UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE UFR de PHARMACIE

2004

THESE

Présentée pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

Spécialité : Biochimie et Biologie Moléculaire

Par **Michael SCHNEKENBURGER** Né le 22 novembre 1977 à Saint-Dizier (52)

Régulation de l'expression de la glutathion S-transférase P1-1 au cours de la différenciation de la lignée leucémique humaine K562

Présentée et soutenue publiquement le 18 décembre 2004

Membres du Jury

Monsieur le Professeur Mario DICATO (Luxembourg) : Président de Jury Monsieur le Professeur Laurent DEGOS (Paris) : Rapporteur Monsieur le Professeur Athanase VISVIKIS (Nancy) : Rapporteur Monsieur le Docteur Marc DIEDERICH (Luxembourg) : Examinateur Madame le Professeur Chantal TRENTESAUX (Reims) : Directeur de thèse Monsieur le Docteur Franck MORCEAU (Luxembourg) : Co-Directeur

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés

au « Laboratoire de Recherche sur le Cancer et les Maladies du Sang » au Centre Universitaire du Luxembourg

pendant les deux premières années de ma thèse puis, au cours de la troisième année, le laboratoire a déménagé et est devenu le

> « Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer » à l'Hôpital Kirchberg, Luxembourg

Ce travail n'aurait pu aboutir sans le soutien financier :

du Ministère de la Culture, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Luxembourgeois (bourse de formation-recherche BFR 01/063),

de la Fondation « Recherche Cancer et Sang (FRCS) »

de l'Association « Recherche Scientifiques Luxembourg (RSL),

du « Télévie Luxembourg » et

de l'Association « Een Häerz fir kriibskrank Kanner (Un cœur pour les enfants atteints d'un cancer) » Par ces quelques lignes, il est temps de remercier chacun de ceux qui m'ont soutenu et qui ont participé (de près ou de loin) à l'aboutissement de ce travail.

En premier lieu, je tiens à remercier M. le Professeur Mario Dicato qui est le président de la fondation « Recherche Cancer et Sang » d'avoir donné la permission de réaliser ce travail de thèse pour la Fondation de Recherche Cancer et Sang (FRCS). Je le remercie également de m'avoir fait l'honneur de m'avoir accordé du temps pour juger ce travail.

Je remercie particulièrement M. le Docteur Marc Diederich qui a accepté de m'accueillir au sein du laboratoire RCMS et de m'intégrer dans son équipe.

Je lui suis reconnaissant de l'intérêt qu'il a toujours su porter à mon travail et pour la confiance qu'il m'a accordé (*et pour m'avoir « confié quelques-uns des secrets de la GSTP1-1 et en partie son sort... »*). Je lui adresse tous mes remerciements, pour m'avoir encadré tout au long de mes recherches avec encouragements, pour m'avoir fait partager son expérience et ses compétences ainsi que de son aide à toutes les étapes de ce travail et notamment pour les corrections qu'il a apportées à ce manuscrit. Ce fut une réelle chance que de croiser son chemin et ces années ont été très riches en enseignements aussi bien au niveau scientifique qu'humain et qui constituent pour moi une inestimable expérience.

Enfin, je ne saurais m'arrêter ici sans également remercier Marc pour l'organisation de congrès scientifiques au Luxembourg, pour ce qu'ils apportent au laboratoire et pour ce qu'ils m'ont apporté, ainsi que pour son aide lors de la recherche de mon stage post-doctoral.

J'exprime ma profonde reconnaissance à M. le Docteur Franck Morceau pour avoir pris la co-direction de ma thèse. Sans lui ce travail n'aurait pas pu prendre jour. Il a su guider mes premiers pas dans le monde de la différenciation cellulaire et notamment de ces fameux GATA-1, globines, anthracyclines et bien sûr de ces « magiques » cellules K562, ainsi que m'initier aux techniques de biologie moléculaire. La passion pour son travail, son enthousiasme et l'intérêt qu'il a toujours témoigné vis-à-vis de mon travail ont été des encouragements quotidiens.

Je lui adresse tout particulièrement mes remerciements, pour toute l'aide qu'il m'a apporté, sa très grande disponibilité, pour ses qualités humaines et pédagogiques qui ne sont plus à démontrer et pour sa patience au cours de ces années.

Enfin, Franck trouve ici le témoignage de ma sincère reconnaissance pour tes conseils précieux et constructifs ainsi que pour tes relectures avisées et tes corrections que tu as

apportées à ce manuscrit qui ont permis d'améliorer sa qualité et son aspect didactique. Je suis très heureux d'avoir travaillé sous ta direction, d'avoir pu profiter de nos discussions fleuves pendant lesquelles tu m'as transmis ton savoir, ta rigueur scientifique et tant d'autres choses.

J'exprime ma gratitude à Mme. le Professeur Chantal Trentesaux qui m'a permis d'entrer en contact avec le laboratoire RCMS et plus particulièrement avec Marc Diederich et Franck Morceau. Sans votre aide, ce travail n'aurait jamais pu commencer. Ensuite je vous remercie d'avoir pris la co-direction de ma thèse et pour m'avoir guidé tout au long de ma thèse avec la grande gentillesse qui vous caractérise. Enfin, Chantal trouvez ici toute ma reconnaissance pour le temps consacrée à la correction de ce manuscrit.

Je remercie particulièrement, M. le Professeur Laurent Degos et M. le Professeur Athanase Visvikis d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse et surtout d'avoir accepté de venir de loin et de consacrer une partie de leur temps pour juger ce travail. J'espère que ce mémoire saura éveiller leur attention. Leurs avis et leurs remarques ont permis d'améliorer le contenu de cette thèse.

Mon travail a également été appuyé par l'équipe de Mr le Docteur Craig Tomlinson. Je tiens donc à le remercier, ainsi que toute son équipe, pour m'avoir « hébergé » dans son laboratoire pour les expériences d'hybridations de micropuces à ADN au cours d'un voyage à Cincinnati (Ohio, USA). Je tiens à remercier, par la même occasion, M. le Professeur Alvaro Puga pour son accueil, son hospitalité et sa grande convivialité pendant ce séjour.

TABLE DES MATIERES

ABREVIATIONS ET SYMBOLES	1
TABLE DES ILLUSTRATIONS	4
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	7
I- INTRODUCTION GENERALE	8
I. 1- La pathologie cancéreuse	8
I. 2- Cancer et moyens thérapeutiques	8
I. 3- La résistance aux médicaments anticancéreux	10
I. 4- La résistance aux médicaments et la différenciation en tant que thérapie	12
II- GLUTHATION ET CHIMIORESISTANCE	13
II. 1- Le système du gluthation	13
II. 2- Enzymes intervenant dans la synthèse et la conjugaison du glutathion	16
III- LA GLUTATHION S-TRANSFERASE P1-1 (GSTP1-1) : ROLE,	
REGULATION ET CANCER	22
III. 1- Généralités	22
III. 2- GSTP1-1 et cancer	22
III. 3- Etude du mécanisme de régulation transcriptionnelle	27
IV- LA DIFFERENCIATION EN TANT QUE THERAPIE : « LA THERAPIE	
DIFFERENCIANTE »	36
IV. 1- Hématopoïèse et différenciation	36
IV. 2- Induction de la différenciation des cellules cancéreuses	38
V- LA LIGNEE K562 COMME MODELE D'ETUDE DE LA DIFFERENCIATIO	N
•••••••••••••••••••••••••••••••••••••••	41
V. 1- La lignée K562	41
V. 2- Les facteurs de transcription impliqués dans la différenciation hématopoïétique.	41
BUT DU TRAVAIL	52
MATERIELS ET METHODES	56
I- CULTURE ET MANIPULATION DE CELLULES EUCARYOTES	57
I. 1- Les lignées cellulaires	57
I. 2- Les conditions de culture	60
I. 3- Viabilité des cellules : test de coloration au bleu trypan	60
II- LES EFFECTEURS PHARMACOLOGIQUES ET TRAITEMENTS	
CELLULAIRES	61
II. 1- Les inducteurs de la différenciation	61
II. 2- Autres agents utilisés	64
III- MISE EN EVIDENCE DE LA DIFFERENCIATION ERYTHROIDE OU	
MEGACARYOCYTAIRE DES CELLULES K562	66
III. 1- Mise en évidence de la différenciation érythroïde des cellules K562 : test à la	
benzidine	66
III. 2- Mise en évidence de la différenciation mégacaryocytaire des cellules K562 : étu	ude
de l'expression du marqueur de surface CD61 par cytométrie en flux	67
IV-EXTRACTION DES FACTEURS NUCLEAIRES ET CYTOPLASMIQUES	69
IV. 1- Principe	69
IV. 2- Réactifs	69
IV. 3- Protocole	70
IV. 4- Détermination de la concentration protéique des extraits cellulaires	70
V- PREPARATION D'EXTRAITS D'ARN	71

V. 1- Extraction des ARN totaux	71
V. 2- Détermination de la concentration en ARN des extraits cellulaires	71
V. 3- Détermination de la qualité des extraits d'ARN par la technologie Agilent	71
VI- ETUDE DE L'EXPRESSION DE L'ARNm DE GSTP1-1 PAR NORTHER	Ν
BLOT	73
VI. 1- La sonde d'ADNc	73
VI. 2- Northern blot et hybridation	74
VII- ETUDE DE L'EXPRESSION DE L'ARNM PAR REVERSE TRANSCRIP	TASE
-POLYMERASE CHAIN REACTION (RT-PCR)	77
VII. 1- Transcription inverse	77
VII. 2- Amplification par polymerase chain reaction (PCR)	77
VIII- ETUDE DE L'EXPRESSION PROTEIQUE PAR WESTERN BLOT	79
VIII. 1- Principe	79
VIII. 2- Réactifs	79
VIII. 3- Protocole	80
IX- ETUDE DE L'ACTIVITE LIANTE DES FACTEURS DE TRANSCRIPTIO	ON .82
IX. 1- Principe	82
IX. 2- Les sondes oligonucléotidiques	82
IX. 3- Retard de migration sur gel	85
IX. 4- Supershift	87
X- ETUDE DE LA REGULATION TRANSCRIPTIONNELLE PAR	
TRANSFECTION TRANSITOIRE	89
X. 1- Les vecteurs recombinants utilisés	89
X. 2- Transformation des bactéries	89
X. 3- Purification des plasmides (maxipréparation d'ADN plasmidique)	90
X. 4- Transfection transitoire des cellules et mesure de l'activité transcriptionnelle	91
XI- ETUDE DU TRANSCRIPTOME PAR LA TECHNIQUE DES MICROPUO	CES A
	94
XI. 1- Principe général	94
XI. 2- Préparation des micropuces : obtention et dépôt des sondes sur lame (printin	1g)96
XI. 3- Préparation des échantillons cibles : synthèse des ADNc et marquage	97
XI. 4- Hybridation	100
XI. 5- Acquisition et traitements des résultats	100
XII- ANALYSE STATISTIQUE DES DONNEES	102
KESULIAIS	103
I- EI UDE DE L'EAPRESSION DU GENE DE LA GSIPI-I AU COURS DE L DIFFEDENCIATION DES CELLULES V542	A 105
L 1 Différenciation vers la voie éruthroïde	105
I. 1- Differenciation vers la voie er yunoide	105
I. 2- Induction de la différenciation par le butyrate	110
I. 5- Induction de la différenciente sur l'expression de l'ADNm de GSTD1 1 dens	12J
1. 4- Effet des agents différenciains sur l'expression de l'ARNII de OSTF1-1 dans	122
II FTIDE DE LA DECHI ATION TRANSCRIPTIONNELLE DE LA CSTRI	1 ATT
COURS DE L'INDUCTION DE LA DIFFÉRENCIATION	-1 AU 140
II 1- Recherche de séquences cibles de facteurs de transcription spécifiques de la	140
différenciation hématopoïétique	140
II 2- Effet de la différenciation des cellules K 562 sur la transactivation d'un gène	140
rapporteur sous le contrôle de sites GATA par transfection transitoire	145
II 3- Etude de la capacité de liaison des facteurs de transcription aux sites GATA	1 et
GATAp du promoteur de la GSTP1-1	
1 1	

II. 4- Etude de la capacité de liaison de GATA-1 aux sites GATAd et GATAp du	
promoteur de la GSTP1-1 dans les cellules K562 induites à se différencier	161
II. 5- Effet de l'inhibition de la traduction sur l'activité différenciante et sur la synthetie	nèse
de novo de protéines	183
III- EFFETS DE LA DIFFERENCIATION ERYTHROÏDE INDUITE PAR LA	DOX
SUR LE TRANSCRIPTOME	189
DISCUSSION	198
I- CHOIX DU SYSTEME D'ETUDE	199
II- INDUCTION DE LA DIFFERENTIATION	200
II. 1- Induction de la différenciation érythroïde	201
II. 2- Induction de la différenciation mégacaryocytaire	202
II. 3- Induction de la différenciation par le butyrate	203
III- ETUDE DE L'EXPRESSION DU GENE GSTP1-1 AU COURS DE LA	• • • •
DIFFERENCIATION	206
III. 1- Effet de l'induction de la différenciation érythroïde par les anthracyclines sur	
l'expression de la GSTPI-1	206
III. 2- Effet de l'induction de la differenciation erythroide par l'hemine sur l'expres	sion
de la GSTPI-I	207
III. 3- Effet de l'induction de la différenciation megacaryocytaire par le TPA sur	200
l'expression de la GSTPI-1	208
III. 4- Effet de l'induction de la différenciation par le butyrate sur l'expression de la	200
USIFI-I	209
lignáe Jurkat	31a 211
IN- MECANISMES MOI FOUL AIRES LIANT L'EXPRESSION DE LA CSTP	211 1_1 A
I A DIFFERENCIATION	212
IV 1- Mise en évidence de sites GATA dans le promoteur de la GSTP1-1	212
IV 2- Effet des inducteurs de différenciation K 562 sur la transactivation d'un gène	212
rapporteur sous le contrôle de sites GATA	213
IV. 3- Etude de l'activité liante des sites GATA identifiés dans le promoteur de la	
GSTP1-1	214
IV. 4- Etude de l'activité liante du site GATAd au cours de la différenciation	215
V- ETUDE DES MECANISMES POST-TRANSCRIPTIONNELS IMPLIQUES	
DANS LA REGULATION DE L'EXPRESSION DE LA GSTP1-1	218
V. 1- Etude de la stabilité de l'ARNm de GSTP1-1 après traitement par l'hémine	218
V. 2- Stabilité de l'ARNm de GSTP1-1 après traitement par le butyrate	220
V. 3- Effet de l'inhibition de la traduction sur l'activité différenciante et sur la synth	ıèse
de novo de protéines	221
VI- EFFETS DE LA DIFFERENCIATION ERYTHROÏDE INDUITE PAR LA	DOX
SUR LE TRANSCRIPTOME	222
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	224
I- Conclusion	225
II- Perspectives	228
BIBLIOGRAPHIE	230
PUBLICATIONS ISSUES DE CE TRAVAIL	256

ABREVIATIONS ET SYMBOLES

aa	aminoallyl
Acla	aclarubicine
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
AMPc	adénosine mono phosphate cyclique
AP-1	activator protein 1
ARE	élément de réponse aux antioxydants (Antioxidant Response
	Element)
ARN	acide ribonucléique
ARNase	ribonucléase
ARNm	ARN messager
ARNr	ARN ribosomique
ATF	activating transcription factor
ATP	adénosine tri-phosphate
ATRA	all-trans-retinoic-acid
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
BKLF	basic krüppel-like factor
bZIP	basic region leucine zipper
CBP	CREB binding protein
CDK	protéine kinase cycline-dépendante (cyclin-dependant
	protein kinase)
ChIP	immunoprécipitation de la chromatine (Chromatin
	Immunoprecipitation)
СНХ	cycloheximide
CREB	cAMP responsive element binding protein
Cv	cvanine
DAF	decay-accelerating factor
DEPC	diéthyl-pyrocarbonate
DMSO	diméthylsulfoxide
Dox	doxorubicine
DTT	dithiotréitol
FDTA	acide éthylènediamine tétracétique
FGF	enidermal growth factor
FGTA	acide éthylèneglycol tétracétique
FKLE	erythroïd Kriippel-like factor
eALAS	5-aminolevulinate synthétase
FMSA	electrophoretic mobility shift assay
FRK	extracellular signal regulated kinase
ERK	ospèces régetives de l'exugène
ENO EDVE 1	espèces reactives de l'oxygene
	insthice venete de flueres séine
FIIC FOC1	fiscand of C ATA 1
	Inend of GATA-1
гон	Ionicie sumulating normone
GATAC	UATA consensus
GATAcm	GATA consensus mutée
GATAd	GATA distale

GATAdm	GATA distale mutée		
GATAp	GATA proximale		
GATApm	GATA proximale mutée		
GCS	gamma-glutamylcystéine synthétase		
GCL	gamma-glutamylcystéine ligase		
GGT	gamma-glutamyltransférase		
GKLF	gut-enriched krüppel-like factor		
Glv A	glycophorine A		
GPIIIA	glycoprotéine IIIA		
GSH	glutathion		
GSSG	glutathion disulfide		
GST	glutathion S-transférase		
HO	perovyde d'hydrogène		
	histone désacétulase		
	hydroxyathyl piperazina athana sulfonia agid		
	factour du choa thermique (heat choak factor)		
	nación du choc inclinique (neai snock factor)		
	inkikiter of kongeD		
IKB			
IKK	IKB kinase		
JNK	c-JUN N-terminal Kinase		
Kb	kilobase		
KDa	kilodalton		
LAL	leucémie aiguë lymphoblastique		
LAM	leucémie aiguë myéloblastique		
LB	Luria Bertani		
LCR	locus control region		
LKLF	lung krüppel-like factor		
LLC	leucémie lymphoïde chronique		
LMC	leucémie myéloïde chronique		
Lox	15-lipoxygénase		
MAP	mitogen-activated proein		
MAPK	MAP kinase		
MDR	résistance multiple aux drogues (multidrug resistance)		
MEK	MAPK/ERK kinase		
MEL	cellules érythroleucémiques murines (Murine erythroleukemia)		
MKK	MAP kinase kinase		
MOPS	acide 4-morpholino propane sulfonique		
MRP	protéine de résistance multiple aux drogues		
	(multidrug-resistance protein)		
NADPH	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, forme réduite		
NaN ₃	azide de sodium		
NFE-1	nuclear factor erythroid 1		
NFE-2	nuclear factor erythroid 2		
NF-ĸB	nuclear Factor-kappa B		
NIK	NF- κ B inducing kinase		
NRF	NF-F2-related factor		
NT	(région) non-traduite		
0.	ovygène moléculaire		
O_2	anion superoxyde		
∇_2	alucoprotáine P		
1-5P	Siycopioteme-i		

PSA	persulfate d'ammonium
Pb	paire de base
PBGD	porphobilinogène désaminase
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
РКА	protéine kinase A
РКС	protéine kinase C
PMSF	phényl méthyl sulfonyl fluoride
R-EPO	récepteur de l'érythropoïétine
RT-PCR	reverse transcriptase-polymerase chain reaction
SCL	stem cell leukemia
SDS	sodium dodecyl sulfate
SSC	saline sodium citrate
SVF	sérum de veau foetal
TE	Tris EDTA
TBHQ	tert-Butylhydroquinone
TBE	Tris borate EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tétraméthyle éthylène diamine
TNF	facteur de nécrose des tumeurs (tumor necrosis factor)
TNF-R1	TNF receptor 1
TRAF	TNF receptor associated factor
TPA	12-O-tétradécanoyl-phorbol-13-acétate
TRE	élément de réponse au TPA (TPA response element)
TSA	trichostatine A
U.A.	unités arbitraires
UKLF	ubiquitous krüppel-like factor
UV	ultra-violet
Val	valine
VEGF	vascular endothelial growth factor

TABLE DES ILLUSTRATIONS

≻ <u>FIGURES</u>:

Figure 1 : Formule semi-développée du glutathion
Figure 2 : Représentation schématique du métabolisme du glutathion17
Figure 3 : Le promoteur de la GSTP1-1
Figure 4 : Structure de différents domaines de liaison à l'ADN
Figure 5 : Schéma de l'hématopoïèse
Figure 6 : La lignée cellulaire K562 est multipotente
Figure 7 : L'hématopoïèse
Figure 8 : Formules semi-développées des agents utilisés pour induire la différenciation des cellules
K562
Figure 9 : Principe général de l'analyse de l'expression transcriptionnelle sur une puce à ADN de type
« spottée » (adapté de Duggan <i>et al.</i> , 1999)
<u>Figure 10</u> : Pourcentage de cellules K562 hémoglobinisées en fonction de la concentration d'acla ou
de dox
<u>Figure 11</u> : Inhibition de croissance des cellules K562 en fonction de la concentration d'acla ou de
dox
<u>Figure 12</u> : Pourcentage de cellules K562 hémoglobinisées en fonction du temps de traitement par
I acla ou la dox
Figure 13 : Inhibition de croissance des cellules K562 en fonction du temps de traitement par l'acla ou
Figure 14: Expression de l'ARNm de GSTPI-1 dans les cellules K562 au cours de 6 jours d'induction
de la différenciation erythroide par les anthracyclines
<u>Figure 15</u> : Expression de la proteine GSTP1-1 dans les cellules K562 au cours de 6 jours d'induction
de la differenciation erythroide par les anthracyclines.
<u>Figure 16</u> : Hemoglobinisation des cellules K562 en fonction de la concentration en hemine
<u>Figure 17</u> : Hemoglobinisation des cellules K562 en fonction du temps de traitement par l'hemine 114
Figure 18 : Expression de l'ARNm de GSTPI-1 dans les cellules K562 au cours de 5 jours d'induction
de la différenciation érythroide par l'hémine
<u>Figure 19</u> : Expression de la proteine GSTPI-1 dans les cellules K562 au cours de 5 jours d'induction
de la differenciation erythroide par l'hemine. $11/$
<u>Figure 20</u> : Quantification de la differenciation megacaryocytaire des cellules K562 en fonction de la
Eigene 21. Juliitéen de engineeren des cellules K562 en fenetien de la concentration en TDA
<u>Figure 21</u> : Inhibition de croissance des cellules K562 en fonction de la concentration en TPA
<u>Figure 22</u> : Pourcentage de centries K562 exprimant le marqueur CD61 en fonction du temps de
Figure 22 - Expression de l'ADNm de CSTD1 1 dans les cellules K562 enrès 1 è 6 jours d'induction
<u>Figure 25</u> : Expression de l'ARINM de GSTPT-1 dans les centres K502 après 1 à 0 jours d'induction
Eigene 24. Expression de la protétice CSTD1.1 dere les cellules K562 en cours de 1 à Gierre
<u>Figure 24</u> : Expression de la proteine GSTPI-1 dans les cellules K562 au cours de 1 a 6 jours
a induction de la différenciation megacaryocytaire par le TPA
<u>Figure 25</u> : Suivi de la differenciation erythroide ou megacaryocytaire en fonction de concentrations
$\frac{127}{12}$
<u>Figure 20</u> : Effet sur les caracteristiques cellulaires de la lignee K562 au cours de 6 jours d'induction
Les a uniferenciation erythronde ou megacaryocytaire par le butyrate
<u>Figure 21</u> . Expression de l'ARIVIII de OSTFT-1 dans les centres K502 au cours de 0 jours d'induction de la différenciation énuthroïde (1 mM) et mégacanyacuteire (2 mM) par la hyterrate 120
Lie la uniferenciation el vultoride (1 mivi) el megacal yocytalle (2 mivi) par le outyrate
<u>rigure 20</u> . Expression de la proteine OSTFT-1 dans les centres K502 au cours de 0 jours d'induction de la différenciation émithroïde (1 mM) et mégacamacauteire (2 mM) par la huturate 121
ue la universitation el vinione (1 mivi) el megacal yocytane (2 mivi) par le outyrate
<u>Figure 27</u> . Enci de 50 μ vi d'hemme sur la promeration centrane de la figure Jurkat au cours de 5 jours de traitement
jours de traitement

<u>Figure 30</u> : Expression de l'ARNm de GSTP1-1 dans les cellules Jurkat après 1 à 3 jours de traitement
Figure 31 · Effet des inducteurs de la différenciation de la lignée K 562 sur la prolifération cellulaire de
la lignée Jurkat au cours de 6 jours de traitement
Figure 32 · Effet des inducteurs de la différenciation de la lignée K562 sur l'expression de l'ARNm de
<u>GSTP1-1</u> dans la lignée Jurkat au cours de 6 jours de traitement
Figure 33 · Résultat de la recherche assistée par ordinateur de sites de fivation de facteurs de
regule 35. Resultat de la recherche assiste par ordinateur de sites de fixation de facteurs de 1/3
Figure 24 : La promotour de la CSTD1 1
<u>Figure 35</u> . Le promoteur de la OSTF1-1
<u>Figure 55</u> . Activite transcriptionnene d'un promoteur sous le controle de GATA après la auravergassion de concentrations ergissentes du factour CATA 1 au CATA 1 muté
surexpression de concentrations croissantes du facteur GATA-1 ou GATA-1 mute
<u>Figure 50</u> : Activite transcriptionnelle d'un promoteur sous le controle de GATA après la
Surexpression du facteur GATA-1
<u>Figure 37</u> : Activité transcriptionnelle d'un promoteur sous le contrôle de GATA après induction de la $\frac{1500}{1000}$
differenciation des cellules K562
Figure 38 : Activité liante des facteurs nucléaires des différentes lignées leucémiques avec les sondes
GATA distale, proximale et consensus
<u>Figure 39</u> : Activité liante des facteurs nucléaires des différentes lignées leucémiques avec les sondes
GATA mutées
<u>Figure 40</u> : Effet du temps et de la température d'incubation sur l'activité liante des protéines
nucléaires de la lignée K562156
<u>Figure 41</u> : Mise en évidence de la spécificité des complexes C3 et C4 obtenues avec la sonde GATAd
et les extraits de cellules K562 par compétition avec des sondes froides159
Figure 42 : Identification des protéines contenues dans les complexes de liaison obtenus avec la sonde
GATA distale et les extraits nucléaires de cellules K562160
Figure 43 : Modulation de l'activité liante des facteurs nucléaires des cellules K562 au cours de 6
jours d'induction de la différenciation érythroïde par les anthracyclines
Figure 44 : Modulation de l'activité liante des facteurs nucléaires des cellules K562 au cours de 5
jours d'induction de la différenciation érythroïde par l'hémine165
Figure 45 : Expression de l'ARNm de GATA-1 dans les cellules K562 au cours de 5 jours d'induction
de la différenciation érythroïde par l'hémine
Figure 46 : Etude de l'activité liante des facteurs nucléaires de cellules K562 à la sonde NF-κB-323 au
cours de 5 jours d'induction de la différenciation érvthroïde par l'hémine
Figure 47 : Etude de l'activité liante des facteurs nucléaires de cellules K562 à la sonde AP-1-73 au
cours de 5 jours d'induction de la différenciation érythroïde par l'hémine
Figure 48 : Etude de la stabilité de l'ARNm de GSTP1-1 dans les cellules K562 après 48 h de
traitement nar l'hémine
Figure 49 · Modulation de l'activité liante des facteurs nucléaires extraits des cellules K562 après 6
iours d'induction de la différenciation mégacarvocytaire par le TPA
Figure 50 : Modulation de l'activité liante des facteurs nucléaires des cellules K562 au cours de 6
<u>iours d'induction de la différenciation érythroïde et mégacaryocytaire par le butyrate</u>
Figure 51 : Expression de l'ARNm de GATA 1 et GATA 2 dans les cellules K 562 au cours de
<u>Pigure 51</u> . Expression de l'ARNIII de OATA-1 et OATA-2 dans les centres K502 au cours de
Finduction de la differenciation par le outyrate
<u>Figure 52</u> : Modulation de l'activité name des facteurs nucleaires des centres K.502 au cours de 6
Jours a induction de la differenciation erythroide et megacaryocytaire par le butyrate
<u>Figure 55</u> : Etude de la stabilite de l'AKNM de GSTPI-I dans les cellules K562 après 48 h de
traitement par le outyrate. 182
Figure 54 : Effets du CHX sur l'augmentation de l'expression de l'ARNm de GSTP1-1 induite par
l'acla, la dox et l'hémine au cours de la différenciation érythroïde des cellules K562
<u>Higure 55</u> : Schéma expérimental des comparaisons d'expression du transcriptome de cellules K562
induites ou non à se différencier vers la voie érythroïde par la dox pendant 3 jours utilisé dans l'étude
par hybridation de micropuces
Figure 56 : Etapes du protocole d'étude du transcriptome par hybridation d'une lame de micropuce.

► <u>TABLEAUX</u>:

Tableau 2 : La superfamille des GSTs humaines.20Tableau 3 : Exemples de cancers associés à une expression de GSTP1-1 élevée.23Tableau 4 : Les différents membres des familles qui constituent les facteurs capables de se fixer sur un site AP-1.32Tableau 5 : Lignées cellulaires utilisées pour l'étude de l'expression de la GSTP1-1 humaine.57Tableau 6 : Séquences des oligonucléotides utilisés pour les expériences d'amplification par PCR.78Tableau 7 : Description des anticorps primaires et secondaires utilisés en western blot.80Tableau 8 : Séquences des oligonucléotides utilisés pour les expériences de retard sur gel.83Tableau 9 : Anticorps utilisés pour les supershifts (Santa Cruz Biotechnology).88Tableau 10 : Effets du CHX sur la prolifération cellulaire et l'hémoglobinisation des cellules K562184	Tableau 1 : Agents cytotoxiques éliminés par le GSH et entraînant la résistance	16
Tableau 3 : Exemples de cancers associés à une expression de GSTP1-1 élevée. 23 Tableau 4 : Les différents membres des familles qui constituent les facteurs capables de se fixer sur un 32 Tableau 5 : Lignées cellulaires utilisées pour l'étude de l'expression de la GSTP1-1 humaine. 57 Tableau 6 : Séquences des oligonucléotides utilisés pour les expériences d'amplification par PCR. 78 Tableau 7 : Description des anticorps primaires et secondaires utilisés en western blot. 80 Tableau 8 : Séquences des oligonucléotides utilisés pour les expériences de retard sur gel. 83 Tableau 9 : Anticorps utilisés pour les supershifts (Santa Cruz Biotechnology). 88 Tableau 10 : Effets du CHX sur la prolifération cellulaire et l'hémoglobinisation des cellules K562 184	Tableau 2 : La superfamille des GSTs humaines	20
Tableau 4 : Les différents membres des familles qui constituent les facteurs capables de se fixer sur un 32 Tableau 5 : Lignées cellulaires utilisées pour l'étude de l'expression de la GSTP1-1 humaine	Tableau 3 : Exemples de cancers associés à une expression de GSTP1-1 élevée.	23
site AP-1. 32 <u>Tableau 5</u> : Lignées cellulaires utilisées pour l'étude de l'expression de la GSTP1-1 humaine	Tableau 4 : Les différents membres des familles qui constituent les facteurs capables de se fixer sur	un
<u>Tableau 5</u> : Lignées cellulaires utilisées pour l'étude de l'expression de la GSTP1-1 humaine	site AP-1.	32
<u>Tableau 6</u> : Séquences des oligonucléotides utilisés pour les expériences d'amplification par PCR78 <u>Tableau 7</u> : Description des anticorps primaires et secondaires utilisés en western blot	Tableau 5 : Lignées cellulaires utilisées pour l'étude de l'expression de la GSTP1-1 humaine	57
<u>Tableau 7</u> : Description des anticorps primaires et secondaires utilisés en western blot. 80 <u>Tableau 8</u> : Séquences des oligonucléotides utilisés pour les expériences de retard sur gel. 83 <u>Tableau 9</u> : Anticorps utilisés pour les supershifts (Santa Cruz Biotechnology). 88 <u>Tableau 10</u> : Effets du CHX sur la prolifération cellulaire et l'hémoglobinisation des cellules K562 184	Tableau 6 : Séquences des oligonucléotides utilisés pour les expériences d'amplification par PCR	78
<u>Tableau 8</u> : Séquences des oligonucléotides utilisés pour les expériences de retard sur gel	Tableau 7 : Description des anticorps primaires et secondaires utilisés en western blot.	80
<u>Tableau 9</u> : Anticorps utilisés pour les supershifts (Santa Cruz Biotechnology)	Tableau 8 : Séquences des oligonucléotides utilisés pour les expériences de retard sur gel	83
Tableau 10: Effets du CHX sur la prolifération cellulaire et l'hémoglobinisation des cellules K562induites à se différencier vers la voie érythroïde.184	Tableau 9 : Anticorps utilisés pour les supershifts (Santa Cruz Biotechnology)	88
induites à se différencier vers la voie érythroïde	Tableau 10 : Effets du CHX sur la prolifération cellulaire et l'hémoglobinisation des cellules K562	
	induites à se différencier vers la voie érythroïde	.184

Etude bibliographique

G

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Etude bibliographique

I- INTRODUCTION GENERALE

I. 1- La pathologie cancéreuse

Le cancer est l'une des principales causes de mortalité et sa proportion ne cesse d'augmenter. Sous le terme de cancer, on regroupe plusieurs dizaines de maladies distinctes (certainement entre 100 et 200), qui se caractérisent toutes par un dérèglement du cycle cellulaire. Ces cellules sont bloquées à un stade précoce du processus de différenciation/maturation et elles ne répondent plus aux facteurs contrôlant la prolifération et la différenciation entraînant une croissance anarchique des cellules. Ainsi, elles sont engagées dans un processus d'immortalisation, prolifèrent indéfiniment, n'assument plus les fonctions biologiques pour lesquelles elles étaient destinées et par conséquent donnent naissance à un clone malin appelé tumeur.

En revanche, quand son origine est liée à des cellules qui sont issues d'un système d'organes répartis dans tout le corps, on parle alors de leucémies ou de lymphomes. De ce fait, le cancer apparaît comme une maladie complexe, qui croît au détriment de l'organisme sans autre finalité apparente que la destruction et la mort.

D'une manière générale, la meilleure façon de réduire les risques de développer un cancer consiste à minimiser ces facteurs externes et de s'orienter vers une stratégie de prévention: la chimioprévention.

I. 2- Cancer et moyens thérapeutiques

En matière de lutte contre la pathologie cancéreuse, la cancérologie a fait et continue à faire des progrès, grâce à l'amélioration progressive des modalités thérapeutiques et en diversifiant les procédés utilisés. Mais la meilleure façon, à long terme, d'obtenir les chances de survie les plus élevées est d'améliorer le dépistage afin de permettre une prise en charge et un traitement le plus précoce possible.

Lorsque la tumeur est encore bien localisée, l'exérèse reste le traitement le plus adapté. Cependant, la chirurgie peut entraîner la formation de métastases et / ou la dissémination des cellules tumorales. La radiothérapie, qui utilise des rayonnements ionisants est également couramment utilisée pour des tumeurs localisées, et souvent de manière complémentaire à la chirurgie.

Néanmoins, certains types de cancers comme les lymphomes ou les leucémies ne peuvent être traités que par une stratégie médicamenteuse, la chimiothérapie. Cette stratégie constitue un outil thérapeutique prépondérant, seul ou en complément d'autres thérapeutiques. De plus, elle est aussi bien utilisée pour réduire le volume de la masse tumorale primaire que pour éliminer les cellules circulantes et métastasiques.

La chimiothérapie consiste en l'utilisation d'agents qui interfèrent avec le métabolisme et la vie cellulaire, ce sont des agents cytotoxiques (qui provoquent la mort cellulaire) et cytostatiques (qui bloquent la croissance cellulaire) naturels ou de synthèse.

Si ces médicaments entrent dans des classes précises, certains d'entre eux peuvent avoir une activité préférentielle de type antibiotique par exemple mais aussi une activité alkylante. Ces produits anticancéreux peuvent intervenir, seuls, ou en potentialisant l'effet d'autres thérapeutiques : les agents se liant à l'ADN sont connus notamment pour potentialiser l'effet de la radiothérapie. Ils peuvent intervenir à toutes les phases du cycle cellulaire et, le plus souvent, sur la phase la plus active, c'est-à-dire la phase (S) de synthèse.

Il existe aujourd'hui différents médicaments disponibles, classés en plusieurs groupes :
Les antimétabolites sont des produits voisins des métabolites normaux, mais qui se substituent à des nucléotides. Par ce biais, ils empêchent les synthèses nucléotidiques ; secondairement, ils empêchent la réplication d'ADN, rendant la mitose impossible.

- Les alcoylants ou alkylants agissent directement sur l'ADN grâce à la présence de deux groupements alkyles très électrophiles. Ils présentent donc une affinité pour les structures nucléophiles tels que les acides nucléiques, provoquant des lésions qui empêchent la duplication et la transcription.
- Les intercalants. Leur mode d'action est basé sur une interaction avec l'ADN. De nombreux dérivés dépendent de cette classe de médicaments et particulièrement les anthracyclines qui correspondent à l'une des familles les plus importantes de produits anticancéreux dont le chef de file est la doxorubicine. Outre l'interaction avec l'ADN, les anthracyclines interviennent par d'autres mécanismes notamment par formation de radicaux libres (superoxydes) qui génèrent des cassures de l'ADN et par liaison avec les membranes cellulaires au niveau des lipides.

- Les "poisons" du fuseau ou antimitotiques sont pour la plupart des extraits de plantes. Les alcaloïdes de la pervenche interviennent en empêchant la formation du fuseau achromatique rendant impossible la division cellulaire.
- Les inhibiteurs de topoisomérase II regroupent des médicaments qui peuvent agir selon deux mécanismes d'action. Le premier groupe est constitué de substances capables de s'intercaler entre les bases de l'ADN et les molécules du second groupe peuvent inhiber de manière directe l'action de la topoisomérase II mais sans activité intercalante avec l'ADN.
- Les inhibiteurs de protéines à activité tyrosine kinase ont directement pour cible spécifique le système enzymatique (Bcr-Abl) responsable de l'activation cellulaire des cellules cancéreuses de la leucémie myéloïde chronique (LMC).
- Les modulateurs de la réponse immunitaire ont pour objectif de stimuler la réponse immune anticancéreuse. Ces produits comprennent essentiellement l'interleukine II et l'interféron.

La plupart de ces molécules sont peu ou pas sélectives. Elles agissent aussi bien sur les cellules néoplasiques que sur les cellules saines, même si les médicaments anticancéreux ne sont efficaces que sur les cellules en division et donc sur un tissu à renouvellement cellulaire rapide. Ceci explique la toxicité et les nombreux effets secondaires rencontrés lors d'une chimiothérapie.

I. 3- La résistance aux médicaments anticancéreux

De nombreuses tumeurs exposées à de fortes concentrations de principe actif développent des phénomènes de résistance vis-à-vis des substances anticancéreuses utilisées, ce qui diminue leur efficacité. Ces phénomènes de résistance sont la principale cause d'échec de la chimiothérapie.

Cette chimiorésistance, qui se manifeste d'emblée (résistance primaire) ou qui apparaît progressivement au cours du traitement par des expositions à des doses croissantes de médicament, peut se définir comme la capacité des cellules tumorales à survivre à l'exposition d'agents cytotoxiques lorsqu'ils sont administrés aux doses maximales tolérables pour les tissus sains. Les recherches sur ce phénomène montrent que les cellules cancéreuses peuvent résister en développant différents mécanismes de résistance classés selon deux phénotypes distincts.

Le phénotype typique correspond au phénotype de multichimiorésistance dit phénotype MDR (multidrug Resistance). Celui-ci se traduit par une résistance croisée à différents médicaments anticancéreux, une diminution de leur accumulation intracellulaire de façon à maintenir une concentration non cytotoxique et une modification de la structure membranaire par la surexpression d'une glycoprotéine de 170 kDa codée par le gène MDR-1 chez l'Homme, la glycoprotéine-P (P-gp), qui fonctionne comme un système de transport actif dépendant de l'ATP et qui permet l'efflux du médicament.

Quant au phénotype atypique, il regroupe l'altération de la topoisomérase II, la résistance à l'apoptose, l'altération de l'expression des cytochromes P-450 conduisant à une modification de la clairance du médicament, l'activation des systèmes de réparations des lésions provoquées par les agents alkylants sur l'ADN, ou encore l'augmentation des processus de détoxication, en particulier celui du système glutathion (GSH) impliquant les enzymes γ -glutamyltransférase (GGT), glutathion *S*-transférase (GST) et gamma-glutamylcystéine ligase (GCL).

Les gluthation *S*-transférases constituent une remarquable famille d'enzymes impliquées dans la détoxication cellulaire des xénobiotiques. Ces enzymes permettent la conjugaison de divers composés électrophiles avec le GSH. Diverses toxines hydrophobes conjuguées au GSH deviennent également plus hydrosolubles et sont donc plus facilement excrétées des cellules. Il est dès lors très clair que les cellules cancéreuses peuvent utiliser ces enzymes pour se protéger contre divers agents cytotoxiques en les inactivant rapidement (Hayes and Pulford, 1995).

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

Etude bibliographique

I. 4- La résistance aux médicaments et la différenciation en tant que thérapie

La différenciation est un processus cellulaire physiologique important qui permet un remplacement continu et régulé des cellules qui constituent les différents tissus. Ce processus permet aux cellules d'acquérir des caractères nouveaux et des propriétés de plus en plus précises. La différenciation est contrôlée comme les autres processus cellulaires par des régulations transcriptionnelles qui permettent l'expression d'un phénotype différencié.

L'expression du phénotype différencié est régulé par des facteurs de transcription généraux ou des facteurs de transcription spécifiques de la voie de différenciation mais qui peuvent aussi intervenir dans le contrôle de l'expression de gènes impliqués dans d'autres processus.

Un dérèglement des processus de différenciation est un point important des mécanismes de la cancérogenèse.

Parmi les stratégies anticancéreuses, la chimiothérapie différenciante a pour objectif de réduire les effets secondaires par une action plus sélective des médicaments tout en rétablissant la régulation des processus de différenciation.

Au vu de ces données, il nous semble intéressant d'étudier la régulation des éléments du système glutathion et en particulier de l'enzyme de détoxication GST, impliquée dans les phénomènes de résistance aux anticancéreux, dans le cadre de la différenciation tumorale induite par des agents chimiques.

II- GLUTHATION ET CHIMIORESISTANCE

La chimiothérapie occupe une place importante dans le traitement clinique des cancers. Malheureusement, près d'un cancer sur deux développe une résistance vis-à-vis des médicaments anticancéreux entraînant l'échec de la chimiothérapie. Les nombreuses recherches entreprises pour comprendre ce phénomène de résistance ont permis de montrer que les cellules peuvent résister en développant différents mécanismes. Parmi ces mécanismes, notre laboratoire étudie celui qui implique une augmentation des processus de détoxication, et en particulier celui du système glutathion (GSH) et des enzymes de son métabolisme.

II. 1- Le système du gluthation

II. 1. 1- Généralités sur le cycle du glutathion : cycle de Meister

Le glutathion (GSH) est un tripeptide ubiquitaire, formé de glycine, de cystéine et de glutamate. Cependant, il a une particularité : c'est le groupement carboxylique en position γ de la chaîne latérale du glutamate qui établit la liaison peptidique avec la cystéine. C'est donc le N-[N-L-gamma-glutamyl-L-cystéinyl]-glycine (**Figure 1**), décrit pour la première fois en 1888 par Rey-Pailhade.



Figure 1 : Formule semi-développée du glutathion.

Ce tripeptide, avec une concentration qui varie de 0,1 à 10 mM, est le thiol intracellulaire (SH) non protéique le plus abondant. C'est dans le foie qu'on le trouve à la concentration la plus élevée (10 mM). On le retrouve également dans les liquides physiologiques, mais a des concentrations plus faibles (1 à 50 μ M) (Pastore *et al.*, 2003).

