydantes produites au cours du métabolisme du GSH par la GGT, peuvent induire des changements redox des cystéines du récepteur TNFR-1 et ainsi changer l'affinité du récepteur pour son ligand.

Afin d'étudier si ces changements redox dans la structure du TNFR-1 peuvent altérer la fonction de celui-ci, à savoir ses caractéristiques de liaison à son ligand, nous avons étudié l'activité liante des récepteurs au TNF pour leur ligand, le TNF α , dans les cellules K562 traitées ou non au TNF α (Figure 49).

Les résultats obtenus montrent que le traitement au TNF α pendant 3 jours (100 ng/ml) diminue l'activité liante des récepteurs au TNF pour le TNF α radioactif (^{125}I -TNF α) comparé au témoin non traité (Figure 49A), mais un traitement de 6 jours (Figure 49 B), par contre, augmente l'activité liante des récepteurs TNF. L'inhibiteur de la GGT, l'acivicine, augmente légèrement l'activité liante mais l'ABBA, un autre inhibiteur de la GGT, n'a pas d'effet, ce qui probablement exclut une implication de la GGT dans ce résultat et indique que probablement le TNF α régule lui-même l'activité liante de ses récepteurs.

III. 3. 4. - Analyse du nombre de récepteurs TNFR-1 présents sur les cellules K562 traitées ou non au TNF α par cytométrie en flux.

Afin de vérifier si les variations de l'activité liante des récepteurs TNF sont dues à des variations du nombre de récepteurs TNF, nous avons effectué une analyse par cytométrie en flux en utilisant un AC reconnaissant spécifiquement le récepteur TNFR-1, le récepteur principal des récepteurs au TNF (Figure 50).

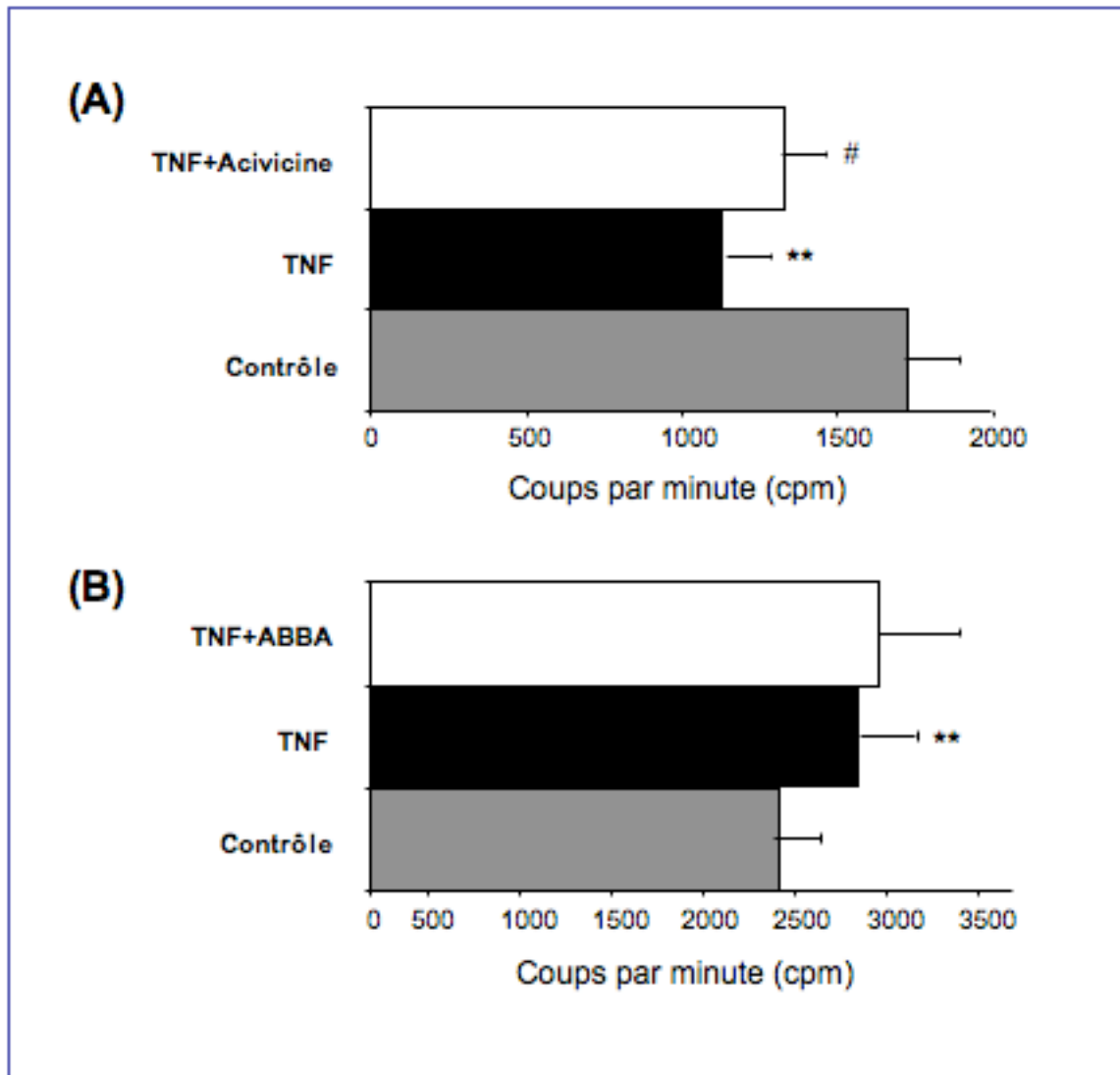


Figure 49 : Etude de la liaison du ^{125}I -TNF α aux cellules K562 traitées ou non au TNF α .

Les cellules K562 ont été traitées au TNF α pendant 3 (A) et 6 jours (B). Les cellules ont ensuite été incubées avec le TNF α marqué radioactivement à l'iode 125 (^{125}I -TNF α) et la radioactivité, exprimée en coup par minute (cpm), est mesurée. Les trois échantillons suivants ont été analysés: des cellules non traitées au TNF α , qui servent de contrôle, des cellules traitées au TNF α pendant 3 et 6 jours et des cellules traitées avec des inhibiteurs de la GGT, en (A) à l'acivicine et en (B) à l'ABBA. L'échantillon non traité servant de contrôle. ** indique $p < 0,01$ comparé au contrôle et # indique $p < 0,05$ comparé par rapport à l'échantillon traité au TNF α .

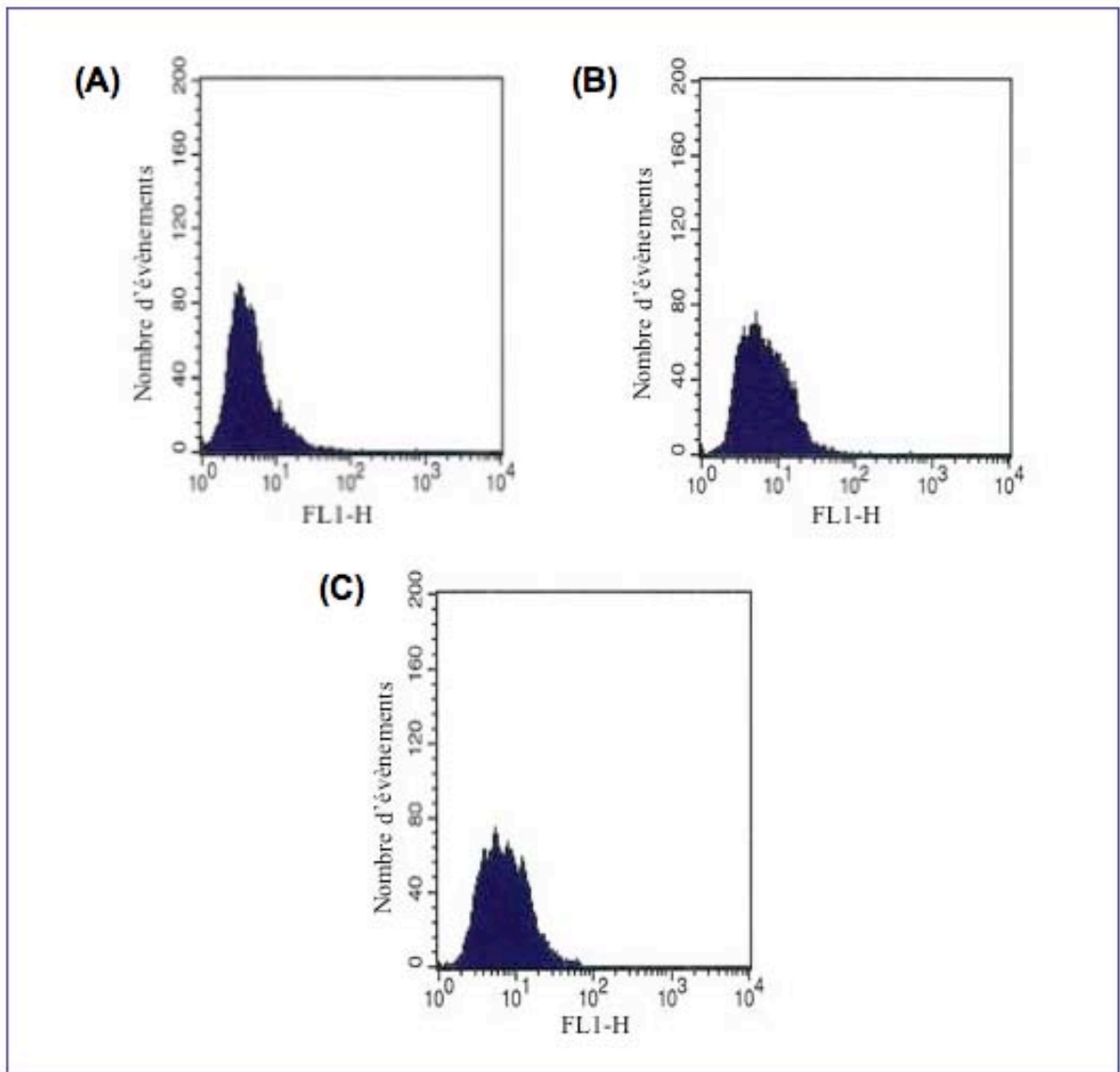


Figure 50 : Analyse du nombre de récepteurs TNFR-1 présents sur les cellules K562 traitées ou non au $\text{TNF}\alpha$ par cytométrie en flux.

Les cellules K562 traitées au $\text{TNF}\alpha$ pendant 6 jours ont été incubées avec un AC anti-TNFR-1, couplé à un fluorochrome émettant dans le vert, puis analysées. (A) Cellules K562 non traitées au $\text{TNF}\alpha$, servant de contrôle. (B) Cellules traitées au $\text{TNF}\alpha$ (100 ng/ml, 6 jours). (C) Cellules traitées au $\text{TNF}\alpha$ et à l'inhibiteur de la GGT, l'ABBA.

Le résultat obtenu montre que le nombre de récepteurs est augmenté dans les cellules traitées au TNF α pendant 6 jours (Figure 50B), par rapport au témoin (Figure 50A), mais que l'inhibiteur de la GGT, l'ABBA, n'intervient pas (Figure 50 C).

Ce résultat est cohérent avec le résultat de l'activité liante des récepteurs TNF au TNF α radioactif obtenu après 6 jours.

III. 3. 5. - Etude de l'affinité du récepteur TNFR-1 pour le TNF α dans les cellules K562 traitées ou non au TNF α par Scatchard plot.

Puisque les résultats précédents montrent que le TNF α augmente l'activité liante ainsi que le nombre de récepteurs TNFR-1 dans les cellules K562 après 6 jours, nous avons ensuite vérifié si un traitement au TNF α change également l'affinité de liaison du TNFR-1 pour son ligand, le TNF α (Figure 51).

Le résultat obtenu montre une augmentation de l'affinité de liaison du récepteur TNFR-1 pour son ligand dans les cellules K562 traitées au TNF α pendant 6 jours par rapport au contrôle. Ce résultat n'a malheureusement été obtenu qu'une seule fois.

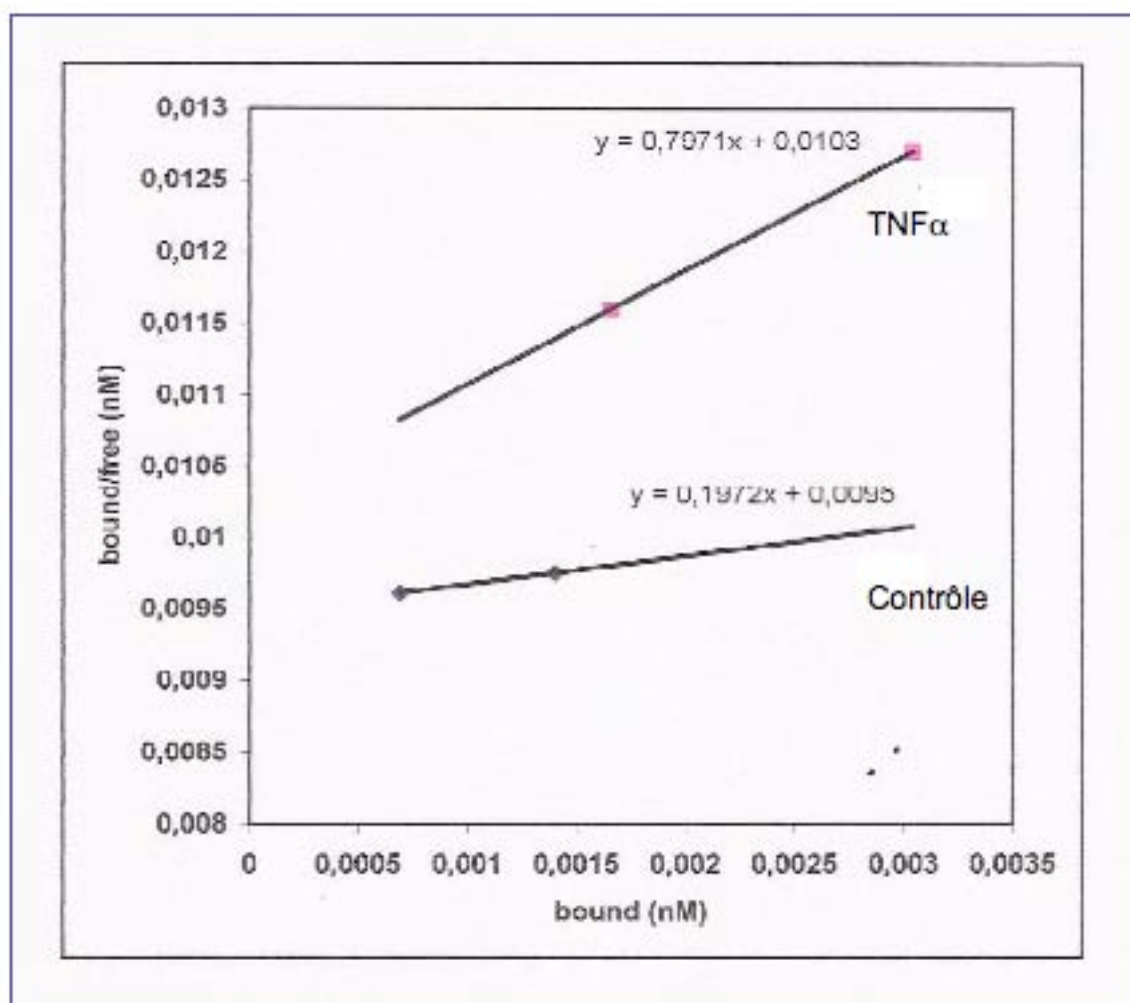


Figure 51 : Analyse de l'affinité du récepteur TNFR-1 pour son ligand TNFα dans les cellules K562 par Scatchard plot .

L'analyse par Scatchard plot a été réalisée avec les cellules K562 non traitées (Contrôle) ou traitées au TNFα (TNF) pendant 6 jours. Après le traitement, les cellules ont été lavées et incubées avec des concentrations croissantes de TNFα marqué à l' ^{125}I , puis la radioactivité liée à la cellule a été déterminée avec un compteur γ . Les Scatchard plots, déterminant l'affinité de liaison du ^{125}I - TNFα pour le récepteur TNFR-1, ont été réalisés avec le logiciel GraphPad Prism®. L'échantillon non traité servant de contrôle.

III. 4. - Etude de l'effet de la curcumine sur l'expression de différents gènes impliqués dans les multiples voies de signalisation NF- κ B

III. 4. 1. - Etude de l'effet de la curcumine sur l'expression de 84 gènes impliqués dans les différentes voies NF- κ B par PCR en temps réel.

La curcumine, qui a été utilisée comme inhibiteur du facteur de transcription NF- κ B lors de nos expériences (Chapitre III.I.), l'inhibe en inactivant le complexe IKK et en bloquant la phosphorylation de I κ B α et la translocation de p65 (Bharti *et al.*, 2003). Dans la mesure où plusieurs voies de signalisation peuvent activer le facteur de transcription NF- κ B (Beinke and Ley 2004), nous avons voulu étudier si d'autres cibles de la curcumine existent dans les différentes voies NF- κ B.

Ainsi nous avons réalisé des expériences de PCR en temps réel en utilisant des amorces reconnaissant 84 gènes impliqués dans les différentes voies NF- κ B (Figure 52).

Les résultats obtenus montrent que parmi les 84 gènes activés par le TNF α , 39 sont modulés par la curcumine, 29 inhibés et 10 activés (Figures 53 et 54).

Le gène le plus inhibé par la curcumine est le gène CD40, un récepteur au TNF. Ce gène est exprimé avec une valeur de Ct de 25,67 après traitement des cellules au TNF α , mais après co-traitement TNF α plus curcumine, l'ADNc est retrouvé sous forme de traces avec une valeur de Ct de 33.

Les 11 gènes les plus inhibés de la voie NF- κ B par la curcumine sont les gènes CCL2 (-14,07%), CD40 (-141,83%), IKBKE (-44,67%), IL1A (-8,86%), IL1B (-14,07%), IRAK2 (-14,07%), NFKB2 (-8,86%), NFKBIA (-14,07%), RELB (-11,17%), TNF (-14,07) et TNFSF10 (-28,14%) (Figure 54) et les gènes activés par la curcumine sont AGT (7,22%), CASP1 (5,73%), CSF3 (7,22%), FOS (5,73%), IFNG (2,27%), IL10 (28,88%), TICAM2 (3,61%), TLR2 (9,09%), TLR9 (7,22%) et TNFRSF7 (9,09%) (Figure 55).