Etude bibliographique

II. 1. 2- Le glutathion : propriétés, rôles et fonctions

Les fonctions du GSH sont principalement dues à son caractère nucléophile. En effet, sa conjugaison aux composés électrophiles rend ceux-ci plus hydrosolubles et donc plus facilement transportables donc excrétables de la cellule. De cette façon, il se trouve impliqué dans de nombreuses fonctions physiologiques et il joue notamment un rôle central dans la défense cellulaire contre le stress oxydant et les xénobiotiques (Choi *et al.*, 1997).

Le mécanisme par lequel le GSH régule les fonctions de certaines protéines, où le groupement thiol de la protéine est lié de manière réversible au GSH, est appelé : glutathionylation (Pastore *et al.*, 2003). De cette manière, le GSH est notamment impliqué dans le transport des acides aminés et de certaines protéines (hème, bilirubine) (Anderson ME, 1998 ; Ishikawa and Ali-Osman, 1993). Par ce mécanisme, il peut également jouer différents rôles dans la stabilisation et la protection des protéines et la régulation de l'activité d'enzymes (Cotgreave and Gerdes, 1998 ; Fratelli *et al.*, 2002).

Le « stress oxydant », qui peut être dû à divers oxydants, aux rayonnements UV, à une hyperoxie, à l'activation du système immunitaire, peut engendrer une mort cellulaire rapide ou perturber tout le fonctionnement cellulaire en entraînant une modification des cascades de signaux de transduction.

D'une manière générale, le stress oxydant correspond à une perturbation de l'homéostasie du potentiel redox cellulaire par ces oxydants. Cette perturbation est due soit à une surproduction des ERO (espèces réactives de l'oxygène), soit à la défaillance des systèmes de défense cellulaire. Les défenses cellulaires contre les ERO font appel à des enzymes antioxydantes : la superoxyde dismutase et la catalase qui convertissent respectivement O_2^- en H_2O_2 et H_2O_2 en H_2O (Franco *et al.*, 1999).

Mais le GSH est également très important grâce à son cycle redox puisqu'il permet de diminuer les taux des ERO ou des produits de la peroxydation lipidique en les transformant en alcools lipidiques non toxiques (Brown, 1994). En effet, grâce à la fonction thiol de sa cystéine, il agit comme un tampon "anti-oxydant" et pendant ce cycle, le GSH est oxydé en glutathion disulfide (GSSG), qui est réduit rapidement à son tour en GSH par l'action de la glutathion réductase en présence de NADPH (Filomeni *et al.*, 2002) maintenant ainsi la proportion GSH:GSSG à 99 :1.

Le maintien d'un taux de GSH normal pourrait donc être impliqué dans la résistance à la toxicité de divers oxydants.

Les anthracyclines, dont le chef de file est la doxorubicine, sont réduites en radicaux semi-quinones par la cytochrome P450 réductase et les radicaux ainsi formés réagissent avec l'oxygène pour former des anions superoxyde O_2^- . Ce mécanisme serait responsable de la cardiotoxicité des anthracyclines, par peroxydation des lipides (Mizutani *et al.*, 2003).

En facilitant le métabolisme des antinéoplasiques ou en détoxifiant les radicaux libres générés par ces traitements, le GSH pourrait réduire leur cytotoxicité, ainsi que celle des radiations ionisantes. Il a ainsi été montré que l'induction de la résistance au cisplatine et aux agents alkylants dans des lignées humaines de tumeurs ovariennes s'accompagne d'une augmentation de 30 à 50 fois du taux de GSH par rapport aux mêmes cellules non résistantes (Godwin *et al.*, 1992).

Mais l'efficacité de ces traitements, et en particulier de la doxorubicine, est limitée par les résistances qui sont présentes dès le début du traitement ou qui apparaissent au cours de l'administration du médicament. L'efflux très rapide de la molécule hors des cellules est un des mécanismes évoqués pour expliquer cette résistance, mais la rétention de la doxorubicine n'est pas toujours corrélée à sa cytotoxicité, ce qui suggère que les mécanismes sont multiples.

Le GSH pourrait être impliqué dans la résistance aux anthracyclines en protégeant les cellules contre les radicaux libres produits lors de leur métabolisme. Ainsi, des taux élevés de GSH intracellulaire ont été corrélés à une résistance intrinsèque aux anthracyclines, tandis que les variations d'activité des enzymes de son métabolisme ont été associées à la résistance acquise (Lutzky *et al.*, 1989).

Enfin, diverses études ont montré l'intérêt d'utiliser du GSH exogène pour prévenir les dommages cellulaires engendrés par toutes situations pathologiques où le stress oxydant semble être un des mécanismes impliqués (Kowalski DP *et al.*, 1990 ; Strubelt *et al.*, 1999 ; Younes and Strubelt, 1990).

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

En fait, on voit que le GSH est surtout impliqué dans la détoxication de divers agents cytotoxiques utilisés en chimiothérapie anticancéreuse et cette détoxication peut être à l'origine de la résistance à certains médicaments anticancéreux (Schroder CP *et al.*, 1996 ; Zhang K *et al.*, 1998) (**Tableau 1**).

Tableau 1 : Agents of	ytotoxiques	éliminés par	r le GSH et	t entraînant	la résistance
-----------------------	-------------	--------------	-------------	--------------	---------------

Agent cytotoxique	Références
5-fluorouracile	(Jin <i>et al.</i> , 2002)
Arsenic	(Leslie <i>et al.</i> , 2004)
Bléomycine	(Day et al., 2002)
Carboplatine	(Jansen <i>et al.</i> , 2002)
Chlorambucil	(Zhang K et al., 1999)
Chloroéthylnitroso-urée	(Ali-Osman et al., 1990; Bacolod et al., 2002)
Cisplatine	(Jansen et al., 2002 ; Okuno et al., 2003)
Cyclophosphamide	(Tsukamoto et al., 1998)
Daunorubicine	(Benderra <i>et al.</i> , 2000)
Dexamethasone	(Inoue H et al., 2002)
Doxorubicine	(Kalinina <i>et al.</i> , 2001)
Melphalan	(Vahrmeijer et al., 1996)
Mitomycine-C	(Itamochi et al., 2002)

II. 2- Enzymes intervenant dans la synthèse et la conjugaison du glutathion

Le métabolisme du GSH est régulé par six réactions enzymatiques constituant le cycle du gamma-glutamyl ou cycle de Meister (Meister and Anderson, 1983).

L'ensemble des enzymes intervenant dans le système du glutathion, les enzymes permettant sa synthèse (γ -glutamyltransférase, γ -glutamylcystéine ligase), sa conjugaison (glutathion *S*-transférases), ou l'élimination des conjugués au glutathion, par la pompe membranaire GS-X, pourraient également être impliquées dans ces phénomènes de résistance aux médicaments anticancéreux (Hengstler *et al.*, 1998 ; Ishikawa and Ali-Osman, 1993) (**Figure 2**).



<u>Figure 2</u> : Représentation schématique du métabolisme du glutathion.

Après sa synthèse, le glutathion (GSH) peut-être conjugué à de nombreux composés électrophiles (X) grâce à la glutathion S-transférase (GST). Les produits de cette réaction (GS-X) peuvent ainsi être éliminés par transport actif par la pompe GS-X. La γ -glutamyltransférase (GGT) permet la dégradation du GSH extracellulaire, et donc intervient dans son recyclage en permettant à la glutamylcystéine de pénétrer à nouveau, et servir de substrat à de nouvelles synthèses de GSH. GCL = γ -glutamylcystéine ligase.

II. 2. 1- La γ-glutamylcystéine ligase (GCL)

La GCL (E.C. 6.3.2.2) est aussi appelée γ-glutamylcystéine synthétase (GCS). Cette enzyme intervient dans la première étape de la biosynthèse du GSH intracellulaire, elle catalyse la synthèse de γ-glutamylcystéine à partir de cystéine et de glutamate ; après la biodisponibilité en cystéine, c'est l'autre étape limitante de cette synthèse. De plus, la GCL subit un rétrocontrôle négatif par le GSH (Hamilton *et al.*, 2003).

La GCL est composée de deux sous-unités : la grande sous unité de 73 kDa possède l'activité catalytique et le site du rétrocontrôle par le GSH; la petite sous unité de 28 kDa pourrait réguler l'activité cinétique de l'enzyme (Huang CS *et al.*, 1993).

II. 2. 2- La γ-glutamyltransférase (GGT)

La GGT (E.C. 2.3.2.2) catalyse le clivage de la liaison glutamyl-cystéine du GSH ; c'est une enzyme membranaire dont le site actif est dirigé vers le milieu extracellulaire. Au cours de cette réaction, la cystéinylglycine est produite ; celle-ci est ensuite clivée par des dipeptidases en acides aminés, lesquels peuvent pénétrer dans les cellules et servir à la synthèse *de novo* de GSH (Ishikawa and Ali-Osman, 1993). La disponibilité en cystéine constitue une des étapes limitantes de la synthèse de GSH.

La GGT est constituée de deux sous-unités ; la séquence amino terminale de la grande sous-unité contient un domaine hydrophobe qui permet l'ancrage de l'enzyme dans la membrane ; le reste de la sous-unité est fortement glycosylé et est associé à la petite sous-unité (Joyce-Brady *et al.*, 2001). Cette dernière contient le site de fixation de la partie γ -glutamyl du substrat naturel, le GSH, et améliore l'activité catalytique de l'enzyme.

Le GSH extracellulaire n'entrerait dans le milieu intracellulaire qu'après métabolisation par la GGT. Le GSH serait ainsi métabolisé par cette enzyme pour produire un résidu d'acide glutamique et un dipeptide, la cystéinyl-glycine. Ces derniers composés, une fois transportés à l'intérieur de la cellule, pourraient servir à la synthèse intracellulaire de GSH (Meister and Anderson, 1983).

II. 2. 3- Les glutathion S-transférases (GST)

La réactivité du groupe nucléophile thiol du GSH est une voie importante du métabolisme de nombreux xénobiotiques lipophiles et de composés endogènes possédant un centre électrophile. La conjugaison peut, suivant la nature du substrat électrophile, être ou non enzymatique avant leur élimination par la pompe GS-X (Ishikawa, 1992).

Les GST sont une grande famille d'isoenzymes, qui font partie de la classe II des enzymes de détoxication. En effet, elles catalysent la conjugaison du GSH aux composés électrophiles cytotoxiques. Les GST séquestrent également des toxines par une liaison de forte affinité et sont parmi les principaux cyto-protecteurs contre divers composés toxiques et certains médicaments. Les composés ainsi conjugués au GSH sont souvent moins toxiques, plus hydrosolubles et peuvent ensuite être expulsés plus facilement de la cellule (Salinas and Wong, 1999).

Les GST sont ubiquitaires puisqu'on les trouve chez les vertébrés, les plantes, les champignons, les bactéries, les insectes et les parasites (Gate and Tew, 2001). Dans ces organismes, elles sont impliquées dans un grand nombre de phénomènes de résistance incluant les agents anticancéreux (McLellan and Wolf, 1999), les insecticides (Ranson *et al.*, 1997), les herbicides (Dixon *et al.*, 1998) et les antibiotiques microbiens (Arca *et al.*, 1990) de part leur propriété de conjugaison.

La superfamille des GST comporte un large éventail d'enzymes qui est subdivisé en un nombre toujours croissant de classes en fonction de divers critères incluant : les propriétés cinétiques, structurales et de substrat, la séquence et l'immunologie en relation avec la spécificité d'expression dans un tissu (Sheehan *et al.*, 2001).

Chez l'homme cette superfamille est composée de sept classes d'enzymes cytosoliques solubles appelées : α , μ , π , θ , ω , σ , ζ , ou respectivement : A, M, P, T, O, S, Z, une classe mitochondriale (κ) ou GSTK et une classe d'enzymes microsomales MGST (**Tableau 2**).

Tableau 2 : La superfamille des GSTs humaines.

ND : non déterminé

Classe	Gène	Chromosome	Références
Alpha	A1	- бр	(Board and Webb, 1987 ; Guthenberg <i>et al.</i> , 1986 ; Hubatsch <i>et al.</i> , 1998 ; Liu <i>et al.</i> , 1998 ; Rhoads <i>et al.</i> , 1987 ; Sayed <i>et al.</i> , 2002 ; Singh SV <i>et al.</i> , 2004)
	A2		
	A3		
	A4		
Mu	M1	1p	
	M2		(Campbell et al., 1990 ; Gough et al., 1994 ; Inskip
	M3		<i>et al.</i> , 1995 ; Kearns <i>et al.</i> , 2003 ; Terrier <i>et al.</i> , 1990 ; Tew, 1994 ; Xu <i>et al.</i> , 1998)
	M4		
	M5		
Theta	T1	- 22q	(Broo <i>et al.</i> , 2002 ; Hallier <i>et al.</i> , 1993 ; Juronen <i>et</i>
	T2		<i>al.</i> , 1996 ; Landi, 2000 ; Pemble S <i>et al.</i> , 1994 ; Rebbeck, 1997 ; Schroder KR <i>et al.</i> , 1992)
Pi	P1	11q	(Commandeur <i>et al.</i> , 1995 ; Duvoix <i>et al.</i> , 2003 ; Terrier <i>et al.</i> , 1990)
Zeta		14q	(Blackburn <i>et al.</i> , 1998 ; Board <i>et al.</i> , 1997 ; Ricci <i>et al.</i> , 2004)
Sigma		4q	(Jowsey et al., 2001)
Omega	01	10q	(Board <i>et al.</i> , 2000 ; Li YJ <i>et al.</i> , 2003)
Kappa		ND	(Morel et al., 2004 ; Pemble SE et al., 1996)

Chaque classe est le produit d'un gène différent localisé sur un chromosome différent mais chacune serait issue d'un gène ancestral unique (Hayes and Pulford, 1995 ; Mannervik *et al.*, 1992 ; Sheehan *et al.*, 2001 ; Strange *et al.*, 2001). Les GST microsomales sont des trimères membranaires contrairement à toutes les autres classes qui sont des dimères cytoplasmiques (Zhang J and Lou, 2003).

L'homologie entre les différentes classes n'excède pas 30 % et se retrouve principalement dans la partie hydrophile NH₂ terminale aussi appelée « G-site » ou domaine I (site de liaison au GSH). La région C terminale qui est hydrophobe et non spécifique est plus variable et est appelée « H-site » ou domaine II, elle a un rôle dans la liaison au substrat (Snyder and Maddison, 1997). Cette partie confère également, à l'isoforme de GST, sa spécificité de substrat (Armstrong, 1997 ; Dirr *et al.*, 1994). La tyrosine localisée dans le « Gsite » est considérée comme cruciale dans les fonctions de l'enzyme et serait capable d'agir comme un accepteur de protons relargués par le GSH (Atkins *et al.*, 1993).

De nombreuses études ont démontré une expression des différentes formes de GST qui est spécifique du tissu et du stade de développement considéré (Hayes and Mantle, 1986). Par exemple, la GSTA est principalement exprimée dans le foie, la rate et les testicules et les taux d'expression sont similaires dans les tissus fœtaux et adultes. En revanche, l'isoforme GSTM a été isolée de plusieurs tissus extra-hépathiques comprenant le cerveau, le cœur, le poumon et l'aorte. La GSTP, à l'origine isolée du placenta, est exprimée dans le foie fœtal mais est absente du foie adulte. Cette isoforme est exprimée en grande quantité dans les érythrocytes et dans le poumon.

Le polymorphisme dans cette famille a été décrit pour beaucoup de gènes, mais à l'heure actuelle, les données concernes principalement un polyallélisme dans les familles μ , π , θ (Hayes and Strange, 2000 ; Rebbeck, 1997).

III- LA GLUTATHION S-TRANSFERASE P1-1 (GSTP1-1) : ROLE, REGULATION ET CANCER

III. 1- Généralités

La glutathion S-transférase P1-1 (E.C. 2.5.1.18) est une protéine dimérique (homo- ou hétérodimérique) avec des sous-unités de 23 à 28 kDa ; produit du gène *GSTP*, elle est exprimée comme la GST majoritaire dans le poumon, le sein, le gros intestin ou la vessie (Commandeur *et al.*, 1995).

Elle existe sous forme de trois variants A, B, C exprimés dans la plupart des tissus mais pas dans le foie adulte. Elle présente des polymorphismes de la région codante au niveau des codons 105 et 114, qui lui confèrent des activités catalytiques différentes (Stanulla *et al.*, 2000).

La GSTP1-1 a une forte affinité et spécificité pour l'acide éthacrynique, ce substrat peut ainsi servir en tant qu'inhibiteur de la GSTP1-1.

III. 2- GSTP1-1 et cancer

Jusqu'à présent, la littérature ne permet pas d'établir si une surexpression de la GSTP1-1 est la cause ou la conséquence du processus de cancérisation, toutefois des données permettent d'envisager son implication dans la cancérogenèse et dans la résistance aux anticancéreux.

III. 2. 1- Rôle dans la cancérogenèse et les tumeurs

De nombreux travaux associent la GSTP1-1 au développement tumoral. En effet, une augmentation de l'expression de cette enzyme de détoxication a pu être observée chez les patients par rapport à des personnes saines dans un large éventail de cancers (**Tableau 3**).

Cela a été également démontré pour des leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) dans lesquelles elle est associée à la rechute dans plus de la moitié des cas (Sauerbrey *et al.*, 1994), des leucémies lymphoïdes chroniques (LLC) (Schisselbauer *et al.*, 1990) et des leucémies aiguës non lymphoblastiques dans lesquelles l'expression de la GSTP1-1 est en corrélation avec la réponse à la première induction thérapeutique, à la durée de la première rémission et à la survie à long terme (Tidefelt *et al.*, 1992). Dans les lymphomes à cellules B, une augmentation de la GSTP1-1 est liée à un mauvais pronostic (Ribrag *et al.*, 2003).

Une approche par micropuce, comparant le profil d'expression des gènes de patients sains ou atteints d'une leucémie aiguë myéloblastique (LAM) et d'une lignée cellulaire LAM, montre une surexpression du gène codant pour la GSTP1-1 (Court *et al.*, 2004).

Type de cancer	Références	
Côlon	(Kanbagli et al., 2000 ; Miyanishi et al., 2001 ; Nakajima et al., 2003)	
Estomac / Intestin	(Mohammadzadeh et al., 2003; Monden et al., 1997)	
Oesophage	(Mohammadzadeh et al., 2003)	
Ovaire	(Green et al., 1993; Inoue T et al., 1995)	
Pancréas	(Trachte <i>et al.</i> , 2002)	
Peau	(Henderson <i>et al.</i> , 1998)	
Poumon	(Boss et al., 2001 ; Howie et al., 1990)	
Prostate	(Cookson <i>et al.</i> , 1997)	
Sein	(Gudmundsdottir et al., 2001 ; Huang J et al., 2004)	
Testicule	(Klys et al., 1992)	
Tête et cou	(Kelders et al., 2002 ; Nishimura et al., 1996)	
Tissu myéloïde	(Petrini et al., 1995)	

Tableau 3 : Exemples de cancers associés à une expression de GSTP1-1 élevée.

D'autres auteurs ont suggéré une relation potentielle entre l'expression de la GSTP1-1 et l'agressivité de certains sarcomes des tissus mous (Toffoli *et al.*, 1992), ou encore un lien entre l'expression de la GSTP1-1 et la rechute après un traitement par chimiothérapie (Huang J *et al.*, 2003). Le plasma de patients atteints de cancer de la vessie contient des taux plus élevés de GSTA1-1 et de GSTP1-1 que ceux retrouvés chez les sujets sains, alors que les patients atteints de cancers rénaux présentent seulement une augmentation de GSTP1-1. Certaines équipes suggèrent que des taux élevés de GSTP1-1 pourraient être corrélés à un mauvais pronostic dans le cas de cancer du sein sans atteinte ganglionnaire (Gilbert L *et al.*, 1993). Koomagi *et al.* ont montré que la surexpression de la GSTP1-1 peut être la conséquence des conditions d'hypoxie provoquées par une vascularisation insuffisante des tumeurs (Koomagi *et al.*, 1995).

Le polymorphisme de la GSTP1-1 est également important pour le pronostic de la survie. En effet, Stanulla *et al.* ont montré que les enfants atteint de LAL et homozygotes pour la forme polymorphe Val₁₀₅ ont un risque plus faible de présenter une rechute de leur maladie que ceux présentant les autres polymorphismes du gène GSTP1 (Stanulla *et al.*, 2000). De la même manière, les patients avec un génotype homozygote présentent une survie plus importante dans le cas d'un cancer du colon traité par chimiothérapie (Stoehlmacher *et al.*, 2002).

L'ensemble de ces observations semble impliquer les GST dans la cancérogenèse. Néanmoins, certaines études ont montré que l'expression de la GSTP1-1 pouvait, au contraire, être diminuée dans certains types de cancer. C'est notamment le cas pour les cancers de l'œsophage et plus particulièrement de la maladie de Barrett où l'apparition et la progression de la maladie pourrait être imputée à la perte d'expression de cette enzyme et cet événement précoce pourrait servir de marqueur (Brabender *et al.*, 2002).

III. 2. 2- Rôle dans la résistance aux anticancéreux

La GSTP1-1 semble être impliquée dans la cancérogenèse, mais les GST jouent surtout un rôle important dans l'acquisition de la résistance cellulaire aux anticancéreux. Morrow *et al.* ont montré que l'augmentation de l'expression de la GSTP1-1 dans des cellules dérivées d'un carcinome de sein (MCF-7) est liée à une résistance à l'acide éthacrynique (Morrow *et al.*, 1998).

La doxorubicine (dox), est très utilisée pour traiter des pathologies hématologiques malignes ou des tumeurs solides, malgré sa grande cardiotoxicité. L'activité antitumorale des anthracyclines n'est pas entièrement élucidée ; elles présentent une forte affinité pour l'ADN et s'intercalent entre les bases, tandis que leur radical sucre interagit avec les désoxyribose-phosphates de l'ADN (Manfait *et al.*, 1982).

Les anthracyclines sont réduites en radicaux semi-quinones par la cytochrome P450 réductase et les radicaux libres ainsi formés réagissent avec l'oxygène pour former des anions superoxydes O_2^{-1} qui sont à l'origine d'un stress oxydant (Zhou *et al.*, 2001b). Ce mécanisme est l'une des hypothèses qui expliquent la cardiotoxicité des anthracyclines, en entraînant la peroxydation des lipides. Mais la génération d'espèces réactives de l'oxygène et la peroxydation lipidique ne sont pas les seules explications. Les dommages cardiaques peuvent également être engendrés par un dysfonctionnement des mitochondries (Zhou *et al.*, 2001a) ou une modulation de la transcription des gènes (Minotti *et al.*, 2004). Il a également été montré que les anthracylines sont capables d'induire l'apoptose des cellules cardiaques (Arola *et al.*, 2000 ; Kang *et al.*, 2000) et ce mécanisme passerait par la diminution du facteur GATA-4 impliqué dans le développement cardiaque (Kim *et al.*, 2003).

Mais l'efficacité de la dox est limitée par les résistances qui sont présentes dès le début du traitement ou qui apparaissent au cours de l'administration (Harbottle *et al.*, 2001). L'efflux très rapide de la molécule hors des cellules est un des mécanismes évoqués pour expliquer cette résistance, mais la rétention de la dox n'est pas toujours corrélée à sa cytotoxicité, ce qui suggère que les mécanismes sont multiples. En effet, il a été montré que la GSTP1-1 qui s'accumule dans le noyau des cellules résistantes à la dox aurait pour fonction de protéger les dommages à l'ADN engendrés par cet agent (Goto *et al.*, 2001 ; Goto *et al.*, 2002).

En outre, le glutathion et les enzymes de son métabolisme pourraient être impliqués dans la résistance aux anthracyclines en protégeant les cellules contre les radicaux libres produits lors du métabolisme. Ainsi des taux élevés de GSH intracellulaire ont été rapportés à une résistance intrinsèque aux anthracyclines, tandis que les variations d'activité des enzymes de son métabolisme ont été associées à la résistance acquise (Harbottle *et al.*, 2001 ; Lutzky *et al.*, 1989). Masanek *et al.* ont montré que des lignées cellulaires présentant des résistances à la dox ou au taxol ont une activité GSTP1-1 augmentée (Masanek *et al.*, 1997), alors que Puchalski *et al.* découvrent une résistance à la dox dans des cellules COS transfectées par un gène de GSTP1-1 (Puchalski and Fahl, 1990). Par ailleurs les cellules MCF-7 développent une résistance à l'acide éthacrynique, au benzopyrène et à la dox quand elles sont transfectées avec la GSTP1-1(Moscow *et al.*, 1989).

Une étude réalisée sur plusieurs lignées humaines de cancer du côlon, a montré que la résistance à la dox pourrait être liée à une augmentation de l'activité catalytique des GST

(Beaumont *et al.*, 1998). En effet, Nakajima *et al.* ont montré que dans la lignée HuCCT1 de carcinome du côlon, la GSTP1-1 est impliquée dans la résistance aux médicaments anticancéreux et que l'utilisation d'un oligonucléotide antisens diminue l'expression de la GSTP1-1 et augmente la sensibilité des cellules à la dox (Nakajima *et al.*, 2003). Ils ont également montré que le traitement des cellules avec un inhibiteur de GSTP1-1, le C16C2, permet d'augmenter les activités antitumorales de la dox et du cyclophosphamide. De la même manière, des cellules K562 résistantes à la dox et traitées au verapamil ou au droloxifène, présentent une expression de GSTP1-1 diminuée et deviennent plus sensibles à un traitement par la dox (Li J *et al.*, 2001).

De plus, la transfection de plasmides portant le gène de la GSTP1-1 dans des cellules murines apporte une augmentation de la résistance au cisplatine et carboplatine (Puchalski and Fahl, 1990). Dans des lignées de cellules tumorales de singe ou de hamster cette surexpression a entraîné une résistance envers divers agents alkylants, dont la dox (Miyazaki *et al.*, 1990).

Une étude montre que chez des patientes atteintes d'un cancer du sein et traitées avec des anticancéreux (5-fluorouracile, dox et mitomycine), les cellules malignes de patientes qui sont positivement immunoréactives pour la GSTP1-1 sont plus résistantes aux médicaments et à l'apoptose et prolifèrent plus que les cellules des patientes qui sont négatives pour cette réaction (Su *et al.*, 2003).

Néanmoins, dans les mécanismes de résistances aux anticancéreux, la GSTP1-1 intervient souvent associée à d'autres moyens de résistance. Volm *et al.* ont observé qu'une surexpression de la GSTP1-1 dans des tumeurs pulmonaires, associée à celle de la glycoprotéine gp170 (codée par le gène multi-drug-resistance, mdr1), entraîne une résistance à la dox (Volm *et al.*, 1992). Cette résistance acquise à la dox est également accompagnée d'une augmentation des mécanismes d'efflux (Harbottle *et al.*, 2001). En outre, la protéine d'efflux MRP2 (multidrug-resistance protein 2) est requise pour augmenter l'élimination du conjugué formé par la GSTP1-1 dans des cellules HepG2 pour se protéger de la cytotoxicité induite par le 4-nitroquinoline 1-oxyde (Morrow *et al.*, 2000).

La GSTP1-1 semble donc très importante dans le mécanisme conduisant à une résistance. Par contre, les mécanismes par lesquels les GST pourraient intervenir dans la résistance aux anticancéreux font l'objet de controverses. Le principal mécanisme suggéré est

celui de la conjugaison des xénobiotiques au GSH. D'autres possibilités sont évoquées, comme la liaison des médicaments et leur efflux hors des cellules (Stanulla *et al.*, 2000). De plus, la GSTP1-1 rendrait les cellules résistantes à l'apoptose en inhibant la voie de signalisation des mitogen-activated protein (MAP) kinases qui contrôlent la survie et la mort cellulaire. La GSTP1-1 pourrait réguler cette voie par une interaction protéine-protéine. La GSTP1-1 a également été décrite comme un inhibiteur de la c-Jun N-terminal kinase (JNK) dans des conditions normales (Adler *et al.*, 1999 ; Yin *et al.*, 2000). En revanche, cette suppression de l'activité JNK est levée dans des conditions de stress oxydant (Adler *et al.*, 1999 ; Yin *et al.*, 2000).

Une surexpression de la GSTP1-1 consécutive à la pathologie cancéreuse et / ou à une chimiothérapie peut altérer la régulation de la voie MAP kinase et entraîner la résistance à l'apoptose. Cette régulation peut expliquer la résistance observée avec de nombreux anticancéreux, corrélée à une augmentation de la GSTP1-1 et cela, même avec des agents qui ne sont pas des substrats pour cette enzyme.

Un autre sujet de discussion est la part relative des différentes isoenzymes dans ces mécanismes. Ainsi, chez des patients atteints de leucémie lymphoïde chronique et qui présentent une résistance aux dérivés de nitroso-urée ou au chlorambucil, l'activité GST est plus élevée que chez les patients ayant la même type de leucémie sans traitement (Tew, 1994 ; Zhang Y *et al.*, 2002).

Enfin, plusieurs travaux ont montré que dans des conditions de stress oxydant, l'expression des gènes codant pour des enzymes à activité antioxydante, telles que les GST, était augmentée (Bergelson *et al.*, 1994 ; Huang J *et al.*, 2004 ; Owuor and Kong, 2002).

L'ensemble de ces résultats laisse supposer que la GSTP1-1 joue un rôle très important dans la cancérogenèse et dans la résistance aux anticancéreux, plus particulièrement dans le cas des leucémies humaines. Il semble donc particulièrement intéressant d'étudier les mécanismes de régulation de l'expression de cette enzyme.

III. 3- Etude du mécanisme de régulation transcriptionnelle

Du fait de son association aux processus tumoraux, à l'apparition de chimiorésistances et à ses propriétés antioxydantes, de nombreuses équipes tentent de comprendre les mécanismes de la régulation de l'expression transcriptionnelle de la GSTP1-1.

III. 3. 1- Mécanisme de régulation de l'expression d'un gène

La régulation de l'expression d'un gène peut se faire à plusieurs niveaux. Parmi ceux ci, il existe celui qui fait intervenir les éléments régulateurs *cis* et *trans*. En effet, il existe des séquences d'ADN, composées de quelques nucléotides, dispersées tout au long de la région 5' et 3' du gène. Ces régions portent le nom d'éléments « cis-régulateur » et constituent les séquences distales du promoteur ; mais ces régions peuvent se trouver également en aval du promoteur.

Certaines protéines, les facteurs de transcription, viennent se fixer à ces séquences d'ADN. Il s'agit généralement de protéines qui peuvent contenir des métaux comme le zinc par exemple. Lorsque le complexe « cis-trans » est formé, il y a une brusque modification du taux de transcription du gène, c'est-à-dire une modification du nombre d'ARN messagers synthétisés. Ces régulations du taux de transcription peuvent être positives ou négatives.

III. 3. 2- Etude du promoteur de la GSTP1-1

Chez l'homme, en 1989, l'équipe de Morrow *et al.* a étudié la structure du gène de la GSTP1-1. Ils ont montré que le gène comporte 7 exons et 6 introns qui s'étendent sur 2,8 kb (Morrow *et al.*, 1989). En ce qui concerne le promoteur, ils ont trouvé plusieurs éléments potentiellement régulateurs :

- > une TATA box située 29 pb en amont du point de départ de la transcription
- deux séquences Sp1
- > une séquence TRE (TPA responsive element). TRE est un site de liaison pour AP-1
- des répétitions du motifs ATAAA en 5' du promoteur basal.

Morrow *et al.* exposent que la séquence située entre -80 et -8, contenant les sites Sp1 et AP-1, est absolument nécessaire à la transcription de ce gène (Morrow *et al.*, 1989). De plus la région située entre -73 et +8 semble être indispensable à sa répression par l'acide rétinoïque (Xia *et al.*, 1996). En fait le site TRE, capable de fixer AP-1, est essentiel à l'activité promotrice (Moffat *et al.*, 1994). Le site Sp1 proximal est lui aussi essentiel, alors que le site distal n'est pas nécessaire à la transcription (Jhaveri and Morrow, 1998).

Le promoteur de la GSTP1-1 a été décrit comme contenant de multiples copies du site ARE (Antioxidant Response Element) sans que des inducteurs typiques d'ARE puissent induire l'expression de la GSTP1-1 dans les kératinocytes HaCat (Zhang Y *et al.*, 2002). De même, le site NF- κ B like a été décrit comme un élément potentiellement supresseur de l'ARE sans que cela puisse être confirmé dans ces cellules (Moffat *et al.*, 1996a ; Xia *et al.*, 1996). Par définition, un ARE, est un site répondant à un traitement aux antioxydants et aux xénobiotiques tels que le TPA, la β -naphthoflavone ou le *tert*-Butylhydroquinone (tBHQ).

Par contre la séquence de l'ARE n'est pas parfaitement définie, puisque plusieurs groupes ont donné une séquence correspondant à l'ARE avec des caractéristiques différentes. Certains décrivent l'ARE comme une séquence non consensus mais contenant une séquence principale (Wang and Williamson, 1994), avec des bases flanquantes conservées qui sont nécessaires (Wasserman and Fahl, 1997). Pour d'autres, l'ARE est constitué de plusieurs TRE (élément de réponse au TPA) ou de TRE-like en répétitions inverses ou directes (Dhakshinamoorthy and Jaiswal, 2000 ; Xie *et al.*, 1995). Enfin, certains considèrent que l'ARE est une séquence TRE-like (Huang HC *et al.*, 2000 ; Yu R *et al.*, 2000).

Un TRE est un site répondant au promoteur de tumeur TPA (2-O-Tetradecanoylphorbol 13-acetate). Ce site correspond à une séquence consensus : TGAG/CTCA, fixant les facteurs de transcription de la famille AP-1.

Chez les levures, un site similaire a été découvert, c'est le site YRE. Il a une séquence consensus (TT/GAC/GTAA) reconnue par le facteur YAP-1p, découvert par sa capacité à se fixer sur un TRE humain. La séquence constituant le site forme le plus souvent 2 demi sites palindromiques permettant ainsi au facteur de transcription de se fixer sur les 2 brins. La fixation du facteur YAP-1p sur le TRE est due à la ressemblance des 2 sites (Nguyên *et al.*, 2000).

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

Des travaux réalisés dans notre laboratoire, ont montré que la méthylation des sites CpG du promoteur basal du gène GSTP1 est un mécanisme essentiel pour le contrôle de l'expression de ce gène dans les cellules leucémiques humaines (Borde-Chiché *et al.*, 2001b). Borde-Chiché *et al.*, ont également montré que le site du facteur AP-1 est crucial pour l'induction du gène de GSTP1-1 par le TPA. Ils ont identifié par supershift les composants du complexe induit comme étant les facteurs c-jun, fra-1 et la sous-unité p45 de NF-E2 (Borde-Chiché *et al.*, 2001a).

D'autres travaux réalisés récemment dans notre laboratoire, ont permis de montrer l'existence d'un site NF- κ B situé entre -323 et -314 dans la séquence promotrice de la GSTP1-1 grâce au logiciel TFSearch qui compare la séquence du promoteur de la GSTP avec différents sites de fixation de facteurs de transcription connus (Morceau *et al.*, 2004). En effet, ces travaux ont montré que la séquence NF- κ B peut lier, dans les cellules K562, les dimères p50/p65 et p65/p65 et que ce site est impliqué dans la régulation du gène de GSTP1-1 par le TNF (tumor necrosis factor) α .

Les facteurs de transcription jouent un rôle très important dans la régulation de l'expression des gènes et pour une compréhension complète, l'étude de chacun de ces sites est essentielle.

III. 3. 3- Les facteurs de transcription impliqués dans la régulation de l'expression de la GSTP1-1

Les sites de liaisons des principaux facteurs connus pour être impliqués dans la régulation du promoteur du gène de la GSTP1-1 sont représentés dans la **Figure 3**.

	NF-kB	AP-1 Sp1 Sp1	+1	
Promoteur		Promoteur basal	Gène GSTP1-1	
-1263 pb	-323	-69 -57 -47		

B

aacaagagat.caatatctag.aataaatgga.gatctgcaaa.tcaacagaaa.gtaggcagca aagccaaaga.aaatagccta.aggcacagcc.actaaaagga.acgtgatcat.gtcctttgca gggacatggg.tggagctgga.agccgttagc.ctcagcaaac.tcacacagga.acagaaaacc agcgagaccg.catggtctca.cttataagtg.ggagctgaac.aatgagaaca.catggtcaca tggcggcgat.caacacacac.tggtgcctgt.tgagcggggt.gctggggggg.gagagtacca ggaagaatag.ctaagggata.ctgggcttaa.tacctgggtg.atgggatgat.ctgtacagca aaccatcatg.gcgcacacac.ctatgtaaca.aacctgcaca.tcctgcacat.gtaccccaga acttcaaata.aaagttggac.ggccaggcgt.ggtggctcac.gcctgtaatc.ccagcacttt gggaagccga.ggcgtgcaga.tcacctaagg.tcaggagttc.gagaccagcc.cggccaacat ggtgaaaccc.cgtctctact.aaaaatacaa.aaatcagcca.gatgtggcac.gcacctataa ttccacctac.tcgggaggct.gaagcagaat.tgcttgaacc.cgagaggcgg.aggttgcagt gagccgccga.gatcgcgcca.ctgcactcca.gcctgggcca.cagcgtgaga.ctacgtcata tccacccctc.tcccctgccc.tgtgaagcgg.gtgtgcaagc.tccgggatcg.cagcggtctt agggaatttc.cccccgcgat.gtcccggcgc.gccagttcgc.tgcgcacact.tcgctgcggt cctcttcctg.ctgtctgttt.actccctagg.ccccgctggg.gacctgggaa.agagggaaag gcttccccgg.ccagctgcgc.ggcgactccg.gggactccag.ggcgcccctc.tgcggccgac gcccggggtg.cagcggccgc.cgggggctggg.gccggcggga.gtccgcggga.ccctccagaa gageggeegg.egeeg<mark>tgact.ea</mark>geaet<mark>ggg.geggag</mark>e<mark>ggg.geggga</mark>eeae.eet**tata**agg ctcggaggcc.gcgaggcctt.cgctggagtt.tcgccgccgc.agtcttcgcc.accagtgagt acgcgcggcc.cgctccccgg.ggatggggct.cagagctccc.agcatggggc.caacccgcag

<u>Figure 3</u> : Le promoteur de la GSTP1-1.

A : Détail des éléments régulateurs du promoteur de la GSTP1-1, accompagnés de leur position respective. **B** : Séquence de la région -1224 à +96. La tata-box est en gras (-31/-28) et en italique et le site d'initiation de la transcription est en position +1. Les autres sites sont surlignés : 2 sites Sp1 en -47/-39 et -57/-49, AP-1 en -69/-63 et NF- κ B -323/-314.

A

III. 3. 3. 1- Le facteur de transcription AP-1

Les facteurs de transcription AP-1 sont des protéines régulatrices à motif bZIP (basic region leucine zipper) (**Figure 4**) qui se fixent sous forme d'homo- ou hétérodimères (**Tableau 4**). Ces dimères sont composés de facteurs de la famille Jun, de facteurs de la famille Fos et dans certains cas de facteurs activant la transcription ATF (activating transcription factor) / CREB ou d'autres protéines à bZIP (protéines Maf) (Motohashi *et al.*, 2002).

<u>Tableau 4</u> : Les différents membres des familles qui constituent les facteurs capables de se fixer sur un site AP-1.

Famille	Membres		
ATF/CREB	ATF1, ATF2, ATF3, ATF4, B-ATF, CREB1, CREB2		
Fos	c-Fos, v-Fos, Fos B, Fra1, Fra2		
Jun	c-Jun, v-jun, JunB and JunD		
Maf	v-Maf, c-Maf, l-Maf, s-Maf, MafA, MafB, MafG, MafF, MafK, NF-E2, NRF1, NRF2, NRF3,		

Les facteurs AP-1 se fixent sur des séquences appelés TRE (élément de réponse au TPA). La séquence consensus de fixation est 5' –TGA(C/G)TCA– 3', qui présente des homologies avec la séquence consensus de type ARE (Elément de Réponse aux Antioxydants, 5'-TGACNNNGC-3'). La séquence située entre -69 et -61 dans le promoteur de la GSTP1-1 est parfaitement consensus.

AP-1 a été initialement décrit comme un facteur de transcription qui permettait l'expression de gènes en réponse à la stimulation cellulaire par le TPA; on sait maintenant que la liaison de AP-1 est induite par un grand nombre de stimuli comme les facteurs de croissance, les cytokines, les neurotransmetteurs, le peroxyde d'hydrogène, les UV ou le stress cellulaire (Whitmarsh and Davis, 1996). Les complexes AP-1 peuvent agir comme des régulateurs positifs ou négatifs de la transcription en se liant à leurs séquences cibles sur l'ADN ou par des interactions protéines/protéines (Liebermann *et al.*, 1998).



<u>Figure 4</u> : Structure de différents domaines de liaison à l'ADN.

bZIP: domaine à motif leucine zipper. Les leucines sont représentées par des boules jaunes. Znf1: domaine à doigts de zinc de type 1 (3 doigts sont représentés). Znf2: domaine à deux doigts de zinc de type 2 des récepteurs hormonaux nucléaires (un dimère est représenté).

III. 3. 3. 2- Le facteur de transcription Sp1

Le facteur Sp1 est un facteur de transcription ubiquitaire qui a d'abord été isolé dans les cellules HeLa et qui possède une structure en triple doigt de zinc (**Figure 4**). Ce facteur se lie à une ou plusieurs boîtes GC 5'-GGGGGGGGG-3' ou à un motif constitué de 9 pb : 5'-(G/A)(G/A)GGC(G/T)(G/A)(G/A)(G/T)-3', où chaque doigt reconnaît un triplet (Kadonaga *et al.*, 1987 ; Kadonaga and Tjian, 1986). Ces motifs sont présents dans le promoteur de nombreux gènes près du site d'initiation de la transcription. Mais Sp1 n'est pas le seul facteur qui se lie à ces éléments; les autres membres de cette famille contiennent également un domaine de liaison à l'ADN très conservé (Kaczynski *et al.*, 2003).

Dans le promoteur de la GSTP1-1, on trouve deux sites Sp1 avec pour séquences nucléotidiques : 5' -GGGGCGGAG- 3' de -47 à -39 (pour le site distal) et 5' -GGGGCGGGA-3' de -57 à -49 (pour le site proximal). Sp1 est activé par la protéine kinase A (PKA) et donc par la voie de l'AMPc (Rohlff *et al.*, 1997).

Sa fixation sur son site peut avoir des effets activateurs ou inhibiteurs de la transcription et dans le cas de la GSTP1 on observe un effet plutôt activateur. En effet, (Moffat *et al.*, 1996b) ont montré qu'un seul des deux sites Sp1 (le site distal) était utilisé et que celui-ci était absolument nécessaire pour une transcription basale optimale. Des études récentes ont montré que beaucoup d'autres facteurs de transcription peuvent se lier sur ce site Sp1, riche en GC et que ces protéines peuvent entrer en compétition avec Sp1 pour cette région promotrice pour activer ou réprimer l'activité.

Son activité transcriptionnelle est très perturbée par le stress oxydant. En effet, le stress oxydant inhibe la liaison de ce facteur à son site et le traitement au peroxyde d'hydrogène inhibe sa liaison à l'ADN (Ammendola *et al.*, 1994).