Position	UniGene	RefSeq	Symbol	Description	Gene Name
A01	Ha.19383	NM_000029	AGT	Angiotensinogen (serpin peptidase inhibitor, clade A, member 8)	ANHU/SERPINA8
A02	Ha.525622	NM_005163	AKT1	V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1	PKB/PRKBA
A03	Ha.435267	NM_005171	ATF1	Activating transcription factor 1	TREB36
A04	Ha.567382	NM_003921	BCL10	B-cell CLL/lymphoma 10	CARMEN/CIPER
A05	Ha.31210	NM_005178	BCL3	B-cell CLL/lymphoma 3	BCL4/D19537
A06	Ha.69771	NM_001710	BF	B-factor, propargin	CFAB/GBG
A07	Ha.503704	NM_001166	BIRC2	Baculoviral IAP repeat-containing 2	API1/HAIP2
A08	Ha.405153	NM_006092	CARD4	Caspase recruitment domain family, member 4	NOD1
A09	Ha.2490	NM_033292	CASP1	Caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase (interleukin 1, beta, convertase)	ICE/IL1BC
A10	Ha.369736	NM_001228	CASP8	Caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase	FLICE/MACH
A11	Ha.303649	NM_002982	CCL2	Chemokine (C-C motif) ligand 2	GD/CF-2/GD/CF-2 HC11
A12	Ha.472860	NM_001250	CD40	CD40 antigen (TNF receptor superfamily member 5)	Bp50/CDW40
B01	Ha.390736	NM_003879	CFLAR	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator	CASH/CASP8AP1
B02	Ha.198998	NM_001278	CHUK	Conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase	IKKBA/IKK-alpha
B03	Ha.1349	NM_000758	CSF2	Colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)	GMCSF
B04	Ha.2233	NM_000759	CSF3	Colony stimulating factor 3 (granulocyte)	G-CSF/GCSF
B05	Ha.515134	NM_020428	SLC44A2	Solute carrier family 44, member 2	CTL2/DKFP2p666A071
B06	Ha.352224	NM_007838	EDARADD	EDAR-associated death domain	EDARADD
B07	Ha.126667	NM_057139	EDG2	Endothelial differentiation, lysophosphatidic acid G-protein-coupled receptor, 2	Gpr26/LPA1
B08	Ha.326035	NM_001964	EGR1	Early growth response 1	AT225/GOS30
B09	Ha.181128	NM_005229	ELK1	ELK1, member of ETS oncogene family	Elk1
B10	Ha.482562	NM_001992	F2R	Coagulation factor II (thrombin) receptor	CF2R/HTR
B11	Ha.86131	NM_003824	FADD	Fas (TNFRSF6)-associated via death domain	GG3/MORT1
B12	Ha.2007	NM_000639	FASLG	Fas ligand (TNF superfamily, member 6)	APT1/LG1/CD178
C01	Ha.25647	NM_005252	FOS	V-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	c-fos
C02	Ha.74471	NM_001651	GJA1	Gap junction protein, alpha 1, 43kDa (connexin 43)	CX43/DFNB38
C03	Ha.517581	NM_002133	HMOX1	Heme oxygenase (decycling) 1	HO-1/hK286B10
C04	Ha.421649	NM_000867	HTR2B	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2B	5-HT(2B)/5-HT2B
C05	Ha.515126	NM_000201	ICAM1	Intercellular adhesion molecule 1 (CD54), human rhinovirus receptor	BB2/CD54
C06	Ha.37026	NM_024013	IFNA1	Interferon, alpha 1, fibroblast	IFL/IFN
C07	Ha.93177	NM_002176	IFNB1	Interferon, beta 1, fibroblast	IFB/IFF
C08	Ha.856	NM_000619	IFNG	Interferon, gamma	IFG/IFI
C09	Ha.413513	NM_001556	IKKBK	Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase beta	IKK-beta/IKK2
C10	Ha.321045	NM_014002	IKBKE	Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase epsilon	IKK-epsilon
C11	Ha.43505	NM_003639	IKBKG	Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase gamma	FIP-3/FIP3
C12	Ha.193717	NM_000572	IL10	Interleukin 10	CSIF/IL-10
D01	Ha.1722	NM_000575	IL1A	Interleukin 1, alpha	IL-1A/IL1
D02	Ha.126256	NM_000576	IL1B	Interleukin 1, beta	IL-1/IL1-BETA
D03	Ha.557403	NM_000877	IL1R1	Interleukin 1 receptor, type I	CD121A/D2S1473
D04	Ha.512234	NM_000600	IL6	Interleukin 6 (interferon, beta 2)	BSF2/HGF
D05	Ha.624	NM_000584	IL8	Interleukin 8	3-10C/AMCF-1
D06	Ha.522819	NM_001569	IRAK1	Interleukin-1 receptor-associated kinase 1	IRAK/pelle
D07	Ha.449207	NM_001570	IRAK2	Interleukin-1 receptor-associated kinase 2	IRAK-2
D08	Ha.525704	NM_002228	JUN	V-jun sarcoma virus 17 oncogene homolog (avian)	API
D09	Ha.36	NM_000595	LTA	Lymphotoxin alpha (TNF superfamily, member 1)	LT1/TNFB
D10	Ha.1116	NM_002342	LTBR	Lymphotoxin beta receptor (TNF superfamily, member 3)	CD18/D125370
D11	Ha.180566	NM_173844	MALT1	Mucosa associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1	DKFZp434L132/MLT
D12	Ha.508461	XM_042066	MAP3K1	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1	MAP3KK1/MEKK
D13	Ha.82116	NM_002468	MYD88	Myeloid differentiation primary response gene (88)	MyD88
D14	Ha.367965	NM_033297	NALP12	NACHT, leucine rich repeat and PYD containing 12	PYPAF7/RNOC2
D15	Ha.431926	NM_003998	NFKB1	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1 (p105)	DKFZp686C01211/EBP-1
D16	Ha.73090	NM_002502	NFKB2	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2 (p49/p100)	LYT-10/LYT10
D17	Ha.81328	NM_002529	NFKBIA	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	IKBA/MAD-3
D18	Ha.130036	NM_177952	PPM1A	Protein phosphatase 1A (formerly 2C), magnesium-dependent, alpha isoform	PP2C-ALPHA/PP2CA
D19	Ha.159130	NM_002880	RAF1	V-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1	CRAF/Raf-1
D20	Ha.370620	NM_002908	REL	V-rel reticulendotheliosis viral oncogene homolog (avian)	C-Ral
D21	Ha.502875	NM_021975	RELA	V-rel reticulendotheliosis viral oncogene homolog A, nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 3, p65 (avian)	NFKB3
D22	Ha.307905	NM_006509	RELB	V-rel reticulendotheliosis viral oncogene homolog B, nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 3 (avian)	I-REL
D23	Ha.436922	NM_005798	RFP2	Rat finger protein 2	CAR/LEU5
D24	Ha.247077	NM_001664	RHOA	Ras homolog gene family, member A	ARH12/ARHA
D25	Ha.519842	NM_003804	RIPK1	Receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase 1	RIP
D26	Ha.187946	NM_005415	SLC20A1	Solute carrier family 20 (phosphate transporter), member 1	GLVR1/Ghr-1
D27	Ha.470943	NM_007315	STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa	DKFZp686B04100/ISGF-3
D28	Ha.505874	NM_013254	TBK1	TANK-binding kinase 1	NAK/T2K
D29	Ha.278391	NM_021649	TICAM2	Toll-like receptor adaptor molecule 2	TICAM-2/TIRAP3
D30	Ha.111805	NM_003263	TLR1	Toll-like receptor 1	DKFZp547D0610/DKFP2p564H0682
D31	Ha.519033	NM_003264	TLR2	Toll-like receptor 2	TL4
D32	Ha.29499	NM_003265	TLR3	Toll-like receptor 3	TLR3
D33	Ha.174312	NM_003266	TLR4	Toll-like receptor 4	TOLL/toll
D34	Ha.366986	NM_006068	TLR6	Toll-like receptor 6	TLR6
D35	Ha.443036	NM_016562	TLR7	Toll-like receptor 7	TLR7
D36	Ha.272410	NM_016610	TLR8	Toll-like receptor 8	MGC119599
D37	Ha.87968	NM_017442	TLR9	Toll-like receptor 9	TLR9
D38	Ha.510745	NM_182547	TMED4	Transmembrane emp24 protein transport domain containing 4	HNLF
D39	Ha.241570	NM_000594	TNF	Tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)	DIF/TNF-alpha
D40	Ha.211600	NM_006290	TNFAIP3	Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	A20/TNFAIP2
D41	Ha.401745	NM_003844	TNFRSF10A	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10a	AP02/DR4
D42	Ha.521456	NM_003842	TNFRSF10B	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b	DR5/KILLER
D43	Ha.279594	NM_001065	TNFRSF1A	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A	CD120a/PPF
D44	Ha.355307	NM_001242	TNFRSF7	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 7	CD27/S152
D45	Ha.478275	NM_003810	TNFSF10	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	AP02L/Apo-2L
D46	Ha.129708	NM_003807	TNFSF14	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 14	HVEM/LIGHT
D47	Ha.460996	NM_003789	TRADD	TNFRSF1A-associated via death domain	Ha.89862
D48	Ha.29344	NM_014261	TICAM1	Toll-like receptor adaptor molecule 1	PRV/TIRB/TICAM-1
D49	Ha.534255	NM_004048	B2M	Beta-2-microglobulin	B2M
D50	Ha.412707	NM_000194	HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (Lesch-Nyhan syndrome)	HGPR1/HPRT
D51	Ha.546556	NM_012423	RPL13A	Ribosomal protein L13a	RPL13A
D52	Ha.544577	NM_002046	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	G3PD/GAPD
D53	Ha.520640	NM_001011	ACTB	Actin, beta	b-Actin
D54	N/A	X66290	HGDC	Human Genomic DNA Contamination	HGDC
D55	N/A	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control	RTC
D56	N/A	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control	RTC
D57	N/A	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control	RTC
D58	N/A	SA_00103	PPC	Positive PCR Control	PPC
D59	N/A	SA_00103	PPC	Positive PCR Control	PPC
D60	N/A	SA_00103	PPC	Positive PCR Control	PPC

Figure 52 : Liste des gènes de la famille NF-κB utilisés pour la PCR en temps réel.

Symbole du gène	TNF α + curcumine / TNF α	Symbole du gène	TNF α + curcumine / TNF α
AGT	7,22	LTA	-2,22
AKT1	-1,76	LTBR	-1,76
ATF1	-1,11	MALT1	-1,76
BCL10	1,14	MAP3K1	-2,22
BCL3	-4,43	MYD88	-2,22
BF	1,81	NALP12	1,14
BIRC2	-3,52	NFKB1	-5,58
CARD4	-2,22	NFKB2	-8,86
CASP1	5,73	NFKBIA	-14,07
CASP8	-1,11	PPM1A	-1,76
CCL2	-14,07	RAF1	-2,22
CD40	-141,83	REL	-1,11
CFLAR	-1,76	RELA	-1,40
CHUK	-1,40	RELB	-11,17
CSF2	-5,58	RFP2	-1,11
CSF3	7,22	RHOA	-1,40
SLC44A2	-1,11	RIPK1	-2,22
EDARADD	-1,76	SLC20A1	-1,40
EDG2	1,43	STAT1	-2,79
EGR1	1,81	TBK1	-1,40
ELK1	-1,76	TICAM2	3,61
F2R	-2,22	TLR1	-1,11
FADD	1,43	TLR2	9,10
FASLG	1,43	TLR3	-1,76
FOS	5,73	TLR4	1,14
GJA1	-2,79	TLR6	-1,11
HMOX1	5,73	TLR7	2,27
HTR2B	-2,22	TLR8	1,43
ICAM1	-7,04	TLR9	7,22
IFNA1	1,14	TMED4	-1,11
IFNB1	1,14	TNF	-14,07
IFNG	2,27	TNFAIP3	-7,04
IKBKB	-1,76	TNFRSF10A	-1,11
IKBKE	-44,67	TNFRSF10B	-1,40
IKBKG	-1,40	TNFRSF1A	-1,76
IL10	28,88	TNFRSF7	9,10
IL1A	-8,86	TNFSF10	-28,14
IL1B	-14,07	TNFSF14	-1,11
IL1R1	1,14	TRADD	-1,76
IL6	-2,22	TICAM1	-3,52
IL8	-5,58	B2M	1,43
IRAK1	-1,40	HPRT1	1,14
IRAK2	-14,07	RPL13A	-1,11
JUN	2,27	GAPDH	1,14
		ACTB	-1,67

Figure 53 : Etude, par PCR en temps réel, de l'effet de la curcumine sur différents gènes des voies NF- κ B, activés par le TNF α , dans les cellules K562.

Le tableau montre les 89 gènes étudiés par PCR en temps réel (84 gènes NF- κ B et 5 gènes contrôles). Les résultats sont représentés en divisant les valeurs de Ct des cellules traitées au TNF α plus curcumine par les valeurs de Ct des cellules traitées au TNF α . Les valeurs colorées en rouge et bleu sont significatives ($p < 0,05$) et indiquent soit une activation par la curcumine (en rouge), soit une inhibition par la curcumine (en bleu).

(A)

Nom du gène	Symbole	Taux d'inhibition (%)	Test de Student probabilité	Ct (TNF α + curcumine)	Ct (TNF α)
GDCF-2/GDCF-2 HC11	CCL2	-14,07	0,0021	29,67	25,67
Bp50/CDW40	CD40	-141,83	0,0001	33	25,67
IKK-i/IKKE	IKBKE	-44,67	0,0029	29,67	24
IL-1A/IL1	IL1A	-8,86	0,0009	28,67	25,33
IL-1/IL1-BETA	IL1B	-14,07	0,0041	30,33	26,33
IRAK-2	IRAK2	-14,07	0,0024	27	23
LYT-10/LYT10	NFKB2	-8,86	0,0247	25,67	22,33
IKBA/MAD-3	NFKBIA	-14,07	0,0024	25	21
I-REL	RELB	-11,17	0,0298	28,67	25
DIF/TNF-alpha	TNF	-14,07	0,0159	30	26
APO2L/Apo-2L	TNFSF10	-28,14	0,026	28,33	23,33

(B)

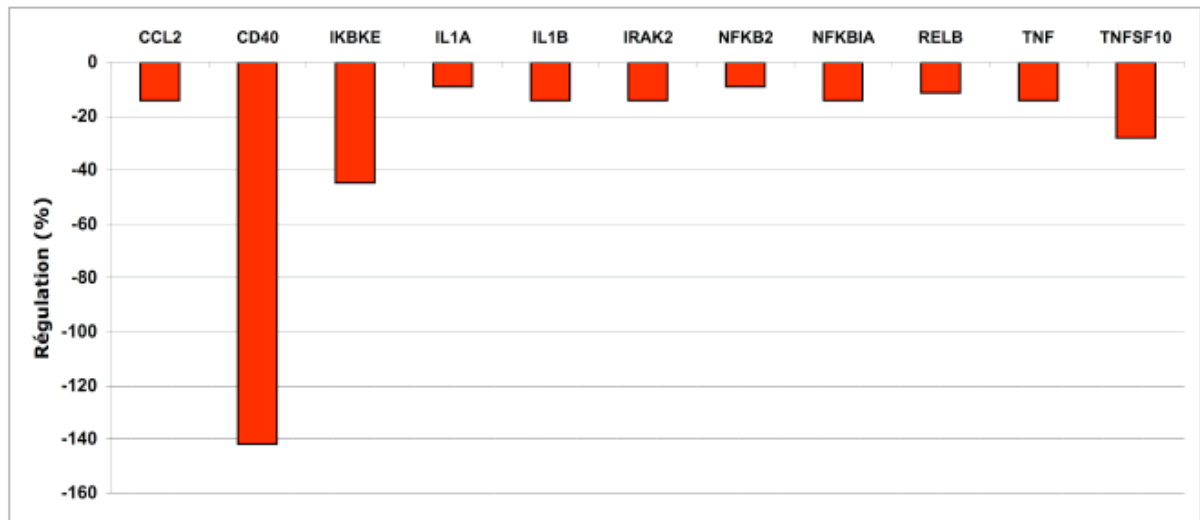


Figure 54 : Illustration du taux d'inhibition de différents gènes des voies NF- κ B par la curcumine.

(A) Le tableau montre le nom et le symbole des 11 gènes des voies NF- κ B, les plus inhibés par la curcumine, ainsi que leur taux d'inhibition (%), leurs valeurs Ct et le test de Student.

(B) Histogramme représentant le taux d'inhibition de 11 gènes des voies NF- κ B par la curcumine.

(A)

<i>nom du gène</i>	<i>symbole</i>	<i>Taux d'activation (%)</i>	<i>Test de Student probabilité</i>	<i>Ct (TNFα + curcumine)</i>	<i>Ct (TNFα)</i>
ANHU/SERPINA8	AGT	7,22	0,0001	15,77	18,62
ICE/IL1BC	CASP1	5,73	0,0163	16,10	18,62
G-CSF/GCSF	CSF3	7,22	0,0160	13,77	16,62
c-fos	FOS	5,73	0,0072	7,43	9,95
IFG/IFI	IFNG	2,27	0,0025	17,77	18,95
CSIF/IL-10	IL10	28,88	0,0012	13,10	17,95
TICAM-2/TIRAP3	TICAM2	3,61	0,0133	7,43	9,29
TIL4	TLR2	9,09	0,0038	13,10	16,29
TLR9	TLR9	7,22	0,0001	12,77	15,62
CD27/S152	TNFRSF7	9,09	0,0001	15,77	18,95

(B)

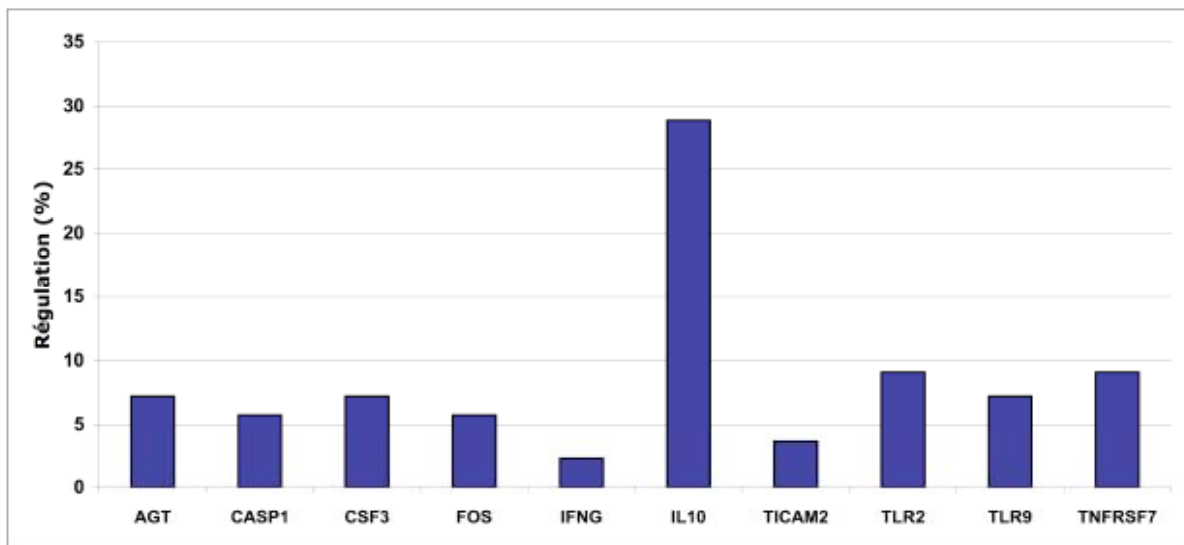


Figure 55 : Illustration du taux d'activation de différents gènes des voies NF- κ B par la curcumine.

(A) Le tableau résume les 10 gènes des voies NF- κ B activés par la curcumine, ainsi que leur taux d'activation, leurs valeurs Ct et le test de Student. (B) Histogramme représentant le taux d'activation de 10 gènes des voies NF- κ B par la curcumine.

III. 4. 2. - Etude de l'effet du TNF α et de la curcumine sur l'expression des protéines CD40, p50, RelB, I κ B α et IL-10 par WB.

Afin de confirmer les résultats de PCR obtenus pour les gènes CD40, p50 (ou NF κ B1), RelB, I κ B α (ou NF κ BIA) et IL-10 au niveau protéique, nous avons réalisé des WB avec les AC ciblant les protéines CD40, p50, RelB, I κ B α et IL-10 (Figure 56). Les résultats obtenus montrent que la protéine CD40 est induite avec un traitement au TNF α (20 ng/ml, 6h), comparé au contrôle non traité, et que cette induction disparaît lorsque la curcumine est ajoutée au TNF α . La curcumine seule n'a pas d'effet. Le traitement au TNF α induit également les protéines p50 et RelB et cette induction disparaît de nouveau lorsque la curcumine est ajoutée au TNF α . La curcumine seule n'a pas d'effet sur la protéine RelB alors qu'elle diminue légèrement la protéine p50. La protéine I κ B α est également légèrement diminuée avec la curcumine seule et disparaît complètement avec le traitement TNF α plus curcumine. Le TNF α seul n'a pas d'effet. L'IL-10, par contre, est induite avec le traitement TNF α plus curcumine mais ne change pas avec le TNF α seul et la curcumine seule.

En conclusion, les résultats obtenus par WB confirment les résultats obtenus par PCR en temps réel pour ces gènes.

III. 4. 3. - Etude de l'effet du TNF α et de la curcumine sur la sécrétion de l'IL-8 par les cellules K562.

Un autre gène inhibé par la curcumine est le gène codant pour l'IL-8. Afin de confirmer cet effet inhibiteur sur la protéine IL-8, nous avons mesuré la sécrétion de l'IL-8 par les cellules K562 traitées ou non au TNF α seul, à la curcumine seule et traitées au TNF α plus curcumine (Figure 57). Le résultat obtenu montre une induction de la sécrétion d'IL-8 après traitement au TNF α , pas de variation avec la curcumine seule mais une disparition de l'induction obtenue avec le TNF α lorsque la curcumine est ajoutée au préalable. Ce résultat confirme le résultat obtenu par PCR en temps réel.

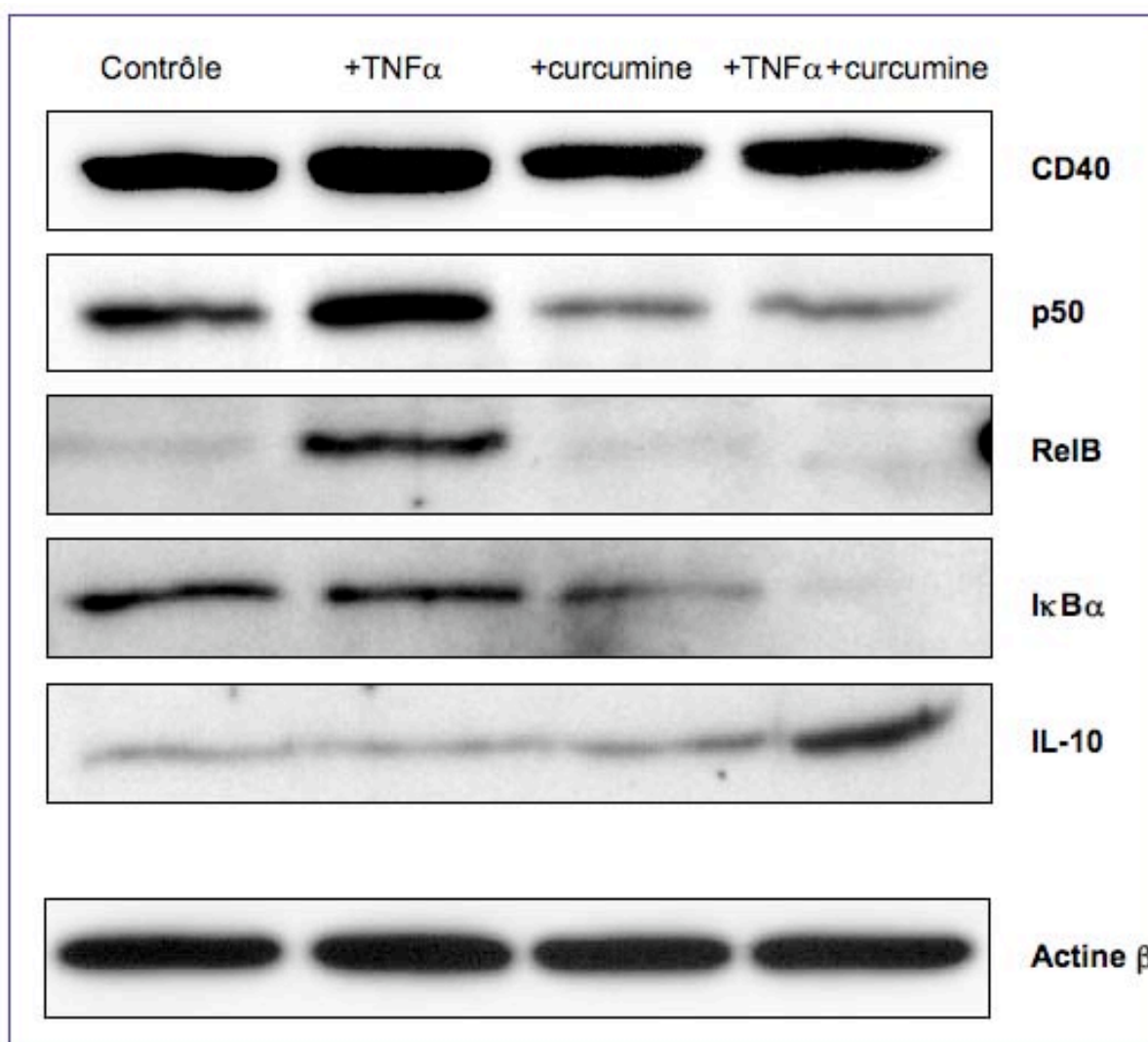


Figure 56 : Etude de l'effet du TNF α et de la curcumine sur les protéines CD40, p50, RelB, I κ B α , cFos et IL-10.

Les protéines totales des cellules K562 traitées au TNF α (20 ng/ml, 6h) (+ TNF α), à la curcumine (20 μ M, 2h) (+ curcumine), au TNF α plus curcumine (8h) (+TNF α +curcumine) ou non traitées (contrôle) ont été extraites et analysées par WB en utilisant les AC CD40, p50, RelB, I κ B α , cFos, IL-10 et l'AC anti- β -actine comme contrôle interne. L'échantillon non traité servant de contrôle.

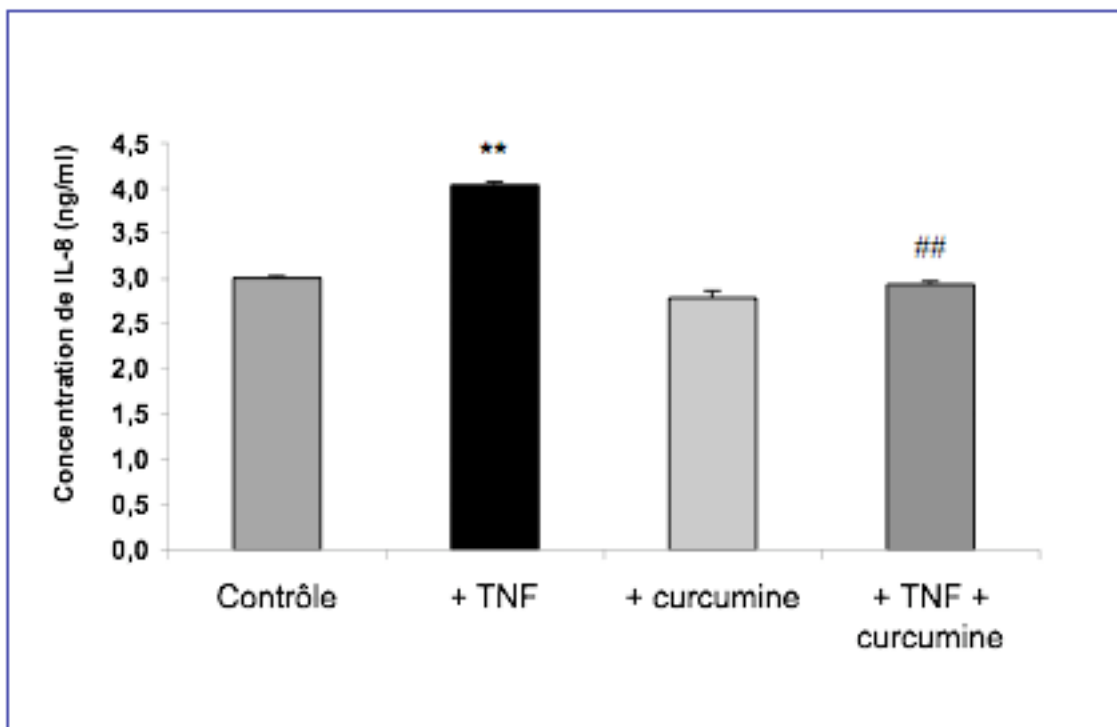


Figure 57 : Etude de l'effet du $\text{TNF}\alpha$ et de la curcumine sur la sécrétion de l'IL-8 par les cellules K562.

La concentration de l'IL-8 sécrétée par les cellules K562, traitées au $\text{TNF}\alpha$ (20 ng/ml, 6h) (+ $\text{TNF}\alpha$), à la curcumine (20 μM , 2h) (+ curcumine), au $\text{TNF}\alpha$ plus curcumine (8h) (+ $\text{TNF}\alpha$ +curcumine) ou non traitées (contrôle) a été mesurée par un test ELISA. L'échantillon non traité servant de contrôle. ** indique $p < 0,01$ comparé au contrôle et ## indique $p < 0,01$ comparé par rapport à l'échantillon traité au $\text{TNF}\alpha$.

IV. - Discussion

IV. 1. - Le $\text{TNF}\alpha$ induit l'expression de la γ -glutamyltransférase via $\text{NF-}\kappa\text{B}$ en coopération avec Sp1

De nombreux gènes inductibles par le stress oxydant ou par certains médicaments anticancéreux sont régulés par les facteurs de transcription $\text{NF-}\kappa\text{B}$.

Afin de déterminer si la GGT, une enzyme impliquée dans la résistance des cellules aux médicaments anticancéreux, est également régulée par $\text{NF-}\kappa\text{B}$, nous avons étudié sa régulation par deux agents connus pour activer le facteur de transcription $\text{NF-}\kappa\text{B}$, le TPA et le $\text{TNF}\alpha$.

L'expression du gène codant pour la GGT humaine est contrôlée par plusieurs promoteurs (Daubeuf *et al.*, 2001 ; Visvikis *et al.*, 2001). De ce fait, plusieurs ARNm sont issus du même gène. Ces ARNm diffèrent dans leur partie 5'NT, mais contiennent tous le même cadre de lecture et sont désignés comme ARNm de type A, B et C.

Pour notre travail, nous avons choisi d'étudier plus en détail la régulation du promoteur C de la GGT, puisque la régulation de ce promoteur est encore en partie inconnue et l'analyse informatique de sa séquence a révélé la présence de 2 sites de fixation pour le facteur $\text{NF-}\kappa\text{B}$. En effet, le traitement au $\text{TNF}\alpha$, conduit à une augmentation de l'activité promotrice ainsi qu'à une augmentation de l'expression de l'ARNm de type C. Le même résultat a été obtenu pour le promoteur B et les ARNm de type A et B. Le TPA n'a pas d'effet sur les deux promoteurs.

Ces premiers résultats montrent donc que l'expression de la GGT est induite par cette cytokine $\text{TNF}\alpha$ dans les cellules K562.

Daubeuf *et al.*, ont confirmé l'augmentation des ARNm de type A par le $\text{TNF}\alpha$ dans les cellules HepG2 (Daubeuf *et al.*, 2001) et Bouman *et al.*, ont détecté une augmentation de l'expression de l'ARNm de type A par d'autres cytokines, l' $\text{IFN-}\alpha$ et l' $\text{IFN-}\beta$ (Bouman *et al.*, 2002). L'expression des ARNm de type B et C n'est augmentée qu'avec le traitement à l' $\text{IFN-}\beta$.

La curcumine, un composé naturel connu pour ses propriétés anti-inflammatoires (Menon and Sudheer 2007), a pu empêcher l'induction par le $\text{TNF}\alpha$ au niveau du promoteur ainsi qu'au niveau de l'expression des trois ARNm de la GGT dans les cellules K562.

Etant donné que la curcumine est connue comme étant un inhibiteur du facteur de transcription NF- κ B (Aggarwal *et al.*, 2006 ; Singh and Aggarwal 1995), nous avons alors émis une première hypothèse selon laquelle la voie de signalisation NF- κ B est impliquée dans la régulation de la GGT par le $\text{TNF}\alpha$.

Afin de prouver cette hypothèse, nous avons réalisé des expériences avec des siRNA dirigés contre les sous-unités les plus représentées de NF- κ B, la sous-unité p50 et la sous-unité p65 et les résultats obtenus montrent qu'effectivement les facteurs de transcription NF- κ B sont directement ou indirectement responsables de l'induction de la GGT après traitement des cellules K562 au $\text{TNF}\alpha$.

D'autres équipes ont confirmé l'implication de NF- κ B dans la régulation de l'expression d'autres protéines du métabolisme du GSH. En effet, Morales *et al.* ont démontré que l'induction de l'expression de l'ARNm γ GCS par le $\text{TNF}\alpha$ est également médiée par le facteur de transcription NF- κ B (Morales *et al.*, 1997) et Duvoix *et al.*, ainsi que d'autres équipes confirment l'importance de ce facteur de transcription dans la régulation de l'expression de la GSTP1-1, une autre protéine impliquée dans le cycle du GSH (Duvoix *et al.*, 2003 ; Morceau *et al.*, 2004).

Yang *et al.*, quant à eux, ont montré l'implication directe de NF- κ B dans la régulation du promoteur de la sous-unité catalytique de la γ GCL (GCLC), alors que le promoteur de la sous-unité « modifiée » de la γ GCL (GCLM), ainsi que le promoteur de la GS sont indirectement régulés *via* NF- κ B (Yang *et al.*, 2005). Il est donc fortement probable que les enzymes du métabolisme du GSH soient régulées en partie par les mêmes mécanismes.

Les protéines impliquées dans la régulation de la GGT en amont des facteurs de transcription NF- κ B ont été déterminées en surexprimant des protéines de la voie de signalisation NF- κ B canonique dans les cellules K562. Les résultats ont montré que les protéines TRAF2, TRADD ainsi que la protéine p65, ont stimulé l'activité du promoteur C, alors que l'inhibiteur de NF- κ B, l' $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$, l'a diminuée. La voie canonique est activée par les cytokines pro-inflammatoires, ainsi qu'en réponse à des infections microbiennes ou virales (Ghosh and Karin 2002). TRADD est une protéine adaptatrice qui interagit avec le récepteur au $\text{TNF}\alpha$, le TNFR-1 (Hsu *et al.*, 1995), ainsi qu'avec une autre protéine adaptatrice, TRAF2 (Hsu *et al.*, 1996b).

Lorsque la voie NF- κ B est activée, le complexe IKK, composé des deux sous-unités catalytiques (IKK α et IKK β) (Roff *et al.*, 1996 ; Sakurai *et al.*, 2003) ainsi que de la protéine d'échafaudage IKK γ ou NEMO (Yamaoka *et al.*, 1998), est recruté par les protéines adaptatrices pour phosphoryler l'I κ B α . L'I κ B α phosphorylé va alors être dégradé par le protéasome et par conséquent les facteurs de transcription NF- κ B sont libérés et peuvent activer des gènes.

La forme dominante négative utilisée pour nos expériences ne peut être phosphorylée et donc pas dégradée, ce qui explique l'effet négatif de ce plasmide sur l'activité promotrice de la GGT.

L'implication de la voie NF- κ B canonique a également été démontrée dans la régulation de l'expression de la GSTP1-1 (Morceau *et al.*, 2004).

Puisque la voie NF- κ B est donc impliquée dans la régulation du promoteur C de la GGT dans les cellules K562, nous avons ensuite voulu déterminer la séquence sur l'ADN qui lie les facteurs de transcription activés par cette voie. Les 2 sites NF- κ B putatifs, détectés par MatInspector dans la séquence du promoteur C de la GGT, ne sont cependant malheureusement pas fonctionnels dans les cellules K562. Afin de déterminer quelle séquence est alors responsable de l'induction du promoteur C de la GGT par la voie NF- κ B, nous avons muté systématiquement le promoteur C par séquence de 10 pb.

Finalement des expériences par gel retard ont confirmé la liaison de la protéine p50 NF- κ B sur une séquence située de -111 à -123 pb par rapport au site d'initiation, qui est responsable de l'activité de base ainsi que de l'induction du promoteur C de la GGT par le TNF α .

La nature de la deuxième protéine, également capable de se lier sur cette séquence, est encore inconnue. Il pourrait s'agir d'un membre de la famille des facteurs de transcription ETS puisqu'une analyse par MatInspector de cette séquence a également mis en évidence un motif correspondant à un facteur de transcription ETS. De plus, la co-transfection avec des membres de cette famille a démontré un rôle de ces facteurs dans la régulation de la GGT par le TNF α dans les cellules K562.

Il reste cependant à déterminer si la protéine PEA, qui a le meilleur effet des trois protéines ETS testées, est effectivement capable de se lier à cette séquence. Dans ce cas, une compétition pour cette séquence est probable : la protéine NF- κ B jouant un rôle d'inducteur du promoteur C de la GGT et la protéine ETS exerçant plutôt un rôle de répresseur.

Un autre facteur de transcription jouant un rôle dans l'activité promotrice de la GGT dans les cellules K562 est la protéine Sp1. La mutagenèse systématique du promoteur C de la GGT a détecté des séquences dans le promoteur C de la GGT, qui ne présentent plus d'activité transcriptionnelle, lorsqu'elles sont mutées. Ces séquences correspondent à des sites Sp1. Un site de liaison Sp1 a également été démontré dans le promoteur 2 de la GGT de rats (Mikkelsen *et al.*, 2002a).