III. 3. 3. 3- Le facteur de transcription NF-κB

Le facteur NF- κ B est un membre de la famille des protéines activatrices de la famille Rel et est notamment activé par le stress oxydant. Ce facteur comporte un domaine central appelé "Rel Homology Domain ". Cette région est impliquée dans la fixation à l'ADN, dans l'interaction avec son inhibiteur I κ B et dans la dimérisation. Il est responsable de l'activation des gènes impliqués dans les processus de défense des cellules, dans la réponse immunitaire et inflammatoire, dans l'expression des cytokines et de leurs récepteurs, dans l'expression des molécules d'adhésion, dans la croissance cellulaire et dans l'apoptose (Haefner, 2002).

NF-κB est un dimère qui, chez les mammifères, est composé des protéines p50 (ou NFKB1), p52, p65 (ou RelA), Rel B et c-Rel. NF-κB est lié à un inhibiteur, tel que IκB (α , β ou γ) ou Bcl-3, lorsqu'il est dans un état non-activé dans le cytoplasme. Son activation nécessite la phosphorylation de l'inhibiteur par IKK (IκB kinase), qui se libère et est dégradé par le protéasome, permettant alors à NF-κB d'être activé et d'être transloqué dans le noyau pour aller se fixer à ses séquences d'ADN cibles. La séquence consensus de reconnaissance est composée d'un motif de 12 bases: : 5'-GGG(A/G)(C/A/T)CT(C/T)(C/T)CCC-3' (Yamamoto Y and Gaynor, 2004).

5'-GGGAATTTCC-3' est la séquence correspondante à NF-κB-like, retrouvée dans le promoteur de la GSTP1-1 de -98 à -89. Il a été montré que ce site fonctionne comme un répresseur dans le promoteur de la GSTP1-1 dans des cellules de tumeur mammaire humaine (MCF-7) (Moffat *et al.*, 1996a). De plus, le site NF-κB-like est à 20 pb du site AP-1 ce qui pourrait permettre des interactions entre les protéines se fixant sur chacun des sites.

Notre équipe a par ailleurs mis en évidence une autre séquence de type NF- κ B située entre -323 et -314 et a montré que ce site intervient dans la régulation de l'expression du gène de GSTP1-1 (Morceau *et al.*, 2004).

IV- LA DIFFERENCIATION EN TANT QUE THERAPIE : « LA THERAPIE DIFFERENCIANTE »

La protéine GSTP1-1 est impliquée dans la cancérogenèse et dans les mécanismes de résistance aux anticancéreux pendant un traitement par chimiothérapie. De plus, cette isoforme est la GST majoritairement exprimée dans les érythrocytes (Guthenberg and Mannervik, 1981). Il paraît donc important de bien connaître les mécanismes de régulation de son expression dans ce type de cellule et dans les autres lignées sanguines dans le cas des leucémies afin de potentialiser l'efficacité des traitements par des anticancéreux.

IV. 1- Hématopoïèse et différenciation

IV. 1. 1- Différenciation, cellules souches et cancer

La différenciation repose sur des processus d'activation / inactivation de gènes *via* des cascades complexes de régulation. On ne peut pas considérer une cellule en différenciation individuellement. En effet, son "profil d'expression" dépend de son environnement : interactions cellule-cellule, cellule-matrice. Ce sont ces signaux extra-cellulaires qui vont déclencher les signaux de régulation internes. La différenciation cellulaire est régulée au niveau de la transcription à l'aide de facteurs de transcription, au niveau de l'épissage alternatif chez les vertébrés, au niveau de la durée de vie des ARNm dans la cellule.

La différenciation est controlée comme les autres processus cellulaires physiologiques par une régulation transcriptionnelle qui intervient dans l'expression du phénotype différencié. L'expression de ce phénotype différencié passe par le contrôle de l'expression de gènes spécifiques des voies de différenciation tels que des facteurs de transcription spécifiques du type cellulaire (Cantor and Orkin, 2001 ; Graf, 2002). Ces protéines vont réguler de manière spécifique des gènes d'autres protéines qui vont permettre d'obtenir le phénotype caractéristique du type cellulaire différencié.

De plus, un grand nombre d'autres gènes, qui ne sont pas spécifiques des voies de différenciation, vont être régulés de manière spécifique au cours de ces processus par des facteurs de transcription généraux ou des facteurs de transcription spécifiques de la voie de différenciation.

La ligne de recherche classique en stratégie anti-cancéreuse consiste en l'identification d'oncogènes et de suppresseurs de tumeurs qui régulent la prolifération et la mort cellulaire. De plus, l'aspect d'un arrêt dans le processus de différenciation normal est un point important des mécanismes de la cancérogenèse (Enver and Greaves, 1998). En effet, c'est ce processus du développement cellulaire qui explique en quoi les cellules cancéreuses diffèrent des cellules normales en termes d'apparence, de croissance ou de comportement. Mais ce qui est moins connu ce sont les mécanismes qui sont à l'origine de ce blocage de la différenciation (Tenen, 2003).

Les cellules souches partagent des mécanismes de régulation et de signalisation cellulaire avec les cellules cancéreuses laissant supposer un lien entre les deux (Sell and Dunsford, 1989). Ainsi, plus particulièrement par exemple les mutations génétiques dans des cancers hématopoïétiques montrent comment des altérations spécifiques dans l'expression des gènes se manifestent par l'arrêt de la maturation de la lignée cellulaire à un stade spécifique de la différenciation (Sell, 1993).

La compréhension des mécanismes qui contrôlent le développement normal et le maintien de la différenciation des cellules souches peut fournir de nouvelles voies de recherche en terme de la signalisation dans les cellules cancéreuses et, à plus long terme, de nouvelles approches dans le traitement des cancers en induisant la différenciation, d'où le terme de « thérapie différenciante » (Sell and Pierce, 1994).

IV. 1. 2- Hématopoïèse

L'hématopoïèse constitue l'ensemble des mécanismes par lequel les différentes lignées des cellules matures du sang sont produites et régulées à partir de cellules souches hématopoïétiques pluripotentes. Un nombre restreint de cellules souches progénitrices peuvent donner l'ensemble des phénotypes des cellules du sang (Sell, 2004).

Les cellules souches pluripotentes vont, dans la moelle osseuse, donner naissance aux cellules souches multipotentes de la voie myéloïde et lymphoïde. Ces cellules souches vont ensuite donner naissance aux progéniteurs des différentes lignées cellulaires des voies myéloïde (érythrocytes, plaquettes, lymphocytes, granulocytes polynucléaires et monocytes) et lymphoïde (lymphocytes B et T) qui vont alors s'engager vers les différentes voies de différenciation pour donner des précurseurs, qui par la suite vont aboutir aux différents types cellulaires du sang circulant (Cantor and Orkin, 2001 ; Nakano, 2003) (**Figure 5**). Au cours de ces étapes

successives qui permettent le passage de la cellule souche hématopoïétique aux cellules matures, interviennent des mécanismes de régulation complexes de prolifération et de différenciation, afin d'assurer la survie et la mort cellulaire (Passegue *et al.*, 2003 ; Testa, 2004).

IV. 2- Induction de la différenciation des cellules cancéreuses

IV. 2. 1- Les leucémies

Dans les hémopathies malignes, les cellules tumorales se caractérisent le plus souvent par un état hautement indifférencié dans lequel les fonctions de prolifération sont maintenues.

En effet, les leucémies sont provoquées par des changements génétiques où une cellule unique, qui produit des progéniteurs, va proliférer et s'immortaliser (Domen, 2001 ; Passegue *et al.*, 2003). Ainsi, les cellules leucémiques possèdent la marque d'un réarrangement génique qui est présent dans toutes les cellules transformées.

Ces éléments suggèrent une origine unique de l'ensemble des cellules tumorales à partir d'un progéniteur. Les effets du changement génique dans la cellule qui est un précurseur d'une population sont amplifiés par l'augmentation du nombre de cellules malignes de différents types dans les leucémies mono / myéloïde incluant un type varié de cellules granulocytaires (polynucléaires, basophiles, neutrophiles et eosinophiles) et aussi de monocytes, érythrocytes et plaquettes (mégacaryocytes) (Pardal *et al.*, 2003 ; Schmidt and Przybylski, 2001).

IV. 2. 2- Induction de la différenciation en tant que thérapie

L'induction de la différenciation ou « thérapie différenciante » constitue une alternative aux traitements cytotoxiques des cancers. Les cellules tumorales sont généralement bloquées dans leur processus de différenciation suite à des dysfonctionnements moléculaires dans des étapes importantes qui régulent l'équilibre entre prolifération et différenciation au niveau des cellules progénitrices immatures. Ces clones malins ont toutefois conservé des potentialités de maturation conduisant à l'expression de phénotype différencié. (Dontu *et al.*, 2003 ; Singh SK *et al.*, 2003). La différenciation en tant que thérapie est d'autant plus intéressante que les leucémies sont les cancers les plus difficiles à traiter (Bonnet and Dick, 1997 ; Reya *et al.*, 2001).



Figure 5 : Schéma de l'hématopoïèse.

Toutes les cellules matures du sang sont produites et régulées, au cours de l'hématopoïèse, à partir de cellules souches hématopoïétiques pluripotentes. Les cellules souches pluripotentes vont, dans la moelle osseuse, donner naissance aux cellules souches multipotentes de la voie myéloïde et lymphoïde. Ces cellules souches vont ensuite donner naissance aux progéniteurs des différentes lignées cellulaires de la voie myéloïde (érythrocytes, plaquettes, polynucléaires, et monocytes) et de la voie lymphoïde (lymphocytes B et T) qui vont ensuite s'engager dans les différentes voies de différenciation pour donner des précurseurs, qui par la suite vont aboutir aux différents types cellulaires du sang.

La thérapie différenciante vise à restaurer certaines étapes clés qui régulent l'expression de gènes liés au maintien de l'équilibre prolifération / différenciation cellulaire. Les cellules cancéreuses en recouvrant leurs propriétés différenciantes, perdent progressivement leur capacités prolifératives meurent par apoptose ce qui évitent les réactions inflammatoires observées avec l'administration des cytotoxiques. De ce fait, la différenciation cellulaire peut être considérée comme une approche thérapeutique visant à soigner les maladies hématologiques (Koeffler and Golde, 1980).

De nombreuses molécules ont été étudiées pour leurs propriétés différenciantes. Parmi ces molécules, on trouve le butyrate et ses dérivés dont le phénylbutyrate de sodium qui est converti *in vivo* en phénylacétate. *In vitro*, le phénylacétate et le phénylbutyrate peuvent induire la différenciation par différents mécanismes (Carducci *et al.*, 1996). Le butyrate est un inhibiteur des histone désacétylases qui induit la différenciation cellulaire par un maintien de l'ouverture de la chromatine qui permet une reprogrammation de l'expression des gènes (Marks *et al.*, 2000). Ces effets différenciants s'accompagnent d'un arrêt de la prolifération (Xiong *et al.*, 1993) lié à un blocage du cycle cellulaire en phase G1/G0 dû à l'induction de la protéine du cycle cellulaire p21^{waf/cip1} (Gilbert J *et al.*, 2001), un inhibiteur des protéines kinases cycline-dépendante (CDK pour cyclin-dependant protein kinase).

De plus, Goh *et al.* ont montré que le phénylbutyrate diminue l'expression de divers gènes en relation avec le cancer. Ceux de la protéine anti apoptotique Bcl- X_L , du marqueur de progression prostatique cavéoline-1 et du facteur de croissance pro-angiogénique vascular endothelial growthh factor (VEGF) (Goh *et al.*, 2001). Cette équipe a également montré que le phénylbutyrate, en combinaison avec la radiothérapie, peut induire l'apoptose dans des cellules cancéreuses prostatiques.

L'acide rétinoïque (dérivé de la vitamine A par oxydation) sous sa conformation tout trans (ATRA : all-trans-retinoic-acide) est le composé le mieux étudié en tant qu'agent différenciant et utilisé en clinique avec succès dans le traitement de la leucémie aiguë promyélocytaire (Degos, 1997 ; Degos and Wang, 2001 ; Waxman, 2000) pour différencier les cellules leucémiques en polynucléaires neutophiles matures (Hansen *et al.*, 2000).

Enfin, un autre composé, l'arsenic a été utilisé en clinique pour induire la différenciation d'une leucémie aiguë promyélocytaire en entraînant des rémissions (Miller WH, Jr. *et al.*, 2002 ; Zhu *et al.*, 1997).

V- LA LIGNEE K562 COMME MODELE D'ETUDE DE LA DIFFERENCIATION

Une meilleure approche de la thérapie différenciante passe par une meilleure compréhension des mécanismes régulant la différenciation des cellules hématopoïétiques et nécessite le choix de lignées cellulaires dont la différenciation est inductible. Parmi ces modèles nous nous sommes intéressés à la lignée humaine K562.

V. 1- La lignée K562

La lignée K562 a été établie par Lozzio *et al.* en 1970 à partir du liquide pleural d'une patiente atteinte de leucémie myéloïde chronique en crise blastique (Lozzio and Lozzio, 1975). Cette lignée possède une anomalie caryotypique caractéristique : le chromosome de 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 avec le gène Bcr sur le chromosome 22 (Woessmann and Mivechi, 2001). Le gène hybride qui résulte de cette translocation conduit à la synthèse d'une protéine de fusion Bcr-Abl à forte activité tyrosine-kinase qui serait responsable de la résistance de cette lignée à l'apoptose (McGahon *et al.*, 1994).

L'avantage majeur de la lignée K562, c'est son caractère multipotent. En effet, ces cellules sont bloquées à un stade immature de différenciation, mais sont capables de s'orienter vers l'une des trois lignées circulantes (érythroïde, mégacaryocytaire ou monocytaire) en présence d'inducteurs appropriés (Sutherland *et al.*, 1986 ; Tsiftsoglou *et al.*, 2003 ; Vainchenker *et al.*, 1981). Cette lignée cellulaire humaine coexprime donc des gènes marqueurs des voies de différenciation érythoïde et mégacaryocytaire (Rowley *et al.*, 1992) (**Figure 6**).

<u>V. 2- Les facteurs de transcription impliqués dans la différenciation</u> <u>hématopoïétique</u>

V. 2. 1- EKLF

Le facteur de transcription erythroid krüppel-like factor (EKLF) est un facteur spécifique de la voie érythroïde.



<u>Figure 6</u> : La lignée cellulaire K562 est multipotente.

Les cellules K562 peuvent se différencier vers la voie érythroïde ou mégacaryocytaire en fonction de l'agent utilisé.

Il appartient à la famille des krüppel protéines qui contiennent trois doigts de zinc caractéristiques en position carboxy terminale, classiquement $Cys-X_{2-4}-Cys-X_{12}$ -His- X_{3-4} -His, et qui reconnaît les boîtes CACCC. Le membre caractéristique et le plus connu de cette famille est Sp1 (Turner and Crossley, 1999a).

Ces dernières années, une nouvelle sous-famille de protéines rattachées aux krüppel protéines est apparue pour former la famille des krüppel-like factor (Turner and Crossley, 1999b). Cette sous-famille est composée notamment de BKLF (Basic krüppel-like factor), LKLF (Lung krüppel-like factor), GKLF (Gut-enriched krüppel-like factor), UKLF (Ubiquitous krüppel-like factor) et de EKLF (Anderson KP *et al.*, 1995 ; Crossley *et al.*, 1996 ; Matsumoto *et al.*, 1998 ; Shields *et al.*, 1996). De plus, Asano *et al.* ont montré l'existence d'un nouveau facteur, FKLF, capable d'induire l'expression des gènes de globines fœtales et embryonnaires (Asano *et al.*, 1999) et d'un facteur FKLF-2 capable d'induire les promoteurs des gènes spécifiques de la voie érythroïde (Asano *et al.*, 2000). Le facteur EKLF peut interagir de manière physiologique et fonctionnelle avec le facteur GATA-1 (Merika and Orkin, 1995).

EKLF se lie avec une haute affinité aux motifs CACCC et CCACACCCT situés dans la région LCR du gène codant pour la β -globine mais ces sites ne fixent pas Sp1 (Gillemans *et al.*, 1998). Chez la souris, des altérations génétiques du gène codant pour EKLF entraînent une déficience importante de l'expression de β -globine entraînant la mort de l'embryon au moment où la synthèse de β -globine adulte devrait normalement être induite (Perkins *et al.*, 1995). Le facteur EKLF apparaît donc comme un élément essentiel dans la régulation de l'expression des globines pendant la différenciation érythroïde (Turner and Crossley, 1999b).

V. 2. 2- NF-E2

Le facteur de transcription nuclear factor-erythroid 2 (NF-E2) a été cloné à partir de cellules érythroleucémiques murines (MEL). Ce facteur reconnaît une séquence de 11 pb comprenant le site AP-1 (souligné) et 4 bases supplémentaires (C/T)GC<u>TGA(G/C)TCA(T/C)</u> (Andrews *et al.*, 1993).

Les motifs de reconnaissance de NF-E2 sont trouvés dans les régions LCR (locus control region) des gènes α et β -globine, dans les promoteurs de la porphobilinogène désaminase (PBGD) et de la ferrochélatase, deux enzymes appartenant à la voie de

biosynthèse de l'hème (Mignotte *et al.*, 1989a ; Mignotte *et al.*, 1989b ; Ney *et al.*, 1990). Ces données indiquent que NF-E2 est impliqué dans la synthèse de l'hémoglobine.

NF-E2 est un hétérodimère composé de deux sous-unités de 45 et 18 kDa (Andrews, 1998), appartenant à la superfamille des facteurs de transcription b ZIP (basic leucine zipper) (Ney *et al.*, 1993). La sous-unité p18 appartient à la famille de protéines codées par les protooncogènes MaF (MafF, MafG, MafK) (Andrews *et al.*, 1993 ; Motohashi *et al.*, 2002). La sous-unité p18 est exprimée de manière ubiquitaire, alors que la sous-unité p45 est spécifique des voies de l'hématopoïèse (Blank and Andrews, 1997). Le domaine de liaison à l'ADN de la sous-unité p45 est comparable à celui des protéines Cap'n'collar (cnc) qui sont impliquées dans le développement et la différenciation des tissus de nombreux organismes. Cette famille de protéine est également composée de p45 NF-E2, Nrf1, Nrf2, Nrf3, Bach1, and Bach2 (Derjuga *et al.*, 2004 ; McMahon *et al.*, 2001).

Toki *et al.* ont isolé l'ADNc codant pour la MafK humaine. Le gène MafK code pour une protéine de 156 acides aminés qui est largement exprimée, avec des taux élevés dans le cœur, le placenta et le foie. Ils ont aussi montré que MafK peut dimériser avec p45 mais aussi avec NF-E2-related factor (NRF) 1 et NRF2 et que ces hétérodimères se lient aux sites NF-E2. Des résultats similaires ont été trouvés avec MafG (Toki *et al.*, 1997). La protéine MaFK lie la séquence consensus de NF-E2 en absence de la protéine p45 *in vitro* et inhibe la transcription d'un gène rapporteur sous le contrôle de NF-E2. La sous-unité p45 introduite seule dans ces mêmes cellules transfectées, n'induit pas la transcription et ne se fixe pas à l'ADN.

Le rôle du complexe NF-E2 n'est pas encore parfaitement défini. Il jouerait un rôle activateur dans la régulation des gènes de globine (Sawado *et al.*, 2001).

De plus, les cellules de la lignée CB3 qui correspondent à des cellules MEL n'exprimant pas NF-E2 de part l'insertion du virus de Friend dans le gène p45, ne synthétisent pas de globine (Lu *et al.*, 1994). Mais en ajoutant l'ADNc codant pour p45, les cellules CB3 restaurent l'expression des gènes de globines. Toutefois, l'invalidation du gène p45 chez la souris n'altère pas de façon significative l'érythropoïèse. Ces résultats laissent penser qu'*in vivo* en absence de NF-E2, des protéines de type AP-1 prendraient le relais (Shivdasani and

Orkin, 1995). En revanche, NF-E2 est un facteur essentiel pour la maturation des plaquettes (Shivdasani *et al.*, 1995).

V. 2. 3- Les facteurs de transcription de la famille GATA

Compte tenu de leur omniprésence, dans le système hématopoïétique, les facteurs de la famille GATA participent à la régulation transcriptionnelle d'un grand nombre de gènes différents exprimés au niveau de plusieurs lignées sanguines.

V. 2. 3. 1- Généralités

Les membres de cette famille doivent leur appellation à la nature spécifique de leur site de liaison à l'ADN : le motif GATA contenu dans la séquence consensus T/A(GATA)A/G (Evans *et al.*, 1988 ; Tsai *et al.*, 1989).

Les facteurs GATA contiennent un ou deux domaines qui, avec une région adjacente basique très conservée, forment le domaine de liaison à l'ADN (Lowry and Atchley, 2000). Ce domaine est constitué d'une séquence d'acides aminés Cys-X₂-Cys-X₁₇-Cys-X₂-Cys (Tsai *et al.*, 1989), dont les deux paires de résidus Cys sont liées à un atome de zinc. Cette structure confère à la protéine une forme digitée dite en « doigt de zinc », permettant sa liaison à l'ADN (Martin *et al.*, 1990). Chacun des doigts est constitué de feuillets ß antiparallèles et d'une hélice α avec plus ou moins 30 acides aminés. En dehors des régions en doigts de zinc, ces protéines présentent de petites homologies de séquences (Yamamoto M *et al.*, 1990 ; Zon *et al.*, 1991).

Les facteurs GATA sont ubiquitaires puisque maintenant il en a été trouvé à travers le règne eucaryote, des champignons aux plantes et des invertébrés aux vertébrés (Patient and McGhee, 2002). En revanche, ces facteurs n'ont que peu évolué puisque seulement six membres ont été identifiés chez les vertébrés, quatre chez la Drosophile et onze chez les Nématodes (Fossett and Schulz, 2001). Les facteurs GATA jouent un rôle essentiel dans les processus de développement, en guidant le devenir et le destin des cellules. Plus particulièrement, ils interviennent dans la régulation de la différenciation et le contrôle de la prolifération cellulaire et de la mobilité.

Concernant leur mécanisme d'action au niveau de l'ADN, les protéines GATA pourraient maintenir la chromatine dans un état relâché et faciliter les interactions entre les régions *cis*-régulatrices et les facteurs de la machinerie transcriptionnelle. Ceci a été démontré au niveau des LCR (locus control region) des gènes de globine (Orkin, 1992).

Le motif GATA a d'abord été défini comme un élément *cis*-régulateur des gènes de globines. Evans *et al.*, ont en effet montré que tous les promoteurs des gènes de globines de poulet possédaient une séquence GATA conforme à la séquence consensus T/A(GATA)A/G (Evans *et al.*, 1988). Dans le même temps, Wall *et al.* ont observé la présence de plusieurs motifs GATA dans l'activateur (enhancer) du gène humain de la β -globine (Wall *et al.*, 1988). Puis Martin *et al.*, ont démontré que la présence du motif GATA dans le promoteur du gène humain de β -globine était nécessaire à sa surexpression (Martin *et al.*, 1989). De nombreux auteurs ont ensuite confirmé ces résultats en montrant l'implication de la séquence GATA dans la régulation de l'expression de tous les gènes de globines humaines.

Mignotte et *al.* se sont en revanche intéressés à d'autres gènes érythroïdes, comme la porphobilinogène désaminase (PBGD), et ont montré que le promoteur de ce gène présente la séquence consensus GATA (Mignotte *et al.*, 1989b). Depuis, d'autres travaux ont permis de constater que le motif GATA est présent dans les promoteurs et/ou enhancers de tous les gènes spécifiques de la lignée érythroïde.

Cette généralisation implique les gènes des protéines membranaires (glycophorine), des récepteurs de facteurs de croissance de la lignée érythroïde (récepteur de l'érythropoïétine, R-EPO) (Chiba *et al.*, 1991 ; Zon *et al.*, 1991), des facteurs de transcription tels que GATA-1 lui-même (Tsai *et al.*, 1991), SCL (stem cell leukemia ou tal-1) (Aplan *et al.*, 1992) et EKLF (Miller IJ and Bieker, 1993).

Cependant, le motif GATA, isolé ou même présent en copies multiples, ne peut à lui seul assurer une spécificité d'expression érythroïde. Il doit être associé au motif CCACC ou CCGCC, et seule cette association confère la spécificité érythroïde. Cette combinatoire GATA CCACC/CCGCC est aujourd'hui considérée comme le "label" d'une région régulatrice active au cours de l'érythropoïèse. Les deux séquences ont une activité synergique car la mutation de l'une ou l'autre entraîne toujours une perte totale d'activité transcriptionnelle (Frampton *et al.*, 1990). Il est à noter que, le motif CCACC/CCGCC est reconnu par la famille des protéines Sp1, et peut également fixer le facteur érythrocytaire EKLF (Gregory *et*

al., 1996). Ces résultats démontrent, entre autre, que des coopérations très étroites entre les différents facteurs de transcription sont indispensables à la régulation fine de l'expression d'un gène. Le rôle d'un facteur de transcription ne peut donc être considéré que dans un contexte global impliquant une étude étendue et approfondie des régions régulatrices d'un gène.

V. 2. 3. 2-Les différents membres de la famille des facteurs GATA

La famille des facteurs de transcription GATA comporte six membres : GATA 1 à GATA 6. Ces membres peuvent être repartis en deux groupes en fonction du fait qu'ils soient impliqués ou non dans la régulation de l'hématopoïèse. Ce sont les facteurs GATA 1, 2 et 3 que l'on trouve particulièrement impliqués dans le système hématopoïètique, alors que les autres membres de la famille GATA (GATA-4, 5 et 6) n'ont pas été identifiés dans ce système (Tang *et al.*, 2001).

Ces derniers sont des facteurs qui sont principalement impliqués dans le développement et qui sont surtout exprimés dans les tissus endodermiques et mésodermiques du coeur, des poumons, des intestins, du foie, des gonades, et de la tête (Arceci *et al.*, 1993 ; Karis *et al.*, 2001 ; Keijzer *et al.*, 2001 ; Molkentin, 2000 ; Tamura *et al.*, 1993 ; Wada *et al.*, 2002).

V. 2. 3. 2. 1-Le facteur GATA-1

Les cellules érythroïdes de vertébrés contiennent un facteur de transcription tissuspécifique qui a été nommé Eryf1 (erythroid factor 1) par Evans *et al.* (Evans *et al.*, 1988), puis NF-E1 (nuclear factor erythroid 1) par Wall *et al.* (Wall *et al.*, 1988) ou GF-1 par Martin *et al.* (Martin *et al.*, 1989) et enfin GATA-1 en 1990 lors d'une conférence internationale (Conference of Hemoglobin Switching, Warrenton, VA, USA).

GATA-1 est le premier membre de la famille des facteurs de transcription GATA dont le gène a été cloné. Cette protéine nucléaire et tous les membres de cette famille doivent leur appellation à la nature spécifique de leur site de liaison à l'ADN : le motif consensus T/A(GATA)A/G (Evans and Felsenfeld, 1989 ; Tsai *et al.*, 1989). Le facteur GATA-1 est fortement exprimé dans les cellules érythroïdes matures, les mégacaryocytes et les éosinophiles (Martin *et al.*, 1990 ; Romeo *et al.*, 1990 ; Yamamoto M *et al.*, 1990 ; Yu C *et al.*, 2002 ; Zon *et al.*, 1993) et à un moindre niveau dans les progéniteurs multipotents (Leonard *et al.*, 1993 ; Sposi *et al.*, 1992).

Il a été établi que le facteur GATA-1, accompagné de la protéine Friend of GATA-1 (FOG1) (Crispino *et al.*, 1999), est absolument nécessaire à la maturation et à la différenciation des précurseurs de la lignée érythroïde (Pevny *et al.*, 1991) et qu'il constitue un régulateur essentiel de la transcription de ses gènes cibles. Dans des précurseurs érythroïdes déficients en GATA-1, la maturation cellulaire est accompagnée d'apoptose (Pevny *et al.*, 1995 ; Weiss and Orkin, 1995), alors que dans les précurseurs mégacaryocytaires cette déficience est associée à une hyperprolifération (Shivdasani *et al.*, 1997). Il a également été observé que l'expression du gène de GATA-1 augmente au cours de l'érythropoïèse normale (Dalyot *et al.*, 1993 ; Leonard *et al.*, 1993). Par conséquent, GATA-1 est impliqué dans la croissance mais aussi la mort cellulaire.

Bien que GATA-1 soit apparemment spécifique de l'hématopoïèse, il est aussi exprimé dans d'autres tissus tels que les cellules de Sertoli du testicule (Ito *et al.*, 1993 ; Yomogida *et al.*, 1994).

La fonction principale de GATA-1 est de transactiver des promoteurs contenant le site de liaison GATA (Evans and Felsenfeld, 1991 ; Martin *et al.*, 1990). Au vu de leurs résultats, Chiba *et al.* (Chiba *et al.*, 1991) ont proposé un schéma de la différenciation érythroïde impliquant GATA-1 et le gène du récepteur de l'érythropoïétine (R-EPO) repris par la suite par Dalyot *et al.* (Dalyot *et al.*, 1993). Le rôle essentiel de GATA-1 dans l'érythropoïèse a été confirmé par les travaux de Simon *et al.*, qui ont montré que l'absence de ce facteur *in vivo* empêche le développement des cellules érythroïdes (Simon *et al.*, 1992). Weiss *et al.* ont précisé par des études *in vitro* l'importance du facteur GATA-1 dans les différents stades du développement érythroïde (Weiss *et al.*, 1994). Ils démontrent ainsi l'absolue nécessité de ce facteur dans les stades les plus précoces de l'érythropoïèse. Par ailleurs, la perte de GATA-1 bloque la maturation définitive des proérythroblastes en érythrocytes matures, un stade relativement tardif de l'érythropoïèse (Weiss *et al.*, 1994).

Cependant, il a été constaté que les gènes cibles du facteur GATA-1, comme les gènes des globines embryonnaires et adultes, des facteurs *trans* SCL (tal-1) (Aplan *et al.*, 1992), et

EKLF (Crossley *et al.*, 1994), et du R-EPO (Zon *et al.*, 1991), sont exprimés à un niveau presque normal dans les proérythroblastes dépourvus du facteur GATA-1 (GATA-1⁻). Ces résultats suggèrent qu'un autre membre de la famille GATA puisse intervenir pour compenser la perte de GATA-1. Or, il se trouve que le facteur GATA-2 est surexprimé dans les cellules GATA-1⁻.

En outre, des expériences ont montré que GATA-1 est impliqué dans la régulation positive de son propre promoteur et que celui-ci pourrait être également contrôlé par d'autres facteurs de la famille GATA (Hannon *et al.*, 1991 ; Nicolis *et al.*, 1991 ; Schwartzbauer *et al.*, 1992 ; Tsai *et al.*, 1991).

Il apparaît que le facteur GATA-1 est essentiel à la différenciation érythroïde et de certaines lignées myéloïdes. En effet, des études, ont montré que GATA-1 associé au facteur SCL/tal-1 et à la protéine LIM-only bridging protéine LMO2, sont suffisants pour induire la différenciation érythroïde dans l'ectoderme natif dans des explants d'embryon de *Xenopus* (Mead *et al.*, 2001).

De plus, des expériences dans des embryons de souris déficientes en GATA-1 ont permis de montrer que des domaines différents de la protéine GATA-1 sont nécessaires pour le développement des précurseurs hématopoïétiques et la différenciation terminale (Shimizu *et al.*, 2001). Ainsi, le doigt de zinc en C-terminal est nécessaire à toutes les lignées sanguines, alors que le doigt N-terminal intervient seulement pour les cellules au stade terminal de différenciation.

Ces mécanismes impliquent des interactions avec des protéines qui peuvent interagir avec le doigt N-terminal. Ainsi, les fonctions de GATA-1 apparaissent étroitement modulées par des interactions protéine-protéine tels que les proteines Sp1, EKLF (Merika and Orkin, 1995) ou avec des cofacteurs transcriptionnels tel que les protéines FOG, PU.1 et CBP (cAMP responsive element binding protein (CREB) binding protein) (Kowalski K *et al.*, 2002 ; Tang *et al.*, 2001).

En effet, il a été montré chez la souris que l'interaction physique de CBP avec GATA-1, mise en évidence par immuno-coprécipitation, stimule l'activité transcriptionnelle de ce dernier. De plus, l'expression de la protéine virale E1A (qui inhibe l'action de CBP) affecte la différenciation et l'expression des gènes cibles du facteur GATA-1 (Blobel *et al.*, 1998).

Il a été décrit que la valine (en position 205) dans le doigt de zinc N-terminal de GATA-1 est nécessaire à une interaction avec FOG1 (Nichols *et al.*, 2000). Une mutation de cet acide aminé ne permet plus l'interaction avec FOG1 et inhibe la différenciation érythroïde.

Enfin, PU.1 et GATA-1 sont deux facteurs qui peuvent interagir physiquement et qui peuvent s'inhiber mutuellement au niveau de leur activité transcriptionnelle (Nerlov *et al.*, 2000 ; Rekhtman *et al.*, 2003 ; Rekhtman *et al.*, 1999). Une surexpression de PU.1 entraîne un blocage de la différenciation érythroïde (Rao *et al.*, 1997).

En plus, les fonctions de GATA-1 sont également modulées par un vaste ensemble de modifications post-traductionnelles (Cantor *et al.*, 2002 ; Tang *et al.*, 2001). GATA-1 est phosphorylé *in vivo* dans la partie N-terminale (Crossley and Orkin, 1994), et l'inhibition de phosphatases augmente l'activité liante de GATA-1 à ses séquences cibles dans les cellules K562 (Partington and Patient, 1999). GATA-1 est également acétylé sur des séquences proches du doigt de zinc en C-terminal et cette modification permet *in vivo* de stimuler son activité transcriptionnelle (Boyes *et al.*, 1998).

De plus, il a été montré dans les cellules érythroïdes que GATA-1 est séquestré dans des compartiments cellulaires qui favorisent les interactions protéine-protéine et qui par conséquent favorisent les modifications post-traductionnelles (Elefanty *et al.*, 1996).

Enfin, il a été montré que le facteur GATA-1 peut être sumoylé *in vivo* par une protéine proche de l'ubiquitine, SUMO-1 (Collavin *et al.*, 2004) mais le rôle de cette modification n'a pas encore été mis en évidence.

Enfin, il est intéressant de souligner que le taux d'expression de la protéine GATA-1 n'est pas identique d'une lignée cellulaire à l'autre et que son taux d'expression varie également en fonction du stade de développement au cours de l'hématopoïèse (Tang *et al.*, 2001). En effet, il est exprimé faiblement dans les progéniteurs multipotents et son expression est ensuite fortement augmentée durant la différenciation érythroïde alors qu'elle est diminuée au cours de la différenciation myéloïde.

V. 2. 3. 2. 2-Le facteur GATA2

GATA-2 est retrouvé dans les lignées hématopoïétiques et il est également nécessaire à une hématopoïèse efficace. Ainsi, GATA-2 est exprimé dans des cellules souches et dans des progéniteurs multipotents (Leonard *et al.*, 1993 ; Sposi *et al.*, 1992). Il est fortement exprimé pendant la différenciation mégacaryocytaire et sa surexpression inhibe la différenciation érythroïde et favorise la différenciation mégacaryocytaire (Ikonomi *et al.*, 2000b). GATA-2 est également retrouvé dans les cellules endothéliales, les fibroblastes, le muscle cardiaque, le rein, le foie et dans les tissus cérébraux embryonnaires (Labbaye *et al.*, 1995 ; Leonard *et al.*, 1993 ; Mouthon *et al.*, 1993).

GATA-2 est étroitement lié au développement des progéniteurs sanguins et sa surexpression n'est pas suffisante pour bloquer la différenciation (Gottgens *et al.*, 2002 ; Kumano *et al.*, 2001).

Enfin, il faut également s'intéresser au taux d'expression du facteur GATA-2, car celui-ci varie également au cours des stades du développement hématopoïétique. En effet, GATA-2 est essentiel dans les stades précoces du développement (cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques) mais son expression diminue au cours de l'érythropoïèse alors qu'elle augmente au cours de la thrombopoïèse (Ohneda and Yamamoto, 2002). De plus, une surexpression de GATA-1 diminue celle de GATA-2 alors qu'une augmentation de GATA-2 n'a pas d'effet sur celle de GATA-1 mais induit la différenciation mégacaryocytaire en inhibant la voie érythroïde (Ikonomi *et al.*, 2000b).

Ainsi, il apparaît clairement que ce sont les taux relatifs des facteurs GATA-1 et GATA-2 qui sont critiques au cours de l'hématopoïèse (Ikonomi *et al.*, 2000a).

V. 2. 3. 2. 3- Le facteur GATA-3

GATA-3 est exprimé dans les cellules érythroïdes de poulet et dans les lymphocytes T (George *et al.*, 1994 ; Yamamoto M *et al.*, 1990), mais pas dans les lymphocytes B ni les macrophages. Dans les cellules T, le facteur GATA-3 intervient dans la balance Th-1/Th-2.

GATA-2 et GATA-3 sont également présents dans d'autres tissus, comme les cellules endothéliales (Dorfman *et al.*, 1992) et dans le système nerveux (George *et al.*, 1994 ; Yamamoto M *et al.*, 1990).

51

But du travail

 \mathbf{G}

BUT DU TRAVAIL

((

Comme le montre cette étude bibliographique, l'étude de la régulation du gène de la GST humaine (GSTP1-1) laisse encore de nombreux points à éclaircir. En effet, les travaux précédents laissent présager l'existence de mécanismes complexes et variés pour le contrôle de l'expression de cette enzyme. Pourtant, le produit du gène GSTP1-1 est impliqué dans le métabolisme du glutathion, dans la protection contre le stress oxydant, dans la chimiorésistance à certains anticancéreux et dans la résistance à l'apoptose. De plus, l'enzyme GSTP1-1 est surexprimée dans certains cancers et leucémies.

Notre travail s'inscrit dans la thématique du laboratoire dont l'objectif est de mieux cerner les mécanismes transcriptionnels qui régulent l'expression du gène humain de la GSTP1-1, afin de décrire les mécanismes qui peuvent conduire à une surexpression en réponse aux médicaments anticancéreux.

Notre hypothèse générale de travail est la suivante :

L'induction de la différenciation des cellules cancéreuses est à la base de la « thérapie différenciante » qui repose sur l'utilisation de doses non cytotoxiques d'agents thérapeutiques. Cette approche vise à reprogrammer, au moins partiellement, des processus de différenciation dans les cellules tumorales tout en inhibant leur prolifération par un effet cytostatique. L'induction de la différenciation se traduit par une surexpression de gènes marqueurs, spécifiques de la voie stimulée. Ce phénomène relève de mécanismes transcriptionnels, voire post-transcriptionnels, mettant en jeu l'activation de facteurs de transcription dans la cellule. Dès lors, il ne peut être exclu que des gènes liés à la résistance contre les médicaments anticancéreux puissent constituer des cibles pour ces facteurs de transcription dans les cellules induites à se différencier.

Ainsi, le but de notre travail est d'étudier la régulation transcriptionnelle du gène codant pour la GSTP1-1 dans des cellules leucémiques humaines induites à se différencier par des agents thérapeutiques.

Outre leur capacité à induire un stress oxydant lorsqu'ils sont administrés à des concentrations cytotoxiques, l'ester de phorbol (TPA) et les deux anthracyclines, aclarubicine (acla) et doxorubicine (dox), sont connus pour induire la différenciation des cellules K562 lorsqu'ils sont utilisés à des concentrations non cytotoxiques. Les cellules sont alors induites à se différencier vers la voie mégacaryocytaire ou la voie érythroïde, en corrélation avec une

surexpression de gènes marqueurs, connus pour être régulés par des facteurs de transcription étroitement liés au phénomène de différenciation hématopoïétique. Lors d'études préalables au laboratoire, il a été mis en évidence que le promoteur du gène de la GSTP1-1 peut interagir, *in vitro* et dans des conditions de stress oxydatif, avec le facteur de transcription NF-E2 (Nuclear Factor Erythroid 2), qui participe à la différenciation des cellules érythrocytaires et mégacaryocytaires.

<u>Afin de répondre aux objectifs que nous nous sommes fixés, nous étudierons les</u> <u>points suivants</u> :

- Dans un premier temps nous examinerons par les techniques de northern blot et de western blot, l'expression du gène GSTP1 dans les cellules K562 en fonction de la voie de différenciation induite (érythroïde ou mégacaryocytaire) et de l'agent inducteur utilisé.
- 2. Afin de préciser et d'expliquer les résultats obtenus sur la régulation de l'expression du gène de la GSTP1-1 après induction de la différenciation des cellules K562, une autre lignée leucémique humaine ne possédant pas de potentialité de différenciation érythroïde ou mégacaryocytaire sera utilisée avec les inducteurs de la différenciation des cellules K562.
- 3. Afin de déterminer si des facteurs de transcription jouant un rôle essentiel dans la différenciation érythroïde et mégacaryocytaire sont impliqués dans la régulation du gène de la GSTP1, nous rechercherons la présence de séquences cibles pour ces facteurs au niveau de son promoteur grâce à un logiciel spécifique.
- 4. Afin d'évaluer si les inducteurs de la différenciation des cellules K562 sont capables de moduler l'expression des facteurs de transcription associés au sites identifiés dans le promoteur du gène de la GSTP1-1, nous réaliserons des expériences de transfection transitoire. Ces expériences seront réalisées avec un plasmide rapporteur capable de répondre au facteur susceptible de se fixer sur un des sites identifiés. Ces sites potentiellement *cis*-régulateurs et des facteurs de transcription correspondants, seront utilisés dans des expériences de co-transfection dans des cellules qui n'expriment par ces facteurs.

- 5. Les interactions entre ces séquences d'ADN identifiées et des facteurs nucléaires extraits de différentes lignées cellulaires seront étudiées par retard de migration sur gel. La spécificité des complexes nucléo-protéiques ainsi observés sera évaluée par des expériences de compétition. La nature de ces complexes sera déterminée par l'utilisation d'anticorps et l'analyse par retard de migration sur gel.
- 6. Afin d'évaluer si les séquences mises en évidence sont impliquées dans la régulation de la GSTP1-1 au cours de la différenciation, l'activité liante au promoteur de son gène, des facteurs identifiés précédemment, sera étudiée par retard de migration sur gel avec des facteurs nucléaires extraits de cellules différenciées.
- 7. Afin d'expliquer les différences observées avec les différents inducteurs utilisés, au niveau de l'expression de la GSTP1-1 et de l'expression des facteurs impliqués dans la régulation, nous étudierons les effets des inducteurs de la différenciation au niveau de la régulation post-transcriptionnelle de la GSTP1-1.
- 8. Enfin, nous utiliserons la technique d'hybridation de micropuces afin de mettre en évidence les variations au niveau du génome entier suite a une cinétique d'induction de la différenciation érythroïde des cellules K562 par la doxorubicine.

MATERIELS ET METHODES

I- CULTURE ET MANIPULATION DE CELLULES EUCARYOTES

I. 1- Les lignées cellulaires

Nos études ont été réalisées sur différentes lignées cellulaires d'origine humaine provenant de la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Allemagne) (Figure 7, Tableau 5).

<u>Tableau 5</u> : Lignées cellulaires utilisées pour l'étude de l'expression de la GSTP1-1 humaine.