Une analyse *in vivo* confirme que les deux facteurs de transcription p50 NF- κ B et Sp1 sont responsables de l'activité de base du promoteur C de la GGT. Le facteur de transcription Sp1 a pourtant besoin de la protéine p50 NF- κ B pour recruter l'ARN polymérase II et ainsi stimuler la transcription du promoteur C de la GGT.

Une coopération entre NF- κ B et Sp1 pour l'assemblage d'un complexe de transactivation fonctionnel est bien connue (Ainbinder *et al.*, 2002 ; Granero *et al.*, 2005 ; Ueda *et al.*, 1994 ; Wang, T. *et al.*, 2001 ; Yao *et al.*, 2007 ; Zhu *et al.*, 2007).

Alors que les résultats obtenus avec les siRNA contre la protéine p65 NF- κ B supposent une implication de cette protéine dans l'induction de la GGT par le TNF α , l'analyse *in vivo* de l'activité promotrice de la GGT ne peut pas confirmer une telle implication au niveau ADN. La protéine p65 semble être impliquée dans l'activité de base du promoteur C de la GGT mais ne joue pas de rôle après traitement au TNF α . Nous supposons donc que la protéine p65 NF- κ B joue plutôt un rôle indirect dans la stimulation de la GGT par le TNF α dans les cellules K562. En fait, il est connu que le dimère p50/p65 régule l'expression de la protéine p50 elle-même, de la protéine I κ B α , ainsi que de la protéine TRAF2 (Haskill *et al.*, 1991 ; Ten *et al.*, 1992 ; Wang, C. Y. *et al.*, 1998), trois protéines connues pour jouer un rôle dans la régulation de la GGT. L'inhibition de la protéine p65 par siRNA pourrait donc diminuer l'expression de ces trois protéines et ainsi réduire l'activité transcriptionnelle du promoteur C de la GGT.

Vu que le mécanisme moléculaire responsable de l'induction de la GGT par le TNF α a uniquement été démontré dans les cellules leucémiques myéloïdes chroniques K562, nous avons voulu déterminer si ce mécanisme peut également être envisageable dans d'autres lignées cancéreuses. Les résultats des WB, effectués avec 12 lignées cellulaires différentes, montrent cependant que seule la lignée Meg01 répond de la même façon au TNF α que les cellules K562. Cette lignée a également été établie à partir d'une leucémie myéloïde

chronique. Cet effet inducteur du TNF α sur la GGT est donc probablement spécifique de la leucémie myéloïde chronique.

IV. 2. - Le TNF α induit l'activité enzymatique de la γ -glutamyl-transférase et la dirige dans des domaines constitués d'actine dans les cellules K562

Vu que la GGT est une enzyme dont le rôle est de catalyser le transfert des groupements γ -glutamyl d'un donneur vers un accepteur, nous avons ensuite vérifié si le TNF α induit également l'activité enzymatique de la GGT. La GGT, fortement glycosylée (Meister *et al.*, 1981), est composée de deux sous-unités issues d'un précurseur qui est clivé protéolytiquement dans le réticulum endoplasmique. A cause de cette maturation complexe de la GGT, nous avons choisi des traitements au TNF α plus longs. Effectivement, nous n'observons une induction significative de l'activité enzymatique de la GGT qu'à partir de 3 jours. Ces résultats sont confirmés par les résultats de Ruedig *et al.*, qui observent également une induction de l'activité GGT après 3 jours de traitement au TNF α . (Ruedig and Dringen 2004). D'autres cytokines, l'IFN- α et l'IFN- β (Bouman *et al.*, 2002) ainsi que l'IL-1 β (Meroni *et al.*, 2000) augmentent également l'activité enzymatique de la GGT après 3 jours. Les auteurs suggèrent que l'induction de l'activité enzymatique de la GGT par l'IL-1 β soit partiellement médiée par NF- κ B.

L'induction de l'expression et de l'activité de la GGT par le TNF α peut avoir plusieurs significations biologiques importantes. Le TNF α peut induire l'expression de la GGT pour se défendre contre un stress oxydant (Liu *et al.*, 1996b), ou peut induire la synthèse des leukotriènes et donc médier l'inflammation. De plus, la stimulation de la GGT par le TNF α pourrait prolonger l'activation de NF- κ B dans les cellules, puisque la GGT elle-même est capable de promouvoir l'activation de NF- κ B ainsi que sa translocation nucléaire (Dominici *et al.*, 2003).

Par ailleurs, Karp *et al.*, ont montré que le clivage du GSH par la GGT et par conséquent la réutilisation par la cellule de la Cys libérée permettent à celle-ci de maintenir des niveaux faibles d'ERO intracellulaires et donc d'empêcher l'apoptose des cellules Ramos B induites

par le stress oxydant (Karp *et al.*, 2001). En plus, Carlisle *et al.* ajoutent que la GGT peut moduler l'apoptose en altérant l'activité de NF- κ B (Carlisle *et al.*, 2003).

Il est donc possible que l'induction de l'expression de la GGT fasse partie des multiples mécanismes conduisant à la survie cellulaire.

Par contre, l'induction de la GGT peut également jouer le rôle opposé comme signal de survie, puisque les niveaux faibles d'H₂O₂ résultant de l'activité de la GGT peuvent maintenir la prolifération cellulaire et protéger les cellules contre l'apoptose, probablement à travers une induction de l'activité de la PARP (del Bello *et al.*, 1999). Des études supplémentaires sont donc nécessaires pour clarifier ces résultats contrastés.

Une deuxième raison pour le long délai entre l'induction de la synthèse et l'induction de l'activité enzymatique de la GGT, pourrait être lié au fait que le traitement au TNF α induit un stress au réticulum endoplasmique dans les cellules K562. Ce stress pourrait ralentir la maturation de la GGT et donc son transfert vers la membrane plasmique.

Une analyse par microscopie de la GGT a révélé qu'à partir de 3 jours de traitement au TNF α , le TNF α dirige la GGT à des endroits particuliers de la cellule. Ces endroits sont des domaines constitués d'actine et sont naturellement présents dans les cellules K562. Cette induction de la GGT dans ces domaines est liée à l'induction de l'activité enzymatique de la GGT, puisque les deux résultats sont obtenus après les mêmes temps de traitement, ce qui peut donc avoir une signification physiologique. Il est probable que la GGT se localise dans ce domaine pour exercer son activité. Afin de confirmer cette hypothèse, des expériences supplémentaires sont évidemment nécessaires.

Une observation similaire a notamment été publiée pour la protéine TRADD. La protéine TRADD est recrutée dans des domaines semblables au niveau de la membrane plasmique après traitement des cellules au TNF α . Ces domaines contiennent également une autre protéine, le récepteur TNFR-1 (Jones *et al.*, 1999). En effet, la protéine TNFR-1 est localisée dans des radeaux lipidiques (ou "lipid raft" en anglais) à la surface cellulaire (Cottin *et al.*, 2002) (nos résultats, figure 23). On peut donc envisager que ces radeaux lipidiques contiennent également la GGT. Des expériences de co-localisation sont évidemment nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

IV. 3. - Etude préliminaire d'une boucle physiologique $\text{TNF}\alpha \rightarrow \gamma$ -glutamyltransférase $\rightarrow$ TNFR-1 dans les cellules K562

La GGT peut produire des ERO, en particulier le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), en présence de fer et d'oxygène lors du catabolisme du glutathion. Dominici *et al.* suggèrent que les changements redox issus de cet effet prooxydant de la GGT peuvent affecter la structure d'un récepteur avec d'éventuelles conséquences sur sa conformation et sa fonctionnalité. D'autres équipes ajoutent que les altérations redox peuvent diminuer l'expression du TNFR-1 au niveau de la membrane plasmique et induire le relargage des récepteurs dans le milieu (Hino *et al.*, 1999 ; Zhang, Z. *et al.*, 2001).

Afin de déterminer si une production d'ERO peut également être observée dans les cellules K562, traitées ou non au $\text{TNF}\alpha$, nous avons mesuré la production d' H_2O_2 dans les cellules K562 pendant 3 et 6 jours. Après 3 jours de traitement, nous ne pouvons pas observer une production d' H_2O_2 , ce qui est probablement lié à la faible activité de la GGT, mais après 6 jours une légère production d' H_2O_2 ainsi qu'une légère oxydation des thiols des protéines de surface ont pu être observées. Des expériences supplémentaires sont cependant nécessaires pour confirmer ces résultats.

Les études sur la capacité de liaison du récepteur TNFR-1 et de son ligand ont montré qu'après 3 jours de traitement au $\text{TNF}\alpha$, la capacité de liaison diminue, alors qu'après 6 jours de traitement, la capacité de liaison ainsi que l'affinité du récepteur pour son ligand augmentent. La GGT n'est pourtant pas impliquée dans ce processus.

Une analyse du nombre de récepteurs TNFR-1 après 6 jours a montré que l'augmentation de la capacité de liaison pouvait être due à une augmentation du nombre de récepteurs TNFR-1. Ces résultats supposent donc que le $\text{TNF}\alpha$ régule lui-même le nombre de ses récepteurs. Cette hypothèse a été confirmée dans les kératinocytes humains (Trefzer *et al.*, 1993).

La régulation d'un récepteur par son ligand a également été observée pour d'autres cytokines, comme l'IL-6 (Bauer *et al.*, 1989) (Zohnhofer *et al.*, 1992).

De plus, les résultats laissent supposer que cette régulation varie avec le temps de traitement, puisqu'une diminution de la capacité de liaison a été observée après 3 jours alors qu'après 6 jours une augmentation a été observée. Nous pouvons donc parler d'une modulation biphasique du TNFR-1 par le $\text{TNF}\alpha$ dans les cellules K562.

En effet, cette modulation biphasique a été observée par d'autres équipes (Trefzer *et al.*, 1993). Le TNF α réduit d'abord l'expression du récepteur TNFR-1, puis l'augmente. Trefzer *et al.* ajoutent que cette modulation biphasique peut également être observée au niveau de l'ARNm du récepteur TNFR-1. Les auteurs supposent que la diminution de l'expression du TNFR-1 peut être due soit à un relargage des récepteurs dans le milieu soit à une internalisation des récepteurs TNFR-1 dans le cytoplasme (Porteu and Nathan 1990 ; Trefzer *et al.*, 1993). Ils ajoutent que l'augmentation est plutôt due à une synthèse *de novo* qu'à un recyclage des récepteurs.

Ces résultats préliminaires ainsi que les résultats obtenus avec le TNF α et la GGT permettent de proposer une boucle physiologique impliquant le TNF α , la GGT et le récepteur TNFR-1 (Figure 58). Le TNF α stimule la synthèse des ARNm, des protéines et de l'activité de la GGT et les ERO produits au cours du catabolisme du glutathion par la GGT altèrent l'affinité du récepteur TNFR-1 pour le TNF α , fermant ainsi la boucle physiologique. Des expériences supplémentaires sont évidemment nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

IV. 4. - Détermination de nouvelles cibles de la curcumine dans les voies NF- κ B.

Dans une autre partie de cette thèse, nous avons étudié l'effet de la curcumine sur 84 gènes impliqués dans les voies de signalisation NF- κ B dans les cellules K562. Parmi les 84 gènes étudiés, 10 sont induits et 29 sont réduits par le pré-traitement à la curcumine.

Les résultats des PCR en temps réel et les résultats des WB montrent que la cytokine anti-inflammatoire IL-10 est fortement induite par la curcumine. Ceci est cohérent avec le rôle anti-inflammatoire joué par la curcumine et a également été confirmé par Fahey *et al.* (Fahey *et al.*, 2007). D'autre part, nos résultats montrent que les récepteurs Toll-like (TLR) 2 (TLR2) et 9 (TLR9) sont induits par le pré-traitement à la curcumine. Les TLR sont une classe de récepteurs qui activent les réponses immunitaires cellulaires suivant l'activation par des ligands d'origine microbienne. Ces résultats sont en contraste avec d'autres études, dans lesquelles la curcumine inhibe l'expression de l'ARNm du TLR2 induite par le LPS (Matsuguchi *et al.*, 2000). Des études supplémentaires sont donc nécessaires pour clarifier ces résultats contrastés.

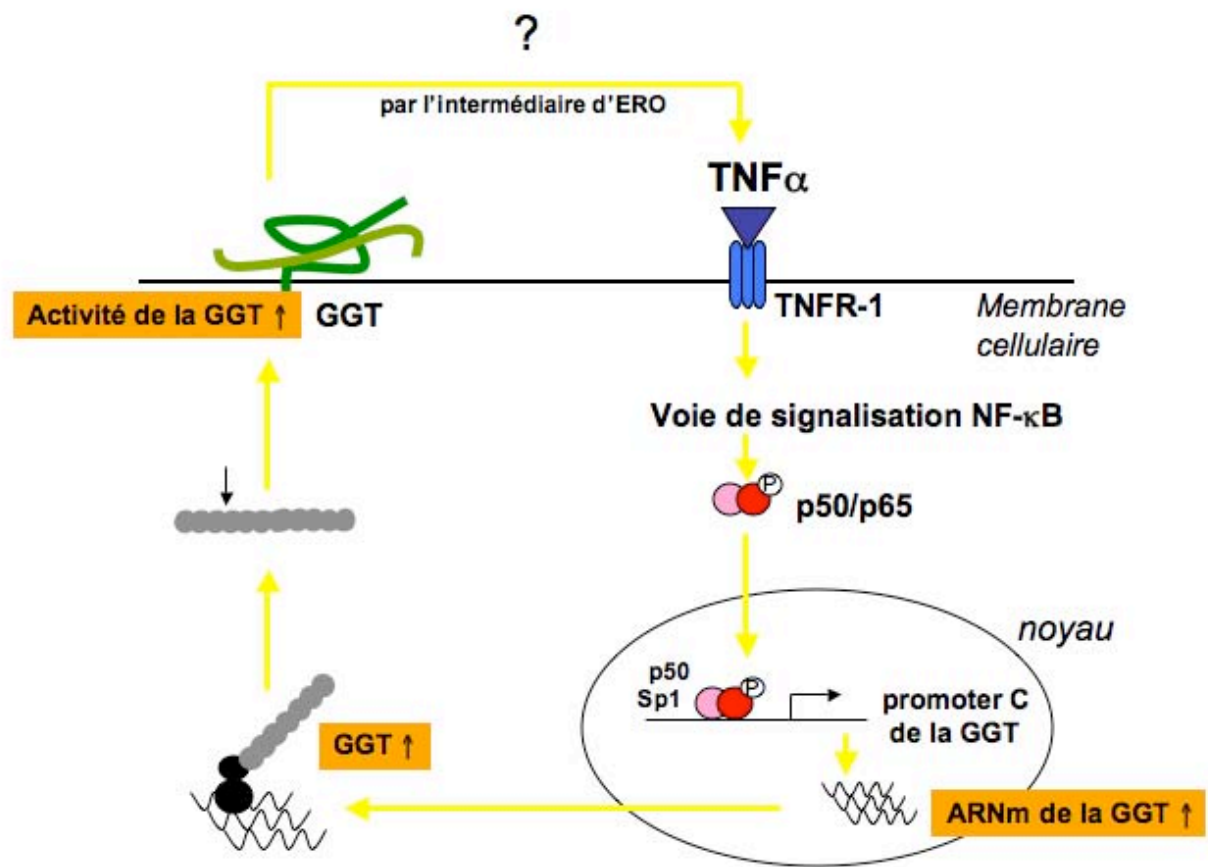


Figure 58 : Schéma montrant la boucle physiologique « TNFα → GGT → TNFR-1 ».

Lorsque les cellules K562 sont traitées au TNFα, celui-ci se lie sur son récepteur TNFR-1 et déclenche la voie de signalisation NF-κB. Les facteurs de transcription NF-κB et Sp1 ainsi que l'ARN polymérase II se fixent sur le promoteur C de la GGT et induisent une augmentation du nombre d'ARNm de la GGT ainsi qu'une augmentation du nombre de protéines. La GGT est ensuite clivée, glycosylée et transportée vers la membrane cellulaire où elle joue son rôle de métaboliseur du GSH avec une activité accrue due au TNFα.

L'hydrolyse du glutathion par la GGT, stimulée par le TNFα, libère des espèces réactives de l'oxygène (ERO), capables d'oxyder certaines protéines de surface dont le récepteur TNFR-1. L'oxydation du TNFR-1 augmente son affinité pour son ligand, le TNFα, ce qui ferme la boucle physiologique impliquant le TNFα et la GGT.

Un autre gène induit par le pré-traitement à la curcumine est la caspase 1 (CASP1). La caspase 1 est une enzyme qui clive d'autres protéines, comme le précurseur des cytokines inflammatoires IL-1 β et IL-18 en des peptides actifs matures (Thornberry *et al.*, 1992). Elle induit également l'apoptose. L'induction de la caspase 1 avec la curcumine est cohérente avec le rôle pro-apoptotique joué par la curcumine. Nos résultats de l'induction de l'IFN γ (IFNG) par la curcumine ont également été confirmés par d'autres études (Gertsch *et al.*, 2003). C'est cependant la première fois qu'une stimulation des gènes AGT, CSF3, TICAM2 et TNFRSF7 a été observée avec la curcumine.

D'autre part, le pré-traitement à la curcumine réduit l'expression de 29 gènes NF- κ B.

En effet, nos résultats montrent que la curcumine inhibe l'expression du gène de la « chemokine ligand 2 » (CCL2), qui est également connu sous le nom de « monocyte chemoattractant protein-1 » (MCP-1). Cette inhibition a été confirmée par Watanabe *et al.*, qui ont montré que la curcumine inhibe l'expression de la protéine MCP-1 induite par le LPS dans les fibroblastes gingivales humaines (Watanabe *et al.*, 1996).

Le gène le plus inhibé par la curcumine est le gène CD40, un membre de la superfamille des récepteurs au TNF. Cette inhibition a été confirmée par WB. C'est la première fois qu'une modulation de CD40 a été observée avec un pré-traitement à la curcumine.

En outre, nous avons constaté que la cytokine CSF2, qui est également connue sous le nom de « granulocyte macrophage colony stimulating factor » (GM-CSF), est inhibée par un pré-traitement à la curcumine. Cela a également été observé par Gertsch *et al.*, qui ont constaté que la curcumine diminue l'expression des ARNm de GM-CSF induits par le TPA (Gertsch *et al.*, 2003).

Nos résultats de l'inhibition de la molécule d'adhésion intercellulaire 1 (ICAM1) et de la diminution de l'ARNm de l'IL-8, ainsi que la diminution de la sécrétion de l'IL-8 par les cellules K562 ont également été confirmés par d'autres équipes. Jobin *et al.* ont montré que le traitement à la curcumine réprime l'expression des gènes ICAM-1 et IL-8 médiée par l'IL-1 β dans les cellules CEI-6, HT-29 et Caco-2 (Jobin *et al.*, 1999). Ils ajoutent que ces effets sont le résultat de la suppression de l'activation de NF- κ B.

Précédemment, notre laboratoire a publié que la curcumine peut empêcher la transcription des protéines STAT1 (signal transducer and activator of transcription) et STAT2 induite par l'IFN- β et l'IFN- γ , ainsi que la phosphorylation de STAT1 et STAT3 dans les cellules K562

(Blasius *et al.*, 2006). Dans cette thèse, nous montrons que la curcumine réduit l'expression de STAT1 dans cette même lignée cellulaire.

Il est bien connu que la curcumine peut inhiber l'expression du gène p50 (NFKB1) induite par le TNF α (Singh and Aggarwal 1995), ainsi que l'expression des gènes TNF α et IL-1 induite par le LPS (Lantz *et al.*, 2005 ; Lee, J. J. *et al.*, 2003), mais c'est la première fois qu'une modulation de l'expression des ARNm de CARD4, F2R, MALT1, PPM1A et TNFAIP3, ainsi que de RelB au niveau ARN et protéine a été observée.

De façon intéressante, quelques-uns des ARNm induits avec le pré-traitement à la curcumine (AGT (Brasier *et al.*, 1990), CSF3 (Nishizawa and Nagata 1990), FOS (Li *et al.*, 2004), IFNG (Sica *et al.*, 1992), IL10 (Cao *et al.*, 2006), TLR2 (Wang, T. *et al.*, 2001) et TLR9 (Takeshita *et al.*, 2004)) ou diminués avec le pré-traitement à la curcumine (CCL2 (Ueda *et al.*, 1994), CD40 (Hinz *et al.*, 2001), CSF2 (Schreck and Baeuerle 1990), IL1A (Mori and Prager 1996), IL1B (Hiscott *et al.*, 1993), IL6 (Liebermann and Baltimore 1990), IL8 (Kunsch and Rosen 1993), NFKB1 (Ten *et al.*, 1992), NFKB2 (Lombardi *et al.*, 1995), NFKBIA (Haskill *et al.*, 1991), RELB (Bren *et al.*, 2001), TNF (Shakhov *et al.*, 1990), TNFAIP3 (Krikos *et al.*, 1992), TNFSF10 (Baetu *et al.*, 2001) et TICAM1 (Hardy *et al.*, 2004)) sont régulés par NF- κ B lui-même.

Cela suggère que la plupart des gènes impliqués dans les différentes voies de signalisation NF- κ B sont régulés par les facteurs de transcription NF- κ B.

Dans l'ensemble, nos résultats mettent en évidence de nouvelles cibles de la curcumine dans les différentes voies de signalisation NF- κ B, ce qui peut être utile pour mieux comprendre le rôle joué par ce composé naturel dans diverses maladies.

V. - Conclusion et Perspectives

V. 1. - Conclusion

L'ensemble de nos études effectuées sur la GGT dans les cellules K562, nous permet de proposer un modèle de régulation de la GGT (Figure 59). Le TNF α se lie sur son récepteur TNFR-1 et déclenche la voie de signalisation NF- κ B. Les facteurs de transcription p50 NF- κ B et Sp1, ainsi que l'ARN polymérase II, se fixent sur le promoteur C de la GGT et induisent une augmentation du nombre d'ARNm de la GGT ainsi qu'une augmentation du nombre de protéines. La GGT est ensuite clivée, glycosylée et transportée vers la membrane cellulaire où elle joue son rôle de métaboliseur du GSH avec une activité accrue grâce au TNF α .

D'une manière intéressante, nos expériences visant à inhiber cette voie de régulation confortent notre modèle. En effet, l'inhibition de la fixation du TNF α à son récepteur par l'utilisation d'un AC anti-TNF α , l'inhibition du complexe IKK par la curcumine et la diminution de l'expression des protéines p50 et p65 par des siRNA spécifiques conduisent à une inhibition de l'induction du promoteur C par le TNF α .

V. 2. - Perspectives

Bien que l'observation de la GGT par microscopie indique une concentration de la GGT dans des microdomaines ou des radeaux lipidiques (« lipid rafts ») après traitement des cellules K562 au TNF α , des expériences supplémentaires sont nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

- Premièrement, il est important de confirmer que la concentration de la GGT à des endroits particuliers de la cellule après traitement au TNF α se situe bien au niveau de la surface cellulaire.
- Deuxièmement, il faudrait vérifier si la GGT se localise dans des microdomaines ou dans des radeaux lipidiques en utilisant des marqueurs spécifiques.
- Troisièmement, il est intéressant de vérifier par co-localisation si la GGT se localise au même endroit de la cellule que le récepteur TNFR-1.

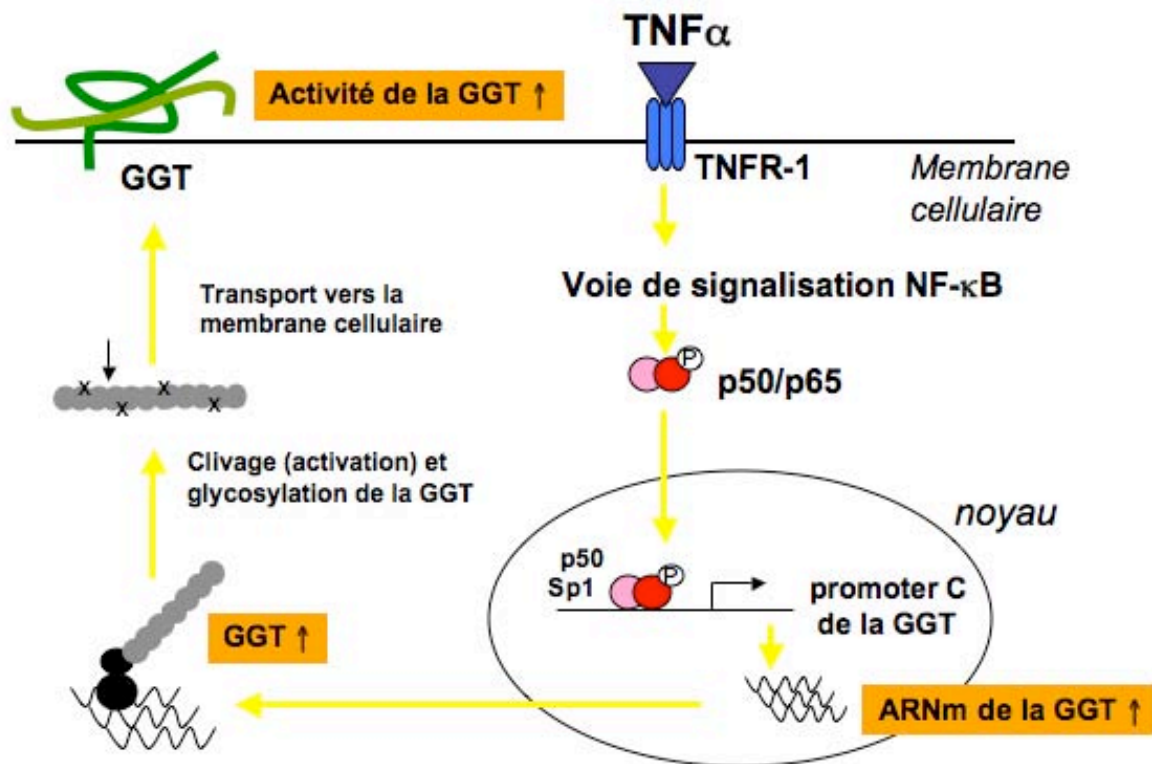


Figure 59 : Schéma résumant les résultats obtenus pour la γ -glutamyltransférase après traitement des cellules K562 au TNF α .

Le TNF α se lie sur son récepteur TNFR-1 et déclenche la voie de signalisation NF- κ B. Les facteurs de transcription p50 NF- κ B et Sp1, ainsi que l'ARN polymérase II, se fixent sur le promoteur C de la GGT et induisent une augmentation du nombre d'ARNm de la GGT ainsi qu'une augmentation du nombre de protéines. La GGT est ensuite clivée, glycosylée et transportée vers la membrane cellulaire où elle joue son rôle de métaboliseur du GSH avec une activité accrue due au TNF α .

Deuxièmement, dans la mesure où nos résultats nous permettent de proposer un modèle d'une boucle physiologique impliquant le $\text{TNF}\alpha$, la GGT et le TNFR-1 dans les cellules K562, il faudra confirmer certains résultats obtenus :

- En premier lieu, il est important de confirmer les résultats de la production d' H_2O_2 dans les cellules K562 ainsi que les résultats des WB avec l'IAB. En plus, il serait essentiel de vérifier le rôle de la GGT, en l'inhibant, dans les phénomènes redox.
- Ensuite, il est nécessaire de confirmer le résultat obtenu par Scatchard plot et d'utiliser un inhibiteur de la GGT afin de déterminer son implication dans l'augmentation de l'affinité du récepteur TNFR-1.

Finalement, à plus long terme, nous envisageons d'approfondir notre étude sur la régulation du promoteur B de la GGT afin de vérifier si le promoteur B est également régulé par la voie NF- κ B et de déterminer les sites responsables de l'induction de ce promoteur par le $\text{TNF}\alpha$.

De plus, nous envisageons d'identifier le promoteur contrôlant la transcription de l'ARNm de type A, qui est complètement inconnu jusqu'à présent.

L'ensemble de ces études nous permettront donc de mieux connaître les mécanismes moléculaires responsables de la régulation transcriptionnelle du gène de la GGT humaine.

VI. - Bibliographie

ACCAOUI M. J., ENOIU M., MERGNY M., MASSON C., DOMINICI S., WELLMAN M. and VISVIKIS A.

Gamma-glutamyltranspeptidase-dependent glutathione catabolism results in activation of NF-kB.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 2000, 276, 1062-1067.

AGGARWAL B. B.

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.

AGGARWAL B. B., SHISHODIA S., ASHIKAWA K. and BHARTI A. C.

The role of TNF and its family members in inflammation and cancer: lessons from gene deletion.

Curr Drug Targets Inflamm Allergy, 2002, 1, 327-341.

AGGARWAL S., TAKADA Y., SINGH S., MYERS J. N. and AGGARWAL B. B.

Inhibition of growth and survival of human head and neck squamous cell carcinoma cells by curcumin via modulation of nuclear factor-kappaB signaling.

Int. J. Cancer, 2004, 111, 679-692.

AGGARWAL S., ICHIKAWA H., TAKADA Y., SANDUR S. K., SHISHODIA S. and AGGARWAL B. B.

Curcumin (diferuloylmethane) down-regulates expression of cell proliferation and antiapoptotic and metastatic gene products through suppression of IkappaBalpha kinase and Akt activation.

Mol. Pharmacol., 2006, 69, 195-206.

AHMAD S., OKINE L., WOOD R., ALJIAN J. and VISTICA D. T.

gamma-Glutamyl transpeptidase (gamma-GT) and maintenance of thiol pools in tumor cells resistant to alkylating agents.

J. Cell. Physiol., 1987, 131, 240-246.

AINBINDER E., REVACH M., WOLSTEIN O., MOSHONOV S., DIAMANT N. and DIKSTEIN R.

Mechanism of rapid transcriptional induction of tumor necrosis factor alpha-responsive genes by NF-kappaB.

Mol. Cell. Biol., 2002, 22, 6354-6362.

AMMON H. P., ANAZODO M. I., SAFAYHI H., DHAWAN B. N. and SRIMAL R. C.

Curcumin: a potent inhibitor of leukotriene B4 formation in rat peritoneal polymorphonuclear neutrophils (PMNL).

Planta Med., 1992, 58, 226.

ANTCZAK C., DE MEESTER I. and BAUVOIS B.

Transmembrane proteases as disease markers and targets for therapy.

J. Biol. Regul. Homeost. Agents, 2001a, 15, 130-139.

ANTCZAK C., DE MEESTER I. and BAUVOIS B.

Ecto-peptidases in pathophysiology.

Bioessays, 2001b, 23, 251-260.

BAETU T. M., KWON H., SHARMA S., GRANDVAUX N. and HISCOTT J.

Disruption of NF-kappaB signaling reveals a novel role for NF-kappaB in the regulation of TNF-related apoptosis-inducing ligand expression.

J. Immunol., 2001, 167, 3164-3173.

BAEUERLE P. A. and BAICHWAL V. R.

NF-kappa B as a frequent target for immunosuppressive and anti-inflammatory molecules.

Adv. Immunol., 1997, 65, 111-137.

BALDWIN A. S., JR.

The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights.

Annu. Rev. Immunol., 1996, 14, 649-683.

BARNES P. J. and ADCOCK I. M.

NF-kappa B: a pivotal role in asthma and a new target for therapy.

Trends Pharmacol. Sci., 1997, 18, 46-50.

BARNES P. J. and KARIN M.

Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases.

N. Engl. J. Med., 1997, 336, 1066-1071.

BAROUKI R., FINIDORI J., CHOBERT M. N., AGGERBECK M., LAPERCHE Y. and HANOUNE J.

Biosynthesis and processing of gamma-glutamyl transpeptidase in hepatoma tissue culture cells.

J. Biol. Chem., 1984, 259, 7970-7974.

BAUER J., BAUER T. M., KALB T., TAGA T., LENGYEL G., HIRANO T., KISHIMOTO T., ACS G., MAYER L. and GEROK W.

Regulation of interleukin 6 receptor expression in human monocytes and monocyte-derived macrophages. Comparison with the expression in human hepatocytes.

J. Exp. Med., 1989, 170, 1537-1549.

BEG A. A., SHA W. C., BRONSON R. T. and BALTIMORE D.

Constitutive NF-kappa B activation, enhanced granulopoiesis, and neonatal lethality in I kappa B alpha-deficient mice.

Genes Dev., 1995, 9, 2736-2746.

BEINKE S. and LEY S. C.

Functions of NF-kappaB1 and NF-kappaB2 in immune cell biology.

Biochem. J., 2004, 382, 393-409.

BHARTI A. C. and AGGARWAL B. B.

Nuclear factor-kappa B and cancer: its role in prevention and therapy.

Biochem. Pharmacol., 2002, 64, 883-888.

BHARTI A. C., DONATO N., SINGH S. and AGGARWAL B. B.

Curcumin (diferuloylmethane) down-regulates the constitutive activation of nuclear factor-kappa B and IkappaBalpha kinase in human multiple myeloma cells, leading to suppression of proliferation and induction of apoptosis.

Blood, 2003, 101, 1053-1062.

BLASIUS R., REUTER S., HENRY E., DICATO M. and DIEDERICH M.

Curcumin regulates signal transducer and activator of transcription (STAT) expression in K562 cells.

Biochem. Pharmacol., 2006, 72, 1547-1554.

BORUD O., MORTENSEN B., MIKKELSEN I. M., LEROY P., WELLMAN M. and HUSEBY N. E.

Regulation of gamma-glutamyltransferase in cisplatin-resistant and -sensitive colon carcinoma cells after acute cisplatin and oxidative stress exposures.

Int. J. Cancer, 2000, 88, 464-468.

BOUMAN L., SANCEAU J., ROUILLARD D. and BAUVOIS B.

gamma-Glutamyl transpeptidase expression in Ewing's sarcoma cells: up-regulation by interferons.

Biochem. J., 2002, 364, 719-724.

BRADFORD M. M.

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.

Anal. Biochem., 1976, 72, 248-254.

BRAND K., PAGE S., ROGLER G., BARTSCH A., BRANDL R., KNUECHEL R., PAGE M., KALTSCHMIDT C., BAEUERLE P. A. and NEUMEIER D.

Activated transcription factor nuclear factor-kappa B is present in the atherosclerotic lesion.

J. Clin. Invest., 1996, 97, 1715-1722.

BRASIER A. R., RON D., TATE J. E. and HABENER J. F.

A family of constitutive C/EBP-like DNA binding proteins attenuate the IL-1 alpha induced, NF kappa B mediated trans-activation of the angiotensinogen gene acute-phase response element.

EMBO J., 1990, 9, 3933-3944.

BREN G. D., SOLAN N. J., MIYOSHI H., PENNINGTON K. N., POBST L. J. and PAYA C. V.

Transcription of the RelB gene is regulated by NF-kappaB.

Oncogene, 2001, 20, 7722-7733.

CAO S., ZHANG X., EDWARDS J. P. and MOSSER D. M.

NF-kappaB1 (p50) homodimers differentially regulate pro- and anti-inflammatory cytokines in macrophages.

J. Biol. Chem., 2006, 281, 26041-26050.

CARLISLE M. L., KING M. R. and KARP D. R.

Gamma-glutamyl transpeptidase activity alters the T cell response to oxidative stress and Fas-induced apoptosis.

Int. Immunol., 2003, 15, 17-27.

CARSWELL E. A., OLD L. J., KASSEL R. L., GREEN S., FIORE N. and WILLIAMSON B.

An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors.

Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1975, 72, 3666-3670.

CARTER B. Z., WISEMAN A. L., ORKISZEWSKI R., BALLARD K. D., OU C. N. and LIEBERMAN M. W.

Metabolism of leukotriene C4 in gamma-glutamyl transpeptidase-deficient mice.

J. Biol. Chem., 1997, 272, 12305-12310.

CHANG M., SHI M. and FORMAN H. J.

Exogenous glutathione protects endothelial cells from menadione toxicity.

Am. J. Physiol., 1992, 262, L637-643.

CHEN H., ZHANG Z. S., ZHANG Y. L. and ZHOU D. Y.

Curcumin inhibits cell proliferation by interfering with the cell cycle and inducing apoptosis in colon carcinoma cells.

Anticancer Res., 1999, 19, 3675-3680.

CHUANG S. E., KUO M. L., HSU C. H., CHEN C. R., LIN J. K., LAI G. M., HSIEH C. Y. and CHENG A. L.

Curcumin-containing diet inhibits diethylnitrosamine-induced murine hepatocarcinogenesis.

Carcinogenesis, 2000, 21, 331-335.

CLARK S. and KONSTANTOPOULOS N.

Sulphydryl agents modulate insulin- and epidermal growth factor (EGF)-receptor kinase via reaction with intracellular receptor domains: differential effects on basal versus activated receptors.

Biochem. J., 1993, 292 (Pt 1), 217-223.

COLLART M. A., BAEUERLE P. and VASSALLI P.

Regulation of tumor necrosis factor alpha transcription in macrophages: involvement of four kappa B-like motifs and of constitutive and inducible forms of NF-kappa B.

Mol. Cell. Biol., 1990, 10, 1498-1506.

COLLINS S. J., GALLO R. C. and GALLAGHER R. E.

Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture.

Nature, 1977, 270, 347-349.

COTTIN V., DOAN J. E. and RICHES D. W.

Restricted localization of the TNF receptor CD120a to lipid rafts: a novel role for the death domain.

J. Immunol., 2002, 168, 4095-4102.

COURTAY C., HEISTERKAMP N., SIEST G. and GROFFEN J.

Expression of multiple gamma-glutamyltransferase genes in man.

Biochem. J., 1994, 297 (Pt 3), 503-508.

DAUBEUF S., ACCAOUI M. J., PETTERSEN I., HUSEBY N. E., VISVIKIS A. and GALTEAU M. M.

Differential regulation of gamma-glutamyltransferase mRNAs in four human tumour cell lines.

Biochim. Biophys. Acta, 2001, 1568, 67-73.