Lignée	Type de cancer	Marqueur de surface	Densité maximale
Jurkat	Leucémie à cellules T aiguë	CD2+, CD3+, CD4+, CD5+, CD6+, CD7+, CD8-, CD13-, CD19-, CD34+, TCRalpha/beta+, TCRgamma/delta-	1,5.10 ⁶ cellules/mL
U937	Lymphome histiocytique	CD3-, CD13(+), CD14-, CD15+, CD19-, CD33+, CD34-, CD68+	10 ⁶ cellules/mL
Raji	Lymphome de Burkitt	CD3-, CD10+, CD13(+), CD19+, CD20+, CD37+, HLA-DR+, smIgG(+), cyIgG-, smIgM(+), cyIgM+, sm/cykappa-, sm/cylambda-	1,5.10 ⁶ cellules/mL
K562	Leucémie myéloïde chronique	CD3-, CD13+, CD19-, CD34-, CD41(+), CD42+, CD45+, CD71+, GlyA(+)	1,5.10 ⁶ cellules/mL

GlyA : glycophorine A

I. 1. 1- La lignée Jurkat

La lignée JURKAT a été établie à partir des cellules périphériques d'un patient de 15 ans atteint d'une leucémie aiguë à cellules T en 1974 (Schneider *et al.*, 1977).



<u>Figure 7</u> : L'hématopoïèse.

Les lignées leucémiques utilisées dans notre étude ont été établies à partir de cellules engagées dans différentes voies de différenciation de l'hématopoïèse.

I. 1. 2- La lignée U937

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 en 1974 (Sundstrom and Nilsson, 1976). Les cellules U937 ont des propriétés de monocytes et expriment des marqueurs de cette lignée comme le récepteur au facteur C3 du complément. Cette lignée peut être induite vers la différenciation monocytaire. Ces cellules expriment l'ARNm pour c-myc.

I. 1. 3- La lignée Raji

La lignée RAJI a été établie à partir des cellules provenant de la glande maxillaire d'un patient africain de 11 ans atteint d'un lymphome de Burkitt en 1963 (Pulvertaft, 1964).

I. 1. 4- La lignée K562

La lignée K562 a été établie à partir des cellules prélevées dans le liquide pleural d'une patiente de 53 ans atteinte d'une leucémie myéloïde chronique en crise blastique aiguë, en 1970 (Lozzio and Lozzio, 1975). Il s'agit de cellules considérées comme multipotentes, bloquées à un stade immature de différenciation, capables de s'orienter vers l'une des trois lignées circulantes, érythroïde, mégacaryocytaire ou monocytaire, en présence d'inducteurs appropriés (Sutherland *et al.*, 1986 ; Tsiftsoglou *et al.*, 2003 ; Vainchenker *et al.*, 1981).

D'un point de vue caryotypique, les cellules K562 sont porteuses du 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 sur le chromosome 22 (Woessmann and Mivechi, 2001). Le gène hybride qui résulte de cette translocation conduit à la synthèse d'une protéine de fusion Bcr-Abl à forte activité tyrosine-kinase et qui serait responsable de la résistance de cette lignée à l'apoptose (McGahon *et al.*, 1994).

Matériels et méthodes

I. 2- Les conditions de culture

I. 2. 1- Le milieu de culture

Toutes les cellules sont entretenues en suspension dans du milieu liquide RPMI 1640 avec ultraglutamine 1 (Glutamine stabilisée) (Bio Whittaker), supplémenté par un mélange d'antibiotiques (Pénicilline 100 U/mL et Streptomycine 100 μ g/mL) et d'antimycotique (Fungizone B, 0,25 μ g/mL) (Bio Whittaker) et par 10 % (v/v) de sérum de veau fœtal (SVF) (Bio Whittaker) décomplémenté.

I. 2. 2- Standardisation des conditions de culture

Les cellules sont cultivées en boîte plastique ventilée dans un incubateur thermostaté à $+37^{\circ}$ C, saturé en humidité (95 %) et équilibré à 5 % de CO₂ pour tamponer le pH du milieu de culture. Les cellules sont ensemencées à 5.10⁴ cellules/mL pour les K562, à 10⁵ cellules/mL pour les Raji, les Jurkat et les U937. Pour le repiquage, tous les trois jours, les cellules sont centrifugées à 350 g pendant 10 min., comptées, puis réensemencées à la concentration initiale.

I. 2. 3- Congélation/décongélation des stocks de cellules

Les stocks de cellules congelées sont préparés dans du milieu RPMI contenant 10 % de DMSO et additionné de 20 % de SVF. Les cellules sont congelées lentement jusqu'à -80°C, puis sont conservées dans l'azote liquide. La décongélation des cellules se fait en les réchauffant rapidement à 37°C dans leur milieu de culture usuel. Les cellules sont utilisées pendant un nombre restreint de passages (± 30) avant la décongélation d'un nouveau stock.

I. 3- Viabilité des cellules : test de coloration au bleu trypan

Les cellules en culture sont diluées au demi dans une solution de bleu trypan et laissées en contact pendant trois min. Pendant ce lapse de temps, le colorant pénètre dans les cellules mortes. Le nombre de cellules bleues par rapport au nombre total de cellules est ensuite compté sur cellule de Malassez.

Matériels et méthodes

II- LES EFFECTEURS PHARMACOLOGIQUES ET TRAITEMENTS CELLULAIRES

Le traitement des cellules est toujours réalisé au début de la phase de croissance exponentielle, après 24 h de croissance dans du milieu frais contenant 10 % de SVF.

Différents agents pharmacologiques ont été utilisés comme inducteurs des voies érythroïde et mégacaryocytaire des cellules K562. Ces molécules sont connues pour induire la différenciation par des mécanismes différents, mais qui ne sont pas forcément totalement clarifiés. Parmi ces inducteurs, deux anthracyclines : la doxorubicine (dox) et l'aclarubicine (acla), ont été utilisées comme inducteurs de la différenciation érythroïde et un ester de phorbol : le TPA est un inducteur potentiel de la lignée K562 vers la voie mégacaryocytaire. Ces trois agents ont également été utilisés pour leur potentiel à générer un stress oxydant.

II. 1- Les inducteurs de la différenciation

II. 1. 1- Les inducteurs de la voie érythroïde

II. 1. 1. 1- L'aclarubicine (acla)

L'aclarubicine est le nom commercial de l'aclacinomycine, antibiotique antinéoplasique isolé en 1975 à partir d'une culture de *Streptomyces Galilaeus* (Oki *et al.*, 1975). L'aclacinomycine appartient au groupe des anthracyclines de classe II. Celle-ci est constituée d'une aglycone, l'alkinove (chromophore) sur laquelle sont attachés trois sucres (L-rhodosamine, 2-désoxyfucose et L-cinérulose) (Fourcade *et al.*, 1983) (**Figure 8**). Cet antibiotique glycosidique est commercialisé sous forme d'un lyophilisat de chlorydrate d'aclarubicine (Sigma). La solution mère, à 10⁻³ M, est préparée par dissolution à l'abri de la lumière de 5 mg du lyophilisat (M : 848 g.mol⁻¹) (Sigma) dans 5,9 mL d'eau stérile. Cette solution est répartie en aliquotes et conservée trois semaines à - 20°C. Les dilutions pour les traitements sont effectuées extemporanément à l'abri de la lumière dans du milieu de culture.

II. 1. 1. 2- La doxorubicine (dox)

La doxorubicine est le nom commercial de l'adriamycine, antibiotique isolé à partir d'une culture de souche mutante de *Streptomyces Caesius* (Arcamone *et al.*, 1969). L'adriamycine (ou 14-hydroxydaunomycine) appartient au groupe des anthracyclines de classe II. Celle-ci est constituée d'un hétérocycle anthracyclique lié à une daunosamine (**Figure 8**). Cet antibiotique glycosidique est commercialisé sous forme d'un lyophilisat de chlorydrate de doxorubicine (Sigma). La solution mère, à 10⁻³ M, est préparée par dissolution à l'abri de la lumière de 5 mg du lyophilisat (MM : 579,98 g.mol⁻¹) (Sigma) dans 8,6 mL d'eau stérile. Cette solution est répartie en aliquotes et conservée trois semaines à - 20°C. Les dilutions pour les traitements sont effectuées extemporanément à l'abri de la lumière dans du milieu de culture.

II. 1. 1. 3- L'hémine

L'hémine humaine ou ferriprotoporphyrine IX possède une structure aromatique (porphyrine) qui est constituée de quatre noyaux pyrrol, comprenant chacun un atome d'azote et quatre atomes de carbone. Les carbones périphériques de ces noyaux sont substitués par des chaînes latérales courtes (**Figure 8**). L'hémine est un dérivé naturel de l'hème (forme oxydée), elle est obtenue par chauffage d'une solution d'hémoglobine additionnée d'acide acétique et de chlorure de sodium.

La solution mère, à 10^{-3} M, est préparée par dissolution à l'abri de la lumière de 65,2 mg du lyophilisat (MM : 652 g.mol⁻¹) (ICN) dans 2,5 mL d'éthanol absolu et 2,5 mL de KOH 0,2 M. 95 mL de tampon phosphate 1X (PBS) sont alors ajoutés. Après filtration sur filtre 0,22 μ m, la solution est aliquotée et conservée à -20° C. Les dilutions pour les traitements sont effectuées extemporanément à l'abri de la lumière dans du milieu de culture.









D

B



<u>Figure 8</u> : Formules semi-développées des agents utilisés pour induire la différenciation des cellules K562.

Acla (A), dox (B) : R=OH, hémine (C), TPA (D).

Matériels et méthodes

II. 1. 2- Inducteur de la voie mégacaryocytaire : Ester de phorbol

Parmi les esters de phorbol, celui dont les effets ont été les plus étudiés est le 12-Otetradecanoylphorbol 13-acetate ou TPA, c'est un agent qui est principalement utilisé comme promoteur de tumeur (**Figure 8**).

La solution mère, à 10⁻³ M, est préparée par dissolution à l'abri de la lumière de 1 mg du lyophilisat (MM : 616,8 g.mol⁻¹) (ICN) dans 1,62 mL de diméthylsulfoxide (DMSO). Cette solution est répartie en aliquotes et conservée à -80°C. Les dilutions pour les traitements sont effectuées extemporanément à l'abri de la lumière dans du milieu de culture.

II. 1. 3- L'acide butyrique

L'acide butyrique ou *n*-butanoïque est un acide gras à courte chaîne (CH_3 - CH_2 - CH_2 -COOH) (**Figure 8**). Il est d'origine naturelle et est retrouvé par exemple dans la lavande, la citronelle, la noix de muscade, les fraises et le beurre. Cet agent présente la particularité de pouvoir induire la différenciation érythroïde ou mégacaryocytaire des cellules K562 en fonction de la concentration utilisée. C'est un inhibiteur des histone désacétylases (HDAC).

La solution mère (MM : 88,11 g.mol⁻¹ et densité : 0,96) provient de chez MERCK. Les dilutions pour les traitements sont effectuées extemporanément dans du milieu de culture.

II. 2- Autres agents utilisés

II. 2. 1- L'actinomycine D

L'actinomycine D peut être utilisée comme un inhibiteur de l'ARN polymérase chez les eucaryotes, elle permet donc de bloquer la transcription en s'intercalant entre deux bases azotées de l'ADN. Elle est utilisée pour étudier la dégradation des ARNm et en déterminer la durée de vie sous l'effet d'un traitement par exemple.

La solution mère, à 500 μ g/mL, est préparée par dissolution de 5 mg du lyophilisat (MM : 1255,5 g.mol⁻¹) (Sigma) dans 10 mL d'eau milliQ stérile et est conservée à 4°C à l'abri de la lumière. Les dilutions pour les traitements sont effectuées extemporanément dans du milieu de culture.

64

Les cellules sont traitées par 5 μ g/mL d'actinomycine D pendant différents temps, puis les ARN totaux sont extraits et les ARNm sont alors étudiés. La demi-vie des ARNm (t_{1/2}) est donnée par le temps de traitement à l'actinomycine D nécessaire pour que 50 % des ARNm soient dégradés par rapport à des cellules non traitées.

II. 2. 2- Le cycloheximide

Le cycloheximide est un antibiotique qui est capable d'inhiber le centre peptidyl transférase du ribosome qui est l'élément nécessaire à l'hydrolyse de la liaison ester entre le dernier ARNt et la chaîne polypeptidique, libérant ainsi le peptide néosynthétisé lors de la synthèse protéique. Le cycloheximide peut donc être utilisé comme un inhibiteur spécifique de la traduction chez les eucaryotes.

La solution mère, à 100 mg/mL, est préparée par dissolution de 1 g du lyophilisat (MM : 281,4 g.mol⁻¹) (Sigma) dans 10 mL d'éthanol et est conservée à 4°C. Les dilutions, pour les traitements, sont effectuées extemporanément, dans du milieu de culture.

II. 2. 3- Le tumor necrosis factor (TNF) α

Le TNF α ou cachectine est une cytokine sécrétée par les monocytes / macrophages, les lymphocytes et les mastocytes et qui sert de médiateur de l'immunité. Le TNF α est un inducteur typique de NF- κ B.

La solution mère, à 10 μ g/mL, est préparée par dissolution de 10 μ g du lyophilisat (Sigma) dans 1 mL d'une solution stérile d'albumine de sérum de veau à 0,5 % (p/v) dans du PBS 1X et est conservée à 4°C. Les dilutions pour les traitements sont effectuées extemporanément dans du milieu de culture.
III- MISE EN EVIDENCE DE LA DIFFERENCIATION ERYTHROIDE OU MEGACARYOCYTAIRE DES CELLULES K562

III. 1- Mise en évidence de la différenciation érythroïde des cellules K562 : test à la benzidine

III. 1. 1- Principe

L'hémoglobine peut être utilisée comme un marqueur phénotypique de la lignée érythroïde. En effet, selon la méthode d'Orkin *et al.*, l'hémoglobine se colore en bleu en présence d'eau oxygénée et de benzidine réduite. Grâce à ses propriétés pseudoperoxydasiques, l'hémoglobine est capable de décomposer l'eau oxygénée (H_2O_2) en eau et en oxygène moléculaire (O_2). L' O_2 ainsi libéré oxyde la benzidine qui prend une coloration bleue visible au microscope à contraste de phase. Le taux de cellules différenciées est exprimé en pourcentage de cellules synthétisant de l'hémoglobine ou benzidine positives par rapport à la population totale (Orkin *et al.*, 1975).

III. 1. 2- Réactifs

Le chlorhydrate de benzidine (Fluka Chimika) est dissout dans une solution d'acide acétique 0,5 M pour obtenir une solution à 0,2 %. Cette solution de benzidine est conservée à l'abri de la lumière, à + 4°C pendant plusieurs mois.

> PBS (Phosphate Buffered Saline) 10X, pH ajusté à 7,6:

- NaCl	137 mM
- KCl	2,7 mM
- Na ₂ HPO ₄	4,3 mM
- KH ₂ PO ₄	1,4 mM

Matériels et méthodes

III. 1. 3- Protocole

 3.10^5 cellules sont centrifugées à 350 g pendant 10 min. Le culot est ensuite lavé avec 1 mL de PBS 1X. Après une nouvelle centrifugation à 350 g pendant 10 min., le culot cellulaire est resuspendu dans 100 μ L de sérum physiologique (NaCl 0,9 %). A cette suspension cellulaire sont ajoutés 50 μ L d'un mélange extemporané de benzidine / H₂O₂. Ce mélange est composé d'1 mL de solution de benzidine à 0,2 % et 20 μ L de peroxyde d'hydrogène (Sigma) à 110 volumes. La coloration se développe à l'obscurité et à température ambiante en 20 min. environ. La suspension cellulaire est ensuite diluée dans 300 μ L de NaCl 0,9 %. Les cellules sont comptées, sur lame de Malassez, au microscope optique à contraste de phase. Le nombre de cellules bleues ayant synthétisé de l'hémoglobine est rapporté au nombre total de cellules et exprimé en pourcentage de cellules benzidine positives.

III. 2- Mise en évidence de la différenciation mégacaryocytaire des cellules K562 :étude de l'expression du marqueur de surface CD61 par cytométrie en flux

III. 2. 1- Principe

La cytométrie en flux est la méthode de choix pour révéler des antigènes cellulaires de surface (ou intra-cytoplasmiques) par immunophénotypage. Elle est basée sur une réaction d'immunofluorescence et constitue donc une association de la spécificité des anticorps monoclonaux pour les antigènes respectifs et des propriétés des fluorochromes. Un anticorps fluorescent, c'est-à-dire marqué par le fluorochrome, se fixe spécifiquement à un antigène de surface. L'immunofluorescence est dite directe parce que l'anticorps monoclonal employé est conjugué directement à un fluorochrome.

Ainsi, la mesure directe de l'immunofluorescence d'un anticorps dirigé contre le marqueur de surface CD61 ou glycoprotéine IIIA (GPIIIA) peut être utilisée comme un des marqueurs phénotypiques de la lignée mégacaryocytaire. La différenciation mégacaryocytaire est évaluée par le taux d'expression de ce marqueur (Matsumura *et al.*, 2000).

Le taux de cellules différenciées est exprimé en pourcentage de cellules présentant le marqueur de surface CD61 par rapport à la population totale.

67

Matériels et méthodes

III. 2. 2- Réactifs

L'anticorps dirigé contre la glycoprotéine plaquettaire IIIa ou CD61 est un anticorps monoclonal de souris couplé à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC). Ce conjugué anticorps CD61-FITC (Dako, Danemark) est à 100 μ g/mL.

Le contrôle isotypique est réalisé grâce à une immunoglobine de souris (IgG₁), couplée au FITC. Ce conjugué anticorps IgG₁-FITC (Immunotech, France) est à 100 μ g/mL.

III. 2. 3- Protocole

 2.10^{5} cellules sont centrifugées à 350 g pendant 10 min. Le culot est ensuite lavé avec 1 mL de PBS 1X. Après une nouvelle centrifugation à 350 g pendant 10 min., le culot cellulaire est resuspendu dans 100 μ L de PBS 1X. A cette suspension cellulaire sont ajoutés 20 μ L d'anticorps CD61-FITC. Le marquage est réalisé à température ambiante pendant 20 min. La suspension cellulaire est ensuite lavée deux fois dans 2 mL de PBS 1X et centrifugée à 350 g pendant 10 min. Le culot est repris dans 200 μ L d'un mélange de PBS 1X-azide de sodium 0,01 % (NaN₃). Le contrôle isotypique est traité de la même façon, mais avec 20 μ L d'anticorps IgG₁-FITC. L'immunofluorescence a ensuite été mesurée par un cytomètre FACSCalibur (Becton-Dickison). Les données sont acquises et ensuite traitées par le système informatique Cellquest. Le nombre de cellules exprimant le marqueur CD61 est rapporté au nombre total de cellules et exprimé en pourcentage en tenant compte du témoin et du contrôle isotypique.

IV- EXTRACTION DES FACTEURS NUCLEAIRES ET CYTOPLASMIQUES

IV. 1- Principe

Les facteurs nucléaires sont extraits à partir de lots cellulaires traités ou non, selon la méthode décrite par Schreibe*r et al.* (Schreiber *et al.*, 1989). Les membranes plasmique sont lysées dans un milieu hypertonique en présence de détergent dans des solutions salines contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases.

IV. 2- Réactifs

Remarque : tous les produits chimiques proviennent de la firme ICN (Belgique) et les inhibiteurs de protéases proviennent de la société Roche (Allemagne), sauf indication contraire.

> Tampon A : tampon de lyse

- Hepes pH 7,9	10 mM
- KCl	10 mM
- EDTA (Sigma)	0,1 mM
- EGTA	0,1 mM
- Dithiotréitol (DTT)	1 mM

> Tampon C : tampon d'extraction

- Hepes pH 7,9	20 mM
- NaCl	0,4 M
- EDTA	1 mM
- EGTA	1 mM
- DTT	1 mM
- Glycérol	20 % (v/v)

A ces deux tampons, sont ajoutés extemporanément, un mélange d'inhibiteurs de protéases constitué de :

- Phényl méthyl sulfonyl fluoride (PMSF)	1 mM
- Aprotinine	1000 U/mL
- Pepstatine	15 μg/mL
- Leupeptine	30 µg/mL
- O-phénanthroline (ICN)	1 mM

IV. 3- Protocole

Les tampons A et C sont préparés extemporanément et toutes les étapes du protocole sont effectuées à 4°C dès que les cellules sont récupérées de l'incubateur.

4.10⁶ cellules sont centrifugées à 350 g pendant 10 min. Après lavage au PBS 1X le culot est remis en suspension par agitation douce dans 400 μ L de tampon A. Après 15 min d'incubation dans la glace, on ajoute 25 μ L de détergent Igepal (ICN) à 10 % (v/v) et le mélange est agité vigoureusement au vortex pendant 10 s. L'homogénat est centrifugé 1 min. à 10.000 g à 4°C pour sédimenter les noyaux. Le surnageant qui contient les protéines cytoplasmiques est réparti en aliquotes qui sont conservées à -80°C. Le culot nucléaire est repris par 50 μ L de tampon C. La suspension est placée 15 min. en agitation horizontale vigoureuse à 4°C, puis centrifugée 5 min. à 12.000 g à 4°C.

Le surnageant qui contient les extraits nucléaires est réparti en aliquotes qui sont immédiatement congelées dans l'azote liquide puis stockées à -80°C.

IV. 4- Détermination de la concentration protéique des extraits cellulaires

Il faut déterminer la concentration en protéines des extraits cellulaires pour standardiser la quantité de protéines que l'on utilisera dans les manipulations ultérieures.

Les protéines contenues dans les extraits nucléaires et cytoplasmiques sont donc dosées par dosage colorimétrique au bleu de Coomassie grâce au réactif BIORAD en spectrophotométrie selon la méthode de Bradford (Bradford, 1976). Sa fixation sur les protéines déplace le maximum d'absorption du colorant de 465 nm (rouge) à 595 nm (bleu). Ce dosage est réalisé en utilisant une gamme étalon préparée à l'aide de concentrations décroissantes d'albumine de sérum de veau (BIORAD).

70

V- PREPARATION D'EXTRAITS D'ARN

V. 1- Extraction des ARN totaux

Les ARN totaux sont extraits à partir 5.10^6 cellules lavées au PBS 1X et centrifugées à 350 g pendant 10 min., par le kit Nucleospin RNA II (Macherey-Nagel, Allemagne). Avec cette méthode, les cellules sont lysées dans un tampon contenant une grande quantité d'ions chaotropiques. Ce tampon permet d'inactiver immédiatement les ARNases et de constituer un environnement qui facilite l'adsorption de l'ARN sur une colonne de silice. Ensuite une étape de lavage, avec deux tampons différents, permet d'éliminer les sels, les métabolites et les macromolécules cellulaires. Les ARN totaux purs sont finalement élués avec de l'eau et conservés à -80°C.

V. 2- Détermination de la concentration en ARN des extraits cellulaires

Il faut déterminer la concentration en ARN des extraits cellulaires pour standardiser la quantité d'ARN totale que l'on utilisera dans les manipulations ultérieures.

Les bases pyrimidiques et puriques des acides nucléiques absorbent dans l'UV entre 240 et 300 nm. La concentration en ARN des échantillons peut donc être dosée par spectrophotométrie. Les mesures sont effectuées dans l'UV à 260 nm, en sachant qu'une unité de D.O. correspond à 40 μ g/mL d'ARN.

V. 3- Détermination de la qualité des extraits d'ARN par la technologie Agilent

La qualité des ARN totaux extraits est vérifiée par la technique des puces Agilent (RNA 6000 Nano Labchip®, Agilent Technologie) grâce à un bioanalyseur (Bioanalyzer 2100, Agilent Technology). La technologie Agilent permet de mesurer quantitativement et qualitativement des ARN testés avec une grande sensibilité.

V. 3. 1- Principe de la technologie Agilent

Les puces Agilent sont des lames de verre sur lesquelles est gravé un réseau de capillaires et dans lesquelles, un gel d'acrylamide est coulé. Les échantillons sont déposés

dans des puits simultanément avec un témoin de calibrage de concentration connue qui permet de déterminer la concentration des échantillons de manière quantitative. Ensuite, l'électrophorèse est réalisée grâce à des électrodes qui vont être plongées dans les puits de dépôts et qui vont faire migrer les ARN marqués par un agent fluorescent. Un capteur va mesurer l'intensité de fluorescence lors de la migration de l'ARN. Un marqueur, de concentration définie, réalisé grâce à une solution de différents marqueurs de taille, permet le calibrage de l'appareil.

V. 3. 2- Réactifs et protocole

La qualité des ARN est testé avec le kit (RNA 6000 Nano LabChip®) en suivant les indications fournies. Le kit contient les puces, la station de préparation et tous les réactifs nécessaires.

Après avoir installé la puce sur la station de préparation, 9 μ L de gel d'acrylamide sont déposés dans un puits réservé à cet effet. Le gel est ensuite injecté dans le réseau de capillaires en exerçant une pression positive à l'aide d'une seringue fixée sur la station. Deux autres dépôts de 9 μ L sont réalisés dans deux autres puits de la puce. On dépose ensuite, dans les puits réservés à cet effet, 1 μ L de l'échantillon à tester (préalablement dénaturé pendant 2 min. à 70°C et refroidi sur glace) avec 5 μ L du marqueur (dont la concentration est définie à 150 $\mu g/\mu$ L). Ce marqueur est également ajouté dans le puits destiné au marqueur de taille. Dans ce puits, sera déposé 1 μ L d'une solution de marqueur de taille dénaturée (Ambion® RNA Ladder 6000, Ambion). Après 1 minute d'agitation au vortex, la puce est alors placée dans le bioanalyseur.

Le logiciel d'analyse (Agilent 2100 Bioanalyser Software), couplé au lecteur du bioanalyseur, après électrophorèse et intégration des données, va réaliser une représentation de l'intensité de fluorescence qui est en corrélation directe avec la quantité d'ARN en fonction du temps de migration. Le marqueur présent dans le tampon de lecture va permettre d'aligner les différentes mesures entre elles.

VI- ETUDE DE L'EXPRESSION DE L'ARNM DE GSTP1-1 PAR NORTHERN BLOT

VI. 1- La sonde d'ADNc

VI. 1. 1- La séquence sonde oligonucléotidique utilisée

La sonde utilisée provient de l'American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, U.S.A.) et correspond à un fragment d'ADNc de 0,72 kb codant de l'ARNm de GSTP1-1 humaine.

VI. 1. 2- Marquage de la sonde

VI. 1. 2. 1- Principe et réactifs

Dans notre étude, le radiomarquage est réalisé grâce au kit de marquage Rediprime[™] II (Random Prime Labelling System, AP Biotech). Celui-ci permet un marquage rapide de la sonde d'ADNc par la méthode du random priming. Il contient à l'état lyophilisé le fragment de Klenow de l'ADN polymérase I, les désoxyribonucléotides sauf le dCTP et les amorces composées de toutes les combinaisons statistiques de séquences octamériques. Les ADNc simples brins s'hybrident avec les octamères complémentaires présents dans le milieu réactionnel et servent d'amorces pour l'ADN polymérase I. Les espaces laissés libres entre les octamères hybridés au brin d'ADNc sont comblés par l'action de l'enzyme de Klenow qui permet également l'incorporation de dCTP radiomarqué.

Tampon TE (tris EDTA), pH ajusté à 7,6 :
Tris-HCl 10 mM
EDTA (acide éthylènediamine tétracétique), pH 8 0,5 mM

VIII. 1. 2. 2- Protocole

25 ng d'ADNc double brin (sonde oligonucléotidique) sont dilués dans un volume de 45 μ L de tampon TE, puis dénaturés par chauffage à 100 °C pendant 5 min. et placés dans la glace.

Le contenu du kit Rediprime est reconstitué avec l'ADN dénaturé et 5 μ L de $[\underline{\gamma}^{32}P]dCTP$ à 3000 Ci/mmol (10 μ Ci/ μ L) d'activité spécifique. Le marquage de la sonde se fait pendant 1 h au bain-marie à 37°C. La sonde radioactive est ensuite purifiée sur colonne de silice avec un kit "Qiaquick Removal Nucleotide kit" de QIAGEN (Westburg, Belgique) et éluée avec de l'eau.

VI. 2- Northern blot et hybridation

VI. 2. 1- Principe

Cette méthode consiste à transférer les extraits d'ARN totaux sur une membrane après séparation par électrophorèse dans un gel d'agarose. La vitesse de migration des ARN dans un champ électrique est inversement proportionnelle à leur taille. Après électrophorèse, les ARN contenus dans le gel sont transférés sur une membrane de nylon qui est ensuite mise en présence d'une sonde oligonucléotidique d'ADNc dénaturée et radiomarquée, complémentaire d'un ARNm. Le complexe ARNm-ADNc spécifique formé pourra ainsi être détecté par autoradiographie.

VI. 2. 2- Réactifs

 \triangleright

Gel d'agarose à 1 % ·

Remarque : Tous les produits chimiques proviennent de la firme ICN (Belgique), sauf indication contraire ; et toutes les solutions sont préparées avec de l'eau traitée au DEPC (diéthyl-pyrocarbonate) avant d'être autoclavées.

- Agarose	1 % (p/v)
- Tampon MOPS	1X
- Formaldéhyde	2 % (v/v)
- Bromure d'éthidium	7 µg/mL

74

Tampon MOPS 10X (pH 7) :	
- MOPS (acide 4-morpholino propane sulfonique	e) 0,2 M
- Acétate de Sodium, pH 4	50 mM
-EDTA, pH 8	10 mM
> Tampon Denhart's 50X :	
- Ficoll	1 % (p/v)
- Polyvinylpyrolidone	1 % (p/v)
- albumine de sérum de veau	1 % (p/v)
Tampon de préhybridation/hybridation pour son	de ADN :
- Formamide	50 % (v/v)

	()
- SSC	6X
- EDTA	5 mM
- SDS (sodium dodécyl sulfate)	0,1 % (p/v)
A ajouter extemporanément après dénaturation pendant 5 min. à	100 °C :
- ADN de sperme de hareng	200 µg/mL
- ARNt de levure	100 µg/mL
- Denhart's	5X

L'ADN de sperme de hareng et l'ARNt de levure proviennent de la firme Invitrogen (Belgique).

> SSC 20X : pH ajusté à 7,0

- NaCl	3 M
- Citrate de Sodium	0,3 M

Tampon échantillon :

- glycérol	50 % (v/v)
- EDTA	1 mM
- Bleu de Bromophénol	0,5 % (p/v)

VI. 2. 3- Protocole

10 μ g d'ARN totaux sont dénaturés pendant 15 min. à 65°C dans un mélange dénaturant constitué de :

- MOPS 10X	2 µL
- Formamide	10 µL
- Formaldéhyde	3,5 µL
- H ₂ O	qsp 20 <i>µ</i> I

Après 15 min. le mélange est alourdi par addition de 2 μ L de tampon échantillon avant d'être déposé dans le puits d'un gel d'agarose à 1 %. La migration des ARN dans ce gel se fait à 10 V/cm pendant environ 3 h dans du tampon MOPS 1X.

Après électrophorèse, les ARN sont transférés pendant 2 h en présence de tampon de transfert SSC 20X grâce à un Vacuum Blotter (Appligène, Strasbourg, France) sur une membrane de nylon Hybond-XL (Amersham, Pays-Bas).

Après avoir vérifié que les ARN sont transférés, grâce au bromure d'éthidium un agent intercalant des acides nucléiques qui fluoresce sous lumière UV, la membrane est lavée deux fois dans du SSC 2X puis les ARN sont fixés par exposition de la membrane aux UV (254 nm) pendant 5 min. (à environ 30 cm de la source).

La membrane est alors mise pendant au moins 1 h à 42 °C dans un four à hybrider (Appligène, Strasbourg, France) avec 10 mL de tampon de préhybridation. La solution de préhybridation est ensuite remplacée par le même volume de tampon d'hybridation contenant la sonde radiomarquée dénaturée 5 min. à 100°C puis refroidie dans la glace. Le tube est alors remis à 42°C pendant une nuit.

La membrane est ensuite lavée de la façon suivante :

1 fois 5 min. à température ambiante avec SSC 2X, SDS 0,5 % (p/v), sous agitation.

3 fois 5 min. à température ambiante avec SSC 2X, SDS 0,1 % (p/v) sous agitation.

3 fois 30 min. à 65 °C avec SSC 1X, SDS 0,1 % (p/v), sous agitation.

Après les lavages, une autoradiographie est réalisée par mise en contact de la membrane avec un film d'autoradiographie (Kodak X-OMAT, Amersham-Pharmacia, Pays-Bas) en présence d'écrans intensifiants. Le signal radioactif sur la membrane est aussi visualisé et analysé grâce à un Phosphorimager (Cyclone, Perkin Elmer, Belgique).

76

VII- ETUDE DE L'EXPRESSION DE L'ARNm PAR REVERSE TRANSCRIPTASE -POLYMERASE CHAIN REACTION (RT-PCR)

VII. 1- Transcription inverse

VII. 1. 1- Principe

La transcription inverse est un procédé enzymatique qui permet d'obtenir des ADN complémentaires (ADNc) à partir des ARN totaux extraits de cellules.

VII. 1. 2- Réactifs et protocole

La synthèse d'ADNc est réalisée à l'aide du kit : SuperScriptTM First-strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen). $5\mu g$ d'extrait d'ARN totaux sont soumis à une transcription inverse en utilisant les amorces d'oligo(dt).

VII. 2- Amplification par polymerase chain reaction (PCR)

VII. 2. 1- Principe

L'amplification par PCR, est un procédé qui permet de produire un grand nombre de copies d'une séquence d'ADNc cible à partir des produits obtenus par RT (ADNc totaux) grâce à deux séquences oligonucléotidiques connues appelées amorces qui sont spécifiques des gènes cibles. L'analyse des produits de PCR est réalisée par électrophorèse sur gel d'agarose. La vitesse de migration des ADNc dans un champ électrique est proportionnelle à leur taille. Les ADNc sont visualisés grâce au bromure d'éthidium dans le gel.

VII. 2. 2- Réactifs

Tampon échantillon	
- Glycérol	30 % (v/v)
- TBE (tris borate EDTA)	1X
- Bleu de bromophénol	0,005 % (p/v)
- Xyléne cyanole	0,005 % (p/v)

TBE 10X :	
- Tris	0,9 M
- acide borique	0,9 M
- EDTA	25 mM

VII. 2. 2- Protocole

 \succ

Les ADNc sont amplifiés par PCR avec le même kit que celui utilisé pour la transcription inverse (SuperScriptTM First-strand Synthesis System for RT-PCR) en utilisant la Platinium[®] *Taq* DNA Polymerase High Fidelity et les amorces spécifiques des gènes cibles (**Tableau 6**). L'amplification est réalisée dans un thermocycleur (Eppendorf), après une phase de dénaturation initiale et d'activation de l'enzyme *Taq*I de 5 min. à 94°C, par 20 répétitions du cycle : 94°C pendant 2 min. (dénaturation), 60°C pendant 1 min. (hybridation) et 68°C pendant 2 min. (élongation). L'amplification est terminée par une phase d'élongation supplémentaire de 2 min. à 68°C. Les produits de PCR sont ensuite alourdis par 10 % de tampon échantillon et sont déposés sur un gel d'agarose à 2 % contenant du bromure d'éthidium et sont soumis à une électrophorèse dans du tampon TBE 1X. En utilisant les propriétés du bromure d'éthidium, le gel est photographié pour permettre la quantification des signaux obtenus.

Remarque : pour chaque amplification, on réalise parallèlement une amplification du gène S14, afin de standardiser la quantité d'ARN utilisée.

<u>Tableau 6</u> : Séquences des oligonucléotides utilisés pour les expériences d'amplification par PCR.

Gène cible	Séquence des amorces
GATA-1	(s) : 5'-TCAATTCAGCAGCCTATTCC-3' (as) : 5'-TTCGAGTCTGAATACCATCC-3'
GATA-2	(s) : 5'-TGTTGTGCAAATTGTCAGACG-3' (as) : 5'-CATAGGTGCCATGTGTCCAGC-3'
S14	(s) : 5'-GGCAGACCGAGATGAATCCTC-3' (as) : 5'-CAGGTCCAGGGGGTCTTGGTCC-3'

Le nom des gènes cibles et les paires de séquences oligonucléotides ayant servi d'amorces pour l'amplification sont indiqués. Sens (s) et antisens (as).

VIII- ETUDE DE L'EXPRESSION PROTEIQUE PAR WESTERN BLOT

VIII. 1- Principe

Cette technique combine l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en condition dénaturante (SDS-PAGE) qui permet une analyse des protéines qui migrent en fonction de leur taille dans un champ électrique, à une technique de détection immunochimique des protéines.

VIII. 2- Réactifs

\triangleright	Tampor	n d'électrophorèse 10X :	
		- Tris (ICN)	25 mM
		- Glycine (ICN)	2 M
		- SDS (ICN)	35 mM
	\blacktriangleright	Tampon de transfert 1X :	
		- Tris	2,5 mM
		- Glycine	0,2 M
		- Méthanol	20 % (v/v)
Tampon échantillon dénaturant 2X (conservé en aliquotes à –20			
		- Tris-HCl, pH6,8	0,125 M
		- Glycerol	20 % (p/v)
		- SDS	4 % (p/v)
		- Bleu de Bromophénol	0,005 % (p/v)
		- 2-Mercaptoéthanol	5 % (p/v)
	> (Gel de polyacrylamide de concentration à 4 % :	
		- Polyacrylamide 30 % (mono/bis 37,5:1) (ICN)	4 % (v/v)
		- Tris-HCl, pH6,8	0,125 M
		- SDS	0,1 % (p/v)
		- Persulfate d'ammonium (PSA) (ICN)	0,1 % (p/v)
		- TEMED (N,N,N',N'-tétraméthyle éthylène diamine)	0,05 % (v/v)

Gel de polyacrylamide de séparation à 10 %	:
- Polyacrylamide 30 % (mono/bis 37,5:1)	10 % (v/v)
- Tris-HCl, pH8,8	0,375 M
- SDS	0,1 % (p/v)
- PSA	0,1 % (p/v)
- TEMED (ICN)	0,05 % (v/v)

Les anticorps : Tableau 7

 \triangleright

Tableau 7 : Description des anticorps primaires et secondaires utilisés en western blot.

Les dilutions utilisées sont précisées. Les anticorps secondaires sont couplés à la peroxydase de raifort

Protéine cible	Anticorps primaire	Anticorps secondaire
	Anticorps anti-GSTP1-1	Anticorps de chèvre anti-souris
CSTD1 1	(Transduction Laboratories)	(Transduction Laboratories), dilué
G51P1-1	polyclonal de souris, dilué au	au 1:5000
	1:30000	
	Anticorps anti- β actine (Sigma)	Anticorps de chèvre anti-souris
β actine	monoclonal de souris, dilué au	(Santa Cruz Biotechnology), dilué
	1:5000	au 1:10000
βactine	Anticorps anti- β actine (Sigma) monoclonal de souris, dilué au 1:5000	Anticorps de chèvre anti-souris (Santa Cruz Biotechnology), dilué au 1:10000

VIII. 3- Protocole

Un volume correspondant à 10 μ g de protéines (facteurs cytoplasmiques ou nucléaires) est mélangé à un volume équivalent de tampon échantillon dénaturant 2X, puis porté à 100°C au bain-marie. Après 5 min., les échantillons sont refroidis sur de la glace puis déposés sur un gel.

L'électrophorèse des échantillons est effectuée à 10 mA pour le gel de polyacrylamide à 4 % (gel de concentration) puis à 20 mA dans le gel de polyacrylamide à 10 % (gel de séparation) dans du tampon d'électrophorèse 1X. Après séparation, les protéines sont transférées par électrophorèse sur une membrane de PVDF (Hypo P, Amersham-Pharmacia, Pays-Bas) à une intensité de 200 mA dans le tampon de transfert pendant 1 h à 4°C.

Après transfert, la membrane est saturée dans un tampon PBS 1X-Tween 20 à 0,1 % (ICN) additionné de 5 % de lait écrémé (Gloria) sous agitation pendant 1 h. La membrane est ensuite incubée pendant une nuit à 4°C ou 1 h à température ambiante ou 30 min. à 37°C avec l'anticorps primaire dilué (à la dilution appropriée) dans du PBS 1X-Tween 20 à 0,1 % additionné de 5 % de lait écrémé. La membrane est alors lavée dans du PBS-T 3 fois 5 min. puis 2 fois 10 min.

Après le dernier lavage, la membrane est incubée pendant 1 h à température ambiante avec un anticorps secondaire couplé à la peroxydase de raifort (à la dilution appropriée) dans les mêmes conditions que pour l'incubation avec l'anticorps primaire.

Après lavage, on visualise la position de la protéine d'intérêt par le réactif chimioluminescent ECL+ (Amersham-Pharmacia, Pays-Bas) et par exposition sur un film d'autoradiographie (hyperfilm[™], Amersham-Pharmacia, Pays-Bas).

Le signal chimioluminescent sur la membrane est aussi visualisé et analysé grâce à un appareil Kodak (image station 440cf, Perkin Elmer, Belgique) et quantifié par le logiciel Kodak 1D image analysis.

Matériels et méthodes

IX- ETUDE DE L'ACTIVITE LIANTE DES FACTEURS DE TRANSCRIPTION

La mise en évidence des domaines de fixation des protéines sur l'ADN est essentielle à la compréhension des mécanismes de régulation transcriptionnelle. Pour identifier les domaines protéiques responsables de la liaison, on peut produire des fractions de protéines et étudier leurs propriétés de fixation à l'ADN par la technique de retard de migration sur gel.

IX. 1- Principe

Cette méthode consiste en une analyse des fragments d'ADN par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. La migration des fragments d'ADN dans un champ électrique est proportionnelle à leur taille. Les extraits de protéines nucléaires sont mis en présence de la sonde oligonucléotidique bicaténaire et marquée. Les complexes formés par la liaison des facteurs de transcription à leur site spécifique sur la sonde, sont séparés en fonction de leur poids moléculaire, les plus lourds étant les plus retardés sur le gel. Pour un fragment de taille donnée, la migration et donc la position du complexe ADN-protéine est différente par rapport à celle de l'ADN libre. Les fragments d'ADN appelés sondes ont été préalablement marqués avec de l'ATP γ^{32} P. La position du complexe sonde-protéine sur le gel pourra ainsi être identifiée par autoradiographie.

IX. 2- Les sondes oligonucléotidiques

IX. 2. 1- Les séquences oligonucléotidiques utilisées

Les oligonucléotides sont synthétisées par la société EUROGENTEC et nous parviennent lyophilisées sous forme de séquences d'ADN simple brin sens (+) et antisens (-).

Les séquences oligonucléotidiques utilisées sont présentées dans le Tableau 8.

<u>Tableau 8</u> : Séquences des oligonucléotides utilisés pour les expériences de retard sur gel.

Les noms des oligonucléotides, les séquences sens (s) et les séquences complémentaires antisens (as), la position des oligonucléotides dans le promoteur GSTP1-1 ainsi que la taille des oligonucléotides sont indiqués. Dans les séquences ci-dessous, les sites <u>de fixation des</u> <u>facteurs</u> sont soulignés et en gras. Les séquences en bleu correspondent aux mutations. Les séquences GATAc, AP-1 TRE et NF- κ Bc sont issues des promoteurs respectifs des gènes de tal-1, de la collagénase et de la chaîne légère κ des immunoglobulines.