DAUBEUF S., LEROY P., PAOLICCHI A., POMPELLA A., WELLMAN M., GALTEAU M. M. and VISVIKIS A.

Enhanced resistance of HeLa cells to cisplatin by overexpression of gamma-glutamyltransferase.

Biochem. Pharmacol., 2002, 64, 207-216.

DAUBEUF S., DUVOIX A., WELLMAN-ROUSSEAU M., DIEDERICH M. and VISVIKIS A.

Phorbol ester regulation of the human gamma-glutamyltransferase gene promoter.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 2004, 313, 300-307.

DEL BELLO B., PAOLICCHI A., COMPORTI M., POMPELLA A. and MAELLARO E.

Hydrogen peroxide produced during gamma-glutamyl transpeptidase activity is involved in prevention of apoptosis and maintenance of proliferation in U937 cells.

FASEB J., 1999, 13, 69-79.

DEMPSEY P. W., DOYLE S. E., HE J. Q. and CHENG G.

The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily.

Cytokine Growth Factor Rev., 2003, 14, 193-209.

DESHPANDE S. S., INGLE A. D. and MARU G. B.

Chemopreventive efficacy of curcumin-free aqueous turmeric extract in 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced rat mammary tumorigenesis.

Cancer Lett., 1998, 123, 35-40.

DEVILLIER P., BACCARD N. and ADVENIER C.

Leukotrienes, leukotriene receptor antagonists and leukotriene synthesis inhibitors in asthma: an update. Part I: synthesis, receptors and role of leukotrienes in asthma.

Pharmacol. Res., 1999, 40, 3-13.

DEVIN A., COOK A., LIN Y., RODRIGUEZ Y., KELLIHER M. and LIU Z.

The distinct roles of TRAF2 and RIP in IKK activation by TNF-R1: TRAF2 recruits IKK to TNF-R1 while RIP mediates IKK activation.

Immunity, 2000, 12, 419-429.

DOMINICI S., VALENTINI M., MAELLARO E., DEL BELLO B., PAOLICCHI A., LORENZINI E., TONGIANI R., COMPORTI M. and POMPELLA A.
Redox modulation of cell surface protein thiols in U937 lymphoma cells: the role of gamma-glutamyl transpeptidase-dependent H₂O₂ production and S-thiolation.
Free Radic. Biol. Med., 1999, 27, 623-635.

DOMINICI S., VISVIKIS A., PIERI L., PAOLICCHI A., VALENTINI M. A., COMPORTI M. and POMPELLA A.
Redox modulation of NF-kappaB nuclear translocation and DNA binding in metastatic melanoma. The role of endogenous and gamma-glutamyl transferase-dependent oxidative stress.
Tumori, 2003, 89, 426-433.

DOMINICI S., PIERI L., PAOLICCHI A., DE TATA V., ZUNINO F. and POMPELLA A.
Endogenous oxidative stress induces distinct redox forms of tumor necrosis factor receptor-1 in melanoma cells.
Ann. N. Y. Acad. Sci., 2004, 1030, 62-68.

DRAZEN J. M., ISRAEL E. and O'BYRNE P. M.
Treatment of asthma with drugs modifying the leukotriene pathway.
N. Engl. J. Med., 1999, 340, 197-206.

DROZDZ R., PARMENTIER C., HACHAD H., LEROY P., SIEST G. and WELLMAN M.
gamma-Glutamyltransferase dependent generation of reactive oxygen species from a glutathione/transferrin system.
Free Radic. Biol. Med., 1998, 25, 786-792.

DUVOIX A., MORCEAU F., DELHALLE S., SCHMITZ M., SCHNEKENBURGER M., GALTEAU M. M., DICATO M. and DIEDERICH M.
Induction of apoptosis by curcumin: mediation by glutathione S-transferase P1-1 inhibition.
Biochem. Pharmacol., 2003, 66, 1475-1483.

FAHEY A. J., ADRIAN ROBINS R. and CONSTANTINESCU C. S.
Curcumin modulation of IFN-beta and IL-12 signalling and cytokine induction in human T cells.
J Cell Mol Med, 2007, 11, 1129-1137.

FILOMENI G., ROTILIO G. and CIRIOLO M. R.
Cell signalling and the glutathione redox system.
Biochem. Pharmacol., 2002, 64, 1057-1064.

FRANCO A. A., ODOM R. S. and RANDO T. A.
Regulation of antioxidant enzyme gene expression in response to oxidative stress and during differentiation of mouse skeletal muscle.
Free Radic. Biol. Med., 1999, 27, 1122-1132.

GERTSCH J., GUTTINGER M., HEILMANN J. and STICHER O.
Curcumin differentially modulates mRNA profiles in Jurkat T and human peripheral blood mononuclear cells.
Bioorg. Med. Chem., 2003, 11, 1057-1063.

GHOSH S. and KARIN M.
Missing pieces in the NF-kappaB puzzle.
Cell, 2002, 109 Suppl, S81-96.

GLASS G. A. and STARK A. A.
Promotion of glutathione-gamma-glutamyl transpeptidase-dependent lipid peroxidation by copper and ceruloplasmin: the requirement for iron and the effects of antioxidants and antioxidant enzymes.
Environ. Mol. Mutagen., 1997, 29, 73-80.

GLOIRE G., CHARLIER E., RAHMOUNI S., VOLANTI C., CHARIOT A., ERNEUX C. and PIETTE J.
Restoration of SHIP-1 activity in human leukemic cells modifies NF-kappaB activation pathway and cellular survival upon oxidative stress.
Oncogene, 2006a, 25, 5485-5494.

GLOIRE G., LEGRAND-POELS S. and PIETTE J.
NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later.
Biochem. Pharmacol., 2006b, 72, 1493-1505.

GODWIN A. K., MEISTER A., O'DWYER P. J., HUANG C. S., HAMILTON T. C. and ANDERSON M. E.
High resistance to cisplatin in human ovarian cancer cell lines is associated with marked increase of glutathione synthesis.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1992, 89, 3070-3074.

GOEL A., JHURANI S. and AGGARWAL B. B.
Multi-targeted therapy by curcumin: how spicy is it?
Mol Nutr Food Res, 2008,

GOODMAN S. I., MACE J. W. and POLLACK S.
Serum gamma-glutamyl transpeptidase deficiency.
Lancet, 1971, 1, 234-235.

GRAFF G., STEPHENSON J. H., GLASS D. B., HADDOX M. K. and GOLDBERG N. D.
Activation of soluble splenic cell guanylate cyclase by prostaglandin endoperoxides and fatty acid hydroperoxides.
J. Biol. Chem., 1978, 253, 7662-7676.

GRANERO F., REVERT F., REVERT-ROS F., LAINEZ S., MARTINEZ-MARTINEZ P. and SAUS J.
A human-specific TNF-responsive promoter for Goodpasture antigen-binding protein.
Febs J, 2005, 272, 5291-5305.

GRIFFITHS S. A., GOOD V. M., GORDON L. A., HUDSON E. A., BARRETT M. C., MUNKS R. J. and MANSON M. M.
Characterization of a promoter for gamma-glutamyl transpeptidase activated in rat liver in response to aflatoxin B1 and ethoxyquin.
Mol. Carcinog., 1995, 14, 251-262.

HAEFNER B.

NF-kappa B: arresting a major culprit in cancer.

Drug Discov Today, 2002, 7, 653-663.

HAMMOND J. W., POTTER M., WILCKEN B. and TRUSCOTT R.

Siblings with gamma-glutamyltransferase deficiency.

J. Inherit. Metab. Dis., 1995, 18, 82-83.

HAN B., LUO G., SHI Z. Z., BARRIOS R., ATWOOD D., LIU W., HABIB G. M., SIFERS R. N., CORRY D. B. and LIEBERMAN M. W.

Gamma-glutamyl leukotrienase, a novel endothelial membrane protein, is specifically responsible for leukotriene D(4) formation in vivo.

Am. J. Pathol., 2002, 161, 481-490.

HAN S. S., CHUNG S. T., ROBERTSON D. A., RANJAN D. and BONDADA S.

Curcumin causes the growth arrest and apoptosis of B cell lymphoma by downregulation of egr-1, c-myc, bcl-XL, NF-kappa B, and p53.

Clin. Immunol., 1999, 93, 152-161.

HANIGAN M. H. and PITOT H. C.

Gamma-glutamyl transpeptidase--its role in hepatocarcinogenesis.

Carcinogenesis, 1985, 6, 165-172.

HANIGAN M. H. and FRIERSON H. F., JR.

Immunohistochemical detection of gamma-glutamyl transpeptidase in normal human tissue.

J. Histochem. Cytochem., 1996, 44, 1101-1108.

HANIGAN M. H., FRIERSON H. F., JR., SWANSON P. E. and DE YOUNG B. R.

Altered expression of gamma-glutamyl transpeptidase in human tumors.

Hum. Pathol., 1999a, 30, 300-305.

HANIGAN M. H., GALLAGHER B. C., TOWNSEND D. M. and GABARRA V.

Gamma-glutamyl transpeptidase accelerates tumor growth and increases the resistance of tumors to cisplatin in vivo.

Carcinogenesis, 1999b, 20, 553-559.

HARDING C. O., WILLIAMS P., WAGNER E., CHANG D. S., WILD K., COLWELL R. E. and WOLFF J. A.

Mice with genetic gamma-glutamyl transpeptidase deficiency exhibit glutathionuria, severe growth failure, reduced life spans, and infertility.

J. Biol. Chem., 1997, 272, 12560-12567.

HARDY M. P., MC G. A. F. and O'NEILL L. A.

Transcriptional regulation of the human TRIF (TIR domain-containing adaptor protein inducing interferon beta) gene.

Biochem. J., 2004, 380, 83-93.

HART L. A., KRISHNAN V. L., ADCOCK I. M., BARNES P. J. and CHUNG K. F.

Activation and localization of transcription factor, nuclear factor-kappaB, in asthma.

Am. J. Respir. Crit. Care Med., 1998, 158, 1585-1592.

HASKILL S., BEG A. A., TOMPKINS S. M., MORRIS J. S., YUROCHKO A. D., SAMPSON-JOHANNES A., MONDAL K., RALPH P. and BALDWIN A. S., JR.
Characterization of an immediate-early gene induced in adherent monocytes that encodes I kappa B-like activity.
Cell, 1991, 65, 1281-1289.

HAYDEN M. S. and GHOSH S.
Signaling to NF-kappaB.
Genes Dev., 2004, 18, 2195-2224.

HAYES J. D. and STRANGE R. C.
Potential contribution of the glutathione S-transferase supergene family to resistance to oxidative stress.
Free Radic. Res., 1995, 22, 193-207.

HEISTERKAMP N., RAJPERT-DE MEYTS E., URIBE L., FORMAN H. J. and GROFFEN J.
Identification of a human gamma-glutamyl cleaving enzyme related to, but distinct from, gamma-glutamyl transpeptidase.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1991, 88, 6303-6307.

HEISTERKAMP N., GROFFEN J., WARBURTON D. and SNEDDON T. P.
The human gamma-glutamyltransferase gene family.
Hum. Genet., 2008, 123, 321-332.

HENDERSON W. R., JR.
The role of leukotrienes in inflammation.
Ann. Intern. Med., 1994, 121, 684-697.

HENDRICH S. and PITOT H. C.
Enzymes of glutathione metabolism as biochemical markers during hepatocarcinogenesis.
Cancer Metastasis Rev., 1987, 6, 155-178.

HERBERT J. M., BONO F. and SAVI P.
The mitogenic effect of H₂O₂ for vascular smooth muscle cells is mediated by an increase of the affinity of basic fibroblast growth factor for its receptor.
FEBS Lett., 1996, 395, 43-47.

HERGENHAHN M., SOTO U., WENINGER A., POLACK A., HSU C. H., CHENG A. L. and ROSL F.
The chemopreventive compound curcumin is an efficient inhibitor of Epstein-Barr virus BZLF1 transcription in Raji DR-LUC cells.
Mol. Carcinog., 2002, 33, 137-145.

HINO T., NAKAMURA H., ABE S., SAITO H., INAGE M., TERASHITA K., KATO S. and TOMOIKE H.
Hydrogen peroxide enhances shedding of type I soluble tumor necrosis factor receptor from pulmonary epithelial cells.

Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 1999, 20, 122-128.

HINZ M., LOSER P., MATHAS S., KRAPPMANN D., DORKEN B. and SCHEIDEREIT C.
Constitutive NF-kappaB maintains high expression of a characteristic gene network,
including CD40, CD86, and a set of antiapoptotic genes in Hodgkin/Reed-Sternberg cells.
Blood, 2001, 97, 2798-2807.

HISCOTT J., MAROIS J., GAROUFALIS J., D'ADDARIO M., ROULSTON A., KWAN I.,
PEPIN N., LACOSTE J., NGUYEN H., BENSI G. and ET AL.
Characterization of a functional NF-kappa B site in the human interleukin 1 beta promoter:
evidence for a positive autoregulatory loop.
Mol. Cell. Biol., 1993, 13, 6231-6240.

HOLIC N., SUZUKI T., CORLU A., COUCHIE D., CHOBERT M. N., GUGUEN-
GUILLOUZO C. and LAPERCHE Y.
Differential expression of the rat gamma-glutamyl transpeptidase gene promoters along with
differentiation of hepatoblasts into biliary or hepatocytic lineage.
Am. J. Pathol., 2000, 157, 537-548.

HORWITZ R. J., MCGILL K. A. and BUSSE W. W.
The role of leukotriene modifiers in the treatment of asthma.
Am. J. Respir. Crit. Care Med., 1998, 157, 1363-1371.

HSU H., XIONG J. and GOEDDEL D. V.
The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation.
Cell, 1995, 81, 495-504.

HSU H., HUANG J., SHU H. B., BAICHWAL V. and GOEDDEL D. V.
TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling
complex.
Immunity, 1996a, 4, 387-396.

HSU H., SHU H. B., PAN M. G. and GOEDDEL D. V.
TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal
transduction pathways.
Cell, 1996b, 84, 299-308.

HUANG M. T., SMART R. C., WONG C. Q. and CONNEY A. H.
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, 5941-5946.

HUANG R. P., WU J. X., FAN Y. and ADAMSON E. D.
UV activates growth factor receptors via reactive oxygen intermediates.
J. Cell Biol., 1996, 133, 211-220.

HUGHEY R. P. and CURTHOYS N.
Comparison of the size and physical properties of gamma-glutamyltranspeptidase purified
from rat kidney following solubilization with papain or with Triton X-100.
J. Biol. Chem., 1976, 251, 8763-8770.

HUSEBY N. E. and STROMME J. H.

Practical points regarding routine determination of gamma-glutamyl transferase (gamma-GT) in serum with a kinetic method at 37 degrees C.

Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1974, 34, 357-363.

HUSEBY N. E., ASARE N., WETTING S., MIKKELSEN I. M., MORTENSEN B., SVEINBJORNSSON B. and WELLMAN M.

Nitric oxide exposure of CC531 rat colon carcinoma cells induces gamma-glutamyltransferase which may counteract glutathione depletion and cell death.

Free Radic. Res., 2003, 37, 99-107.

ICIEK M., CHWATKO G., ROKITA H., BALD E. and WLODEK L.

The effects of modulation of gamma-glutamyl transpeptidase activity in HepG2 cells on thiol homeostasis and caspase-3-activity.

Biochim. Biophys. Acta, 2007, 1773, 201-208.

IMLAY J. A. and LINN S.

DNA damage and oxygen radical toxicity.

Science, 1988, 240, 1302-1309.

ISHIKAWA H., CLAUDIO E., DAMBACH D., RAVENTOS-SUAREZ C., RYAN C. and BRAVO R.

Chronic inflammation and susceptibility to bacterial infections in mice lacking the polypeptide (p)105 precursor (NF-kappaB1) but expressing p50.

J. Exp. Med., 1998, 187, 985-996.

JANSSENS S. and TSCHOPP J.

Signals from within: the DNA-damage-induced NF-kappaB response.

Cell Death Differ., 2006, 13, 773-784.

JIANG Y., WORONICZ J. D., LIU W. and GOEDDEL D. V.

Prevention of constitutive TNF receptor 1 signaling by silencer of death domains.

Science, 1999, 283, 543-546.

JOBIN C., PANJA A., HELLERBRAND C., IIMURO Y., DIDONATO J., BRENNER D. A. and SARTOR R. B.

Inhibition of proinflammatory molecule production by adenovirus-mediated expression of a nuclear factor kappaB super-repressor in human intestinal epithelial cells.

J. Immunol., 1998, 160, 410-418.

JOBIN C., BRADHAM C. A., RUSSO M. P., JUMA B., NARULA A. S., BRENNER D. A. and SARTOR R. B.

Curcumin blocks cytokine-mediated NF-kappa B activation and proinflammatory gene expression by inhibiting inhibitory factor I-kappa B kinase activity.

J. Immunol., 1999, 163, 3474-3483.

JONES S. J., LEDGERWOOD E. C., PRINS J. B., GALBRAITH J., JOHNSON D. R., POBER J. S. and BRADLEY J. R.

TNF recruits TRADD to the plasma membrane but not the trans-Golgi network, the principal subcellular location of TNF-R1.

J. Immunol., 1999, 162, 1042-1048.

KARP D. R., SHIMOOKU K. and LIPSKY P. E.

Expression of gamma-glutamyl transpeptidase protects ramos B cells from oxidation-induced cell death.

J. Biol. Chem., 2001, 276, 3798-3804.

KITAMURA T., TOJO A., KUWAKI T., CHIBA S., MIYAZONO K., URABE A. and TAKAKU F.

Identification and analysis of human erythropoietin receptors on a factor-dependent cell line, TF-1.

Blood, 1989, 73, 375-380.

KLEMENT J. F., RICE N. R., CAR B. D., ABBONDANZO S. J., POWERS G. D., BHATT P. H., CHEN C. H., ROSEN C. A. and STEWART C. L.

IkappaBalpha deficiency results in a sustained NF-kappaB response and severe widespread dermatitis in mice.

Mol. Cell. Biol., 1996, 16, 2341-2349.

KNICKELBEIN R. G., INGBAR D. H., SERES T., SNOW K., JOHNSTON R. B., JR., FAYEMI O., GUMKOWSKI F., JAMIESON J. D. and WARSHAW J. B.

Hyperoxia enhances expression of gamma-glutamyl transpeptidase and increases protein S-glutathiolation in rat lung.

Am. J. Physiol., 1996, 270, L115-122.

KORUTLA L. and KUMAR R.

Inhibitory effect of curcumin on epidermal growth factor receptor kinase activity in A431 cells.

Biochim. Biophys. Acta, 1994, 1224, 597-600.

KRIKOS A., LAHERTY C. D. and DIXIT V. M.

Transcriptional activation of the tumor necrosis factor alpha-inducible zinc finger protein, A20, is mediated by kappa B elements.

J. Biol. Chem., 1992, 267, 17971-17976.

KUGELMAN A., CHOY H. A., LIU R., SHI M. M., GOZAL E. and FORMAN H. J.

gamma-Glutamyl transpeptidase is increased by oxidative stress in rat alveolar L2 epithelial cells.

Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 1994, 11, 586-592.

KUNSCH C. and ROSEN C. A.

NF-kappa B subunit-specific regulation of the interleukin-8 promoter.

Mol. Cell. Biol., 1993, 13, 6137-6146.

KUO M. L., HUANG T. S. and LIN J. K.

Curcumin, an antioxidant and anti-tumor promoter, induces apoptosis in human leukemia cells.

Biochim. Biophys. Acta, 1996, 1317, 95-100.

KUTTAN R., BHANUMATHY P., NIRMALA K. and GEORGE M. C.
Potential anticancer activity of turmeric (*Curcuma longa*).
Cancer Lett., 1985, 29, 197-202.

KUTTAN R., SUDHEERAN P. C. and JOSPH C. D.
Turmeric and curcumin as topical agents in cancer therapy.
Tumori, 1987, 73, 29-31.

LAHUNA O., BROUILLET A., CHOBERT M. N., DARBOUY M., OKAMOTO T. and
LAPERCHE Y.
Identification of a second promoter which drives the expression of gamma-glutamyl
transpeptidase in rat kidney and epididymis.
Biochemistry (Mosc). 1992, 31, 9190-9196.

LANTZ R. C., CHEN G. J., SOLYOM A. M., JOLAD S. D. and TIMMERMAN B. N.
The effect of turmeric extracts on inflammatory mediator production.
Phytomedicine, 2005, 12, 445-452.

LASH L. H.
Role of renal metabolism in risk to toxic chemicals.
Environ. Health Perspect., 1994, 102 Suppl 11, 75-79.

LEE J. J., HUANG W. T., SHAO D. Z., LIAO J. F. and LIN M. T.
Blocking NF-kappaB activation may be an effective strategy in the fever therapy.
Jpn. J. Physiol., 2003, 53, 367-375.

LEE S. L., HUANG W. J., LIN W. W., LEE S. S. and CHEN C. H.
Preparation and anti-inflammatory activities of diarylheptanoid and diarylheptylamine
analogs.
Bioorg. Med. Chem., 2005, 13, 6175-6181.

LEH H., COURTAY C., GERARDIN P., WELLMAN M., SIEST G. and VISVIKIS A.
Cloning and expression of a novel type (III) of human gamma-glutamyltransferase truncated
mRNA.
FEBS Lett., 1996, 394, 258-262.

LEH H., CHIKHI N., ICHINO K., GUELLAEN G., WELLMAN M., SIEST G. and
VISVIKIS A.
An intronic promoter controls the expression of truncated human gamma-glutamyltransferase
mRNAs.
FEBS Lett., 1998, 434, 51-56.

LEWIS A. D., HAYES J. D. and WOLF C. R.
Glutathione and glutathione-dependent enzymes in ovarian adenocarcinoma cell lines derived
from a patient before and after the onset of drug resistance: intrinsic differences and cell cycle
effects.
Carcinogenesis, 1988, 9, 1283-1287.

LEWIS R. A., AUSTEN K. F. and SOBERMAN R. J.

Leukotrienes and other products of the 5-lipoxygenase pathway. Biochemistry and relation to pathobiology in human diseases.

N. Engl. J. Med., 1990, 323, 645-655.

LI Y., KIM I. C., KIM Y. J., KIM M. K., YOON Y. D., LEE Y. S. and LEE J. S.

Cloning and sequence analysis of the self-fertilizing fish *Rivulus marmoratus* immediate early gene c-fos.

Mar Environ Res, 2004, 58, 681-685.

LIBERMANN T. A. and BALTIMORE D.

Activation of interleukin-6 gene expression through the NF-kappa B transcription factor.

Mol. Cell. Biol., 1990, 10, 2327-2334.

LIEBERMAN M. W., WISEMAN A. L., SHI Z. Z., CARTER B. Z., BARRIOS R., OU C. N., CHEVEZ-BARRIOS P., WANG Y., HABIB G. M., GOODMAN J. C., HUANG S. L., LEOVITZ R. M. and MATZUK M. M.

Growth retardation and cysteine deficiency in gamma-glutamyl transpeptidase-deficient mice.

Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1996, 93, 7923-7926.

LIMTRAKUL P., LIPIGORNGOSON S., NAMWONG O., APISARIYAKUL A. and DUNN F. W.

Inhibitory effect of dietary curcumin on skin carcinogenesis in mice.

Cancer Lett., 1997, 116, 197-203.

LIU R. M., HU H., ROBISON T. W. and FORMAN H. J.

Differential enhancement of gamma-glutamyl transpeptidase and gamma-glutamylcysteine synthetase by tert-butylhydroquinone in rat lung epithelial L2 cells.

Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 1996a, 14, 186-191.

LIU R. M., HU H., ROBISON T. W. and FORMAN H. J.

Increased gamma-glutamylcysteine synthetase and gamma-glutamyl transpeptidase activities enhance resistance of rat lung epithelial L2 cells to quinone toxicity.

Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 1996b, 14, 192-197.

LIU R. M., SHI M. M., GIULIVI C. and FORMAN H. J.

Quinones increase gamma-glutamyl transpeptidase expression by multiple mechanisms in rat lung epithelial cells.

Am. J. Physiol., 1998, 274, L330-336.

LOMBARDI L., CIANA P., CAPPELLINI C., TRECCA D., GUERRINI L., MIGLIAZZA A., MAIOLO A. T. and NERI A.

Structural and functional characterization of the promoter regions of the NFkB2 gene.

Nucleic Acids Res, 1995, 23, 2328-2336.

LOZZIO C. B. and LOZZIO B. B.

Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome.

Blood, 1975, 45, 321-334.

LYNCH K. R., O'NEILL G. P., LIU Q., IM D. S., SAWYER N., METTERS K. M., COULOMBE N., ABRAMOVITZ M., FIGUEROA D. J., ZENG Z., CONNOLLY B. M.,

BAI C., AUSTIN C. P., CHATEAUNEUF A., STOCCO R., GREIG G. M., KARGMAN S., HOOKS S. B., HOSFIELD E., WILLIAMS D. L., JR., FORD-HUTCHINSON A. W., CASKEY C. T. and EVANS J. F.

Characterization of the human cysteinyl leukotriene CysLT1 receptor.
Nature, 1999, 399, 789-793.

MAELLARO E., DOMINICI S., DEL BELLO B., VALENTINI M. A., PIERI L., PEREGO P., SUPINO R., ZUNINO F., LORENZINI E., PAOLICCHI A., COMPORTI M. and POMPELLA A.

Membrane gamma-glutamyl transpeptidase activity of melanoma cells: effects on cellular H(2)O(2) production, cell surface protein thiol oxidation and NF-kappa B activation status.
J. Cell Sci., 2000, 113 (Pt 15), 2671-2678.

MAROK R., WINYARD P. G., COUMBE A., KUS M. L., GAFFNEY K., BLADES S., MAPP P. I., MORRIS C. J., BLAKE D. R., KALTSCHMIDT C. and BAEUERLE P. A.
Activation of the transcription factor nuclear factor-kappaB in human inflamed synovial tissue.

Arthritis Rheum., 1996, 39, 583-591.

MARTIN M. U. and WESCHE H.

Summary and comparison of the signaling mechanisms of the Toll/interleukin-1 receptor family.

Biochim. Biophys. Acta, 2002, 1592, 265-280.

MARTIN P. and PAPAYANNOPOULOU T.

HEL cells: a new human erythroleukemia cell line with spontaneous and induced globin expression.

Science, 1982, 216, 1233-1235.

MATSUDA Y., TSUJI A. and KATUNUMA N.

Studies on the structure of gamma-glutamyltranspeptidase. III. Evidence that the amino terminus of the heavy subunit is the membrane binding segment.

J. Biochem. (Tokyo). 1983, 93, 1427-1433.

MATSUGUCHI T., MUSIKACHAROEN T., OGAWA T. and YOSHIKAI Y.

Gene expressions of Toll-like receptor 2, but not Toll-like receptor 4, is induced by LPS and inflammatory cytokines in mouse macrophages.

J. Immunol., 2000, 165, 5767-5772.

MAYATEPEK E., OKUN J. G., MEISSNER T., ASSMANN B., HAMMOND J., ZSCHOCKE J. and LEHMANN W. D.

Synthesis and metabolism of leukotrienes in gamma-glutamyl transpeptidase deficiency.

J. Lipid Res., 2004, 45, 900-904.

MCGAHON A., BISSONNETTE R., SCHMITT M., COTTER K. M., GREEN D. R. and COTTER T. G.

BCR-ABL maintains resistance of chronic myelogenous leukemia cells to apoptotic cell death.

Blood, 1994, 83, 1179-1187.

MEISTER A., TATE S. S. and GRIFFITH O. W.
Gamma-glutamyl transpeptidase.
Methods Enzymol., 1981, 77, 237-253.

MEISTER A. and ANDERSON M. E.
Glutathione.
Annu. Rev. Biochem., 1983, 52, 711-760.

MELO J. V., BRITO-BABAPULLE V., FORONI L., ROBINSON D. S., LUZZATTO L. and CATOVSKY D.
Two new cell lines from B-prolymphocytic leukaemia: characterization by morphology, immunological markers, karyotype and Ig gene rearrangement.
Int. J. Cancer, 1986, 38, 531-538.

MENON V. P. and SUDHEER A. R.
Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin.
Adv. Exp. Med. Biol., 2007, 595, 105-125.

MERONI S. B., SUBURO A. M. and CIGORRAGA S. B.
Interleukin-1beta regulates nitric oxide production and gamma-glutamyl transpeptidase activity in sertoli cells.
J. Androl., 2000, 21, 855-861.

MIAGKOV A. V., KOVALENKO D. V., BROWN C. E., DIDSBURY J. R., COGSWELL J. P., STIMPSON S. A., BALDWIN A. S. and MAKAROV S. S.
NF-kappaB activation provides the potential link between inflammation and hyperplasia in the arthritic joint.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1998, 95, 13859-13864.

MIKKELSEN I. M., HUSEBY N. E., VISVIKIS A. and MOENS U.
Activation of the gamma-glutamyltransferase promoter 2 in the rat colon carcinoma cell line CC531 by histone deacetylase inhibitors is mediated through the Sp1 binding motif.
Biochem. Pharmacol., 2002a, 64, 307-315.

MIKKELSEN I. M., MORTENSEN B., LAPERCHE Y. and HUSEBY N. E.
The expression of gamma-glutamyltransferase in rat colon carcinoma cells is distinctly regulated during differentiation and oxidative stress.
Mol. Cell. Biochem., 2002b, 232, 87-95.

MINOWADA J., ONUMA T. and MOORE G. E.
Rosette-forming human lymphoid cell lines. I. Establishment and evidence for origin of thymus-derived lymphocytes.
J. Natl. Cancer Inst., 1972, 49, 891-895.

MORALES A., GARCIA-RUIZ C., MIRANDA M., MARI M., COLELL A., ARDITE E. and FERNANDEZ-CHECA J. C.
Tumor necrosis factor increases hepatocellular glutathione by transcriptional regulation of the heavy subunit chain of gamma-glutamylcysteine synthetase.
J. Biol. Chem., 1997, 272, 30371-30379.

MORCEAU F., DUVOIX A., DELHALLE S., SCHNEKENBURGER M., DICATO M. and DIEDERICH M.

Regulation of glutathione S-transferase P1-1 gene expression by NF-kappaB in tumor necrosis factor alpha-treated K562 leukemia cells.

Biochem. Pharmacol., 2004, 67, 1227-1238.

MORI N. and PRAGER D.

Transactivation of the interleukin-1alpha promoter by human T-cell leukemia virus type I and type II Tax proteins.

Blood, 1996, 87, 3410-3417.

NASH B. and TATE S. S.

In vitro translation and processing of rat kidney gamma-glutamyl transpeptidase.

J. Biol. Chem., 1984, 259, 678-685.

NEURATH M. F., PETTERSSON S., MEYER ZUM BUSCHENFELDE K. H. and STROBER W.

Local administration of antisense phosphorothioate oligonucleotides to the p65 subunit of NF-kappa B abrogates established experimental colitis in mice.

Nat. Med., 1996, 2, 998-1004.

NISHIZAWA M. and NAGATA S.

Regulatory elements responsible for inducible expression of the granulocyte colony-stimulating factor gene in macrophages.

Mol. Cell. Biol., 1990, 10, 2002-2011.

NOMURA S., LAHUNA O., SUZUKI T., BROUILLET A., CHOBERT M. N. and LAPERCHE Y.

A specific distal promoter controls gamma-glutamyl transpeptidase gene expression in undifferentiated rat transformed liver cells.

Biochem. J., 1997, 326 (Pt 2), 311-320.

O'BRIAN C. A., WARD N. E., WEINSTEIN I. B., BULL A. W. and MARNETT L. J.

Activation of rat brain protein kinase C by lipid oxidation products.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 1988, 155, 1374-1380.

O'NEILL L. A.

How Toll-like receptors signal: what we know and what we don't know.

Curr. Opin. Immunol., 2006, 18, 3-9.

OGURA M., MORISHIMA Y., OHNO R., KATO Y., HIRABAYASHI N., NAGURA H. and SAITO H.

Establishment of a novel human megakaryoblastic leukemia cell line, MEG-01, with positive Philadelphia chromosome.

Blood, 1985, 66, 1384-1392.

OKADA T., SUZUKI H., WADA K., KUMAGAI H. and FUKUYAMA K.

Crystal structures of gamma-glutamyltranspeptidase from Escherichia coli, a key enzyme in glutathione metabolism, and its reaction intermediate.

Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2006, 103, 6471-6476.

ORLOWSKI M. and MEISTER A.

The gamma-glutamyl cycle: a possible transport system for amino acids.

Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1970, 67, 1248-1255.

ORNING L., HAMMARSTROM S. and SAMUELSSON B.

Leukotriene D: a slow reacting substance from rat basophilic leukemia cells.

Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1980, 77, 2014-2017.

PAHL H. L.

Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors.

Oncogene, 1999, 18, 6853-6866.

PANKIV S., MOLLER S., BJORKOY G., MOENS U. and HUSEBY N. E.

Radiation-induced upregulation of gamma-glutamyltransferase in colon carcinoma cells is mediated through the Ras signal transduction pathway.

Biochim. Biophys. Acta, 2006, 1760, 151-157.

PAOLICCHI A., DOMINICI S., PIERI L., MAELLARO E. and POMPELLA A.

Glutathione catabolism as a signaling mechanism.

Biochem. Pharmacol., 2002, 64, 1027-1035.

PAWLAK A., LAHUNA O., BULLE F., SUZUKI A., FERRY N., SIEGRIST S., CHIKHI N., CHOBERT M. N., GUELLAEN G. and LAPERCHE Y.

gamma-Glutamyl transpeptidase: a single copy gene in the rat and a multigene family in the human genome.

J. Biol. Chem., 1988, 263, 9913-9916.

PIPER J. T., SINGHAL S. S., SALAMEH M. S., TORMAN R. T., AWASTHI Y. C. and AWASTHI S.

Mechanisms of anticarcinogenic properties of curcumin: the effect of curcumin on glutathione linked detoxification enzymes in rat liver.

Int. J. Biochem. Cell Biol., 1998, 30, 445-456.

PIWOCKA K., ZABLOCKI K., WIECKOWSKI M. R., SKIERSKI J., FEIGA I., SZOPA J., DRELA N., WOJTCZAK L. and 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, 299-307.

PORTEU F. and NATHAN C.

Shedding of tumor necrosis factor receptors by activated human neutrophils.

J. Exp. Med., 1990, 172, 599-607.

PULVERTAFT J. V.

Cytology Of Burkitt's Tumour (African Lymphoma).

Lancet, 1964, 39, 238-240.

RAJAGOPALAN S., PARK J. H., PATEL P. D., LEOVITZ R. M. and LIEBERMAN M. W.

Cloning and analysis of the rat gamma-glutamyltransferase gene.
J. Biol. Chem., 1990, 265, 11721-11725.

RAJPERT-DE MEYTS E., HEISTERKAMP N. and GROFFEN J.
Cloning and nucleotide sequence of human gamma-glutamyl transpeptidase.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1988, 85, 8840-8844.

RANJAN D., JOHNSTON T. D., REDDY K. S., WU G., BONDADA S. and CHEN C.
Enhanced apoptosis mediates inhibition of EBV-transformed lymphoblastoid cell line proliferation by curcumin.
J. Surg. Res., 1999, 87, 1-5.

RAO T. S., BASU N., SETH S. D. and SIDDIQUI H. H.
Some aspects of pharmacological profile of sodium curcumin.
Indian J. Physiol. Pharmacol., 1984, 28, 211-215.

REUTER S., EIFES S., DICATO M., AGGARWAL B. B. and DIEDERICH M.
Modulation of anti-apoptotic and survival pathways by curcumin as a strategy to induce apoptosis in cancer cells.
Biochem. Pharmacol., 2008,

ROFF M., THOMPSON J., RODRIGUEZ M. S., JACQUE J. M., BALEUX F.,
ARENZANA-SEISDEDOS F. and HAY R. T.
Role of IkappaBalpha ubiquitination in signal-induced activation of NFkappaB in vivo.
J. Biol. Chem., 1996, 271, 7844-7850.

ROOT R. K., METCALF J., OSHINO N. and CHANCE B.
H₂O₂ release from human granulocytes during phagocytosis. I. Documentation, quantitation, and some regulating factors.
J. Clin. Invest., 1975, 55, 945-955.

RUEDIG C. and DRINGEN R.
TNF alpha increases activity of gamma-glutamyl transpeptidase in cultured rat astroglial cells.
J. Neurosci. Res., 2004, 75, 536-543.

SAKURAI H., SUZUKI S., KAWASAKI N., NAKANO H., OKAZAKI T., CHINO A., DOI T. and SAIKI I.
Tumor necrosis factor-alpha-induced IKK phosphorylation of NF-kappaB p65 on serine 536 is mediated through the TRAF2, TRAF5, and TAK1 signaling pathway.
J. Biol. Chem., 2003, 278, 36916-36923.

SALINAS A. E. and WONG M. G.
Glutathione S-transferases--a review.
Curr. Med. Chem., 1999, 6, 279-309.

SAMUELSSON B.
Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation.
Science, 1983, 220, 568-575.