SONDE	Séquences	Positions dans le gène	Taille (pb)
GATA DISTALE (GATAd)	(s) : 5'-GAGATCAATATCTAGAATAA-3' (as) : 5'-TTATTCTA <u>GATA</u> TTGATCTC-3'	-1219 à - 1200	20
GATA DISTALE MUTEE (GATAdm)	(s) : 5'-GAGATCAATAAGTAGAATAA-3' (as) : 5'-TTATTCTACTTATTGATCTC-3'	-1219 à - 1200	20
GATA PROXIMALE (GATAp)	(s) : 5'-AGCTAAGG <u>GATA</u> CTGGGCTT-3' (as) : 5'-AAGCCCAGTATCCCTTAGCT-3'	-916 à -897	20
GATA PROXIMALE MUTEE (GATApm)	(s) : 5'-AGCTAAGGCTTACTGGGCTT-3' (as) : 5'-AAGCCCAGTAAGCCTTAGCT-3'	-916 à -897	20
GATA CONSENSUS (GATAc)	(s) : 5'-GGCAGTGCCTTATCTCTGCGGCG-3' (as) : 5'-CGCCGCAGA <u>GATA</u> AGGCACTGCC-3'		23
GATA CONSENSUS MUTEE (GATAcm)	(s) : 5'-GGCAGTGCCACCTCTCTGCGGCG-3' (as) : 5'-CGCCGCAGAGAGGTGGCACTGCC-3'		23
AP-1 -73	(s) : 5'-GCCG <u>TGACTCA</u> GCACTGGGGG-3' (as) : 5'-CCCCAGTGCTGAGTCACGGC-3'	-73 à -54	20
AP-1 TRE	(s) : 5'-CGCTTGA <u>TGACTCA</u> GCCGGAA-3' (as) : 5'-TTCCGGCTGAGTCATCAAGCG-3'		21
NF-κB CONSENSUS (NF-κBc)	(s) : 5'-AGTTGA <u>GGGGACTTTCCC</u> AGGC-3' (as) : 5'-GCCTGGGAAAGTCCCCTCAACT-3'		22
NF-кB-323	(s) : 5'-TCTT <u>AGGGAATTTC</u> CCCCCGCGA-3' (as) : 5'-TCGCGGGGGGGGAAATTCCCTAAGA-3'	-327 à -305	23

IX. 2. 2- Formation des sondes : hybridation des oligonucléotides monocaténaires complémentaires

IX. 2. 2. 1- Principe

Les sondes sont formées par hybridation de quantités équivalentes de brin sens et antisens. L'hybridation est réalisée dans un tampon soumis à une série de températures décroissantes.

IX. 2. 2. 2- Réactifs

> Tampon d'hybridation 5X

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

IX. 2. 2. 3- Protocole

Les oligonucléotides simple brin lyophilisés sont repris dans de l'eau ultrapure, puis 1500 ng de brin sens (+) et 1500 ng de brin antisens (-) sont mis en présence dans 12 μ L de tampon d'hybridation 5X puis hybridés dans un « thermocycler » selon la séquence de température suivante :

- 90°C 5 min (dénaturation)
- 65°C 10 min
- 37°C 10 min
- 20°C 10 min
- 4°C jusqu'au moment de la précipitation

Les sondes ADN double brin sont ensuite précipitées par 0,1 volume d'acétate de Na (3 M) et 3 volumes d'éthanol à 100 % à -20°C. Après 2 ou 3 h (idéalement une nuit), ce mélange est centrifugé à 14000 g pendant 15 min. à 4°C. Le surnageant est éliminé puis le culot est lavé avec 200 μ L d'éthanol à 75 %. Après une centrifugation à 4°C et à 14000 g pendant 10 min., le culot est séché et repris dans 15 μ L H₂O (200 ng/ μ L).

IX. 2. 3- Marquage des sondes

IX. 2. 3. 1- Principe et réactifs

Le marquage enzymatique des sondes est réalisé par la polynucléotide kinase T4 (Roche, Allemagne) qui catalyse le transfert d'un groupement phosphate en position γ de l'ATP ([γ -³²P]-ATP, ICN, Belgique) sur la terminaison 5' hydroxylée de l'ADN.

IX. 2. 3. 2- Protocole

Le marquage est réalisé dans un mélange constitué de :

- 2 μ L oligonucléotides double brin
- 2 μL [γ-³²P]-ATP (activité spécifique: 7000 Ci/mmol)
- 1 µL Polynucléotide kinase T4
- 2 µL Kinase buffer 10X (tampon livré avec la T4 polynucléotide kinase)
- 13 µL H₂O

Ce mélange est incubé 30 min. à 37°C et l'ADN double brin marqué est purifié sur colonne de silice avec un kit "Qiaquick Removal Nucleotide kit" de QIAGEN (Westburg, Belgique) puis élué avec de l'eau.

IX. 3- Retard de migration sur gel

IX. 3. 1- Réactifs

➤ Gel d'acrylamide 5 % :

- Polyacrylamide 30 % (mono/bis 29:1)	5 % (v/v)
- TBE	0,5X
- Persulfate d'ammonium (PAS)	0,2 %
- TEMED 100 %	0,1 %

Binding Buffer 5X (tampon de liaison)

- Tris pH 8	10 mM
- NaCl	50 mM
- EDTA	1 mM
- Glycérol	5 % (v/v)
- DTT	1 mM
- PMSF	2,5 mM

Solution aqueuse d'inhibiteurs de protéases

- DTT	0,5 mM
- PMSF	0,5 mM
- Aprotinine	1000 U/mL
- O-Phénanthroline	1 mM
- Leupeptine	30 µg/mL

Tampon échantillon

- Glycérol	30 % (v/v)
- TBE	1X
- Bleu de bromophénol	0,005 % (p/v)
- Xylène cyanole	0,005 % (p/v)

IX. 3. 2- Protocole

0,2 ng de sonde radiomarquée sont incubés à 4°C dans un mélange contenant :

- 5 à 10 μ g d'extraits nucléaires

- 2,5 μ L de binding buffer

- 2,5 μ L de poly-dIdC à 2 μ g/ μ L (oligonucléotide synthétique qui permet par compétition d'éliminer les fixations non spécifiques des protéines à l'ADN cible)

- 2 μ L d'albumine de sérum de veau à 2 mg/mL (favorise la formation du complexe)

- 1 μ L de spermidine à 80 mM

- solution aqueuse d'inhibiteurs de protéases qsp 20 µL

Après un temps d'incubation défini (voir résultats), le mélange est alourdi par addition de 5 μ L de tampon échantillon avant d'être déposé dans le puits d'un gel de polyacrylamide à 5 %. Les complexes protéines/ADN formés sont alors séparés par électrophorèse pendant 3 h à environ 30 mA dans du TBE 0,5X. Le gel est ensuite fixé dans un mélange aqueux d'acide acétique 10 % et de méthanol 20 % pendant 30 min. Le gel est ensuite séché à chaud par aspiration sous vide puis la révélation se fait par autoradiographie par mise en contact direct avec un film Kodak X-Omat (Amersham-Pharmacia, Pays-Bas). Le signal radioactif est également visualisé et analysé grâce à un Phosphorimager (Cyclone).

IX. 4- Supershift

IX. 4. 1- Principe

Cette technique permet l'identification d'une protéine (facteur de transcription) formant le complexe retardé, par réaction avec un anticorps. Le complexe ainsi formé, étant plus lourd que le complexe protéine-ADN, sa migration sera plus retardée dans le gel. Il est cependant à noter que l'épitope reconnu par l'anticorps peut être situé au niveau du site de liaison à l'ADN. Dans ce cas, l'anticorps empêche la liaison entre la sonde d'ADN et le facteur de transcription, entraînant la disparition du complexe protéine/ADN, on parle alors d'immunodéplétion.

IX. 4. 2- Réactifs

Les anticorps utilisés pour les supershifts sont tous issus de la société Santa Cruz Biotechnology, (SanverTech, Belgique) et sont à une concentration de 200 μ g d'IgG/0,1 mL (**Tableau 9**). Les expériences de supershift avec l'anticorps anti-GATA-1 sont réalisées à l'aide d'un kit (Nushift GATA-1 Kit, Active motif, Belgique) en suivant les indications fournies.

Anticorps	Spécificité
p-c-Jun (sc-822)	anticorps monoclonal de souris dirigé contre les acides aminés 56 à 69 de la protéine c-Jun humaine. Cet anticorps ne réagit qu'avec c-Jun phosphorylé sur la sérine 63
NF-кВ р50 (sc-7178)	anticorps polyclonal de lapin dirigé contre les acides aminés 120 à 239 de la protéine NF-κB p50 humaine
Sp1 (sc-420X)	anticorps monoclonal de souris dirigé contre les acides aminés 609 à 627 de la protéine Sp1 humaine
GATA-2 (sc-9008)	anticorps polyclonal de lapin dirigé contre les acides aminés 120 à 235 de la protéine recombinante GATA-2 humaine
GATA-3 (sc-269)	anticorps monoclonal de souris dérivé de la fusion de myélomes de souris avec des cellules de la rate d'une souris immunisée avec la protéine recombinante humaine GATA-3

Tableau 9 : Anticorps utilisés pour les supershifts (Santa Cruz Biotechnology).

IX. 3. 3- Protocole

Au mode opératoire de retard de migration sur gel décrit précédemment s'ajoute une étape d'incubation en présence d'un anticorps. La concentration d'anticorps à ajouter, le temps et la température d'incubation, ainsi que la chronologie d'addition de celui-ci par rapport aux facteurs nucléaires, nécessite une mise au point au cas par cas (voir résultats).

X- ETUDE DE LA REGULATION TRANSCRIPTIONNELLE PAR TRANSFECTION TRANSITOIRE

X. 1- Les vecteurs recombinants utilisés

Les plasmides d'expression

- pXM-GATA-1 : plasmide d'expression contenant le gène qui code pour la protéine GATA-1 normale.
- pXM-GATAΔ63 : qui code pour une protéine GATA-1 mutée par une délétion de sa partie NH₂ terminale. Cette délétion n'affecte pas la fixation à l'ADN mais ne permet plus l'activité transactivatrice du facteur.

> Le plasmide rapporteur

 pGL3-GATA-luc : dans ce plasmide le gène de la luciférase est associé à trois répétitions du site consensus GATA clonés en amont du promoteur minimal de la métallothionéine dans un vecteur pGL3-basic. Il est utilisé comme contrôle positif de l'induction par les facteurs GATA.

X. 2- Transformation des bactéries

X. 2. 1- Principe

Cette technique a pour but d'amplifier des quantités importantes d'ADN plasmidique. Cette étape est indispensable à la préparation de quantités suffisantes des vecteurs utilisés pour les expériences de transfection.

Matériels et méthodes

X. 2. 2- Réactifs

Le milieu de culture *Luria Bertani* (LB) gélosé utilisé pour la croissance bactérienne est conditionné prêt à l'emploi (Gibco-BRL) et est préparé par addition de 32 g dans un litre d'eau distillée. Après dissolution le milieu est stérilisé. Quand le milieu est suffisamment refroidi, un antibiotique de sélection est additionné puis le milieu est coulé dans des boîtes de Pétri qui sont ensuite conservées à 4°C.

X. 2. 3- Protocole

 $200 \ \mu$ L de bactéries compétentes one shot (Invitrogen) sont incubées 15 min à 4°C en présence de 5 ng de plasmide recombinants. Le mélange subit ensuite un choc thermique à 42°C pendant 45 s (ce qui permet à l'ADN plasmidique de passer à travers les pores de la membrane bactérienne) puis le mélange est replacé sur de la glace.

La suspension de bactéries transformées est ensuite étalée sur un milieu nutritif LB gélosé contenant 100 μ g/mL d'ampicilline (facteur de sélection des bactéries ayant intégré un plasmide). Les géloses sont ensuite incubées toute la nuit dans une étuve à 37°C.

X. 3- Purification des plasmides (maxipréparation d'ADN plasmidique)

X. 3. 1- Principe

Cette technique a pour but de purifier des quantités importantes d'ADN plasmidiques. Cette étape permet la préparation des plasmides utilisés pour les expériences de transfection.

X. 3. 2- Réactifs

Le milieu de culture LB utilisé pour la croissance bactérienne est conditionné prêt à l'emploi (ICN) et est préparé par addition de 25 g dans un litre d'eau distillée. Après dissolution le milieu est stérilisé. Quand le milieu est suffisamment refroidi, un antibiotique de sélection est additionné puis le milieu est conservé à 4°C.

X. 3. 2- Réactifs et protocole

Les clones positifs sont cultivés pendant 8 heures à 37°C sous agitation dans 5 mL de milieu LB contenant 100 μ g/mL d'ampicilline. Puis 250 μ L de cette préculture sont ensemencées dans 250 mL de milieu LB contenant de l'ampicilline (100 μ g/mL) et amplifiées pendant une nuit à 37°C sous agitation. L'ADN plasmidique est isolé et purifié à l'aide d'un kit (Nucleobond Ax, Macherey-Nagel) en suivant les instructions fournies. La détermination de la concentration de l'ADN plasmidique purifié est réalisée par un dosage spectophotométrique de l'absorbance à 260 nm, sachant qu'à 1 unité d'absorbance correspond 50 μ g/mL d'ADN plasmidique. La pureté et la qualité de la préparation sont évaluées par le rapport des absorbances mesurées à 260 et 280 nm qui doit se situer entre 1,8 et 2,1.

X. 4- Transfection transitoire des cellules et mesure de l'activité transcriptionnelle

X. 4. 1- Transfection

X. 4. 1. 1- Principe

La transfection est un outil d'étude de la régulation de l'expression des gènes. Cette technique sert à étudier le rôle régulateur de certaines séquences de gènes dans un système cellulaire (recherche et étude d'éléments régulateurs de la transcription par exemple). Dans nos études le gène rapporteur utilisé est le gène de la luciférase.

Quand les cellules sont transfectées de manière transitoire, l'ADN plasmidique est introduit dans le noyau de la cellule mais n'est pas intégré au génome de celle-ci.

Pour introduire l'ADN il existe plusieurs méthodes. Pour nos expériences nous avons utilisé l'électroporation qui est une technique de perméabilisation de la membrane cellulaire par application direct d'une décharge électrique. Il en résulte la création de pores par lesquels peuvent être introduites dans le cytoplasme de la cellule par diffusion passive des macromolécules comme l'ADN plasmidique suivant des processus simultanés d'électroosmose et d'électrophorèse. Sous l'influence du champ électrique, les composants de la membrane se polarisent jusqu'à établissement d'une différence de potentiel membranaire qui désorganise la membrane cytoplasmique en la rendant perméable aux molécules exogènes.

Cette perméabilité est transitoire et réversible seulement si la durée et l'intensité du champ appliqué ne dépassent pas un seuil critique au delà duquel les cellules sont détruites. Il faut donc trouver un compromis entre un voltage suffisamment élevé pour provoquer l'électroporation mais pas trop toutefois pour qu'il subsiste une proportion de cellules vivantes (10 à 20 %).

En pratique, les cellules sont placées dans une cuve d'électroporation dont les parois métalliques réalisent un condensateur qui est chargé puis déchargé à travers les cellules. La décharge s'effectue en un temps ou « pulse » dont la définition correspond au temps (T) nécessaire pour décharger le condensateur jusqu'à 37 % du voltage initial. Il est relié à deux paramètres qui sont la résistance R du milieu et la capacité C du condensateur par la relation T = RC. Les paramètres à fixer sont la résistance du milieu, le voltage appliqué et la capacité du condensateur.

X. 4. 1. 2- Réactifs et protocole

Des cellules K562 recueillies en phase exponentielle de croissance sont remises en suspension dans du milieu RPMI 1640 contenant 10 % de SVF à une concentration de 1,5 x 10^7 cellules/mL. Pour chaque transfection, 250 μ L de ce mélange additionnés de 5 μ g de plasmide contrôle d'expression de la Renilla et de 5 μ g de plasmide rapporteur du gène de la luciférase placé sous le contrôle des éléments régulateurs du gène d'intérêt sont placés dans une cuve d'életroporation (Biorad Laboratories, Nazareth, Belgium).

Puis les cellules sont électroporées selon les conditions de transfection suivantes (temps, voltage, capacité) préalablement définies au laboratoire : 625 V/cm, 500 μ F et 20 msec. Les transfections des cellules ont été réalisées grâce au BioRad Gene Pulser (Biorad Laboratories). Pour les expériences de co-transfections, 5 μ g de plasmide d'expression sont ajoutés au mélange à électroporer.

Les cellules sont ensuite rapidement transférées dans 10 mL de milieu RPMI 1640 supplémenté en SVF (10 %) et replacées à l'étuve thermostatée à 37°C sous atmosphère saturée en humidité et équilibré à 5 % de CO_2 .

Matériels et méthodes

X. 4. 2- Mesure de l'activité du gène rapporteur : activité luciférase

X. 4. 2. 1- Principe

La luciférase est une enzyme qui en contact de son substrat la luciférine et en présence d'ATP va former un adénylate de luciféryl. Cette molécule va ensuite subir une décarboxylation oxydative accompagnée d'une émission de photons. Le substrat est ajouté en excès par rapport à la luciférase, de ce fait la production de lumière est proportionnelle à l'activité luciférase et est mesurée à l'aide d'un capteur spécifique appelé luminomètre.

X. 4. 2. 2- Réactifs et protocole

Après 18 à 24 h de culture des cellules transfectées, celles-ci sont remises en suspension à une concentration de 10^7 cellules/mL dans du milieu RPMI 1640 avec 10 % de SVF. Puis 75 μ L de cette suspension cellulaire sont déposés en octuple dans des puits de plaques de microtitration a bord opaque mais a fond transparent.

Après les traitements, 75 μ l de Dual-Glo TM Luciferase Reagent (Dual-Glo TM Luciferase Assay system, Promega) sont ajoutés à chaque puits et après 10 min. d'incubation à 22 °C, l'activité luciférase est mesurée grâce à un luminomètre (Berthold). 75 μ l de Dual-Glo TM Stop & Glo® Reagent (Dual-Glo TM Luciferase Assay system) sont ensuite ajoutés et après 10 min. de temps d'incubation à 22 °C, l'activité Renilla est mesurée.

Les émissions de lumière résultant de l'activité luciférase et Renilla sont mesurées par intégration du pic d'émission de lumière en 10 s par le luminomètre piloté par le logiciel Simplicity (Berthold).

Tous les résultats sont exprimés en unité arbitraire de lumière correspondant à l'activité luciférase rapportée à l'activité Renilla.

93

XI- ETUDE DU TRANSCRIPTOME PAR LA TECHNIQUE DES MICROPUCES A ADN

L'hybridation des lames de micropuces et l'analyse des résultats ont été réalisés au laboratoire « The genomics and Microarray Laboratory » dirigé par le Dr. Craig Tomlinson (université de Cincinnati, Ohio, USA) . L'ensemble des informations et des protocoles utilisés peuvent être repris sur leur site internet (http://microarray.uc.edu).

XI. 1- Principe général

Dans le texte qui suit, les fragments d'ADN fixés à la surface de la puce sont appelés « sondes » (« probe » en anglais), et les séquences nucléiques contenues dans l'échantillon à analyser sont appelées « cibles » (« target » en anglais), comme il a été convenu. Les termes sont parfois inversés selon les publications.

Les puces à ADN permettent d'étudier parallèlement l'expression de plusieurs milliers de gènes (Duggan *et al.*, 1999), voire de l'expression de la totalité des gènes du transcriptome. La **Figure 9** présente un schéma de leur mode de fonctionnement.

De très nombreuses sondes moléculaires connues (oligonucléotides ou ADNc) sous la forme de produits de PCR ou de séquences connues synthétisées sont fixées sur une surface de quelques centimètres carrés de manière ordonnée par des pointes métalliques équivalentes à des micro-pipettes (spotter), sous formes d'unités d'hybridation (spots). Ces sondes correspondent à un ensemble de gènes dont on veut analyser le niveau d'expression dans des situations biologiques données.

Deux populations de cibles venant de deux situations biologiques différentes, sous la forme d'ADNc, vont être couplées à des fluorochromes différents (la cyanine (Cy) 5 et la cyanine 3). La mise en présence des séquences cibles marquées et des sondes conduit à la formation, par hybridation, de duplex selon la règle d'appariement définie par Watson et Crick. Les deux populations de cibles étant déposées en même temps sur la puce, elles entrent en compétition pour s'hybrider avec les différentes sondes. L'expression d'un gène dans une situation donnée est donc en corrélation directe avec la quantité de fluorochrome présent sur le spot correspondant.

94



<u>Figure 9</u> : Principe général de l'analyse de l'expression transcriptionnelle sur une puce à ADN de type « spottée » (adapté de Duggan *et al.*, 1999).

Deux lots d'ADNc (un lot test et un lot référence) obtenus par RT à partir des ARN totaux, ont incorporé des nucléotides modifiés qui permettent de les marquer avec deux fluorochromes à spectres d'émission distincts (les plus couramment utilisés sont les cyanines Cy3 :vert et Cy5 :rouge) et sont hybridés simultanément à une lame de verre sur laquelle sont fixées des séquences oligonucléotidiques sondes (spots) : puce spottée. Après l'hybridation des ARN cibles sur les sondes, la lame de micropuce est soumise à une irradiation laser, les fluorochromes excités émettent de la lumière qui est mesurée par microscopie confocale laser. Les données obtenues, par la mesure de l'intensité du signal fluorescent émis sur chaque spot, sont intégrées comme le rapport Cy3 / Cy5 et traitées, afin d'estimer le taux d'expression différentiel du gène correspondant.

Après une étape de lavage, une analyse de la surface de la puce à l'aide d'un scanner permet le repérage des hybridations effectives grâce aux signaux émis par les marqueurs de la cible et va permettre l'enregistrement d'une image.

Il s'en suit des étapes d'extraction de données, de normalisation, puis une analyse statistique des données. C'est à ce stade que l'on va pouvoir déterminer quels gènes ont une expression différentielle dans les situations comparées.

XI. 2- Préparation des micropuces : obtention et dépôt des sondes sur lame (printing)

22102 oligonucléotides de 70 mer sont utilisés en tant que sondes pour préparer les micropuces. Ce sont des séquences uniques et spécifiques qui viennent de la base de données du génome humain et synthétisées à façon par un fournisseur pour être prêts à être « spotter » (Qiagen-Operon, MWG Biotech).

Parmi ces gènes, 768 font partie des « stress and ageing genes » et certains sont présents en multiple copies et peuvent servir de témoin : β -actine (16), N-myc (3), transcription factor 3 (12), protéine ribosomale S9 (16), cytochrome c-1 (15), facteur d'initiation de la traduction 4A, isoforme 2 (12), glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (17), histone H2B (11), protéine de choc thermique 70 kDa, 1A (17), lactate déshydrogénase A (17), α -tubuline (17), nucléoporine 62 kDa (17), protéine ribosomale L5 (12), échantillon inconnu (4).

Les sondes obtenues sont dissoutes dans du SSC 3X et un volume de 2 nL (0,015 pmole) par oligonucléotide est prélevé par capillarité grâce aux 48 pointes en inox fendues (MicroQuill®, Majer Precision Engineering) de la tête d'impression (TeleChem international) d'un spotteur (microarrayer, Omnigrid) placé dans une enceinte fermée où l'air y est filtré (pour protéger les lames des poussières), la température contrôlée et l'hygrométrie maintenue entre 65 et 75 %.

Le dépôt des sondes se fait par effet de tension de surface sous la forme d'un spot (\pm 100 μ m de diamètre) à la surface d'une lame de verre de microscope fonctionnalisée (coated) avec la fonction gamma-amino propyl silane (GAPS) par liaison covalente grâce aux charges

positives des groupements amines qui permettent de fixer l'ADN (Ultra GAPS, Corning). La distance entre chaque spot est de 300 μ m. Après chaque dépôt, les pointes sont lavées et séchées.

La fixation des sondes oligonucléotidiques sont ensuite immobilisées à la surface des lames grâce à une irradiation UV (600 mJ) (« cross-linking ») qui permet la formation de liaisons covalentes entre les résidus thymidyl et les atomes de carbone des groupements aminés par un Stratalinker® UV Crosslinker.

Les micropuces obtenues sont stockées à température ambiante à l'abri de la poussière et devront être utilisées au cours du mois suivant.

XI. 3- Préparation des échantillons cibles : synthèse des ADNc et marquage

XI. 3. 1- Principe

Les cibles sont préparées à partir des ARN totaux. La première étape de la préparation des cibles consiste en la synthèse de l'ADNc par RT au cours de laquelle sont incorporées des nucléotides modifiés avec un groupement amine réactif, des aminoallyl-dUTP (aa-dUTP).

Ces nucléotides serviront par la suite à marquer les cibles, en les couplant à des fluorochromes réactifs, des N-hydroxysuccinimidyl esters (NHSesters) de Cy3 ou de Cy5, selon la réaction décrite par Randolph et Waggoner (Randolph and Waggoner, 1997). Ces molécules fluorescentes diffèrent par leur spectre d'absorption et d'émission : la Cy3 émet à 540 nm (vert) et la Cy5 émet à 650 nm (rouge).

XI. 3. 2- Obtention des ARN et analyse de leur qualité

La qualité et la pureté des ARN sont des éléments essentiels pour la réussite de l'expérience. Une mauvaise purification peut être la cause d'une synthèse inefficace des cibles marquées et d'une augmentation des bruits de fond sur la lame. L'ARN est aussi très sensible à la dégradation, celle-ci pouvant induire l'obtention de données biaisées en altérant la proportion des espèces présentes initialement dans l'échantillon étudié. Il est nécessaire de travailler très rapidement en portant des gants et de maintenir les tubes au froid afin d'éviter la dégradation des ARN.

Les ARN totaux sont extraits par le kit Nucleospin RNA II et leur qualité est vérifiée par la technique du Labchip® grâce au Bioanalyzer d'Agilent (voir la partie V de la section matériels et méthodes concernant l'extraction des ARN totaux).

Les ARN totaux sont ensuite dosés grâce à un spectrophotomètre de type Nano Drop (ND-1000, NanoDrop Technologies) qui permet une analyse rapide sur une faible quantité de l'échantillon. Cette analyse permet de déterminer également la pureté des échantillons par la détermination de deux rapports d'absorbance : A260/A280 et A260/A230.

XI. 3. 3- Synthèse des ADNc avec incorporation d'aa-dUTP par RT

Un mélange constitué de 10 μ g d'ARN totaux (quantité nécessaire pour un marquage) et de 5 μ g d'amorce oligo(dT) dans un volume final de 18 μ L est dénaturé 10 min au bainmarie à 70°C. Après ces 10 min, le mélange est refroidi 5 min sur glace et est additionné de 11,6 μ L d'un mélange constitué de :

- 5X RT Buffer (Invitrogen)	
- DTT 0,1 M	3 µL
- 50X dNTP mix (ratio de 7/3 pour aa-dUTP/dTTP)	0,6 µL
- RNAsin 40 U/ µL (Fisher)	0,5 μL
- Superscript III RT 200 U/ μL (Invitrogen)	1,5 μL

Le mélange de 50X dNTP avec un rapport aa-dUTP/dTTP = 7/3 est constitué de :

- 25 mM de chaque nucléotide dATP, dGTP, dCTP (Amersham Pharmacia)

- 7,5 mM de dTTP (Amersham Pharmacia)

- 17,5 mM d'aa-dUTP (Sigma)

Le mélange total de 29,6 μ L est incubé pendant 1 h à 50°C. Au cours de cette étape, la transcription inverse des ARN en ADNc permet l'incorporation des aa-dUTP, afin d'obtenir des aa-ADNc.

Les ARN qui ont servi de matrice sont ensuite dégradés par une hydrolyse alcaline de 10 min à 70°C avec 15 μ L de NaOH 0,1 M. Après refroidissement du mélange, la réaction est stoppée par neutralisation du NaOH par l'ajout de 15 μ L d'HCl 0,1 M.

Les aa-ADNc obtenus sont ensuite purifiés par précipitation alcoolique pendant une nuit à -20° C avec 6 μ L d'acétate de sodium (3 M, pH 5,2) et 150 μ L d'éthanol absolu. Les échantillons sont ensuite centrifugés pendant 15 min à 14000 g et lavés avec 800 μ L d'éthanol froid à 80 % et centrifugés 10 min à 13000 g. Cette étape de lavage est répétée puis les culots d'ADNc sont séchés et resuspendus dans 15 μ L d'eau.

XI. 3. 4- Marquage des ADNc

Le culot d'aa-ADNc est repris par 5 μ L d'eau et est chauffé à 40°C pendant 5 min puis est additionné de 5 μ L de bicarbonate de sodium (0,1 M, pH 9). Ce mélange sert a reprendre le contenu d'un tube de fluorochrome NHS-Cy3 ou NHS-Cy5 (CyDye Post-labelling Reactive Dye pack, Amersham Pharmacia). La réaction est incubée 1 h à température ambiante et à l'abri de la lumière, en vortexant toutes les 15 min. La réaction est arrêtée par incubation du mélange pendant 15 min à température ambiante et à l'abri de la lumière après l'ajout de 4,5 μ L d'hydroxylamine 4 M.

 $35 \ \mu$ L de d'acétate de sodium (NaOAc ; 0,1 M ; pH 5,2) sont ajoutés aux cibles marquées au Cy3 ou Cy5 obtenues, puis sont purifiées sur colonnes (Qiaquick PCR purification Kit, Qiagen) et éluées dans $35 \ \mu$ L de TE.

Les cibles sont ensuite analysées avec un spectrophotomètre de type Nano Drop, afin de déterminer la concentration en aa-ADNc-marqué et de calculer la fréquence d'incorporation (FI) qui doit être comprise entre 20 et 50 et qui est obtenue par la formule suivante :

> FI = X 324,5 ng d'ADNc

Les aa-ADNc-marqués, qui seront hybridés sur la même micropuce (1 marqué avec la Cy3 + 1 marqué avec la Cy5), sont collectés et séchés 45 min. au speed-vac.

Matériels et méthodes

XI. 4- Hybridation

XI. 4. 1- Préparation des lames de micropuce et des lamelles de protection pour l'hybridation

Les lamelles de protection des micropuces sont nettoyées par immersion dans une solution de lavage (SSC 0,1X, SDS 0,2 %), rincées à l'eau puis immergées dans de l'éthanol pur et séchées. Les lames de micropuce à hybrider sont nettoyées sous un flux d'air comprimé et placées dans un bac à hybridation rempli d'une solution de préhybridation (SSC 5X, SDS 0,1 %, albumine de sérum de veau 1 %) à 42°C pendant 45 min. sous agitation.

Les lames sont ensuite lavées deux fois par une dizaine d'immersions dans un bac d'eau distillée, elles sont ensuite égouttées puis immergées une dizaine de fois dans un bac d'isopropanol. Enfin elles sont séchées afin d'être utilisées immédiatement.

XI. 4. 2- Hybridation et lavage des lames de micropuce

Le culot contenant les deux ADNc marqués, l'un à la Cy5 et l'autre à la Cy3, est resuspendu dans 9 μ L d'eau, puis dénaturé 5 min. à 95°C. A ce mélange sont additionnés 8 μ L d'ADN de thymus de veau à 1 mg/mL (Roche), 2 μ L d'ADN polyA à 10 mg/mL (Sigma) et 2 μ L d'ARNt de levure à 4 mg/mL (Sigma) pour limiter les hybridations non spécifiques et 21 μ L de tampon d'hybridation (formamide 50 %, SSC 10X, SDS 0,2 %) préchauffé à 48°C.

Ce mélange contenant les cibles est appliqué sur les sondes d'une lame de micropuce et recouverte d'une lamelle. L'ensemble est placé dans une chambre à hybridation hermétique (Corning) dont les 2 réservoirs sont remplis avec 12 μ L d'eau et immergée dans un bain-marie à 48 °C pendant 3 jours.

XI. 5- Acquisition et traitements des résultats

XI. 5. 1- Lavage post-hybridation et lecture des lames de micropuce

Après l'incubation, la lame hybridée est lavée à plusieurs reprises dans des solutions de lavage de stringence croissante. La lame et la lamelle sont d'abord placées dans une solution de SDS 0,2 % et SSC 1X, jusqu'à ce que la lamelle se détache d'elle même de la lame. Puis la lame de micropuce est lavée pendant 15 min. à 42°C sous agitation. La lame est

ensuite lavée trois fois 5 min. à 42°C sous agitation dans un second bain contenant du SSC 0,1X et SDS 0,2 % et enfin elle est lavée 2 fois 5 min. à température ambiante dans un troisième bain contenant SSC 0,1X et séchée.

Une fois le séchage terminé la lame est lue sur un scanner GenePix® 4000B (Axon Instruments) qui est pilotée par le logiciel GenePix Pro 4 (Axon Instruments). Le scanner est muni de deux lasers (excitations à 532 et 635 nm) qui fournit de l'énergie aux molécules de fluorochromes. Ces molécules vont l'absorber, se retrouver excitées et par conséquent les cyanines émettent des photons, qui sont alors captés par le photomultiplicateur, ce qui permet l'acquisition simultanée des signaux émis par les fluorochromes Cy3 et Cy5.

La lecture est réalisée avec une résolution de 10 μ m/pixel et une sensibilité maximale de 0,1 molécule de fluorochrome/ μ m².

Les images obtenues pour chaque canal Cy3 et Cy5 sont enregistrées au format TIFF 16 bits en 65535 niveaux de gris. Ces images en niveaux de gris sont converties en images en fausses couleurs. La Cy3 est représentée par la couleur verte, la Cy5 par la couleur rouge. Ces deux images sont ensuite superposées. Ainsi un spot jaune caractérise une expression homologue des deux situations étudiées, un spot vert une expression préférentielle du gène dans la situation marquée au Cy3 et un spot rouge une expression préférentielle du gène dans la situation marquée au Cy5.

XI. 5. 2- Analyse des données

Les images sont analysées grâce au logiciel GenePix Pro 4 (Axon Instruments) afin d'extraire les données numériques qui correspondent à chaque spot d'hybridation.

Le logiciel va générer des données sous forme d'un tableur qui sont ensuite analysées par le statisticien à l'aide d'outils informatiques. L'extraction des données brutes et la qualité des critères d'analyse permettent de détecter les gènes d'intérêt. En effet, à cause de variations expérimentales, les données doivent être filtrées, normalisées et étudiées de manière statistique pour identifier les gènes ayant une expression différentielle.
XII- ANALYSE STATISTIQUE DES DONNEES

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

La différence observée, entre la série témoin et la série étudiée, est considérée comme significative pour des valeurs de p<0,05.

Les valeurs sont exprimées comme la moyenne ± écart-type.

ନ

RESULTATS

Le but de cette étude est de comprendre les mécanismes de régulation transcriptionnelle de l'expression de la GSTP1-1. Nous avons étudié l'expression de cette enzyme impliquée dans la résistance aux anticancéreux et dans la protection contre le stress oxydant.

Il a déjà été montré que le gène de la GSTP chez le rat est sous le contrôle du stress oxydant, en particulier des radicaux hydroxyles (Nakamura *et al.*, 2000), et que ce stress oxydant augmente l'expression d'autres gènes codant pour des enzymes antioxydantes. De plus, il est admis que le stress oxydant, mécanisme cellulaire naturel, agit à de nombreux niveaux de la transduction du signal accompagné de nombreux effets biologiques.

Par ailleurs, l'induction et la régulation des processus de différenciation peuvent être utilisées comme des moyens thérapeutiques. Néanmoins, en rétablissant une régulation normale des processus de différenciation grâce à des médicaments, il semble important de connaître les conséquences de ces traitements. Conséquences sur les voies de différenciation mais aussi sur des gènes non spécifiques de la voie de différenciation induite qui peuvent être régulés au cours de ce processus.

De cette manière, il semble important de connaître les mécanismes de régulation de l'enzyme GSTP1-1 au cours des processus de différenciation, afin de prévoir le développement des phénomènes de résistance liés à la GSTP1-1 en réponse à un traitement par des anticancéreux.

Nous avons décidé de focaliser notre étude sur l'effet d'un ester de phorbol, le 12-Otetradecanoylphorbol 13-acetate ou TPA, de deux anthracyclines (dox et acla), de l'hémine et du butyrate.

Ces molécules sont connues pour être des inducteurs de la différenciation de cellules leucémiques. En effet, la lignée K562 peut être induite à se différencier vers la voie érythroïde par les anthracyclines dox et acla (Morceau *et al.*, 1996a ; Trentesaux *et al.*, 1993), l'hémine (Leppa *et al.*, 1997) et le butyrate (Witt *et al.*, 2000) et vers la voie mégacaryocytaire par le TPA (Alitalo *et al.*, 1990) et le butyrate (Xie *et al.*, 2000).

La GSTP1-1 a été associée à la cancérogenèse et à la résistance aux médicaments anticancéreux. En effet, elle est surexprimée dans la plupart des cellules cancéreuses et elle participe à la détoxication des cellules en conjugant les composés électrophiles au GSH leur permettant d'être expulsés de la cellule. Cette enzyme est donc une bonne cible pour lutter contre la résistance et l'étude des régulations de son expression est donc une base essentielle pour le développement d'une stratégie anticancéreuse.

Dans une étude précédente, notre équipe a montré que le site TRE situé sur le promoteur du gène codant pour la GSTP1-1 est essentiel à l'expression de l'enzyme et que celui-ci est capable de fixer NF-E2. Afin de mieux comprendre la régulation du gène de la GSTP1-1 au cours de la différenciation et de confirmer le rôle de ce site *in vivo*, nous avons utilisé un activateur typique des facteurs de transcription de la famille AP-1, le TPA.

I- ETUDE DE L'EXPRESSION DU GENE DE LA GSTP1-1 AU COURS DE LA DIFFERENCIATION DES CELLULES K562

Les cellules K562 possèdent les caractéristiques d'une leucémie myéloïde chronique humaine. Ce sont des cellules qui sont bloquées au cours de leur processus naturel de maturation à un stade précoce de la différenciation hématopoïétique. Mais cette lignée présente la particularité de pouvoir poursuivre son processus de différenciation vers les voies érythroïde, mégacaryocytaire ou granulocytaire en fonction du type d'inducteur utilisé.

Dans cette partie de l'étude, nous nous sommes intéressés aux effets de certains de ces inducteurs sur l'expression de la GSTP1-1. Plus particulièrement, nous avons voulu déterminer si des molécules, qui sont à la fois génératrices de ROS et inductrices de la différenciation de cellules leucémiques, pouvaient avoir un effet sur l'expression de la GSTP1-1 dans des cellules K562 induites à se différencier.

De plus, l'utilisation d'inducteurs des différentes voies de différenciation permettra d'évaluer s'il existe un lien entre l'expression de la GSTP1-1 et la voie de différenciation induite.

I. 1- Différenciation vers la voie érythroïde

Dans cette première partie, nous avons étudié l'expression de la GSTP1-1 au cours de l'induction de la différenciation érythroïde des cellules K562. Pour atteindre cet objectif, nous avons utilisé les anthracyclines acla et dox, qui sont connues pour induire l'expression de gènes érythroïdes et la synthèse d'hémoglobine dans ces cellules. Nous avons également utilisé, l'hémine, un autre inducteur de la différenciation érythroïde.

Résultats

I. 1. 1- Induction de la différenciation érythroïde par les anthracyclines : acla et dox

Utilisées à des concentrations subtoxiques les anthracyclines acla et dox sont capables d'induire, dans certaines conditions, la différenciation érythroïde des cellules K562 avec un effet cytostatique.

I. 1. 1. 1- Effet sur la différenciation et la prolifération cellulaire

Dans un premier temps, nous avons déterminé les concentrations inductrices optimales en anthracyclines dans nos conditions expérimentales. Nous avons évalué le pourcentage de cellules K562 benzidine positives par le test à la benzidine après trois jours d'induction par des concentrations croissantes d'acla (0, 10, 20, 30, 40 nM) ou de dox (0, 20, 30, 40, 50 nM).

Les résultats sont présentés dans la **Figure 10**. Les courbes de différenciation des cellules K562 montrent que le pourcentage de cellules benzidine positives est maximum pour les concentrations de 20 et 40 nM d'acla et de dox, respectivement. Ces concentrations seront ainsi utilisées dans les études qui suivront. L'inhibition de croissance associée au processus de différenciation a également été suivie en fonction de la concentration de l'inducteur (**Figure 11**). Cette inhibition augmente avec la concentration en inducteur, mais elle reste inférieure à 100 %, ce qui témoigne d'un effet cytostatique des traitements et non d'un effet cytotoxique.

A partir des résultats obtenus précédemment, les cellules K562 ont été traitées durant six jours par des concentrations différenciantes d'acla (20 nM) ou de dox (40 nM). Les ARN totaux et les facteurs cytoplasmiques et nucléaires ont été extraits toutes les 24 h pendant les 6 jours de traitement.

La différenciation érythroïde et l'inhibition de croissance des cellules K562 sont suivies au cours du temps. Nous pouvons constater que le taux de cellules hémoglobinisées augmente avec le temps de traitement pour les deux inducteurs utilisés (**Figure 12**). Lors des deux premiers jours, nous voyons que le taux de différenciation érythroïde induit par la dox est supérieur à celui induit par l'acla. Cette tendance tend à s'inverser après trois jours. Après six jours de traitement les taux de cellules benzidine positives atteignent 70 % et 60 % de différenciation avec l'acla et la dox. L'inhibition de croissance atteint un maximum dès le premier jour avec la dox et au deuxième jour avec l'acla (**Figure 13**).



<u>Figure 10</u> : Pourcentage de cellules K562 hémoglobinisées en fonction de la concentration d'acla ou de dox.

Les cellules K562 sont cultivées pendant 3 jours en présence ou non de différentes concentrations d'acla ou de dox. La différenciation érythroïde est évaluée par le test à la benzidine.



Figure 11 : Inhibition de croissance des cellules K562 en fonction de la concentration d'acla ou de dox.

Les cellules K562 sont cultivées pendant 3 jours en présence ou non de différentes concentrations d'acla ou de dox. L'inhibition de croissance associée à la différenciation induite par l'acla ou la dox est indiquée.

Résultats



<u>Figure 12</u> : Pourcentage de cellules K562 hémoglobinisées en fonction du temps de traitement par l'acla ou la dox.

Les cellules K562 sont cultivées pendant 1 à 6 jours en présence ou non de 20 nM d'acla ou de 40 nM de dox. La différenciation érythroïde est évaluée par le test à la benzidine. Ces donnés sont la moyenne \pm l'écart-type de 3 expériences indépendantes.



Figure 13 : Inhibition de croissance des cellules K562 en fonction du temps de traitement par l'acla ou la dox.

Les cellules K562 sont cultivées pendant 1 à 6 jours en présence ou non de 20 nM d'acla ou de 40 nM de dox. Ces donnés sont la moyenne \pm l'écart-type de 3 expériences indépendantes.

<u>I. 1. 2- Expression de l'ARNm de GSTP1-1 dans les cellules induites</u> à se différencier par les anthracyclines

Afin d'étudier l'expression du gène codant pour la GSTP1-1 au cours de l'induction de la différenciation érythroïde par les anthracyclines, les cellules K562 ont été traitées pendant 6 jours par des concentrations différenciantes d'acla (20 nM) et de dox (40 nM). Les ARN totaux ont été extraits à chaque jour de traitement et analysés par northern blot (**Figure 14-A**).

Les quantités de sonde radiomarquée d'ADNc hybridée aux ARNm de GSTP1-1 ont été quantifiés. La **Figure 14-B** représente l'évolution de l'expression de l'ARNm de la GSTP1-1 dans les cellules K562 maintenues en culture pendant 6 jours sans traitement. Ces résultats mettent en évidence une variation de l'expression de l'ARNm de GSTP1-1 en fonction du temps de culture. En effet, après une baisse d'environ 50 % entre les deux premiers jours s'en suit une augmentation progressive de l'expression qui est fonction du temps de culture, pour atteindre un taux d'expression au sixième jour environ 5 fois supérieur au jour 1.

Compte tenu de cette variation de l'ARNm au cours du temps, nous avons réalisé un témoin pour chaque jour de traitement (**Figure 14-C**). Dans le cas d'une induction par l'acla, cette représentation des résultats permet de mettre en évidence aux jours 1 et 2 du traitement une forte augmentation respectivement de 3,8 et 7,5 fois. En revanche, cette activation n'est plus que de 1,5 à 2 fois entre le troisième et le sixième jour de traitement. Dans le cas de l'induction par la dox, l'augmentation est beaucoup plus faible d'environ deux fois au maximum au jour 2.

<u>I. 1. 1. 3- Expression de la protéine GSTP1-1 dans les cellules induites</u> à se différencier par les anthracyclines

L'analyse par western blot de l'expression de la protéine GSTP1-1 a permis de corréler l'augmentation de son ARNm au cours de l'induction de la différenciation des cellules K562 par l'acla et la dox.



<u>Figure 14</u> : Expression de l'ARNm de GSTP1-1 dans les cellules K562 au cours de 6 jours d'induction de la différenciation érythroïde par les anthracyclines.

10 μ g d'ARN totaux de cellules K562 traitées pendant 1 à 6 jours par des concentrations différenciantes d'acla (20 nM) ou de dox (40 nM), ont été analysés par northern blot et hybridés avec la sonde GSTP1-1. (A), northern blot représentatif de trois expériences indépendantes. Les ARN ribosomiques ont été colorés au bromure d'éthidium et analysés par un appareil Kodak (image station 440cf) et le signal radioactif de la sonde GSTP1-1 a été détecté par un Phosphorimager (Cyclone). (B), quantification de l'expression de l'ARNm de GSTP1-1 dans les cellules non traitées pendant 6 jours. (C), quantification de l'expression de l'ARNm de l'ARNm de GSTP1-1 dans les cellules induites à se différencier au cours de 6 jours de traitement par rapport au témoin correspondant. Toutes les quantifications ont été réalisées à l'aide du logiciel Kodak 1D image analysis puis rapportées à la sous-unité 18S de l'ARN ribosomique. Ces données représentent la moyenne ± l'écart-type de trois expériences indépendantes. * et ** correspondent respectivement à p<0,05 et à p<0,01 par rapport au témoin. Unités arbitraires = U.A.

En effet, 10 μ g de protéines cytoplasmiques des cellules K562 traitées pendant 1 à 6 jours par des concentrations différenciantes d'anthracyclines ont été analysées par western blot avec l'anticorps primaire anti GSTP1-1. Les résultats de cette immunodétection sont présentés dans la **Figure 15-A**.

La quantification des résultats a montré que l'expression de la GSTP1-1 varie faiblement par rapport à son ARNm au cours des 6 jours de culture sans traitement (**Figure 15-B**). La **Figure 15-C** montre globalement une augmentation de la protéine GSTP1-1 dans les cellules K562 traitées par l'acla ou la dox au cours des quatre premiers jours. Après un maximum au quatrième jour, cette augmentation s'infléchit aux cinquième et sixième jours de traitements.

En conclusion, la différenciation érythroïde des cellules K562 induites par les deux anthracyclines utilisées s'accompagne d'une augmentation de l'expression de l'ARNm et de la protéine GSTP1-1. Les variations observées au niveau de l'expression de la protéine sont assez similaires, néanmoins, l'acla entraîne rapidement une forte augmentation de l'expression de l'ARNm alors que l'augmentation produite par la dox est plus faible mais prolongée. A



0,6 0,4 0,2

С



Figure 15 : Expression de la protéine GSTP1-1 dans les cellules K562 au cours de 6 jours d'induction de la différenciation érythroïde par les anthracyclines.

10 µg de protéines cytoplasmiques de cellules K562, traitées pendant 1 à 6 par des concentrations différenciantes d'acla (20 nM) ou de dox (40 nM), ont été analysées par western blot (A), ces données sont représentatives de trois expériences. La chimiluminescence a été analysée par un appareil Kodak (image station 440cf) et quantifiée par le logiciel Kodak 1D image analysis : expression de la GSTP1-1 dans les cellules non traitées aux jours 1 à 6 (B), expression de la GSTP1-1 dans les cellules induites à se différencier pendant 6 jours par rapport à chaque témoin (C), ces données représentent la moyenne ± l'écart-type de trois expériences indépendantes. * et ** correspondent respectivement à p<0,05 et à p<0,01 par rapport au témoin.

I. 1. 2- Induction de la différenciation érythroïde par l'hémine

Afin d'évaluer si les variations observées au niveau de l'expression du gène de la GSTP1-1 sont dépendantes du type d'inducteur utilisé ou de la voie de différenciation érythroïde, nous avons utilisé l'hémine, un dérivé naturel de l'hème, connu pour induire la différenciation érythroïde des cellules K562.

I. 1. 2. 1- Hémoglobinisation et inhibition de croissance

Pour rechercher la concentration inductrice optimale de la différenciation érythroïde des cellules K562, nous avons déterminé le taux de cellules hémoglobinisées par le test à la benzidine après trois jours d'induction par des concentrations croissantes d'hémine (0, 10, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 100 μ M).

L'inhibition de croissance et la viabilité cellulaire associées au processus de différenciation ont également été suivies en fonction de la concentration en inducteur. Les résultats sont présentés dans la **Figure 16**. Nous observons que l'hémine induit environ 40 % de cellules benzidine positives pour une concentration de 10 μ M et ce taux atteint pratiquement 100 % à partir de 40 μ M d'inducteur. L'inhibition de croissance observée augmente en fonction de la concentration en inducteur donc avec l'hémoglobinisation des cellules K562 mais reste inférieure à 100 % ce qui témoigne d'un effet cytostatique du traitement mais pas d'un effet cytotoxique. Le taux de mortalité cellulaire déterminé par le test au bleu trypan, quant à lui, est faible (inférieur à 5 %) jusqu'à des valeurs de 30 μ M d'hémine, en revanche à partir de 40 μ M, le taux augmente assez fortement.

Ainsi, au vu de ces résultats, nous avons retenu la valeur de 30 μ M d'hémine qui donne un pourcentage élevé de cellules benzidine positives sans augmenter significativement la mortalité cellulaire des cellules K562.

L'induction de la différenciation érythroïde des cellules K562 par 30 μ M d'hémine est suivie au cours de 5 jours de traitement. L'inhibition de croissance et le taux de mortalité cellulaire associés à cette induction ont également été déterminés (**Figure 17**). Après un jour d'induction, il y a environ 60 % de cellules K562 différenciées et ce taux augmente avec le temps d'induction pour atteindre des valeurs approchant les 100 %. La différenciation s'accompagne d'un taux de mortalité cellulaire relativement faible.



<u>Figure 16</u> : Hémoglobinisation des cellules K562 en fonction de la concentration en hémine.

Les cellules K562 sont cultivées pendant 3 jours en présence de différentes concentrations d'hémine. La différenciation érythroïde est évaluée par le test à la benzidine. Les effets de la différenciation induite par l'hémine sur l'inhibition de croissance et la mortalité cellulaire sont indiqués. Ces donnés sont la moyenne \pm l'écart-type de 3 expériences indépendantes.



Temps de traitement (jour)

Figure 17 : Hémoglobinisation des cellules K562 en fonction du temps de traitement par l'hémine.

Les cellules K562 sont cultivées pendant 1 à 5 jours en présence ou pas de 30 μ M d'hémine. La différenciation érythroïde est évaluée par le pourcentage de cellules benzidine positives. Les effets de la différenciation induite par l'hémine sur l'inhibition de croissance et la viabilité cellulaire sont exprimés en %. Ces donnés sont la moyenne ± l'écart-type de 3 expériences indépendantes.

I. 1. 2. 2- Expression de la GSTP1-1 au cours de l'induction de la différenciation érythroïde des cellules K562 par l'hémine

L'expression de l'ARNm et de la protéine GSTP1-1 a été étudiée dans les cellules induites à se différencier par 30 μ M d'hémine pendant 5 jours.

Les ARN totaux ont été extraits après chaque jour de traitement et analysés par northern blot (**Figure 18-A**). La **Figure 18-B** présente le taux d'expression relatif de l'ARNm de GSTP1-1, au cours des 5 jours de traitement par l'hémine. Ces résultats permettent de mettre en évidence une augmentation faible et progressive mais significative de l'expression de l'ARNm de la GSTP1-1 dans les cellules K562. Cette augmentation est d'environ 10 % (p<0,05) après 1 jour de traitement et atteint 40 % (p<0,01) après le cinquième jour.

Par ailleurs, les protéines cytoplasmiques ont été extraites de cellules traitées par l'hémine et l'expression de la protéine GSTP1-1 a été analysée par western blot avec l'anticorps primaire anti-GSTP1-1. Les résultats de cette immunodétection sont présentés dans la **Figure 19-A**.

Dans la **Figure 19-B**, la quantification du signal permet de mettre en évidence une augmentation lente et progressive de l'expression de la protéine GSTP1-1 parallèlement au temps d'induction de l'hémoglobinisation des cellules K562, mais qui est néanmoins significative. En effet, après un jour d'induction, l'expression est augmentée d'environ 10 % (p<0,05) et cette augmentation atteint la valeur de 30 % (p<0,01) au bout du cinquième jour de traitement.

Le traitement des cellules K562 par l'hémine (30 μ M) permet d'induire, de manière corrélée, une augmentation du taux de cellules hémoglobinisées et une augmentation faible et progressive de l'expression de l'ARNm et de la protéine GSTP1-1.

En conclusion, l'induction de la différenciation érythroïde des cellules K562 par l'hémine s'accompagne d'une augmentation de l'expression de l'ARNm et de la protéine GSTP1-1. Cette augmentation est faible et progressive en fonction du temps d'induction.



B



<u>Figure 18</u> : Expression de l'ARNm de GSTP1-1 dans les cellules K562 au cours de 5 jours d'induction de la différenciation érythroïde par l'hémine.

10 μ g d'ARN totaux de cellules K562 cultivées pendant 1 à 5 jours dans du milieu seul ou additionné de 30 μ M d'hémine, ont été analysés par northern blot et hybridés avec la sonde GSTP1-1. (A), northern blot représentatif de trois expériences indépendantes. Les ARN ribosomiques ont été colorés au bromure d'éthidium et analysés par un appareil Kodak (image station 440cf) et le signal radioactif de la sonde GSTP1-1 a été détecté par un Phosphorimager (Cyclone). Les quantifications ont été réalisées à l'aide du logiciel Kodak 1D image analysis puis rapportées à la sous-unité 18S de l'ARN ribosomique. (B), quantification de l'expression de l'ARNm de GSTP1-1 dans les cellules induites à se différencier au cours de 5 jours de traitement par rapport au témoin correspondant. Ces données représentent la moyenne \pm l'écart-type de trois expériences indépendantes. * et ** correspondent respectivement à p<0,05 et à p<0,01 par rapport au témoin.



Figure 19 : Expression de la protéine GSTP1-1 dans les cellules K562 au cours de 5 jours d'induction de la différenciation érythroïde par l'hémine.

10 μ g de protéines cytoplasmiques de cellules K562, cultivées pendant 1 à 5 jours en présence ou non de 30 μ M d'hémine, ont été analysées par western blot (A), ces données sont représentatives de trois expériences. La chimiluminescence a été analysée par un appareil Kodak (image station 440cf) et quantifiée par le logiciel Kodak 1D image analysis (B), ces données représentent la moyenne ± l'écart-type de trois expériences indépendantes. * et ** correspondent respectivement à p<0,05 et à p<0,01 par rapport au témoin.

117

I. 2- Induction de la différenciation mégacaryocytaire par le TPA

Nous avons montré précédemment que l'expression du gène codant pour la GSTP1-1 varie au cours de l'induction de la différenciation érythroïde des cellules K562. Pour évaluer si ces variations sont spécifiques du phénotype érythroïde, nous avons utilisé le caractère multipotent de la cellule K562 pour étudier une autre voie de différenciation. En effet, cette lignée peut également être induite à se différencier vers la voie mégacaryocytaire notamment, par le TPA, un ester de phorbol.

I. 2. 1- Effet sur la différenciation et la prolifération cellulaire

Dans nos conditions expérimentales, nous avons recherché la concentration inductrice maximale de la différenciation mégacaryocytaire des cellules K562 par le TPA. La différenciation mégacaryocytaire peut être suivie par cytométrie en flux qui permet de quantifier un marqueur de surface plaquettaire, le CD61 (ou GP IIIa).

Le taux d'expression est évalué en fonction de concentrations croissantes de TPA (0 ; 1 ; 2,5 ; 5 ; 10 ; 15 ; 20 ; 25 ; 30 nM) après trois jours d'induction (**Figure 20-A**). Le nombre de cellules différenciées exprimant le marqueur CD61 est représenté en fonction de la concentration en inducteur (**Figure 20-B**), concentration que nous utiliserons pour la suite de cette étude. L'inhibition de croissance associée au processus de différenciation a été évaluée en parallèle (**Figure 21**). On peut remarquer que l'inhibition de croissance induite par le TPA atteint des valeurs élevées dès les plus faibles concentrations.

Toutefois, cette forte inhibition de croissance reste inférieure à 100 % ce qui témoigne d'un effet cytostatique du traitement par le TPA mais pas d'un effet cytotoxique.

A partir des résultats obtenus précédemment, les cellules K562 ont été traitées durant six jours par le TPA (10 nM).

L'évaluation de l'expression du marqueur CD61, au cours des 6 jours de traitement, est présentée dans la **Figure 22-A**. Le nombre de cellules différenciées est exprimé en fonction du taux d'expression du marqueur CD61 au cours du temps d'induction par le TPA (**Figure 22-B**).



<u>Figure 20</u> : Quantification de la différenciation mégacaryocytaire des cellules K562 en fonction de la concentration en TPA.

Les cellules K562 sont cultivées en présence de différentes concentrations de TPA pendant 3 jours. L'expression du marqueur de surface plaquettaire CD61 est évalué par cytométrie en flux (A). Le nombre de cellules différenciées est exprimé en fonction de l'expression du marqueur CD61 spécifique de la différenciation mégacaryocytaire (B).



<u>Figure 21</u> : Inhibition de croissance des cellules K562 en fonction de la concentration en TPA.

Les cellules K562 sont cultivées en présence de différentes concentrations de TPA pendant 3 jours. L'inhibition de croissance associée à la différenciation induite par le TPA est évaluée en %.



A

B

<u>Figure 22</u> : Pourcentage de cellules K562 exprimant le marqueur CD61 en fonction du temps de traitement au TPA.

Les cellules K562 sont cultivées en présence ou non de 10 nM de TPA pendant 1 à 6 jours. L'expression du marqueur de surface plaquettaire CD61 est évalué par cytométrie en flux (A). Le nombre de cellules différenciées exprimant le marqueur CD61 est représenté en fonction du temps de traitement (B). Le traitement des cellules K562 par 10 nM de TPA permet d'induire la différenciation mégacaryocytaire de manière dépendante du temps de traitement. Ainsi, environ 50 % des cellules sont différenciées après six jours d'induction. Cette différenciation est associée à une inhibition de croissance qui atteint des valeurs proches de 100 %.

I. 2. 2- Expression du gène de la GSTP1-1 au cours de l'induction de différenciation mégacaryocytaire par le TPA

Toutes les 24 h, les ARN totaux et les protéines cytoplasmiques ont été extraits des cellules K562 induites à se différencier par le TPA (10 nM) pendant 6 jours.

L'expression de l'ARNm de la GSTP1-1 et de la protéine a été analysée par northern blot et western blot, respectivement.

Les résultats obtenus par northern blot (**Figure 23-A**) montre une diminution significative de 50 à 60 % (p<0,01) de l'ARNm de GSTP1-1, quel que soit le temps d'induction par le TPA (**Figure 23-B**).

L'analyse par western blot (**Figure 24-A**) de l'expression de la protéine GSTP1-1 montre une diminution significative, pendant les trois premiers jours, d'environ 20 à 30 % (p<0,01) avec une baisse maximale de 40 % (p<0,01) après le troisième jour de traitement. A partir du quatrième jour, l'expression remonte progressivement jusqu'au sixième jour (**Figure 24-B**).

En conclusion, l'induction de la différenciation mégacaryocytaire par le TPA (10 nM) dans les cellules K562 montre d'une manière générale une diminution du taux d'expression de l'ARNm et de la protéine GSTP1-1.



<u>Figure 23</u> : Expression de l'ARNm de GSTP1-1 dans les cellules K562 après 1 à 6 jours d'induction de la différenciation mégacaryocytaire par le TPA.

10 μ g d'ARN totaux de cellules K562 cultivées pendant 1 à 6 jours dans un milieu seul ou additionné de 10 nM de TPA, ont été analysés par northern blot et hybridés avec la sonde GSTP1-1. (A), northern blot représentatif de trois expériences indépendantes. Les ARN ribosomiques ont été colorés au bromure d'éthidium et analysés par un appareil Kodak (image station 440cf) et le signal radioactif de la sonde GSTP1-1 a été détecté par un Phosphorimager (Cyclone). Les quantifications ont été réalisées à l'aide du logiciel Kodak 1D image analysis puis rapportées à la sous-unité 18S de l'ARN ribosomique. (B), quantification de l'expression de l'ARNm de GSTP1-1. Ces données représentent la moyenne \pm l'écart-type de trois expériences indépendantes. ** correspond à p<0,01 par rapport au témoin.



B



<u>Figure 24</u> : Expression de la protéine GSTP1-1 dans les cellules K562 au cours de 1 à 6 jours d'induction de la différenciation mégacaryocytaire par le TPA.

10 μ g de protéines cytoplasmiques de cellules K562, cultivées pendant 1 à 6 jours en présence ou non de 10 nM de TPA, ont été analysées par western blot (A), ces données sont représentatives de trois expériences. La chimiluminescence a été détectée avec un appareil Kodak (image station 440cf), quantifiée par le logiciel Kodak 1D image analysis (B), ces données représentent la moyenne ± l'écart-type de trois expériences indépendantes. * et ** correspondent respectivement à p<0,05 et à p<0,01 par rapport au témoin.

I. 3- Induction de la différenciation par le butyrate

Dans cette partie, nous avons sélectionné un autre inducteur de la différenciation des cellules K562, le butyrate qui a la particularité de pouvoir induire les différenciations érythroïde et/ou mégacaryocytaire en fonction des concentrations utilisées.

I. 3. 1- Effet sur la différenciation et la prolifération cellulaire

Au cours de la première étape nous avons déterminé les concentrations inductrices maximales en butyrate de la différenciation érythroïde et mégacaryocytaire dans nos conditions expérimentales.

Pour rechercher la concentration inductrice maximale de la différenciation érythroïde des cellules K562, nous avons déterminé le pourcentage de cellules hémoglobinisées par le test à la benzidine après trois jours d'induction par des concentrations croissantes de butyrate (0; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,5; 2; 2,5; 3 mM).

Pour rechercher la concentration inductrice maximale de la différenciation mégacaryocytaire des cellules K562, nous avons déterminé le taux de cellules exprimant le marqueur de surface plaquettaire CD61 par cytométrie en flux après trois jours d'induction par des concentrations croissantes de butyrate (0; 0.5; 0.75; 1; 1.25; 1.5; 2; 2.5; 3 mM).

L'inhibition de croissance et la viabilité cellulaire associées au processus de différenciation ont également été suivies en fonction de la concentration en inducteur.

Les résultats sont présentés dans la **Figure 25**. Nous observons que le butyrate induit un maximum de différenciation érythroïde (36,3 %) pour une concentration de 1 mM et un maximum de différenciation mégacaryocytaire (33,7 %) pour une concentration de 2 mM.

La concentration de 1 mM induisant un maximum d'hémoglobinisation des cellules K562, induit également 10,3 % de différenciation mégacaryocytaire. De la même manière, la concentration de 2 mM qui induit le maximum de cellules exprimant le marqueur plaquettaire CD61, induit également 12,1 % de différenciation érythroïde.

L'inhibition de croissance associée à la différenciation des cellules K562 augmente parallèlement avec la concentration en inducteur, tout en restant inférieure à 100 % ce qui témoigne d'un effet cytostatique du traitement mais pas d'un effet cytotoxique. Le taux de mortalité cellulaire déterminé par le test au bleu trypan, quant à lui reste faible quelle que soit la concentration en inducteur.

Ainsi, au vu de ces résultats, nous avons retenu les valeurs de 1 et 2 mM qui donnent respectivement les pourcentages les plus élevés de différenciation érythroïde et mégacaryocytaire sans augmenter significativement la mortalité cellulaire des cellules K562.

A partir des résultats obtenus précédemment, les cellules K562 ont été traitées durant un à six jours par les concentrations différenciantes de butyrate 1 et 2 mM. Chaque lot de cellules traitées a permis de réaliser simultanément une extraction des ARN totaux et des facteurs cytoplasmiques et nucléaires.

L'induction de la différenciation érythroïde et mégacaryocytaire des cellules K562 est suivie au cours du temps en évaluant respectivement, les taux de cellules hémoglobinisées et de cellules exprimant le marqueur de surface plaquettaire CD61. L'inhibition de croissance et le taux de mortalité cellulaire associés à cette induction sont également déterminés (**Figure 26**).

D'après les résultats présentés dans la **Figure 26-A** et dans la **Figure 26-B**, on peut constater que les taux respectifs de différenciation érythroïde et mégacaryocytaire, restent faibles même après six jours d'induction.

Le temps de traitement est corrélé à une augmentation de l'inhibition de croissance, témoignant de l'efficacité de l'induction de différenciation. On note également que le taux de mortalité cellulaire reste faible au cours de cette induction.

I. 3. 2- Effet du butyrate sur l'expression du gène de la GSTP1-1

I. 3. 2. 1- Effet sur l'expression de l'ARNm de GSTP1-1

Afin d'étudier l'effet de l'induction des différenciations érythroïde et mégacaryocytaire des cellules K562 par le butyrate sur l'expression de l'ARNm de GSTP1-1, 10 μ g d'ARN totaux ont été analysés par northern blot. L'hybridation avec la sonde GSTP1-1 de 0,7 kb radiomarquée permet de mettre en évidence l'ARNm de GSTP1-1 de 1,2 kb.



<u>Figure 25</u> : Suivi de la différenciation érythroïde ou mégacaryocytaire en fonction de concentrations croissantes de butyrate.

Les cellules K562 ont été cultivées pendant 3 jours en présence de concentrations croissantes de butyrate. Les caractéristiques de culture cellulaire associées à ces traitements ont été évaluées par comptage au bleu trypan. Le pourcentage de cellules hémoglobinisées a été évalué par le test à la benzidine et le taux d'expression du marqueur CD61 par cytométrie en flux.

A

B



<u>Figure 26</u> : Effet sur les caractéristiques cellulaires de la lignée K562 au cours de 6 jours d'induction de la différenciation érythroïde ou mégacaryocytaire par le butyrate.

Les cellules K562 ont été cultivées pendant 1 à 6 jours dans un milieu seul ou additionné de 1 mM de butyrate (A) ou de 2 mM de butyrate (B). Le taux de mortalité cellulaire associé à ces traitements a été évalué par coloration au bleu trypan. Le pourcentage de cellules hémoglobinisées a été évalué par le test à la benzidine et le taux d'expression du marqueur CD61 par cytométrie en flux. Ces données représentent la moyenne \pm l'écart-type de deux expériences indépendantes.

Les résultats du northern blot sur les ARN des cellules K562 traitées pendant un à six jours par les concentrations différenciantes de 1 mM et 2 mM de butyrate sont présentés dans la **Figure 27-A**.

Ces résultats montrent qu'en fonction du temps de traitement le butyrate entraîne une baisse significative de l'expression de l'ARNm de GSTP1-1 après induction à la fois de la différenciation érythroïde mais aussi de la différenciation mégacaryocytaire. Cependant, la diminution observée avec la concentration de 2 mM de butyrate est plus précoce et plus importante que celle observée avec 1 mM de butyrate (**Figure 27-B**).

I. 3. 2. 2- Effet sur l'expression de la protéine GSTP1-1

Pour confirmer nos résultats nous avons déterminé l'effet de la différenciation érythroïde et mégacaryocytaire induite par le butyrate sur l'expression de la protéine GSTP1-1.

Ainsi, 10 μ g de protéines cytoplasmiques des cellules K562 traités pendant 1 à 6 jours par des concentrations différenciantes de 1 mM et 2 mM de butyrate ont été analysés par western blot avec l'anticorps primaire anti-GSTP1-1. Les résultats de cette immunodétection sont présentés dans la **Figure 28-A**.

Les quantifications sont présentées dans la figure **Figure 28-B**. Ces expériences ne révèlent aucune variation significative de l'expression de la protéine GSTP1-1 après ce type de traitement.

En conclusion, l'induction de la différenciation des cellules K562 par le butyrate a permis de montrer une baisse de l'expression de l'ARNm de GSTP1-1, avec toutefois une diminution plus marquée au cours de l'induction de la différenciation mégacaryocytaire (2 mM) comparée à l'induction de la différenciation érythroïde (1 mM). Par contre, cette diminution n'a pas été observée au niveau de l'expression de la protéine.

129



Figure 27 : Expression de l'ARNm de GSTP1-1 dans les cellules K562 au cours de 6 jours d'induction de la différenciation érythroïde (1 mM) et mégacaryocytaire (2 mM) par le butyrate.

10 μ g d'ARN totaux de cellules K562 cultivées pendant 1 à 6 jours dans du milieu seul ou additionné de concentrations différenciantes de butyrate (1 mM ou 2 mM), ont été analysés par northern blot et hybridés avec la sonde GSTP1-1. (A), northern blot représentatif de deux expériences indépendantes. Les ARN ribosomiques ont été colorés au bromure d'éthidium et analysés par un appareil Kodak (image station 440cf) et le signal radioactif de la sonde GSTP1-1 a été détecté par un Phosphorimager (Cyclone). Les quantifications ont été réalisées à l'aide du logiciel Kodak 1D image analysis puis rapportées à la sous-unité 18S de l'ARN ribosomique. (B), quantification de l'expression de l'ARNm de GSTP1-1 dans les cellules induites à se différencier au cours de 6 jours de traitement par rapport au témoin correspondant. Ces données représentent la moyenne \pm l'écart-type de deux expériences indépendantes.

A

B



B



<u>Figure 28</u> : Expression de la protéine GSTP1-1 dans les cellules K562 au cours de 6 jours d'induction de la différenciation érythroïde (1 mM) et mégacaryocytaire (2 mM) par le butyrate.

10 μ g de protéines cytoplasmiques de cellules K562 cultivées pendant 1 à 6 jours dans du milieu seul ou additionné de concentrations différenciantes de butyrate (1 mM ou 2 mM), ont été analysées par western blot (A), ces données sont représentatives de trois expériences. La chimiluminescence a été analysée par un appareil Kodak (image station 440cf), quantifiée par le logiciel Kodak 1D image analysis (B), ces données représentent la moyenne ± l'écart-type de deux expériences indépendantes. * et ** correspondent respectivement à p<0,05 et à p<0,01 par rapport au témoin.

<u>I. 4- Effet des agents différenciants sur l'expression de l'ARNm de GSTP1-1 dans</u> la lignée Jurkat

Nous avons mis en évidence une variation de l'expression du gène de la GSTP1-1 qui est spécifique de la voie de différenciation induite. En effet, la différenciation des cellules K562 vers la voie érythroïde entraîne d'une manière générale une augmentation de l'expression du gène de la GSTP1-1 indépendamment du type d'inducteur utilisé (anthracyclines ou hémine). A l'opposé, l'induction de la différenciation mégacaryocytaire par le TPA, entraîne une diminution de l'expression du gène de la GSTP1-1.

Afin d'évaluer si cette modulation de l'expression du gène de la GSTP1-1 est en relation avec un processus de différenciation, nous avons étudié l'effet de ces inducteurs sur une lignée non myéloïde, la lignée humaine Jurkat (une leucémie à cellules T).

Les cellules Jurkat ont été traitées par 10 nM de TPA, 20 nM d'acla ou 40 nM de dox pendant 1 à 6 jours ou par 30 μ M d'hémine pendant 1 à 3 jours.

I. 4. 1- Effet de l'hémine sur l'expression de la GSTP1-1 dans les cellules Jurkat

I. 4. 1. 1- Effet sur la différenciation et la prolifération cellulaire

L'effet du traitement par l'hémine (30 μ M) a été étudié pendant 1 à 3 jours, sur l'inhibition de croissance (**Figure 29-A**) et le taux de mortalité cellulaire (**Figure 29-B**).

Les résultats montrent une inhibition de croissance qui augmente en fonction du temps de traitement et qui atteint environ 50 % au bout du troisième jour de traitement. Ce ralentissement de croissance ne s'accompagne pas d'une augmentation significative de la mortalité cellulaire (<7 % après trois jours).

Cette inhibition n'est pas la conséquence d'un effet cytotoxique du traitement, puisqu'elle reste inférieure à 100 % et est accompagnée d'un taux de mortalité qui reste faible.

Α

B



<u>Figure 29</u> : Effet de 30 μ M d'hémine sur la prolifération cellulaire de la lignée Jurkat au cours de 3 jours de traitement.

Les cellules Jurkat ont été traitées pendant 3 jours par 30 μ M d'hémine. L'inhibition de croissance (A) et la mortalité cellulaire (B) ont été évaluées par numération des cellules colorées au bleu trypan. Ces données représentent la moyenne \pm l'écart-type de trois expériences.

I. 4. 1. 2- Effet sur l'expression de l'ARNm de GSTP1

Nous avons ensuite étudié l'effet de ces conditions de traitement sur l'expression de l'ARNm du gène de GSTP1-1 dans la lignée Jurkat par northern blot en présence d'une sonde radiomarquée d'ADNc de GSTP1-1 (**Figure 30-A**).

La **Figure 30-B** présente le taux d'expression relatif de l'ARNm de GSTP1-1, rapporté à celui des ARNr 18S, en fonction du temps de traitement. Cette quantification ne met en évidence aucune différence significative de l'expression de l'ARNm de GSTP1-1, pendant ce temps de traitement avec 30 μ M d'hémine.

I. 4. 2- Effet des anthracyclines et du TPA sur l'expression de la GSTP1-1 dans les cellules Jurkat

I. 4. 2. 1- Effet sur la prolifération cellulaire

L'effet des trois inducteurs (acla, dox et TPA) a été analysé sur l'inhibition de croissance (**Figure 31-A**) et le taux de mortalité cellulaire (**Figure 31-B**) des cellules Jurkat.

Les résultats montrent une forte inhibition de croissance (85 %) dès le deuxième jour de traitement par la dox qui se maintient jusqu'au sixième jour. Cette inhibition n'est pas la conséquence d'un effet cytotoxique, puisque le taux de mortalité cellulaire reste faible jusqu'au quatrième jour. Au delà, l'effet cytotoxique devient significatif (>10%) avec les différents inducteurs. Toutefois, nous remarquons aussi une augmentation plus modérée de la mortalité cellulaire dans les cultures témoins.

Après les traitements par l'acla et le TPA, on constate également un ralentissement de la croissance cellulaire mais beaucoup plus faible que celui observé avec la dox (20 et 40 % respectivement).



<u>Figure 30</u> : Expression de l'ARNm de GSTP1-1 dans les cellules Jurkat après 1 à 3 jours de traitement par 30 μ M d'hémine.

10 μ g d'ARN totaux de cellules Jurkat traitées pendant 1 à 3 jours par 30 μ M d'hémine ont été analysés par northern blot et hybridés avec la sonde GSTP1-1. (A), northern blot représentatif de trois expériences indépendantes. Les ARN ribosomiques ont été révélés au bromure d'éthidium et analysés par un appareil Kodak (image station 440cf) et le signal radioactif de la sonde GSTP1-1 a été détecté par un Phosphorimager (Cyclone). Les quantifications ont été réalisées à l'aide du logiciel Kodak 1D image analysis puis rapportées à la sous-unité 18S de l'ARN ribosomique. (B), quantification de l'expression de l'ARNm de GSTP1-1 dans les cellules Jurkat traitées pendant 3 jours par rapport au témoin correspondant. Ces données représentent la moyenne \pm l'écart-type de trois expériences indépendantes. A

B



<u>Figure 31</u> : Effet des inducteurs de la différenciation de la lignée K562 sur la prolifération cellulaire de la lignée Jurkat au cours de 6 jours de traitement.

Les cellules Jurkat ont été cultivées pendant 1 à 6 jours dans du milieu seul ou additionné de 10 nM de TPA, 20 nM d'acla ou 40 nM de dox. L'inhibition de croissance (A) et la mortalité cellulaire (B) ont été évaluées par numération des cellules au bleu trypan. Ces données représentent la moyenne \pm l'écart-type de trois expériences indépendantes.

I. 4. 2. 2- Effet sur l'expression de l'ARNm de la GSTP1-1

Nous avons analysé l'expression de l'ARNm du gène de GSTP1-1 dans la lignée Jurkat traitée pendant 6 jours par 10 nM de TPA, 20 nM d'acla ou 40 nM de dox. L'analyse par northern blot de 10 μ g d'ARN totaux hybridés avec la sonde d'ADNc de GSTP1-1 radiomarquée est présentée dans la **Figure 32-A**.

La **Figure 32-B** présente le taux d'expression relatif de l'ARNm de GSTP1-1, rapporté à celui des ARNr 18S, en fonction du temps de traitement. Cette quantification ne met en évidence aucune différence significative de l'expression de l'ARNm de GSTP1-1, que ce soit en fonction du temps de traitement ou du type d'inducteur.

En conclusion, les traitements capables d'induire la différenciation des cellules K562 vers la voie érythroïde ou mégacaryocytaire ne modifie pas l'expression du gène de la GSTP1-1 dans une lignée incapable de se différencier vers ces voies. Ainsi, les variations de l'expression du gène de la GSTP1-1 pourraient être spécifiques des potentialités de différenciation de la lignée K562.
Résultats



B



<u>Figure 32</u> : Effet des inducteurs de la différenciation de la lignée K562 sur l'expression de l'ARNm de GSTP1-1 dans la lignée Jurkat au cours de 6 jours de traitement.

10 μ g d'ARN totaux de cellules Jurkat traitées pendant 1 à 6 jours par 10 nM de TPA, 20 nM d'acla ou 40 nM de dox, ont été analysés par northern blot et hybridés avec la sonde GSTP1-1 (A). Northern blot représentatif de trois expériences indépendantes. Les ARN ribosomiques ont été colorés au bromure d'éthidium et analysés par un appareil Kodak (image station 440cf) et le signal radioactif de la sonde GSTP1-1 a été détecté par un Phosphorimager (Cyclone). Les quantifications ont été réalisées à l'aide du logiciel Kodak 1D image analysis puis rapportées à la sous-unité 18S de l'ARN ribosomique. (B), quantification de l'expression de l'ARNm de GSTP1-1 dans les cellules Jurkat traitées pendant 6 jours par rapport au témoin correspondant. Ces données représentent la moyenne \pm l'écart-type de trois expériences indépendantes.

138

En résumé, dans la lignée K562, l'expression du gène de la GSTP1-1 varie en fonction de la voie de différenciation induite.

Les anthracyclines et l'hémine qui induisent la différenciation érythroïde de ces cellules conduisent à une augmentation de l'ARNm et de la protéine GSTP1-1.

Au contraire, lors de la différenciation mégacaryocytaire induite par le TPA, la GSTP1-1 devient très faiblement exprimée.

Avec le butyrate les résultats semblent moins contrastés. En effet, nous pouvons observer une diminution de l'expression comme dans le cas du TPA avec la concentration de 2 mM de butyrate qui induit la différenciation mégacaryocytaire. En revanche, avec la concentration de 1 mM, qui induit la différenciation érythroïde, l'expression de la GSTP1-1 est également diminuée mais de manière moins importante et plus tardive qu'avec la concentration de 2 mM.

Ces résultats suggèrent l'existence d'un mécanisme de régulation transcriptionnel et / ou post-transcriptionnel du gène GSTP1 spécifique de la voie de différenciation induite.

De plus, ce mécanisme de régulation transcriptionnel semble spécifique de la lignée et donc du type cellulaire considéré, puisque les traitements capables d'induire la différenciation des cellules K562 vers les voies érythroïde et mégacaryocytaire n'activent pas de mécanisme de régulation transcriptionnelle de l'expression du gène de la GSTP1-1 dans la lignée Jurkat qui est incapable de se différencier. Ainsi, l'effet observé en plus d'être spécifique de la voie de différenciation induite, est spécifique de la lignée cellulaire.

Ces résultats laissent ainsi envisager une implication potentielle de facteurs et de voies de signalisation qui sont spécifiques de la lignée K562.

II- ETUDE DE LA REGULATION TRANSCRIPTIONNELLE DE LA GSTP1-1 AU COURS DE L'INDUCTION DE LA DIFFERENCIATION

Dans la première partie de cette étude, nous avons mis en évidence une variation de l'expression du gène de la GSTP1-1 qui est dépendante de la voie de différenciation.

Le traitement des cellules K562 par les anthracyclines ou l'hémine, inducteurs de la différenciation érythroïde, entraîne une augmentation de l'expression du gène de la GSTP1-1. A l'opposé, le TPA et le butyrate, inducteurs de la différenciation mégacaryocytaire des cellules K562 provoquent une baisse de l'expression du gène de la GSTP1-1. De plus nous avons montré qu'en absence d'activité différenciante, ces mêmes inducteurs ne modifient pas l'expression du gène de la GSTP1-1 dans la lignée Jurkat.

Des résultats antérieurs obtenus dans l'équipe ont montré l'implication du facteur de transcription p45-NF-E2 dans l'induction du gène de la GSTP1-1 par le TPA (Borde-Chiché *et al.*, 2001a). C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à l'étude des facteurs de transcription impliqués dans la régulation transcriptionnelle des gènes spécifiques des voies érythroïde et mégacaryocytaire et à leur éventuelle interaction avec le promoteur du gène de la GSTP1-1. Nous avons recherché la présence potentielle d'autres sites pour des facteurs de transcription spécifiques de la différenciation érythroïde ou mégacaryocytaire dans le promoteur du gène de la GSTP1-1.

II. 1- Recherche de séquences cibles de facteurs de transcription spécifiques de la différenciation hématopoïétique

Afin d'atteindre cet objectif, la séquence promotrice du gène de la GSTP1-1 comprise entre -1224 et +96 pb a été soumise à une analyse assistée par ordinateur, grâce au logiciel Matinspector de Genomatix (<u>http://www.genomatix.de</u>). Ce logiciel permet une recherche automatique, par comparaison de séquences, de sites susceptibles de lier spécifiquement des facteurs de transcription (Heinemeyer *et al.*, 1998).

Les résultats de cette recherche sont présentés dans la **Figure 33**. Ce programme, nous a permis de retrouver parmi les 1200 sites sortis, les séquences déjà connues des 2 sites Sp1, du site AP-1, du site NF- κ B like et du site NF- κ B dans le promoteur du gène de la GSTP1-1.

Par ailleurs, deux séquences GATA, que nous avons arbitrairement appelé GATA proximal situé en -908/-905 et GATA distal situé en -1211/-1208 ont retenu notre attention. La **Figure 34** montre une représentation schématique du promoteur du gène de la GSTP1-1, avec la position des sites identifiés grâce à la recherche assistée par ordinateur.

Une étude précise des deux séquences GATA précédemment identifiées révèle que celle du site GATA distal est plus proche de la séquence consensus (5'-T/A(GATA)A/G-3') que celle du site GATA proximal, de par la nature des bases adjacentes au motif GATA.

Cette séquence est connue pour permettre la fixation de facteurs de transcription de la famille GATA. Parmi les membres connus de cette famille, les facteurs GATA-1, 2 et 3 sont principalement impliqués dans la régulation transcriptionnelle de l'expression des gènes du système hématopoïétique. Plus particulièrement le facteur GATA-1 est essentiel dans la différenciation érythroïde et mégacaryocytaire.

Ainsi, au vu des différences observées concernant l'expression de la GSTP1-1 en fonction de la lignée et de la voie de différenciation considérée, les sites GATA identifiés dans le promoteur du gène de la GSTP1-1 nous ont semblé être de bons candidats en ce qui concerne leur implication potentielle dans l'expression de ce gène.

En conclusion, l'étude assistée par ordinateur de la séquence promotrice du gène de GSTP1-1 nous a permis de mettre en évidence deux séquences GATA en positions proximale (-908/-905) et distale (-1211/-1208) par rapport au site d'initiation de la transcription.