- SCHMID E., EL BENNA J., GALTER D., KLEIN G. and DROGE W.
Redox priming of the insulin receptor beta-chain associated with altered tyrosine kinase activity and insulin responsiveness in the absence of tyrosine autophosphorylation.
FASEB J., 1998, 12, 863-870.
- SCHNEIDER U., SCHWENK H. U. and BORNKAMM G.
Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma.
Int. J. Cancer, 1977, 19, 621-626.
- SCHRECK R. and BAEUERLE P. A.
NF-kappa B as inducible transcriptional activator of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene.
Mol. Cell. Biol., 1990, 10, 1281-1286.
- SCHREIBER E., MATTHIAS P., MULLER M. M. and SCHAFFNER W.
Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells.
Nucleic Acids Res., 1989, 17, 6419.
- SCHRODER C. P., GODWIN A. K., O'DWYER P. J., TEW K. D., HAMILTON T. C. and OZOLS R. F.
Glutathione and drug resistance.
Cancer Invest., 1996, 14, 158-168.
- SHAKHOV A. N., COLLART M. A., VASSALLI P., NEDOSPASOV S. A. and JONGENEEL C. V.
Kappa B-type enhancers are involved in lipopolysaccharide-mediated transcriptional activation of the tumor necrosis factor alpha gene in primary macrophages.
J. Exp. Med., 1990, 171, 35-47.
- SHAW L. M. and NEWMAN D. A.
Hydrolysis of glutathione by human liver gamma-glutamyltransferase.
Clin. Chem., 1979, 25, 75-79.
- SHI Z. Z., HABIB G. M., LEOVITZ R. M. and LIEBERMAN M. W.
Cloning of cDNA and genomic structure of the mouse gamma-glutamyl transpeptidase-encoding gene.
Gene, 1995, 167, 233-237.
- SHI Z. Z., HAN B., HABIB G. M., MATZUK M. M. and LIEBERMAN M. W.
Disruption of gamma-glutamyl leukotrienase results in disruption of leukotriene D(4) synthesis in vivo and attenuation of the acute inflammatory response.
Mol. Cell. Biol., 2001, 21, 5389-5395.
- SHISHODIA S., AMIN H. M., LAI R. and AGGARWAL B. B.
Curcumin (diferuloylmethane) inhibits constitutive NF-kappaB activation, induces G1/S arrest, suppresses proliferation, and induces apoptosis in mantle cell lymphoma.
Biochem. Pharmacol., 2005, 70, 700-713.

SICA A., TAN T. H., RICE N., KRETZSCHMAR M., GHOSH P. and YOUNG H. A.
The c-rel protooncogene product c-Rel but not NF-kappa B binds to the intronic region of the human interferon-gamma gene at a site related to an interferon-stimulable response element.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1992, 89, 1740-1744.

SINGH S. and AGGARWAL B. B.
Activation of transcription factor NF-kappa B is suppressed by curcumin (diferuloylmethane) [corrected].
J. Biol. Chem., 1995, 270, 24995-25000.

SMITH T. K. and MEISTER A.
Active deglycosylated mammalian gamma-glutamyl transpeptidase.
FASEB J., 1994, 8, 661-664.

SRAMKOSKI R. M., PRETLOW T. G., 2ND, GIACONIA J. M., PRETLOW T. P.,
SCHWARTZ S., SY M. S., MARENGO S. R., RHIM J. S., ZHANG D. and
JACOBBERGER J. W.
A new human prostate carcinoma cell line, 22Rv1.
In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim., 1999, 35, 403-409.

STARK A. A., ZEIGER E. and PAGANO D. A.
Glutathione metabolism by gamma-glutamyltranspeptidase leads to lipid peroxidation: characterization of the system and relevance to hepatocarcinogenesis.
Carcinogenesis, 1993, 14, 183-189.

STAVROVSKAYA A. A.
Cellular mechanisms of multidrug resistance of tumor cells.
Biochemistry (Mosc). 2000, 65, 95-106.

STONE K. R., MICKEY D. D., WUNDERLI H., MICKEY G. H. and PAULSON D. F.
Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145).
Int. J. Cancer, 1978, 21, 274-281.

SUNDSTROM C. and NILSSON K.
Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937).
Int. J. Cancer, 1976, 17, 565-577.

SUZUKI H., KUMAGAI H. and TOCHIKURA T.
gamma-Glutamyltranspeptidase from Escherichia coli K-12: formation and localization.
J. Bacteriol., 1986a, 168, 1332-1335.

SUZUKI H., KUMAGAI H. and TOCHIKURA T.
gamma-Glutamyltranspeptidase from Escherichia coli K-12: purification and properties.
J. Bacteriol., 1986b, 168, 1325-1331.

SUZUKI H., KUMAGAI H., ECHIGO T. and TOCHIKURA T.
DNA sequence of the Escherichia coli K-12 gamma-glutamyltranspeptidase gene, ggt.
J. Bacteriol., 1989, 171, 5169-5172.

SZE G., KAPLOWITZ N., OOKHTENS M. and LU S. C.

Bidirectional membrane transport of intact glutathione in Hep G2 cells.
Am. J. Physiol., 1993, 265, G1128-1134.

TADA K., OKAZAKI T., SAKON S., KOBARAI T., KUROSAWA K., YAMAOKA S., HASHIMOTO H., MAK T. W., YAGITA H., OKUMURA K., YEH W. C. and NAKANO H.
Critical roles of TRAF2 and TRAF5 in tumor necrosis factor-induced NF-kappa B activation and protection from cell death.
J. Biol. Chem., 2001, 276, 36530-36534.

TAK P. P. and FIRESTEIN G. S.
NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases.
J. Clin. Invest., 2001, 107, 7-11.

TAKAHASHI Y., OAKES S. M., WILLIAMS M. C., TAKAHASHI S., MIURA T. and JOYCE-BRADY M.
Nitrogen dioxide exposure activates gamma-glutamyl transferase gene expression in rat lung.
Toxicol. Appl. Pharmacol., 1997, 143, 388-396.

TAKESHITA F., SUZUKI K., SASAKI S., ISHII N., KLINMAN D. M. and ISHII K. J.
Transcriptional regulation of the human TLR9 gene.
J. Immunol., 2004, 173, 2552-2561.

TANIGUCHI N. and IKEDA Y.
gamma-Glutamyl transpeptidase: catalytic mechanism and gene expression.
Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol., 1998, 72, 239-278.

TEN R. M., PAYA C. V., ISRAEL N., LE BAIL O., MATTEI M. G., VIRELIZIER J. L., KOURILSKY P. and ISRAEL A.
The characterization of the promoter of the gene encoding the p50 subunit of NF-kappa B indicates that it participates in its own regulation.
EMBO J., 1992, 11, 195-203.

TEW K. D.
Glutathione-associated enzymes in anticancer drug resistance.
Cancer Res., 1994, 54, 4313-4320.

THORNBERRY N. A., BULL H. G., CALAYCAY J. R., CHAPMAN K. T., HOWARD A. D., KOSTURA M. J., MILLER D. K., MOLINEAUX S. M., WEIDNER J. R., AUNINS J. and ET AL.
A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes.
Nature, 1992, 356, 768-774.

TREFZER U., BROCKHAUS M., LOTSCHER H., PARLOW F., BUDNIK A., GREWE M., CHRISTOPH H., KAPP A., SCHOPF E., LUGER T. A. and ET AL.
The 55-kD tumor necrosis factor receptor on human keratinocytes is regulated by tumor necrosis factor-alpha and by ultraviolet B radiation.
J. Clin. Invest., 1993, 92, 462-470.

TSUCHIYA S., YAMABE M., YAMAGUCHI Y., KOBAYASHI Y., KONNO T. and TADA K.
Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1).
Int. J. Cancer, 1980, 26, 171-176.

TSUTSUMI M., SAKAMURO D., TAKADA A., ZANG S. C., FURUKAWA T. and TANIGUCHI N.
Detection of a unique gamma-glutamyl transpeptidase messenger RNA species closely related to the development of hepatocellular carcinoma in humans: a new candidate for early diagnosis of hepatocellular carcinoma.
Hepatology, 1996, 23, 1093-1097.

UEDA A., OKUDA K., OHNO S., SHIRAI A., IGARASHI T., MATSUNAGA K., FUKUSHIMA J., KAWAMOTO S., ISHIGATSUBO Y. and OKUBO T.
NF-kappa B and Sp1 regulate transcription of the human monocyte chemoattractant protein-1 gene.
J. Immunol., 1994, 153, 2052-2063.

USHIDA J., SUGIE S., KAWABATA K., PHAM Q. V., TANAKA T., FUJII K., TAKEUCHI H., ITO Y. and MORI H.
Chemopreventive effect of curcumin on N-nitrosomethylbenzylamine-induced esophageal carcinogenesis in rats.
Jpn. J. Cancer Res., 2000, 91, 893-898.

VACA C. E. and HARMS-RINGDAHL M.
Nuclear membrane lipid peroxidation products bind to nuclear macromolecules.
Arch. Biochem. Biophys., 1989, 269, 548-554.

VESELY D. L., WATSON B. and LEVEY G. S.
Activation of liver guanylate cyclase by paraquat: possible role of superoxide anion.
J. Pharmacol. Exp. Ther., 1979, 209, 162-164.

VISVIKIS A., PAWLAK A., ACCAOUI M. J., ICHINO K., LEH H., GUELLAEN G. and WELLMAN M.
Structure of the 5' sequences of the human gamma-glutamyltransferase gene.
Eur. J. Biochem., 2001, 268, 317-325.

WANG C. Y., MAYO M. W., KORNELUK R. G., GOEDDEL D. V. and BALDWIN A. S., JR.
NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation.
Science, 1998, 281, 1680-1683.

WANG T., LAFUSE W. P. and ZWILLING B. S.
NFkappaB and Sp1 elements are necessary for maximal transcription of toll-like receptor 2 induced by Mycobacterium avium.
J. Immunol., 2001, 167, 6924-6932.

WATANABE A., TAKESHITA A., KITANO S. and HANAZAWA S.

CD14-mediated signal pathway of Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide in human gingival fibroblasts.

Infect. Immun., 1996, 64, 4488-4494.

WEIH F., CARRASCO D., DURHAM S. K., BARTON D. S., RIZZO C. A., RYSECK R. P., LIRA S. A. and BRAVO R.

Multiorgan inflammation and hematopoietic abnormalities in mice with a targeted disruption of RelB, a member of the NF-kappa B/Rel family.

Cell, 1995, 80, 331-340.

WEIH F., DURHAM S. K., BARTON D. S., SHA W. C., BALTIMORE D. and BRAVO R.
p50-NF-kappaB complexes partially compensate for the absence of RelB: severely increased pathology in p50(-/-)relB(-/-) double-knockout mice.

J. Exp. Med., 1997, 185, 1359-1370.

WEITBERG A. B. and CORVESE D.

Hydroxy- and hydroperoxy-6,8,11,14-eicosatetraenoic acids induce DNA strand breaks in human lymphocytes.

Carcinogenesis, 1989, 10, 1029-1031.

WETMORE L. A., GERARD C. and DRAZEN J. M.

Human lung expresses unique gamma-glutamyl transpeptidase transcripts.

Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1993, 90, 7461-7465.

WHITFIELD J. B.

Gamma glutamyl transferase.

Crit. Rev. Clin. Lab. Sci., 2001, 38, 263-355.

WOESSMANN W. and MIVECHI N. F.

Role of ERK activation in growth and erythroid differentiation of K562 cells.

Exp. Cell Res., 2001, 264, 193-200.

WOODLOCK T. J., BROWN R., MANI M., POMPEO L., HOFFMAN H., SEGEL G. B. and SILBER R.

Decreased L system amino acid transport and decreased gamma-glutamyl transpeptidase are independent processes in human chronic lymphocytic leukemia B-lymphocytes.

J. Cell. Physiol., 1990, 145, 217-221.

WRIGHT E. C., STERN J., ERSSER R. and PATRICK A. D.

Glutathionuria: gamma-glutamyl transpeptidase deficiency.

J. Inherit. Metab. Dis., 1980, 2, 3-7.

WRIGHTON C. J., HOFER-WARBINEK R., MOLL T., EYTNER R., BACH F. H. and DE MARTIN R.

Inhibition of endothelial cell activation by adenovirus-mediated expression of I kappa B alpha, an inhibitor of the transcription factor NF-kappa B.

J. Exp. Med., 1996, 183, 1013-1022.

XU Y. H., SATTLER G. L. and PITOT H. C.

A method for the comparative study of replicative DNA synthesis in GGT-positive and GGT-negative hepatocytes in primary culture isolated from carcinogen-treated rats.
In Vitro Cell. Dev. Biol., 1988, 24, 995-1000.

YAMAOKA S., COURTOIS G., BESSIA C., WHITESIDE S. T., WEIL R., AGOU F., KIRK H. E., KAY R. J. and ISRAEL A.
Complementation cloning of NEMO, a component of the IkappaB kinase complex essential for NF-kappaB activation.
Cell, 1998, 93, 1231-1240.

YANG H., MAGILNICK N., OU X. and LU S. C.
Tumour necrosis factor alpha induces co-ordinated activation of rat GSH synthetic enzymes via nuclear factor kappaB and activator protein-1.
Biochem. J., 2005, 391, 399-408.

YAO P. L., LIN Y. C., SAWHNEY P. and RICHBURG J. H.
Transcriptional regulation of FasL expression and participation of sTNF-alpha in response to sertoli cell injury.
J. Biol. Chem., 2007, 282, 5420-5431.

YOUNES A., GARG A. and AGGARWAL B. B.
Nuclear transcription factor-kappaB in Hodgkin's disease.
Leuk. Lymphoma, 2003, 44, 929-935.

ZHANG H., DICKINSON D. A., LIU R. M. and FORMAN H. J.
4-Hydroxynonenal increases gamma-glutamyl transpeptidase gene expression through mitogen-activated protein kinase pathways.
Free Radic. Biol. Med., 2005, 38, 463-471.

ZHANG H., LIU H., DICKINSON D. A., LIU R. M., POSTLETHWAIT E. M., LAPERCHE Y. and FORMAN H. J.
gamma-Glutamyl transpeptidase is induced by 4-hydroxynonenal via EpRE/Nrf2 signaling in rat epithelial type II cells.
Free Radic. Biol. Med., 2006, 40, 1281-1292.

ZHANG S. Q., KOVALENKO A., CANTARELLA G. and WALLACH D.
Recruitment of the IKK signalosome to the p55 TNF receptor: RIP and A20 bind to NEMO (IKKgamma) upon receptor stimulation.
Immunity, 2000, 12, 301-311.

ZHANG Z., OLIVER P., LANCASTER J. J., SCHWARZENBERGER P. O., JOSHI M. S., CORK J. and KOLLS J. K.
Reactive oxygen species mediate tumor necrosis factor alpha-converting, enzyme-dependent ectodomain shedding induced by phorbol myristate acetate.
FASEB J., 2001, 15, 303-305.

ZHU N. L., LI C., HUANG H. H., SEBALD M., LONDHE V. A., HEISTERKAMP N., WARBURTON D., BELLUSCI S. and MINOO P.
TNF-alpha represses transcription of human Bone Morphogenetic Protein-4 in lung epithelial cells.

Gene, 2007, 393, 70-80.

ZOHLNHOFFER D., GRAEVE L., ROSE-JOHN S., SCHOOLTINK H., DITTRICH E. and HEINRICH P. C.

The hepatic interleukin-6 receptor. Down-regulation of the interleukin-6 binding subunit (gp80) by its ligand.

FEBS Lett., 1992, 306, 219-222.

Résumé

La γ -glutamyltransférase (GGT) est une enzyme membranaire qui catalyse l'hydrolyse du glutathion, le principal antioxydant cellulaire. Cette enzyme est surexprimée dans de nombreux cancers (p.ex. leucémies) et appartient à une famille multigénique d'au moins treize gènes. Le gène I, qui code pour la protéine active, est exprimé en trois ARNm (A, B et C), montrant tous la même phase de lecture ouverte mais différant dans leur région 5' non traduite. A côté de l'implication de la GGT dans le développement des cancers, elle intervient également dans l'acquisition des résistances aux traitements anticancéreux et dans la synthèse des leukotriènes.

Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés aux mécanismes transcriptionnels qui régulent l'expression du gène I de la GGT. Plus particulièrement, nous avons étudié la régulation de la GGT après traitement des cellules K562 avec l'ester de phorbol, TPA, et la cytokine pro-inflammatoire, $\text{TNF}\alpha$. Ces deux substances activent les facteurs de transcription AP-1 et $\text{NF-}\kappa\text{B}$, qui sont connus pour réguler des gènes impliqués dans le développement des chimiorésistances.

Nos résultats montrent que les deux promoteurs B et C de la GGT ainsi que les trois ARNm A, B et C, la protéine GGT ainsi que l'activité enzymatique de la GGT sont induits par le $\text{TNF}\alpha$, mais pas par le TPA, dans la lignée cellulaire K562, qui est établie à partir de cellules issues d'une leucémie myéloïde chronique. Vu que l'induction du promoteur C de la GGT par le $\text{TNF}\alpha$ est fortement diminuée avec la curcumine, un agent chimiopréventif utilisé comme inhibiteur de la voie de signalisation $\text{NF-}\kappa\text{B}$, nous avons émis une première hypothèse selon laquelle le facteur de transcription $\text{NF-}\kappa\text{B}$ serait impliqué dans la régulation du promoteur C de la GGT dans les cellules K562.

Afin de prouver notre hypothèse nous avons utilisé des siRNA ciblant spécifiquement les deux sous-unités les plus représentées de $\text{NF-}\kappa\text{B}$, p50 et p65, et effectivement l'induction du promoteur C de la GGT par le $\text{TNF}\alpha$ est inhibée par ces siRNA. Des expériences par co-transfection avec des protéines de la voie $\text{NF-}\kappa\text{B}$, TRAF2, TRADD, $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ et p65, confirment davantage cette hypothèse selon laquelle le promoteur C de la GGT est régulé par la voie de signalisation $\text{NF-}\kappa\text{B}$ dans les cellules K562.

Des expériences par mutation ont ensuite permis d'identifier le site sur l'ADN qui est responsable de l'induction du promoteur C de la GGT par le $\text{TNF}\alpha$ dans les cellules K562. Ce site, localisé de -111 à -123 par rapport au site d'initiation de la transcription, est au moins capable de fixer le facteur de transcription p50 $\text{NF-}\kappa\text{B}$. A proximité de ce site, nous avons identifié un autre site fonctionnel, localisé de -73 à -92 par rapport au site d'initiation de la transcription, qui lie le facteur de transcription Sp1.

Des analyses par chromatine immunoprécipitation (ou ChIP) ont confirmé la liaison des facteurs de transcription $\text{NF-}\kappa\text{B}$ et Sp1 sur le promoteur C de la GGT et montrent de plus que l'ARN polymérase II est également recruté à cet endroit précis du promoteur. En outre, ces analyses montrent que le traitement au $\text{TNF}\alpha$ induit la liaison des facteurs de transcription p50 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ et Sp1, comparé par rapport aux cellules non traitées, sur le promoteur, et augmente considérablement le recrutement de l'ARN polymérase II à cet endroit précis du promoteur C de la GGT, expliquant ainsi l'induction observée du promoteur C de la GGT après traitement au $\text{TNF}\alpha$.

En conclusion, l'induction de la GGT par le $\text{TNF}\alpha$ peut avoir plusieurs significations biologiques importantes, à savoir augmenter la résistance aux médicaments anticancéreux, se défendre contre un stress oxydant, ou induire la synthèse des leukotriènes et donc médier l'inflammation.

Mots clés: glutathion; cytokines; facteur de nécrose tumorale; régulation génétique