🔹 File Edit View Search Go Bookmarks Tasks Aide 11:03 🌠 🤌 💵 🖗 Matinspector professional: Result - Netscape 6								
CO CO CO C	http://genomatix.gsf.de/mat_fam			-	-	Go Search @		
0	1					Matinspector		
Genomatix	1				à	professional		
Detection of Patterns in DNA Sequences								
	[your comments] [NEW Genometry news]							
	Search Results (77	matches)						
MatInspector Release prof	iessional 4.3 July 2000					Fri Jul 20 10:54:41 2001		
a								
Solution parameter	rs:							
Sequence file(s): GST	seq (1263 br)							
Family matches: yes								
Matinspector library: Matri	x Family Library Version 1.10 February 2001							
Selected group: Verte	brates (Quality library) similarity 0.95							
MATRIX-SEARCH: Core : matri	similarity. 0.95 x similarity: calculated optimized							
·								
Tananata	- CET [2] (4 4262).							
inspecting sequence	e USI [?] (1 - 1203):							
Name of family/matrix	Further Information	Position	Strand	Core sim	Matrix sim	Sequence		
V\$CDCR/CDPCR3HD 01	cut-like homeodomain protein	6 - 15	(-)	1.000	0.970	tattGATCtc		
V\$GATA/LMO2COM 02	complex of Lmo2 bound to Tal-1, E2A proteins, and GATA-1, half-site	11 19	COL	. 000	0.955	taGATAttg		
V\$RPOAJAPOLYA B	Avian C-type PolyA signal	21 - 35	(4)	1.000	0.730	AATAAAtggagatct		
V\$OCTI/OCTI Q6		30 - 44	(+)	1.000	0.897	agatetgeAAATcaa		
provide the second s	octamer factor 1	0.002/02/02/07/07/02			0.075	acagAAAGtaggcag		
V\$BARB/BARBIE 01	octamer factor 1 barbiturate-inducible element	44 - 58	(+)	1.000	0.075			
Y\$BARB/BARBIE 01 Y\$HMTB/MTBF B	loctamer factor 1 barbiturate-inducible element muscle-specific Mt binding site	44 - 58	(+) (-)	1.000	0.901	ggctATTTt		
<u>V\$BARB/BARBIE 01</u> <u>V\$HMTB/MTBF B</u> <u>V\$EBOR/XBP1 01</u>	octmer factor 1 barbitraste-inducible element muscle-specific Mt binding site X-box-binding protein 1	44 - 58 70 - 78 94 - 110	(+) (-) (-)	1.000 1.000 1.000	0.875	ggctATTTt atgatcACGTtcctttt		
V\$BARB/BARBIE 01 V\$HMTB/MTBF B Y\$EBOR/XBP1 01 Y\$EBOX/ARNT 01	octmer factor 1 barbiturate-inducible element muscle-specific Mt binding site X-box-binding protein 1 AbR nuclear translocator homodimers	44 - 58 70 - 78 94 - 110 95 - 110	(+) (-) (+)	1.000 1.000 1.000 1.000	0.845	ggctATTTt atgatcACGTtectttt aaaggaaCGTGatcat		
Y\$BARB/BARBIE 01 Y\$HMTB/MTBF B Y\$EBOR/XBF1 01 Y\$EBOX/ARNT 01 File Edit View S	octamer factor 1 barbitruste-inducible element muscle-specific Mt binding site X-box-binding protein 1 AhR nuclear translocator homodimers earch Go Bookmarks Tasks Aide	44 - 58 70 - 78 94 - 110 95 - 110	(+) (-) (-) (+)	1.000 1.000 1.000 1.000	0.875	ggctATTN atgatrACGToctttt aaaggaaCGTGatrat 11:03 🌮 🖉 💵 🕻		
Y\$BARB/BARBIE 01 Y\$HMTB/MTBF B Y\$EBOR/XBF1 01 Y\$EBOX/ARNT 01 File Edit View S	Octamer factor 1 barbitruste-inducible element muscle-specific Mt binding site X-box-binding protein 1 AhR nuclear translocator homodimers earch Go Bookmarks Tasks Aide Matinspector professional: Residual	44 - 58 70 - 78 94 - 110 95 - 110	(+) (-) (+) ape 6	1.000 1.000 1.000 1.000	0.875	ggctATTTt afgatzACGTtctttt aaaggaaCGTGatzat 11:03 🎸 🍂 🚺		
VY3BARD/BARD/E 01 V\$HMTB/MBF E Y\$EEORXARP1 01 Y\$EEORXARNT 01 File Edit View S	octamer factor 1 barbitrate-inducible element muscle-specific Mt binding site X-box-binding protein 1 AhR nuclear translocator homodimers earch Go Bookmarks Tasks Aide Matinspector professional: Re > >>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>	44 - 58 70 - 78 94 - 110 95 - 110 sult - Netsc	(+) (-) (-) (+) ape 6	1,000 1,000 1,000 1,000	0.901 0.845 0.894	ggetATTTt aggatACGTbetttt aaaggatGGTGateat 11:03 & 11 & Go Search		
Y\$BEARXBEE 01 Y\$HMTE/MTEF E Y\$EEOXXBE1 01 Y\$EEOXXARNT 01 Y\$EEOX Y\$EO Y\$YMYE/YMYE	octment factor 1 barbiturate-inducible element muscle-specific Mt binding site X-box-binding protein 1 AhR nuclear translocator homodimers earch Go Bookmarks Tasks Aide Matinspector professional: Re Matinspector professional: Re Image: Specific Mt binding site Image: Specific Mt binding site Phybe	44 - 58 70 - 78 94 - 110 95 - 110 sult - Netsc	(+) (-) (+) (+) ape 6	1.000 1.000 1.000 1.000 1.000	0.875 0.901 0.845 0.894	ggetATTT atgatACGTbctttt aaaggaaCGTGatoat 11:03 2 2 1 1 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2		
Y3EARD/BARDIE 01 Y3HMTE/MTEP E Y3EDORXXEP1 01 Y3EDORXXEP1 01 Y3EDOX/ARNT 01 Y3EDOX/ARNT 01 Y3EOX/ARNT 02 Y3SOX7Y/SOX5 01	octment factor 1 barbiturate-inducible element muscle-specific Mt binding site X-box-binding protein 1 AhR nuclear translocator homodimers earch Go Bookmarks Tasks Aide Matinspector professional: Re Image: Specific Mt binding site //genomatix.gsf.de/mat_fam Image: Specific Mt binding site //genomatix.gsf.de/mat_fam	44 - 58 70 - 78 94 - 110 95 - 110 95 - 110 sult - Netsc 142 - 150 216 - 225	(+) (-) (+) (+) ape 6	1.000 1.000 1.000 1.000	0.875 0.901 0.845 0.894	IggetAACG avagataCGToctttt avagataCGToctttt 11:03 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2		
Y\$EARD/FARD/E 01 Y\$HIM TE/MTBP E Y\$ED ORXXEP1 01 Y\$ED ORXXEP1 01 Y\$ED OXXARNT 01 File Edit View S Y\$YMYE/YMYE 02 Y\$SORY/SOX5 01 Y\$GREF/GRE C	octment factor 1 barbiturate-inducible element imuscle-specific Nt binding site X-box-binding protein 1 JAR nuclear translocator homodimers earch Go Bookmarks Tasks Aide MatInspector professional: Restrict the spectral spectres spectrespectral spectral spectral spectral spectres spectrespe	44 - 58 70 - 78 94 - 110 95 - 110 •sult - Netsc 142 - 150 216 - 225 224 - 239	(+) (-) (+) (+) (+) (-) (+) (-)	1.000 1.000 1.000 1.000 1.000	0.845 0.901 0.845 0.894 0.894 0.995 0.995 0.986 0.900	IggetACTTR avgatzACGToctttt avaggasCGTGateat 11:03 2 2 1 1 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2		
VSBARD/BARDIE 01 VSHMTE/MTBF E VSEDORXSP1 01 VSEDORXSP1 01 VSEDOX/ARNT 01 VSEDOX/ARNT 01 VSEDOX/ARNT 01 VSEDOX/ARNT 01 VSEDOX/SON 01 VSCDEF/GRE C VSLDPS/LDSP0LYA E	octmer fector 1 barbitraste-inducible element muscle-specific Mt binding site &-box-binding protein 1 AhR nuclear translocator homodimers earch Go Bookmarks Tasks Aide Matinspector professional: Re /w-Myb Sox-5 Glucoorticoid response element Lentiviral Poly A downstream element	44 - 58 70 - 78 94 - 110 95 - 110 95 - 110 142 - 150 216 - 225 224 - 239 248 - 263	(+) (-) (-) (+) (+) (+) (-) (+) (-) (-)	1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000	0.901 0.901 0.845 0.894 0.994 0.995 0.995 0.986 0.900 0.933	IggeCATTR atgatACGTectttt aaaggaaCGTGataat 11:03 & A II & Go Search IgtAACGge IgtaaCAATga graacATga graacatTOTTete ccaGTGTgt tgate		
Y\$EARD/FARD/E 01 Y\$HMTE/MTEF E Y\$EBOX/ARNT 01 Y\$EDOX/ARNT 01 Y\$EDOX/ARNT 01 Y\$EDOX/ARNT 01 Y\$EDOX/ARNT 01 Y\$EDOX/ARNT 01 Y\$EDOX/ARNT 02 Y\$SORY/ISOX5 01 Y\$LDPSXLDSPOLYA B Y\$LCMYE/CMYE 01	octmaer factor 1 barbiturate-inducible element muscle-specific Mt binding site X-box-binding protein 1 AhR nuclear translocator homodimers earch Go Bookmarks Tasks Aide Matinspector professional: Re whtp://genomatix.gsf.de/mat_fam w-Myb Sox-5 Glucocordooid response element Leativital Poly A downstream element o-Myb	44 - 58 70 - 78 94 - 110 95 - 110 500 - 78 95 - 110 500 - 78 95 - 110 500 - 78 500 -	(+) (-) (-) (+) (+) (+) (+) (+) (-) (+) (-) (+)	1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000	0.901 0.901 0.845 0.894 0.995 0.995 0.996 0.900 0.933 0.934	ggedATTR aggerGGTGateat 11:03 2 2 11:03 2 2 11:03 2 2 11:03 2 2 11:03 2 2 11:03 2 2 11:03 2 2 11:03 2 2 11:03		
Y\$EARb/fARB/fE 01 Y\$HMTB/MTBP E Y\$EDOXXBP1 01 Y\$EDOXXARNT 01 Image: the first of the second s	octment factor 1 barbiturate-inducible element muscle-specific Mt binding site X-box-binding protein 1 AhR nuclear translocator homodimers earch Go Bookmarks Tasks Aide Matinspector professional: Re Matinspector professional: Re • http://genomatix.gsf.de/mat_fam •-Myb Sox-5 GRuccorticoid response element c-Myb Beauon-restrictive silencer factor beaudynamic factor beaudynamic factor	44 - 58 70 - 78 94 - 110 95 - 110 35 - 110 142 - 150 216 - 225 244 - 239 248 - 263 259 - 276 266 - 286 260 - 286	(+) (-) (-) (+) (+) (+) (-) (-) (+) (+) (+) (+) (-) (+) (+)	1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000	0.901 0.845 0.894 0.894 0.995 0.995 0.995 0.996 0.900 0.933 0.934 0.720			
YsbaARb/BARBIE 01 YshMTE/MTEP E YsbBoRXXBPL 01 YsbBoRXXBPL 01 YsbBoRXXBPL 01 YsbBoRXXBPL 01 YsbBoRXXBPL 01 YsbBoRXXBPL 01 YsbBoRXXBPL 02 YsbORYXBOX5 01 YsbCRFXCPRE C YsbCNYSICMYB 01 YsbCRYXBOX5 01	octment factor 1 barbiturate-inducible element muscle-specific Mt binding site X-box-binding protein 1 AhR nuclear translocator homodimers earch Go Bookmarks Tasks Aide MatInspector professional: Re >>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>	44 - 58 70 - 78 94 - 110 95 - 110 142 - 150 216 - 225 224 - 239 248 - 263 259 - 276 266 - 286 290 - 310 308 - 329	(+) (·) (·) (+) (+) (+) (·) (·) (·) (·) (·) (·) (·) (·) (·) (·	1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000	0.991 0.901 0.845 0.894 0.995 0.995 0.986 0.900 0.933 0.934 0.720 0.772 0.772	IggetATTR atgateACGToctttt aaaggaaCGTGateat 11:03 A aaggaaCGTGateat I1:03 A aaggaaCGTGateat IgaaCAACGgo IgaaCAATga IggaacgatgTGTTctc IccaGTGTggttgatc IccaGCAccocgctcaacagg IggaacgataccaGGAAggaatg JaacGGCActanocthacta		
YsBARB/BARB/E 01 YsHMTE/MTBP E YsEDORXABPI 01 YsEDORXAPPI 01 YsEDORXAPPI 01 YsEDORXAPPI 01 YsEDORXAPPI 01 YsEDORXAPPI 01 YsEORY/SOX5 01 YsSORY/SOX5 01 YsCMYSICTAP 01 YsKREF/GRE C YsCMYSICMYE 01 YsKREF/NRSF 01 YsKSEC/STAF 01 YsGARAFATA1 02	octamer factor 1 barbitraste-inducible element muscle-specific Mt binding site X-box-binding protein 1 AhR nuclear translocator homodimers earch Go Bookmarks Tasks Aide Matinspector professional: Re Matinspector professional: Re V-Myb Soc-5 Glucocorticoid response element Lentivinal Poly A downstream element c-Myb Bardon restrictive silencer factor signal transducer and activator of transcription 1 Be-Cys GNA concertified factor	44 - 58 70 - 78 94 - 110 95 - 110 95 - 110 142 - 150 142 - 150 216 - 225 224 - 239 248 - 263 259 - 276 266 - 226 266 - 226 260 - 310 308 - 329	(+) (·) (·) (+) (+) (·) (·) (·) (·) (·) (·) (·) (·) (·) (·	1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000	0.973 0.901 0.845 0.894 0.894 0.995 0.995 0.996 0.990 0.933 0.933 0.722 0.772 0.772	IggeCATTT atgat2ACGToctttt aaaggaCGTGatat 11:03 2 2 10 10 10 10 10 10 10 10 10 10 10 10 10		
VSBARB/BARBIE 01 VSHMTE/MTBP E VSHMTE/MTBP E VSEDORXARNT 01 VSEDORXARNT 01 VSEDORXARNT 01 VSEDORXARNT 01 VSEORT/SOCO VSEORT/SOCO VSEORT/SOCO VSEORT/SOCO VSEORT/SOCO VSEORT/SOCO VSTAT/STAT1 01 VSETAT/STAT1 01 VSEORTAP 01 VSEORTAP 01 VSEORTAP 01 VSEORTAP 01 VSEORTAP 01	octamer factor 1 barbiturate-inducible element muscle-specific Mt binding site X-box-binding protein 1 AhR nuclear translocator homodimers earch Go Bookmarks Tasks Aide Matinspector professional: Re Matinspector professional: Re Image: Specific Mt binding street in the spectra professional in the spectra profession in the spectra profession profession profession in the spectra profession in the spe	44 - 58 70 - 78 94 - 110 95 - 110 95 - 110 142 - 150 216 - 225 224 - 239 248 - 263 259 - 276 266 - 286 290 - 310 308 - 329 312 - 325	(+) (·) (·) (+) (+) (·) (·) (·) (·) (·) (·) (·) (·) (·) (·	1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000	0.970 0.970 0.845 0.894 0.894 0.995 0.995 0.996 0.990 0.933 0.934 0.720 0.772 0.765 0.945	IggetATTT attackGThectm aaagsacGTGataat 11:03 & A II & Go Search & getAACage IgacKaTga ggaccagTOTToto ceaGTGTgtgtgat actgtgectGTTGage oocAGCApercegthanage ggacgatacaGAAgaatag bagCGCAgtatecettageta bageGATActggs		
Ysbarb/ARBIE 01 YshMTE/MTEP E Ysbarb.or.xsp1 01 Ysbarb.or.xsp1 01 <td>octamer factor 1 barbiturate-inducible element muscle-specific Mt binding site X-box-binding protein 1 AhR nuclear translocator homodimers earch Go Bookmarks Tasks Aide Matinspector professional: Re Matinspector professional: Re w-Myb Sox-5 Glucocordcoid response element Lentivinal Poly A downstream element o-Myb sec/vs tRNA sene transcription activating factor GRATA-binding factor 1 Barahyun homeo domain factor Nkx-2.5/Csx, timman homolog</td> <td>44 - 58 70 - 78 94 - 110 95 - 110 :sult - Netsc 216 - 225 224 - 239 248 - 263 259 - 276 266 - 286 260 - 286 260 - 230 308 - 329 312 - 325 324 - 347</td> <td>(+) (-) (+) (+) (+) (+) (+) (+) (+) (+) (+) (+</td> <td>1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000</td> <td>0.901 0.845 0.894 0.995 0.996 0.996 0.996 0.996 0.996 0.996 0.933 0.934 0.722 0.765 0.946 0.772 0.765</td> <td>IggedATTT atgatcACGTectttt aaaggaaCGTGataat 11:03 & M I S Go Search grtAACGgo grtAACGgo grtAACGgo grtAACGgo graceATTga grgacetgTOTTbu cocAGTGTgtgtgat actgtgtcrGTTGagg cocAGCAccecgctaacagg gracetgtcrGTGTGagg taccetacacAGAagaatg taggCATArtgg taccetacacAGGTattagcc gtATTAag</td>	octamer factor 1 barbiturate-inducible element muscle-specific Mt binding site X-box-binding protein 1 AhR nuclear translocator homodimers earch Go Bookmarks Tasks Aide Matinspector professional: Re Matinspector professional: Re w-Myb Sox-5 Glucocordcoid response element Lentivinal Poly A downstream element o-Myb sec/vs tRNA sene transcription activating factor GRATA-binding factor 1 Barahyun homeo domain factor Nkx-2.5/Csx, timman homolog	44 - 58 70 - 78 94 - 110 95 - 110 :sult - Netsc 216 - 225 224 - 239 248 - 263 259 - 276 266 - 286 260 - 286 260 - 230 308 - 329 312 - 325 324 - 347	(+) (-) (+) (+) (+) (+) (+) (+) (+) (+) (+) (+	1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000	0.901 0.845 0.894 0.995 0.996 0.996 0.996 0.996 0.996 0.996 0.933 0.934 0.722 0.765 0.946 0.772 0.765	IggedATTT atgatcACGTectttt aaaggaaCGTGataat 11:03 & M I S Go Search grtAACGgo grtAACGgo grtAACGgo grtAACGgo graceATTga grgacetgTOTTbu cocAGTGTgtgtgat actgtgtcrGTTGagg cocAGCAccecgctaacagg gracetgtcrGTGTGagg taccetacacAGAagaatg taggCATArtgg taccetacacAGGTattagcc gtATTAag		
Y3EACRE/BARBIE 01 Y3HMTE/MTEP E Y3EDCOXXEPI 01 Y3EDCOXXEPI 01 Y3EDCOXXEPI 01 Y3EDCOXXENT 01 File Edit View S Y3YMYE/YMYE 02 Y3YMYE/YMYE 02 Y3SORY/SOX5 01 Y3CMFF/GRE C Y3LDPS/LDSPOLYA E Y3CMYE/CMYE 01 Y3STATISTATI 01 Y3XEGATA/GATA1 02 Y3EMYONKX25 02 Y3EMYONKX25 02	octment factor 1 barbiturate-inducible element muscle-specific Mt binding site X-box-binding protein 1 AhR nuclear translocator homodimers earch Go Bookmarks Tasks Aide Matinspector professional: Re • http://genomatix.gsf.de/mat_fam • PMyb Sox-5 GRuccorridord response element Lentwinal Poly A downstream element c-Myb Brachyary Boarbait gators 1 Brachyary homeo domain factor Nkx-2.5/C3x, timman homolog AREB6 (Atp1a1 regulatory element binding factor 6)	44 - 58 70 - 78 94 - 110 95 - 110 142 - 150 216 - 225 224 - 239 248 - 263 259 - 276 266 - 286 290 - 310 308 - 329 312 - 325 324 - 347 326 - 333 327 - 339	(+) (-) (-) (+) (+) (+) (+) (+) (+) (+) (+) (+) (+	1.000 1.0000 1.0000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000	0.901 0.845 0.894 0.995 0.996 0.996 0.996 0.996 0.996 0.933 0.934 0.720 0.772 0.765 0.746 0.946 0.946 0.946	IggetATTR atgateACGToctttt aaaggaCGTGateat 11:03 2 20 20 20 20 20 20 20 20 20 20 20 20 2		
Y\$BARb/BARB/E 01 Y\$HIMTE/MTEP E Y\$BEORX/ARNT 01 Y\$EDORX/ARNT 01 Y\$ENDY Y\$YMYE/YMYE 02 Y\$SORY/ROX5 01 Y\$CMYE/YMYE 02 Y\$CMYE/YMYE 02 Y\$CMYE/YMYE 02 Y\$CMYE/YMYE 01 Y\$CMYE/YMYE 01 Y\$CMYE/YAYE 01 Y\$CMYE/YAYE 01 Y\$SERF/YARE 01 Y\$SERF/YARE 01 Y\$SERF/YARE 01 Y\$SERF/YARE 01 Y\$SERF/YARE 01 Y\$SERF/YARE 02 Y\$ENDER/TAXCEED 02 Y\$CAREE/FAREF6 01 Y\$CAREE/FAREF6 01 Y\$CAREE/FAREFE 02	octment factor 1 barbitrante-inducible element muscle-specific Mt binding site X-box-binding protein 1 AhR nuclear translocator homodimers earch Go Bookmarks Tasks Aide MatInspector professional: Re MatInspector professional: Re Image: Specific Mt binding site Image: Specific Mt binding factor 1 Image: Specific Mt binding factor 6 Image: Specific M	44 - 58 70 - 78 94 - 110 95 - 110 95 - 110 142 - 150 216 - 225 224 - 239 248 - 263 259 - 276 266 - 286 290 - 310 308 - 329 312 - 325 324 - 347 326 - 339 327 - 339 368 - 382 299 - 310	(+) (-) (+) (+) (+) (+) (+) (+) (+) (+) (+) (+	1.000 1.	0.973 0.973 0.845 0.894 0.894 0.995 0.986 0.995 0.986 0.934 0.934 0.720 0.755 0.746 0.691 0.691 0.926 0.926 0.750	IggetATTR attackCGToctttt aaagaaCGTGattat 11:03 A aagaaCGTGattat I1:03 A aagaaCGTGattat I1:03 A aagaaCGTGattat IgaaCAACGgo IgaaCAACGGO IgaaCAACGGO IgaaCAACGGO IgaaCAACGGO IgaaCAACGGO IgaaCAACGGO IgaaCGACGACGACGGO IgaaCGACGACGO IgaaCGACGACGGO IgaaCGACGACGO IgaaCGACGACGO IgaaCGACGACGO IgaaCGACGACGO IgaaCGACGACGO IgaaCGACGACGGO IgaaCGACGACGACGGO IgaaCGACGACGO IgaaCGACGACGACGO Ig		
Y3EARE/EARDIE 01 Y3ENGRXEP1 01 Y3ERGRXEP1 02 Y3SORY/SOX5 01 Y3CORYSCONS 01 Y3CORYSCONSCONSCONSCONSCONSCONSCONSCONSCONSCON	octamer factor 1 barbitraste-inducible element muscle-specific Mt binding site &-box-binding protein 1 AhR nuclear translocator homodimers earch Go Bookmarks Tasks Aide MatInspector professional: Re MatInspector professional: Re > http://genomatix.gsf.de/mat_fam > "Myb Box-5 Ghecoorticoid response element Lentivinal Poly A downstream element c-Myb Becorrestrictive silencer factor signal transducer and activator of transcription 1 Be-Cya EDNA gene transcription setivating factor GATA-binding factor 1 Brechyony homeo domain factor Nix-2.5/Gsz, tuman homolog AREB6 (Ap1a1 regulatory element binding factor 6) Tax/GREB complex Brachyury Brachyury	44 - 58 70 - 78 94 - 110 95 - 110 95 - 110 142 - 150 142 - 150 216 - 225 224 - 239 248 - 263 259 - 276 266 - 286 290 - 310 308 - 329 312 - 325 324 - 339 368 - 382 327 - 339	(+) (+) (+) (+) (+) (+) (+) (+) (+) (+)	1.000 1.	0.970 0.970 0.845 0.894 0.994 0.995 0.986 0.995 0.986 0.900 0.933 0.934 0.722 0.765 0.946 0.972 0.765 0.946 0.994 0.933 0.722 0.756 0.948 0.956 0.756 0.956 0.956 0.956 0.756 0.956 0.956 0.956 0.756 0.956 0.956 0.756 0.956 0.956 0.956 0.756 0.956 0.956 0.956 0.956 0.756 0.956 0.956 0.956 0.956 0.756 0.956 0.956 0.956 0.956 0.956 0.756 0.956 0.956 0.956 0.956 0.956 0.956 0.956 0.756 0.956 0.756 0.	Iggetation and a set of the set o		
Y3EAARD/BARDIE 01 Y3HMTE/MTEF E Y3EBOX/ARNT 01 Y3EBOX/ARNT 01 Y3EBOX/ARNT 01 Y3EBOX/ARNT 01 Y3EBOX/ARNT 01 Y3EBOX/ARNT 01 Y3EBOX/ARNT 02 Y3YMYE/YMYE 02 Y3SORY/SOX5 01 Y3EDFXLSPOLYA B Y3ENFKIRSE 01 Y3STATISTATI 01 Y3ESECISTAF 01 Y3EBACKAGATAI 02 Y3EBACKBACH 01 Y3ERACKBACH 01 Y3CREFIAREE 01 Y3CREFIAREE 02 Y3ERACKBRACH 01 Y3EBACKBP 01 Y3EBACKBP 01 Y3EBACKBP 01 Y3EBACKBP 01 Y3EBACKBP 01 Y3EBACKBP 01	octamer factor 1 barbiturate-inducible element muscle-specific Mt binding site X-box-binding protein 1 AhR nuclear translocator homodimers earch Go Bookmarks Tasks Aide Matinspector professional: Re Matinspector professional: Re Image: Specific Mt binding site Image: Specific Mt binding factor 1 Image: Specific Mt binding factor 1 <td>44 - 58 70 - 78 94 - 110 95 - 110 95 - 110 142 - 150 216 - 225 224 - 239 248 - 263 259 - 276 266 - 286 290 - 310 308 - 329 312 - 325 324 - 347 326 - 333 327 - 339 368 - 382 371 - 394</td> <td>(+) (-) (-) (+) (+) (+) (+) (+) (+) (+) (+) (+) (+</td> <td>1.000 1.</td> <td>0.971 0.845 0.894 0.894 0.894 0.894 0.894 0.995 0.990 0.990 0.933 0.934 0.720 0.772 0.765 0.946 0.772 0.765 0.938 0.938 0.938 0.938 0.938 0.938</td> <td></td>	44 - 58 70 - 78 94 - 110 95 - 110 95 - 110 142 - 150 216 - 225 224 - 239 248 - 263 259 - 276 266 - 286 290 - 310 308 - 329 312 - 325 324 - 347 326 - 333 327 - 339 368 - 382 371 - 394	(+) (-) (-) (+) (+) (+) (+) (+) (+) (+) (+) (+) (+	1.000 1.	0.971 0.845 0.894 0.894 0.894 0.894 0.894 0.995 0.990 0.990 0.933 0.934 0.720 0.772 0.765 0.946 0.772 0.765 0.938 0.938 0.938 0.938 0.938 0.938			
Y§BARB/BARBIE 01 Y§HMTE/MTEF B Y§HMTE/MTEF B Y§BEORX/ARNT 01 Y§EDOX/ARNT 01 Y§YMYB/YMYB 02 Y§COXFORE C Y§LDPS/LDSPOLYA B Y§CMYB/CMYB 01 Y§STATSTATI 01 Y§ERAC/BRACH 01 Y§ERAC/BRACH 01 Y§ERAC/BRACH 01 Y§ERAFB/AREACH 01 Y§CRYF/CDX2 E	octamer factor 1 barbiturate-inducible element muscle-specific Mt binding site X-box-binding protein 1 AhR nuclear translocator homodimers earch Go Bookmarks Tasks Aide Matinspector professional: Re Matinspector professional: Re w-Myb Sox-5 Glucocordcoid response element Lentivinal Poly A downstream element c-Myb Bachya Bachya <	44 - 58 70 - 78 94 - 110 95 - 110 142 - 150 216 - 225 224 - 239 248 - 263 259 - 276 266 - 286 290 - 310 308 - 329 312 - 325 324 - 347 326 - 333 327 - 339 368 - 382 371 - 394 379 - 390	(*) (*) (*) (*) (*) (*) (*) (*) (*) (*)	1.000 1.	0.901 0.845 0.894 0.995 0.996 0.996 0.996 0.996 0.996 0.996 0.933 0.934 0.720 0.772 0.765 0.946 0.975 0.966 0.975 0.966 0.975 0.966 0.975 0.966 0.972 0.772 0.765 0.966 0.975 0.966 0.972 0.966 0.972 0.966 0.972 0.966 0.972 0.966 0.972 0.972 0.966 0.972 0.972 0.972 0.972 0.972 0.972 0.972 0.972 0.975 0.972 0.975 0.976 0.975 0.976 0.977 0.9776			
Y\$BARB/BARBIE 01 Y\$HMTE/MTEP E Y\$BEORXXEPI 01 Y\$EDORXXEPI 01 Y\$EDORXXEPI 01 Y\$EDORXXEPI 01 Y\$EDORXXEPI 01 Y\$EDORXXEPI 01 Y\$EDORXXEPI 02 Y\$VMYE/VMYE 02 Y\$ORPERGRE C Y\$LDPS/LDSPOLYA E Y\$CORFERGRE C Y\$LDPS/LDSPOLYA E Y\$CORFERSE 01 Y\$XECENTAF 01 Y\$XECENTAF 01 Y\$XECENTAF 01 Y\$XECENTAF 01 Y\$XECENTAF 01 Y\$XERCENTAF 01 Y\$XERCENTAF 01 Y\$XEREFARECH 01 Y\$ERACKBACH 01 Y\$ERACKBACHACH 01 Y\$ERACKBACHACH 01	octment factor 1 barbiturate-inducible element muscle-specific Mt binding site X-box-binding protein 1 AhR nuclear translocator homodimers earch Go Bookmarks Tasks Aide Matinspector professional: Re Matinspector professional: Re • http://genomatix.gsf.de/mat_fam • PMyb Sox-5 Glucocorticoid response element Lentwinal Poly A downstream element c-Myb Brachyany Brachyany Brachyany B4BE6 (Atp1a1 regulatory element binding factor 6) Task/CREB complex Brachyany B4BP4 PAR-type chicken viellogenin promoter-binding protein. CA: 2 mammalian caudal related intestinal transcr. factor Barbiturate-ind worke element	44 - 58 70 - 78 94 - 110 95 - 110 142 - 150 216 - 225 224 - 239 248 - 263 259 - 276 266 - 286 290 - 310 308 - 329 312 - 325 324 - 347 326 - 339 368 - 382 327 - 339 368 - 382 371 - 394 379 - 390 380 - 389 427 - 441	(+) (-) (-) (+) (+) (+) (+) (+) (+) (+) (+) (+) (+	1.000 1.	0.901 0.845 0.894 0.995 0.996 0.996 0.996 0.996 0.996 0.933 0.934 0.720 0.772 0.765 0.946 0.933 0.720 0.775 0.946 0.926 0.926 0.590 0.888 0.926 0.590 0.881 0.591 0.889	IggetATTR atgateACGToctttt anaggaaCGTGateat 11:03 A anaggaaCGTGateat I1:03 A anaggaaCGTGateat I1:03 A anaggaaCGTGateat IgaaCAACge IgaaCAACge IgaaCAATga IggaacgatCTGAcge IgaaCGATGATGage IggaaggataCGGCAgaatag InagCGCAGAtacctageta InaggGATACtggg InagCCAGAtacctageta InaggGATACtggg ItatAACGTgggt ItatAACGTgggt ItatACCTgggt		
Ysbarb/ARB/E 01 YshMTE/MTBP E YsbeorxXep1 01 YsyMYE/YMYE 02 YssorY/SOX5 01 YscorY/SOX5 02 YscorY/SO2 02 YscorY/SOX7 02 YscorY/SOX7 01 YscorY/SOX7 01 YscorY/SOX6 01 YscorY/SOX7 02 YscorY/SOX7 02 YscorY/SOX7 01 YscorY/SOX7 01 YscorY/SOX7 01 YscorY/SOX7 01 YscorY/SOX7 02	octamer factor 1 barbitraste-inducible element muscle-specific Mt binding site X-box-binding protein 1 AhR nuclear translocator homodimers earch Go Bookmarks Tasks Aide Barbitraste-inducible element MatInspector professional: Ref Y-Myb Box-5 GRaccorticoid response element Lentivital Poly A downstream element c-Myb Box-5 GRaccorticoid response element Lentivital Poly A downstream element c-Myb Beacortexture stelement restrictive silencer factor signal transducer and activator of transcription 1 Be-Cya GNA excent transcription activating factor GATA-binding factor 1 Brachyary homeo domain factor Nkx-2.5/C3x, timan homolog AFEB6 (Ap1al regulatory element binding factor 6) Tax/CREB complex Brachyary BeAP4 PAR-type chicken vitellogenin promoter-binding protein CA-2 mammalian caudal related intestinal transcr. factor barbitrate-inducible element MyTi zine finger transcription factor involved in primary neurogenesis	44 - 58 70 - 78 94 - 110 95 - 110 95 - 110 142 - 150 216 - 225 224 - 239 248 - 263 259 - 276 266 - 286 290 - 310 308 - 329 312 - 325 324 - 347 326 - 333 327 - 339 368 - 382 371 - 394 379 - 390 380 - 389 427 - 441 429 - 439	(+) (-) (-) (+) (+) (+) (+) (+) (+) (+) (+) (+) (+	1.000 1.	0.995 0.901 0.845 0.995 0.986 0.996 0.996 0.996 0.993 0.934 0.720 0.755 0.946 0.691 0.750 0.926 0.750 0.691 0.691 0.691 0.681 0.919 0.881	IggetATTR avgatzACGToctttt avgatzACGToctttt avgatzACGToctttt II:03 & M II: getAACGge getAACGge getAACGge getaCAATga getaccatTGTTCtc ocaGTATgg ttgatc actg tgcoCATGageg taagCACAgtatoccttgeta taagCGATGageg attgatcatggg attgatcatggg attgatcatggg attgatcatggg attgatcatggg attgatcatggg attgatcatggg attgatcatggg attgatcatggg attgatcatggg attgatcatggg attgatcatggg attgatcatggg attgatcatggg attgatcatggg attgatcatggg attgatcatggg attgatcatggg attgAtAca gettgTGCGccat gettTAAca gettgTGCGccat gettTACGtgggt attgAtCAggg btaAACGgggg attAAACGggg btaAACGgggg btaAACGgggg btaAACGggg btaAACGggg btaAACGggg btaAACGggg btaAACGggg btaAACGggg btaAACGggg		
YSBARB/BARBIE 01 YSHNTE/MTBP E YSEDORXARDI 01 YSEDORXARDI 01 YSEDORXARDI 01 YSEDORXARDI 01 YSEDORXARDI 01 YSEDORXARDI 01 YSEDORXARDI 02 YSARDI 01 YSARDI 01 YSARDI 01 YSARDI 01 YSARDI 01 YSECREPICENZE 01 YSEDAC/BRACH 01 YSECREPICENZE 01 YSEDAC/FOX2 B YSEARE/BAREIE 01 YSERAR/BAREIE 01 YSERE/YE 01 YSERE/YE 01	octamer factor 1 barbiturate-inducible element muxcle-specific Mt binding site &-box-binding protein 1 AhR nuclear translocator homodimers earch Go Bookmarks Tasks Aide Matinspector professional: Re whtp://genomatix.gsf.de/mat_fam 'p-Myb Sox-5 Ghecorticoid response element Lentiviral Poly A downstream element c-Myb neuro-restrictive silencer factor signal transducer and activator of transcription 1 Be-Cys GNA gene transcription activating factor GATA-binding factor 1 Brachyay Brachyay Bab P4 PAR-type chicken vitellogenin promoter-binding protein. Cdx-2 mammalian caudal related intestinal transcr. factor Barburue-inducible element MyT1 zine finger transcription factor R	44 - 58 70 - 78 94 - 110 95 - 110 95 - 110 95 - 110 95 - 110 95 - 110 95 - 110 95 - 110 95 - 110 95 - 110 95 - 110 95 - 110 95 - 110 95 - 110 95 - 110 216 - 225 224 - 239 248 - 263 259 - 276 266 - 286 290 - 310 308 - 329 368 - 382 371 - 394 380 - 389 421 - 439 422 - 439 422 - 439 423 - 445 425 - 435	(+) (-) (-) (-) (-) (-) (-) (-) (-) (-) (-	1.000 1.	0.973 0.901 0.845 0.894 0.894 0.995 0.986 0.990 0.933 0.720 0.772 0.775 0.946 0.720 0.772 0.775 0.946 0.939 0.969 0.969 0.969 0.959 0.959 0.959 0.959 0.959 0.959 0.959 0.959 0.959 0.959 0.959 0.959 0.959 0.959 0.959 0.954 0.954 0.772 0.775 0.945 0.954 0.772 0.775 0.945 0.954 0.772 0.775 0.945 0.775 0.945 0.775 0.954 0.775 0.954 0.775 0.954 0.775 0.954 0.775 0.954 0.775 0.954 0.775 0.955 0.955 0.775 0.955 0.956 0.775 0.956 0.775 0.956 0.775 0.956 0.775 0.956 0.775 0.956 0.775 0.956 0.775 0.956 0.755 0.956 0.956 0.755 0.956 0.755 0.956 0.956 0.950 0.956 0.957 0.956 0.957 0.957 0.957 0.957 0.957 0.957 0.957 0.957 0.957 0.9570 0.9570 0.9570 0.95700 0.95700 0.95700000000000000000000000000000000000	IggeCATTRT avgatcACGToctttt avgatcACGToctttt avgatcACGToctttt II:03 AvgatcACGToctttt getacCatTgat (getacCatTgat (getacCatTgat) (getacCatTgat) (getacCatTgat) actggtgccGTTGAgeg (getacCatTGAgeg) actggtgcCGTGTGAgeg) (getacCatTGAgeg) (getacCatTGAgeg) (getacCatTgattgat) tasgGCATACggs (getacCatTgattgat) (getaCCATggtt actggtgTGCGCcat (getTTAAg (getTgTGCGccat (getTTAag) (getACGTggtt) actggtgTGCGccat (getTTAag) (getACGTggtt) actggtGCGCatTgattgag) (getACGTggtt) actggtGCGCatTgattgag) (getACGTggtt) actggtGCGCatTgattgag) (getACGTggtt) actggtGCGCat (getATTAag) (getACGTggtt) actggtGCGGcat (getACGTggtt) actggtGCGGcat (getACGTggtt) actggtGCGGCat (getACGTggtt) actggtGCGGCCA (getACGTggtt) (getACGTggtt) actggtGCGGCCA (getACGTGTGggt) (getACGTGGCCA (getACGTGTGGCCA (getACGTGGCCA (getACGTGGCCA (getACGTGTGGCCA (getACGTGGCCA (getACGTGGCCA (getACGTGTGGCCA (getACGTGGCCA (getACGGCCA (getACGGCA (ge		
Y\$BARB/BARB/E 01 Y\$HMTE/MTEF E Y\$HMTE/MTEF E Y\$ED OXXARNT 01 Y\$EN OXX5 01 Y\$CONFISOX5 01 Y\$LDPSILDSPOLYA B Y\$LDPSILDSPOLYA B Y\$LDPSILDSPOLYA B Y\$LDPSILDSPOLYA B Y\$LDPSILDSPOLYA B Y\$LDPSILASCATA1 01 Y\$STATTSTAT1 01 Y\$EBAC/FATAGATA1 02 Y\$EBAC/FACH 01 Y\$CCREP/FACCH 01 Y\$CCREP/FACCL 01 Y\$RATYTEACCER 02 Y\$RATYTEACER 04 Y\$RATYTEACER 04 Y\$RATYTEACER 04 Y\$RATYTEACER 04 Y\$RATYTEACER 04 Y\$RATYTEACER 04 Y\$RATYTEACER Y\$RATYTEACER	octamer factor 1 barbiturate-inducible element muscle-specific Mt binding site X-box-binding protein 1 AhR nuclear translocator homodimers earch Go Bookmarks Tasks Aide Matinspector professional: Re Matinspector professional: Re Image: Specific Mt binding site	44 - 58 70 - 78 94 - 110 95 - 110 95 - 110 91 - 10 95 - 110 95 - 110 95 - 110 95 - 110 95 - 110 95 - 110 95 - 110 95 - 110 95 - 110 216 - 225 224 - 239 248 - 263 290 - 310 308 - 329 312 - 325 324 - 347 326 - 333 366 - 332 371 - 394 379 - 390 421 - 439 427 - 441 429 - 439 426 - 456 445 - 476	(+) (-) (-) (-) (-) (-) (-) (-) (-) (-) (-	1.000 1.	0.991 0.991 0.845 0.894 0.894 0.995 0.996 0.996 0.996 0.996 0.933 0.934 0.720 0.772 0.765 0.946 0.933 0.772 0.765 0.946 0.998 0.999 0.998 0.998 0.998 0.999 0.998 0.998 0.998 0.999 0.998 0.999 0.998 0.999 0.998 0.998 0.999 0.998 0.999 0.998 0.998 0.999 0.998 0.999 0.998 0.9990 0.9990 0.9990 0.99900000000	IggeCATTIT atgatcACGToctttt aaaggaCGTGataat 11:03 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2		
Y\$EARB/BARBIE 01 Y\$HMTE/MTEP E Y\$EDORXAPPI 01 Y\$EDORXAPPI 01 Y\$EDORXAPPI 01 Y\$EDORXAPPI 01 Y\$EDORXAPPI 01 Y\$YMYE/YMYE 02 Y\$ORYISOX5 01 Y\$OREFIGE C Y\$DEDORXAPPI 01 Y\$CMYE/CMYE 01 Y\$CMYE/CMYE 01 Y\$CMYE/CMYE 01 Y\$CARACHARSF 01 Y\$STATISTATI 01 Y\$CREE/TARCH 01 Y\$ERAC/BRACH 01 Y\$ERAC/BRACH 01 Y\$CREE/FARED 02 Y\$ERAC/BRACH 01 Y\$CREE/FARED 02 Y\$ERAC/BRACH 01 Y\$ERAF/BARED 01 Y\$ERAF/BARED 01 Y\$ERAF/BARED 01 Y\$ERAF/BARED 01 Y\$ERAF/FARED 01 Y\$ERAF/FAR	octamer factor 1 barbiturate-inducible element muscle-specific Mt binding site X-box-binding protein 1 AhR nuclear translocator homodimers earch Go Bookmarks Tasks Aide Matinspector professional: Re Matinspector professional: Re w-Myb Sox-5 Glucocordcoid response element Lentivinal Poly A downstream element c-Myb Bachya Bachya <	44 - 58 70 - 78 94 - 110 95 - 110 142 - 150 142 - 150 216 - 225 224 - 239 248 - 263 259 - 276 266 - 286 290 - 310 308 - 329 312 - 325 312 - 325 312 - 325 312 - 325 312 - 325 312 - 333 327 - 339 366 - 382 371 - 394 379 - 390 380 - 389 421 - 439 427 - 441 429 - 439	(+) (-) (-) (-) (+) (-)	1.000 1.	0.970 0.970 0.845 0.995 0.995 0.996 0.996 0.996 0.996 0.933 0.934 0.722 0.765 0.946 0.972 0.765 0.946 0.975 0.966 0.969 0.966 0.9681 0.989 0.861 0.969 0.861 0.969 0.861 0.962 0.965 0.975 0.965 0.975 0.965 0.975 0.965 0.975 0.965 0.975 0.965 0.975 0.975 0.965 0.975 0.965 0.975 0.975 0.965 0.975 0	IggetATTR atgateACGToctttt aaagaaCGTGateat 11:03 2 20 20 20 20 20 20 20 20 20 20 20 20 2		
Y358AR6/BAR6/E 01 Y3HMTE/MTBP E Y3EDORXEPI 01 Y4EDOXXEPI 01 Y4EDOXXEPI 01 Y4EDOXXEPI 01 Y4EDOXXEPI 01 Y4EDOXXEPI 01 Y4EDOXXEPI 02 Y4YMYE/YMYE 02 Y4ORF/GRE C Y4CORF/GRE C Y4CORF/CRE 01 Y4STATISTATI 01 Y4SCR2/STAF 01 Y4SCR2/STAF 01 Y4ERAC/BRACH 01	octment factor 1 barbiturate-inducible element muscle-specific Mt binding site X-box-binding protein 1 AhR nuclear translocator homodimers earch Go Bookmarks Tasks Aide Matinspector professional: Re Matinspector professional: Re w-Myb Soz-5 Glacocorticoid response element Lentivial Poly A downstream element c-Myb Be-Cyst BNA sene transcription activating factor GATA-binding factor 1 Brachyary Bate of domain factor Nkx-2.5/Csx, timman homolog AREB6 (Atpla1 regulatory element binding factor 6) Tax/CREB complex Brachyary B4EP4 PAR-type chicken vitellogenin promoter-binding protein. CA:-2 mammalian caudal related intestinal transcr. factor Barbiturate-inducible element MyT1 zinc finger transcription factor R Epstein-Bart virus transcription factor R Exercise 2 Se-Cyst RNA gene transcription activating factor Barbiturate-inducible element MyT1 zinc finger transcription factor R Epstein-Bart virus transcription factor R Exercise 2 <t< td=""><td>44 - 58 70 - 78 94 - 110 95 - 110 95 - 110 142 - 150 142 - 150 216 - 225 224 - 239 248 - 263 259 - 276 266 - 286 266 - 286 260 - 310 308 - 329 312 - 325 324 - 347 302 - 339 362 - 339 362 - 339 362 - 339 362 - 339 362 - 339 363 - 389 379 - 390 380 - 389 427 - 441 429 - 439 426 - 447 465 - 476</td><td>(*) (*) (*) (*) (*) (*) (*) (*) (*) (*)</td><td>1.000 1.</td><td>0.901 0.845 0.894 0.894 0.995 0.996 0.996 0.996 0.996 0.996 0.933 0.934 0.720 0.772 0.765 0.946 0.933 0.934 0.720 0.772 0.765 0.946 0.938 0.926 0.750 0.861 0.889 0.886 0.889 0.886 0.889 0.886 0.889 0.886 0.889 0.886 0.861 0.926</td><td>IggetATTR avgateACGToctttt avgateACGToctttt avgateACGToctttt avgateACGToctttt avgateACGToctttt avgateACGTocttt getACACGgo getACACGgo getACACGgo getACACGgo getACGTGTTCtc cocAGTGTgtgttgatc avgetgetATGCGage getacgateACGGAgatag bagCCCAGtatocttagea avgetgetATGCGage getATTAag gettgttaotAGGTgtgttogc getTTAAg gettgttaotAGGTgtgttogc avgetgtTGGCcat gettgttaotAGGTgtgttogc avgetgtGGGCat gettgttaotAGGTgtgttogc avgetgtGGGCat gettgttaotAGGTgtgttogc avgetgtGGGCat gettgttaotAGGTgtgttogc avgetgtGGGCat gettgttaotAGGTgtgttogc avgetgtGGGCat gettGGAAAC gettGGAAACtggac baAAGTgga gettGCCAagtgctggt gettGGGAtaa gettCCCAagtgctggatt cocAGCActtggaagcoga</td></t<>	44 - 58 70 - 78 94 - 110 95 - 110 95 - 110 142 - 150 142 - 150 216 - 225 224 - 239 248 - 263 259 - 276 266 - 286 266 - 286 260 - 310 308 - 329 312 - 325 324 - 347 302 - 339 362 - 339 362 - 339 362 - 339 362 - 339 362 - 339 363 - 389 379 - 390 380 - 389 427 - 441 429 - 439 426 - 447 465 - 476	(*) (*) (*) (*) (*) (*) (*) (*) (*) (*)	1.000 1.	0.901 0.845 0.894 0.894 0.995 0.996 0.996 0.996 0.996 0.996 0.933 0.934 0.720 0.772 0.765 0.946 0.933 0.934 0.720 0.772 0.765 0.946 0.938 0.926 0.750 0.861 0.889 0.886 0.889 0.886 0.889 0.886 0.889 0.886 0.889 0.886 0.861 0.926	IggetATTR avgateACGToctttt avgateACGToctttt avgateACGToctttt avgateACGToctttt avgateACGToctttt avgateACGTocttt getACACGgo getACACGgo getACACGgo getACACGgo getACGTGTTCtc cocAGTGTgtgttgatc avgetgetATGCGage getacgateACGGAgatag bagCCCAGtatocttagea avgetgetATGCGage getATTAag gettgttaotAGGTgtgttogc getTTAAg gettgttaotAGGTgtgttogc avgetgtTGGCcat gettgttaotAGGTgtgttogc avgetgtGGGCat gettgttaotAGGTgtgttogc avgetgtGGGCat gettgttaotAGGTgtgttogc avgetgtGGGCat gettgttaotAGGTgtgttogc avgetgtGGGCat gettgttaotAGGTgtgttogc avgetgtGGGCat gettGGAAAC gettGGAAACtggac baAAGTgga gettGCCAagtgctggt gettGGGAtaa gettCCCAagtgctggatt cocAGCActtggaagcoga		
Ysbarb/ARB/E 01 YshMTE/MTBP E YsbeorxXep1 01 YsbeorxXep1 02 YsorY/Sox5 01 Yssec/Fract 01 Yssec/Fract/Bract 01 YsorYsorY/Sox7 20 YsberPrybe 01 YsorYsorYsory 01 YsberPrybe 01	octamer factor 1 barbitraste-inducible element muscle-specific Mt binding site X-box-binding protein 1 AhR nuclear translocator homodimers earch Go Bookmarks Tasks Aide Matinspector professional: Re Matinspector professional: Re Y-Myb Box-5 Ghecocritical response element Lentivinal Poly A downstream element c-Myb Box-5 Ghecocritical response element Lentivinal Poly A downstream element c-Myb Bewon-restrictive silencer factor signal transducer and activator of transcription 1 Be-Cya tRNA gene transcription sativating factor GATA-binding factor 1 Drac/GEB complex Brachyary homeo domain factor Nix-2.5/C3x, timman homolog AREB6 (Ap1a1 regulatory element binding factor 6) Tax/CREB complex Brachyary BaB P4 PAR-type chicken vitellogenin promoter-binding protein. C4-2 mammalian caudal related insettinal transcr. factor barbitruate-inducible element MyT1 zine finger transcription factor R Placers 2	44 - 58 70 - 78 94 - 110 95 - 110 95 - 110 sult - Netsc 142 - 150 216 - 225 224 - 239 248 - 263 259 - 276 266 - 286 290 - 310 312 - 325 324 - 347 326 - 333 368 - 382 371 - 339 368 - 382 371 - 339 427 - 441 429 - 439 436 - 456 465 - 476 467 - 487 470 - 490 477 - 488 500 - 513	(*) (*) (*) (*) (*) (*) (*) (*) (*) (*)	1.000 1.	0.973 0.901 0.845 0.894 0.894 0.894 0.894 0.995 0.986 0.900 0.933 0.933 0.934 0.720 0.765 0.765 0.946 0.920 0.772 0.765 0.946 0.938 0.926 0.950 0.947 0.898 0.950 0.891 0.950 0.891 0.950 0.895 0.926 0.934 0.926 0.934 0.926 0.934 0.926 0.934 0.926 0.934 0.926 0.934 0.926 0.934 0.935 0.934 0.934 0.935 0.934 0.934 0.935 0.934 0.935 0.934 0.935 0.934 0.935 0.934 0.935 0.934 0.935 0.934 0.935 0.934 0.935 0.934 0.935 0.934 0.935 0.944 0.947 0.847 0.944 0.944 0.947 0.847 0.944 0.944 0.944 0.947 0.944 0.947 0.944 0.947 0.944 0.947 0.944 0.947 0.944 0.947 0.944 0.947 0.944 0.947 0.944 0.947 0.944 0.947 0.944 0.947 0.944 0.947 0.944 0.947 0.944 0.947 0.944 0.945 0.947 0.944 0.945 0.947 0.944 0.945 0.947 0.944 0.945 0.947 0.944 0.945 0.947 0.944 0.945 0.941 0.945	IggetATTR avgatzACGToctttt avgatzACGToctttt avgatzACGToctttt avgatzACGToctttt avgatzACGToctttt II:03 & & II:03 & & II:03 & & II:03 & & II:03 & & II:03 & & II:03 & & II:03 & & II:03 & & II:03 & & II:03 & & II:03 & & II:03 & & II:03 & & II:03 & & I		
Y\$EARD/BARDIE 01 Y\$HMTE/MTEF E Y\$HO CRXXEPI 01 Y\$EE CRXXEPI 02 Y\$END CRXXEPI 02 Y\$CRYECT 04 Y\$CREFARE 02 Y\$CREFARE 01 Y\$CREFARE 02 Y\$CREFARE 01 Y\$CREFARE 02 Y\$CREFARE 01 Y\$CREFARE 01 Y\$CREFARE 01 Y\$CREFARE 01 Y\$CREFARE 01 Y\$REE VIR 01 Y\$REE VIR 01 Y\$REE VIR 01 Y\$REE VIR 01	octamer factor 1 barbiturate-inducible element muxcle-specific Mt binding site &-box-binding protein 1 AhR auclear translocator homodimers earch Go Bookmarks Tasks Aide Matinspector professional: Re Matinspector professional: Re Image: Specific Mt binding site	44 - 58 70 - 78 94 - 110 95 - 110 95 - 110 95 - 110 95 - 110 95 - 110 95 - 110 95 - 110 95 - 110 95 - 110 95 - 110 95 - 110 95 - 110 95 - 110 95 - 110 216 - 225 224 - 239 248 - 263 259 - 276 308 - 329 308 - 320 308 - 329 368 - 382 371 - 394 379 - 390 429 - 439 427 - 441 429 - 439 436 - 456 465 - 476 470 - 490 477 - 488 526 - 546	(+) (+) (+) (+) (+) (+) (+) (+) (+) (+)	1.000 1.	0.970 0.970 0.845 0.994 0.995 0.995 0.996 0.996 0.990 0.933 0.934 0.722 0.765 0.966 0.772 0.765 0.969 0.699 0.898 0.926 0.691 0.898 0.926 0.898 0.926 0.898 0.926 0.898 0.926 0.898 0.926 0.898 0.926 0.898 0.926 0.898 0.926 0.898 0.926 0.938 0.926 0.938 0.926 0.938 0.926 0.938 0.926 0.938 0.926 0.938 0.926 0.938 0.926 0.938 0.926 0.969 0.989 0.986 0.989 0.986 0.	IggeCATTIT avgatcACGToctttt avgatcACGToctttt avgatcACGToctttt avgatcACGToctttt avgatcACGToctttt getACGTGTGT getAACGgo getAACGgo getAACGgo getAACGgo getaCGTGTCTc getaCGTGTGTege getaCGTGTGAgeg getaCGCAGCGgttacctage actg getaCGCAGAAsattg avgg getaCCAGGAAsattg avgg getaCCAGGAAsattg getaCCAGTgg geta acctaGTAAca gg gTTACGGcat acctaGTAAca gg gTTACGgg geta baAACGTgg getag avgatGGAAttac getaCGCAg getaggat baAACGTgg avg getaggat cocAGCAg getaggat cocAGCActtgg getaC acctaGGAAttac getaCCCAg getaC acctaGGAAttac getaCCCAg getaC acctaGGAAttac acctaGCACttgg getaC acctaGCACttgg getaC acctaGCACttg		
YSBARD/BARDIE 01 YSHMTE/MTEF E YSHEORXARDF 01 YSEDORXARNT 01 FILE Edit View S YSUMYE/YMYE 02 YSORY/SOX5 01 YSCORY/SOX5 02 YSEBOR/CRACH 01	octamer factor 1 barbiturate-inducible element muscle-specific Mt binding site X-box-binding protein 1 AhR nuclear translocator homodimers earch Go Bookmarks Tasks Aide Matinspector professional: Re Matinspector professional: Re w Myb Sox-5 Glucocorticoid response element Lentiviral Poly A downstream element c-Myb Bachyour Glucocorticoid response element Lentiviral Poly A downstream element c-Myb Bachyour Bachyour Bachyour Bachyour Bachyour Brachyour	44 - 58 70 - 78 94 - 110 95 - 110 sult - Netsc 142 - 150 216 - 225 224 - 239 248 - 263 259 - 276 266 - 286 308 - 329 312 - 325 324 - 347 326 - 333 327 - 339 68 - 382 371 - 394 379 - 390 808 - 382 421 - 439 422 - 434 429 - 439 427 - 441 429 - 439 456 - 476 465 - 476 467 - 487 470 - 490 477 - 488 526 - 546 542 - 550	(+) (-) (-) (-) (+) (-)	1.000 1.	0.991 0.991 0.845 0.894 0.894 0.995 0.986 0.900 0.933 0.934 0.720 0.772 0.765 0.946 0.933 0.772 0.765 0.946 0.898 0.956 0.959 0.898 0.956 0.959 0.881 0.947 0.889 0.881 0.960 0.960 0.975 0.986 0.975 0.986 0.975 0.986 0.975 0.986 0.975 0.986 0.972 0.772 0.765 0.986 0.975 0.986 0.975 0.986 0.975 0.986 0.975 0.986 0.975 0.975 0.986 0.975 0.986 0.975 0.986 0.975 0.975 0.986 0.975 0.975 0.986 0.975 0.975 0.976 0.975 0.975 0.976 0.975 0.975 0.976 0.975 0.976 0.975 0.976 0.975 0.976 0.975 0.976 0.975 0.976 0.975 0.976 0.975 0.976 0.975 0.976 0.975 0.976 0.975 0.976 0.975 0.976 0.975 0.975 0.976 0.975 0.976 0.975 0.976 0.977 0.989 0.986 0.9777 0.986 0.975 0.9777 0.986 0.975 0.9777 0.986 0.9750 0.9777 0.986 0.9777 0.986 0.9777 0.9777 0.9777 0.9777 0.9777 0.9777 0.9777 0.9777 0.9777 0.97777 0.97777 0.97777777777	IggeCATTR atgatcACGToctttt anaggaGGTGatat 11:03 A gata Go Search I Go C graAAGGgo IgatACGTo IgatACGgo IgatCATga IggeCocgTOTTCb IggeCocgCocgTOTCb IggeCocgCocg IgTTACAB IggeCocgCocgCOTCb IggeCocgCocgCOTCb IggeCocgCocgCOTCb IggeCocgCocgCOTCb IggeCocgCocgCOTCb IggeCocgCocgCOTCb IggeCocgCocgCOTCb IggeCocgCocgCOTCb IggeCocgCocgCOTCb IggeCocgCocgCO IGGCCABI IggeCocgCocgCO IGGCACTbggIgat IggeCocgCocgCO IGGCAGCCOCABI IggeCTTCb IggeCocgCocgCO IGGCAGCOCABI IggeCOCCABI IggeCocgCocgCO IGGCAGCOCABI IggeCOCCABI IggeCOCCABI IggeCocgCocgCO IGGCAGCOCABI IggeCOCCABI Igge		
Y\$BARB/BARB/E 01 Y\$HMTE/MTEP E Y\$BEORXAPPI 01 Y\$EDORXAPPI 01 Y\$EDORXAPPI 01 Y\$EDORXAPPI 01 Y\$EDORXAPPI 01 Y\$YMYE/YMYE 02 Y\$ONYE/YMYE 02 Y\$ONYE/CMYE 01 Y\$CREF/GRE C Y\$LDPS/LDSPOLYA B Y\$CMYE/CMYE 01 Y\$STATISTATI 01 Y\$STATISTATI 01 Y\$SCRY/ROXCES 02 Y\$ERAC/BRACH 01 Y\$SCRY/ROXCES 02 Y\$ERAC/BRACH 01 Y\$CREP/E4BP4 01 Y\$EREV/R 01 Y\$REP/TAP Y\$REP/TAP <td>octamer factor 1 barbiturate-inducible element muscle-specific Mt binding site X-box-binding protein 1 AhR nuclear translocator homodimers earch Go Bookmarks Tasks Aide Matinspector professional: Re Matinspector professional: Re w-Myb Sox-5 Glacocordicoid response element Lentivinal Poly A downstream element c-Myb Bachyber Bachyber GATA-binding factor 1 Bachyber Joac Cather in Society GATA-binding factor 1 Bachyber Joac Cather in Society Brachyber Joac Cather in Society Joac Cather in Society Brachyber Joac Cather in Society Brachyber Joac Cather in Society Brachyber Brachyber</td> <td>44 - 58 70 - 78 94 - 110 95 - 110 95 - 110 142 - 150 142 - 150 142 - 150 216 - 225 224 - 239 248 - 263 259 - 276 266 - 286 308 - 329 312 - 325 327 - 339 368 - 382 371 - 394 379 - 390 300 - 389 427 - 441 429 - 439 465 - 476 477 - 488 500 - 513 526 - 526 520 - 513</td> <td>(+) (-) (-) (-) (+) (-)</td> <td>1.000 1.</td> <td>0.970 0.970 0.845 0.995 0.995 0.996 0.996 0.906 0.903 0.933 0.934 0.722 0.765 0.946 0.972 0.765 0.966 0.969 0.861 0.956 0.861 0.956 0.861 0.960 0.845 0.966 0.861 0.966 0.845 0.966 0.861 0.966 0.865 0.970 0.865 0.970 0.865 0.970 0.865 0.970 0.865 0.970 0.865 0.970 0.865 0.970 0.865 0.970 0.865 0.970 0.865 0.970 0.865 0.970 0.865 0.970 0.865 0.966 0.865 0.966 0.865 0.970 0.865 0.970 0.865 0.970 0.865 0.970 0.865 0.966 0.865 0.970 0.865 0.970 0.865 0.970 0.865 0.966 0.865 0.970 0.865 0.970 0.865 0.970 0.865 0.966 0.986 0.986 0.986 0.986 0.986 0.986 0.986 0.986 0.986 0.986 0.986 0.986 0.986 0.986 0.986 0.986 0.986 0.986 0.986 0.970 0.845 0.970 0.885 0.970 0.</td> <td>IggetATTR atgateACGToctttt aaaggaCGTGateat II:03 A aaggaCGTGateat II:03 A aaggaCGTGateat II:03 A aaggaCGTGateat IgaaCAACGgo IgraACACGgo IgraACACGgo IgraACATga IgraACGTGTGTTrtc OceAGTGTGTgtgtgac OceAGCACaccgcteaacagg IggaggtaceaGGAAgaatag baaCCCACAcccgcteaacagg IggaggtaceaGGAAgaatag baaCCCACAtacctagcta baaCCGCActacctgcta baaCGCACAtacctagcta ItatAACCTgggt ItatAACGTgggt ItatAACGTgggt ItatAACGTgggt IgaaGGATAAca IgTTACatagg ItatAACGTgggt ItatAACGTgggt ItatAACGTgggt ItatAACGTgggt ItatAACGTgggt ItatAACGTgggt ItatAACGTgggt ItatAACGTgggt ItatAACGTgggt ItatAACGTgggt ItatAACGTgggt ItatAACGTgggt ItatAACGTgggt ItatAACGTggggt ItatAACGTgggt ItatAACGTgggt ItatAACGTggggt ItatAACGTggggt ItatAACGTggggt ItatAACGTggggt ItatAACGTggggt ItatAACGTgggggt ItatAACGTgggggt ItatAACGTgggggt ItatAACGTgggggt ItatAACGTgggggt ItatAACGTgggggt ItatAACGTgggggt ItatAACGTgggggt ItatAACGTgggggt ItatAACGTgggggt ItatAACGTgggggt ItatAACGTgggggt ItatAACGTgggggt ItatAACGTgggggt ItatAACGTgggggt ItatAACGTgggggg ItatAACGTggggggt ItatAACGTgggggg ItatAACGTggggggt ItatAACGTgggggg ItatAACGTgggggg ItatAACGTgggggg ItatAACGTgggggg ItatAACGTgggggg ItatAACGTgggggg ItatAACGTgggggg ItatAACGTgggggg ItatAACGTgggggg ItatAACGTgggggg ItatAACGTgggggg ItatAACGTgggggg ItatAACGTgggggg ItatAACGTgggggg ItatAACGTgggggg ItatAACGTgggggg ItatAACGTgggggg ItatAACGTgggggg ItatAACGTgggggg ItatAACGTgggg ItatAACGTggggg ItatAACGTggggg ItatAACGTggggg ItatAACGTggggg ItatAACGTggggg ItatAACGTggggg ItatAACGTggggg ItatAACGTggggg ItatAACGTggggg ItatAACGTgggg ItatAACGTggggg ItatAACGTggggg ItatAACGTggggg ItatAACGTggggg ItatAACGTggggg ItatAACGTggggg ItatAACGTggggg ItatAACGTggggg ItatAACGTggggg ItatAACGTggggg ItatAACGTggggg ItatAACGTggggg ItatAACGTggggg ItatAACGTgggggg ItatAACGTggggg ItatAACGTggggg ItatAACGTggggg ItatAACGA</td>	octamer factor 1 barbiturate-inducible element muscle-specific Mt binding site X-box-binding protein 1 AhR nuclear translocator homodimers earch Go Bookmarks Tasks Aide Matinspector professional: Re Matinspector professional: Re w-Myb Sox-5 Glacocordicoid response element Lentivinal Poly A downstream element c-Myb Bachyber Bachyber GATA-binding factor 1 Bachyber Joac Cather in Society GATA-binding factor 1 Bachyber Joac Cather in Society Brachyber Joac Cather in Society Joac Cather in Society Brachyber Joac Cather in Society Brachyber Joac Cather in Society Brachyber	44 - 58 70 - 78 94 - 110 95 - 110 95 - 110 142 - 150 142 - 150 142 - 150 216 - 225 224 - 239 248 - 263 259 - 276 266 - 286 308 - 329 312 - 325 327 - 339 368 - 382 371 - 394 379 - 390 300 - 389 427 - 441 429 - 439 465 - 476 477 - 488 500 - 513 526 - 526 520 - 513	(+) (-) (-) (-) (+) (-)	1.000 1.	0.970 0.970 0.845 0.995 0.995 0.996 0.996 0.906 0.903 0.933 0.934 0.722 0.765 0.946 0.972 0.765 0.966 0.969 0.861 0.956 0.861 0.956 0.861 0.960 0.845 0.966 0.861 0.966 0.845 0.966 0.861 0.966 0.865 0.970 0.865 0.970 0.865 0.970 0.865 0.970 0.865 0.970 0.865 0.970 0.865 0.970 0.865 0.970 0.865 0.970 0.865 0.970 0.865 0.970 0.865 0.970 0.865 0.966 0.865 0.966 0.865 0.970 0.865 0.970 0.865 0.970 0.865 0.970 0.865 0.966 0.865 0.970 0.865 0.970 0.865 0.970 0.865 0.966 0.865 0.970 0.865 0.970 0.865 0.970 0.865 0.966 0.986 0.986 0.986 0.986 0.986 0.986 0.986 0.986 0.986 0.986 0.986 0.986 0.986 0.986 0.986 0.986 0.986 0.986 0.986 0.970 0.845 0.970 0.885 0.970 0.	IggetATTR atgateACGToctttt aaaggaCGTGateat II:03 A aaggaCGTGateat II:03 A aaggaCGTGateat II:03 A aaggaCGTGateat IgaaCAACGgo IgraACACGgo IgraACACGgo IgraACATga IgraACGTGTGTTrtc OceAGTGTGTgtgtgac OceAGCACaccgcteaacagg IggaggtaceaGGAAgaatag baaCCCACAcccgcteaacagg IggaggtaceaGGAAgaatag baaCCCACAtacctagcta baaCCGCActacctgcta baaCGCACAtacctagcta ItatAACCTgggt ItatAACGTgggt ItatAACGTgggt ItatAACGTgggt IgaaGGATAAca IgTTACatagg ItatAACGTgggt ItatAACGTgggt ItatAACGTgggt ItatAACGTgggt ItatAACGTgggt ItatAACGTgggt ItatAACGTgggt ItatAACGTgggt ItatAACGTgggt ItatAACGTgggt ItatAACGTgggt ItatAACGTgggt ItatAACGTgggt ItatAACGTggggt ItatAACGTgggt ItatAACGTgggt ItatAACGTggggt ItatAACGTggggt ItatAACGTggggt ItatAACGTggggt ItatAACGTggggt ItatAACGTgggggt ItatAACGTgggggt ItatAACGTgggggt ItatAACGTgggggt ItatAACGTgggggt ItatAACGTgggggt ItatAACGTgggggt ItatAACGTgggggt ItatAACGTgggggt ItatAACGTgggggt ItatAACGTgggggt ItatAACGTgggggt ItatAACGTgggggt ItatAACGTgggggt ItatAACGTgggggt ItatAACGTgggggg ItatAACGTggggggt ItatAACGTgggggg ItatAACGTggggggt ItatAACGTgggggg ItatAACGTgggggg ItatAACGTgggggg ItatAACGTgggggg ItatAACGTgggggg ItatAACGTgggggg ItatAACGTgggggg ItatAACGTgggggg ItatAACGTgggggg ItatAACGTgggggg ItatAACGTgggggg ItatAACGTgggggg ItatAACGTgggggg ItatAACGTgggggg ItatAACGTgggggg ItatAACGTgggggg ItatAACGTgggggg ItatAACGTgggggg ItatAACGTgggggg ItatAACGTgggg ItatAACGTggggg ItatAACGTggggg ItatAACGTggggg ItatAACGTggggg ItatAACGTggggg ItatAACGTggggg ItatAACGTggggg ItatAACGTggggg ItatAACGTggggg ItatAACGTgggg ItatAACGTggggg ItatAACGTggggg ItatAACGTggggg ItatAACGTggggg ItatAACGTggggg ItatAACGTggggg ItatAACGTggggg ItatAACGTggggg ItatAACGTggggg ItatAACGTggggg ItatAACGTggggg ItatAACGTggggg ItatAACGTggggg ItatAACGTgggggg ItatAACGTggggg ItatAACGTggggg ItatAACGTggggg ItatAACGA		
Y3EARB/BARB/E 01 Y3HMTE/MTEP E Y3HDORXARDI 01 Y3EEORXARDI 01 Y3EEORXARDI 01 Y3EEORXARDI 01 Y3EEORXARDI 01 Y3EEORXARDI 01 Y3EEORXARDI 01 Y3EORYARDI 02 Y3VMYE/YMYE 02 Y3VMYE/YMYE 02 Y3SORY/SOX5 01 Y3CORF/GRE C Y3LDPS/LDSPOLYA E Y3CORF/GRE C Y3LDPS/LDSPOLYA E Y3CORF/GRE C Y3LDPS/LASPOLYA E Y3CORF/GRE C Y3CORF/GRE C Y3CORF/GRE C Y3CORF/GRE C Y3SCARE/GRACH 01 Y3SCARE/GRACH 01 Y3EARE/BACH 01	octamer factor 1 barbitraste-inducible element muscle-specific Mt binding site X-box-binding protein 1 AhR nuclear translocator homodimers earch Go Bookmarks Tasks Aide Barbitraste-inducible element Matinspector professional: Reference P-Myb Soc-5 Ghacocritical response element Lentivinal Poly A downstream element c-Hyb Baccorrestrictive silencer factor signal transducer and activator of transcription 1 Be-Cyg GNA eque transcription activating factor GATA-binding factor 1 Drac/CREB complex Brachyary barbetrace during in factor Nkx-2.5/C3x, timman homolog AFEB6 (Ap1al regulatory element binding factor 6) Tax/CREB complex Brachyary BetBP4 PAR-type chicken vitellogenin promoter-binding protein CA-2 mammalian caudal related intestinal transcr. factor barbitrate-inducible element MyT1 zine finger transcription factor R Brachyary Bactor S Be-Cys GNA gene transcription factor R BetBP4 PAR-type chicken vitellogenin promo	44 - 58 70 - 78 94 - 110 95 - 110 95 - 110 95 - 110 142 - 150 216 - 225 224 - 239 248 - 263 259 - 276 266 - 286 290 - 310 308 - 329 312 - 325 324 - 347 326 - 333 366 - 382 379 - 390 380 - 389 427 - 441 429 - 433 436 - 456 500 - 513 526 - 546 500 - 513 526 - 545 500 - 513 526 - 542 542 - 550	(+) (-) (-) (-) (+) (+) (+) (+) (+) (+) (+) (+) (+) (+	1.000 1.	0.9701 0.845 0.995 0.995 0.996 0.996 0.996 0.996 0.996 0.933 0.934 0.720 0.772 0.765 0.946 0.933 0.934 0.720 0.772 0.765 0.946 0.933 0.934 0.720 0.750 0.946 0.996 0.898 0.926 0.750 0.886 0.889 0.886 0.886 0.885 0.845 0.845 0.845 0.885 0.885	IggetATTR avgateACGToctttt avgateACGToctttt avgateACGToctttt avgateACGToctttt avgateACGToctttt avgateACGToctttt generation generation generation generation generation generation generation generation generation generation avgetgetGTGGcott generation generation avgateATAttgg avgateacaGTAttgg avgateacaGTAttgg avgateacaGTAttgg generation avgateacaGTAttgg generation generatio		
YSBARD/BARDE 01 YSHNTE/MTPF E YSEDOX/ARNT 01 YSEOXY/KOX5 01 YSEOXY/KOX5 01 YSEOXY/KOX5 01 YSEOXY/KOX5 01 YSEOXY/KOX5 01 YSECKYEXTAF 01 YSEARE/ARAEL 01 YSEARE/AREBE 01 YSEARE/AREBE 01 YSEARE/AREDE 01 YSEARE/AREDE 01 YSEARE/AREDE 01 YSEARE/AREDE 01 YSEARE/AREDE 01 YSEARE/AREDE 01 YSECOUP/COUP 01 YSECOUP/COUP 01 YSECOUP/COUP 01 YSEREE/AREBE 04 YSEREE/AREBE 04 YSECOUP/COUP 01 YSEEDOX/RESPC4 02 YSEEDOX/REAREARED 04 YSEEDOX/REAREAREDALTY 02 <td< td=""><td>octamer factor 1 barbiturate-inducible element muxel-specific Mt binding site X-box-binding protein 1 AhR nuclear translocator homodimers earch Go Bookmarks Tasks Aide Matinspector professional: Re Matinspector professional: Re Y-Myb Sox-5 Glucocorticoid response element Lentiviral Poly A downstream element C-Myb Becorticoid response element Lentiviral Poly A downstream element GATA-binding factor 1 Brachyay berone domain factor Nbx-2 S/Gsx, tuman homolog AREBE (Atplai regulatory element binding factor 6) Tax/CREB complex Brachyay B4DP4 PAR-type chicken vitellogenin promoter-binding protein. CAx-2 mammalian caudal related intestinal transcr. factor Barahyayy B4DP4 PAR-type chicken vitellogenin promoter-binding protein. CAx-2 mammalian caudal related intestinal transcr. factor Barahyayy B4DP4 PAR-type chicken vitellogenin promoter-binding protein. CAx-2 mammalian caudal related intestinal transcr. factor Barahyayy</td><td>44 - 58 70 - 78 94 - 110 95 - 110 95 - 110 95 - 110 91 - 110 95 - 110 95 - 110 95 - 110 142 - 150 216 - 225 224 - 239 248 - 263 290 - 310 308 - 329 312 - 325 324 - 347 326 - 333 368 - 382 371 - 394 360 - 389 421 - 439 426 - 439 457 - 441 429 - 439 456 - 476 467 - 487 470 - 490 477 - 488 500 - 513 526 - 546 526 - 546 526 - 546 526 - 572 574 - 589 581 - 599 581 - 599</td><td>(+) (+) (+)</td><td>1.000 1.</td><td>0.970 0.970 0.845 0.894 0.994 0.995 0.986 0.990 0.933 0.933 0.720 0.772 0.765 0.946 0.772 0.765 0.946 0.775 0.946 0.750 0.969 0.898 0.959 0.899 0.899 0.899 0.899 0.959 0.899 0.959 0.959 0.899 0.959 0.899 0.959 0.899 0.959 0.959 0.959 0.959 0.959 0.959 0.959 0.959 0.959 0.959 0.959 0.895 0.959 0.959 0.895 0.959 0.895 0.959 0.895 0.959 0.895 0.959 0.895 0.959 0.895 0.959 0.895 0.959 0.895 0.959 0.895 0.959 0.847 0.895 0.950 0.847 0.895 0.950 0.847 0.855 0.960 0.847 0.855 0.960 0.847 0.855 0.960 0.847 0.855 0.960 0.847 0.855 0.960 0.847 0.855 0.960 0.847 0.855 0.960 0.847 0.855 0.960 0.847 0.855 0.960 0.847 0.855 0.960 0.847 0.855 0.960 0.847 0.855 0.960 0.847 0.855 0.960 0.847 0.855 0.972 0.866 0.772 0.866 0.774 0.855 0.970 0.866 0.774 0.855 0.970 0.866 0.774 0.855 0.970 0.855 0.970 0.866 0.774 0.855 0.866 0.774 0.855 0.866 0.774 0.866 0.774 0.855 0.866 0.774 0.866 0.774 0.866 0.774 0.866 0.774 0.866 0.774 0.866 0.774 0.866 0.774 0.875 0.866 0.774 0.875 0.866 0.774 0.875 0.866 0.774 0.875 0.866 0.774 0.875 0.866 0.774 0.875 0.</td><td></td></td<>	octamer factor 1 barbiturate-inducible element muxel-specific Mt binding site X-box-binding protein 1 AhR nuclear translocator homodimers earch Go Bookmarks Tasks Aide Matinspector professional: Re Matinspector professional: Re Y-Myb Sox-5 Glucocorticoid response element Lentiviral Poly A downstream element C-Myb Becorticoid response element Lentiviral Poly A downstream element GATA-binding factor 1 Brachyay berone domain factor Nbx-2 S/Gsx, tuman homolog AREBE (Atplai regulatory element binding factor 6) Tax/CREB complex Brachyay B4DP4 PAR-type chicken vitellogenin promoter-binding protein. CAx-2 mammalian caudal related intestinal transcr. factor Barahyayy B4DP4 PAR-type chicken vitellogenin promoter-binding protein. CAx-2 mammalian caudal related intestinal transcr. factor Barahyayy B4DP4 PAR-type chicken vitellogenin promoter-binding protein. CAx-2 mammalian caudal related intestinal transcr. factor Barahyayy	44 - 58 70 - 78 94 - 110 95 - 110 95 - 110 95 - 110 91 - 110 95 - 110 95 - 110 95 - 110 142 - 150 216 - 225 224 - 239 248 - 263 290 - 310 308 - 329 312 - 325 324 - 347 326 - 333 368 - 382 371 - 394 360 - 389 421 - 439 426 - 439 457 - 441 429 - 439 456 - 476 467 - 487 470 - 490 477 - 488 500 - 513 526 - 546 526 - 546 526 - 546 526 - 572 574 - 589 581 - 599 581 - 599	(+) (+) (+)	1.000 1.	0.970 0.970 0.845 0.894 0.994 0.995 0.986 0.990 0.933 0.933 0.720 0.772 0.765 0.946 0.772 0.765 0.946 0.775 0.946 0.750 0.969 0.898 0.959 0.899 0.899 0.899 0.899 0.959 0.899 0.959 0.959 0.899 0.959 0.899 0.959 0.899 0.959 0.959 0.959 0.959 0.959 0.959 0.959 0.959 0.959 0.959 0.959 0.895 0.959 0.959 0.895 0.959 0.895 0.959 0.895 0.959 0.895 0.959 0.895 0.959 0.895 0.959 0.895 0.959 0.895 0.959 0.895 0.959 0.847 0.895 0.950 0.847 0.895 0.950 0.847 0.855 0.960 0.847 0.855 0.960 0.847 0.855 0.960 0.847 0.855 0.960 0.847 0.855 0.960 0.847 0.855 0.960 0.847 0.855 0.960 0.847 0.855 0.960 0.847 0.855 0.960 0.847 0.855 0.960 0.847 0.855 0.960 0.847 0.855 0.960 0.847 0.855 0.960 0.847 0.855 0.972 0.866 0.772 0.866 0.774 0.855 0.970 0.866 0.774 0.855 0.970 0.866 0.774 0.855 0.970 0.855 0.970 0.866 0.774 0.855 0.866 0.774 0.855 0.866 0.774 0.866 0.774 0.855 0.866 0.774 0.866 0.774 0.866 0.774 0.866 0.774 0.866 0.774 0.866 0.774 0.866 0.774 0.875 0.866 0.774 0.875 0.866 0.774 0.875 0.866 0.774 0.875 0.866 0.774 0.875 0.866 0.774 0.875 0.			
YSBARD/BARDE 01 YSHME/MEP E YSHOR/XARDE 01 YSEDOX/ARNT 01 FILE Edit View S YSUPY/YMYE 02 YSORF/GRAD YSORF/CDX2 B YSARF/GRAD YSKERF/RAD YSKERF/RAD YSKERF/RAD YSKERF/RAD YSKERF/RAD YSKERF/RAD YSKERS/RAD YSKERS/RAD <td> otemar factor 1 barbitraste-inducible element muscle-specific Mt binding site X-box-binding protein 1 AhR nuclear translocator homodimers earch Go Bookmarks Tasks Aide Matinspector professional: Re Mattinspector professional: Re Bashyay homeo domain factor NEx-2.5/Csx, taman homolog</td> <td>44 - 58 70 - 78 94 - 110 95 - 110 95 - 110 95 - 110 95 - 110 95 - 110 95 - 110 95 - 110 95 - 110 91 - 125 216 - 225 224 - 239 248 - 263 259 - 276 266 - 286 290 - 310 308 - 329 368 - 382 371 - 394 380 - 389 421 - 439 422 - 439 422 - 439 445 - 476 4470 - 490 477 - 488 500 - 513 526 - 546 542 - 550 554 - 547 554 - 548 555 - 540 555 - 600 552 - 606</td> <td>(+) (+) (+)</td> <td>1.000 1.000</td> <td>0.991 0.991 0.845 0.894 0.894 0.894 0.894 0.995 0.990 0.990 0.933 0.934 0.720 0.772 0.765 0.946 0.933 0.772 0.765 0.946 0.933 0.934 0.772 0.765 0.960 0.899 0.881 0.926 0.861 0.950 0.950 0.861 0.950 0.95500 0.95500 0.9550000000000</td> <td>IggeCATTR avgatcACGToctttt avgatcACGToctttt avgatcACGToctttt avgatcACGToctttt avgatcACGToctttt getAcGToCtttt getAcGToTTTgtgtgatc actgtgecGTOTCe getAcATga getacGToGGCAgatatg avggeCGTGTCageg attocatraceCAGGTAttagec getagettaccAGGTAttagec getagettaccAGGTAttagec getagettaccAGGTattagec getagettaccAGGTattagec getagettaccAGGTattagec attocatraceCAGGTattagec getagettaccAGGTattagec getagettaccAGGTattagec getagettaccAGGTattagec getagettaccAGGTattagec getagettaccAGGTattagec getagettaccAGGTattagec getagettaccAGGTattagec getagettaccAGGTattagec getagettaccAGGTattagec getagettaccAGGTattagec getagettaccAGGTattagec getagettaccAGGTattagec accttaGTAAca gettgttacAAGTgtgtgcg tocaGCAttagegagetta coccAGGCAttagegagetta coccAGGCAttagegagetta coccAGGCAttagegagettac coccAGGCACttagettac tattagetGGTgcca tattagetGGTgcca tattagetGGTgcca</td>	otemar factor 1 barbitraste-inducible element muscle-specific Mt binding site X-box-binding protein 1 AhR nuclear translocator homodimers earch Go Bookmarks Tasks Aide Matinspector professional: Re Mattinspector professional: Re Bashyay homeo domain factor NEx-2.5/Csx, taman homolog	44 - 58 70 - 78 94 - 110 95 - 110 95 - 110 95 - 110 95 - 110 95 - 110 95 - 110 95 - 110 95 - 110 91 - 125 216 - 225 224 - 239 248 - 263 259 - 276 266 - 286 290 - 310 308 - 329 368 - 382 371 - 394 380 - 389 421 - 439 422 - 439 422 - 439 445 - 476 4470 - 490 477 - 488 500 - 513 526 - 546 542 - 550 554 - 547 554 - 548 555 - 540 555 - 600 552 - 606	(+) (+) (+)	1.000 1.000	0.991 0.991 0.845 0.894 0.894 0.894 0.894 0.995 0.990 0.990 0.933 0.934 0.720 0.772 0.765 0.946 0.933 0.772 0.765 0.946 0.933 0.934 0.772 0.765 0.960 0.899 0.881 0.926 0.861 0.950 0.950 0.861 0.950 0.95500 0.95500 0.9550000000000	IggeCATTR avgatcACGToctttt avgatcACGToctttt avgatcACGToctttt avgatcACGToctttt avgatcACGToctttt getAcGToCtttt getAcGToTTTgtgtgatc actgtgecGTOTCe getAcATga getacGToGGCAgatatg avggeCGTGTCageg attocatraceCAGGTAttagec getagettaccAGGTAttagec getagettaccAGGTAttagec getagettaccAGGTattagec getagettaccAGGTattagec getagettaccAGGTattagec attocatraceCAGGTattagec getagettaccAGGTattagec getagettaccAGGTattagec getagettaccAGGTattagec getagettaccAGGTattagec getagettaccAGGTattagec getagettaccAGGTattagec getagettaccAGGTattagec getagettaccAGGTattagec getagettaccAGGTattagec getagettaccAGGTattagec getagettaccAGGTattagec getagettaccAGGTattagec accttaGTAAca gettgttacAAGTgtgtgcg tocaGCAttagegagetta coccAGGCAttagegagetta coccAGGCAttagegagetta coccAGGCAttagegagettac coccAGGCACttagettac tattagetGGTgcca tattagetGGTgcca tattagetGGTgcca		
YSBARD/BARDIE 01 YSHMTE/MTEF E YSHORXARDE 01 YSEDOX/ARNT 01 YSORY/SOX5 01 YSORF/GRE C YSLDPS/LDSPOLYA B YSCHYE/CMYB 01 YSKAR/ARATA 01 YSARG/ARAGATA1 02 YSERA/CBRACH 01 YSCREP/GRE C YSLDPS/LYA B YSCREP/GRE C YSLDPS/LYA B YSCREP/GRE C YSLDPS/LYA B YSCREP/GRE C YSARE/ARACH 01 YSCREP/GRE C YSEAR/BACH 01 YSCREP/GRE C YSEAR/BACH 01 YSEAR/BACH 01 YSEAR/BACH 01 YSEAR/BARBE 01 YSEAR/RARE 01 YSEAR/RARE 01 YSEAR/RARE 01 YSEAR/RARARARD 02 YSEAR/RARARART 01 YSEAR/RARARART 01 YSEAR/RARARART 01	octmar factor 1 barbiturate-inducible element muscle-specific Mt binding site X-box-binding protein 1 AhR nuclear translocator homodimers earch Go Bookmarks Tasks Aide Matinspector professional: Re Mattinspector professional: Re Social Content Professional: Re Bachyouth Bachyo	44 - 58 70 - 78 94 - 110 95 - 110 95 - 110 142 - 150 142 - 150 142 - 150 216 - 225 224 - 239 248 - 263 259 - 276 266 - 286 308 - 329 312 - 325 327 - 339 366 - 382 371 - 394 379 - 390 380 - 389 422 - 439 445 - 476 465 - 476 467 - 487 500 - 513 526 - 546 500 - 513 526 - 556 526 - 556 527 - 774 - 589 585 - 600 595 - 520 585 - 600 597 - 620	(+) (-) (-) (-) (+)	1.000 1.	0.970 0.970 0.845 0.995 0.995 0.986 0.900 0.933 0.934 0.722 0.765 0.946 0.933 0.934 0.725 0.946 0.905 0.755 0.946 0.755 0.969 0.975 0.969 0.969 0.975 0.969 0.975 0.969 0.975 0.969 0.975 0.969 0.975 0.969 0.975 0.969 0.975 0.969 0.975 0.975 0.969 0.975 0.975 0.969 0.975 0.975 0.969 0.975 0.975 0.975 0.966 0.975 0.			
Y3EA2R5/5A261E 01 Y3ENGXXEPI 01 Y3EDGXXEPI 02 Y3ENGXE0X5 01 Y3CMYENYMYE 02 Y3ENGXE0X5 01 Y3CMYENYMYE 02 Y3ENGXENTER 01 Y3CMYENYE 01 Y3STATISTATI 01 Y3EACERACH 02 Y3EACERACHACH 01 Y3EACERACH 02 Y3EACERACH 01 Y3EACERACH 01 Y3EACERACH 01 Y3EACERACH 01 Y3EACERACH 01 Y3EACERACHEE 04 Y3EACERAC	octmer factor 1 barbitraste-inducible element muscle-specific Mt binding site X-box-binding protein 1 AhR nuclear translocator homodimers earch Go Bookmarks Tasks Aide Matinspector professional: Re Matinspector professional: Re w-Myb Sox-5 Glucocorticoid response element Lentivital Poly A downstream element c-Myb Beauron-restrictive silencer factor grant transducer and activator of transcription 1 Se-Cys tRNA gene transcription activating factor GATA-binding factor 1 Brachyary Ball P4 PAR-type chicken vitellogenin promoter-binding protein CAx-z manualian cavidal related intestinal transcr. factor Barchyary B4B P4 PAR-type chicken vitellogenin promoter-binding protein CAx-z manualian cavidal related intestinal transcr. factor Barchyary B4B P4 PAR-type chicken vitellogenin promoter-binding protein CAx-z manualian cavidal related intestinal transcr. factor Barti virus transcription factor R Bacos 2	44 - 58 70 - 78 94 - 110 95 - 110 95 - 110 sult - Netsc 142 - 150 216 - 225 224 - 239 248 - 263 259 - 276 266 - 286 302 - 329 312 - 325 324 - 343 327 - 339 368 - 382 379 - 330 380 - 389 427 - 441 429 - 439 465 - 476 467 - 487 477 - 488 500 - 513 526 - 522 574 - 589 585 - 600 592 - 606 592 - 606 597 - 620 597 - 620 597 - 620 597 - 620 597 - 620 597 - 620 597 - 620 597 - 620 597 - 620 597 - 620 597 - 620 597 - 620	(+) (-) (-) (-) (-) (-) (-) (-) (-) (-) (-	1.000 1.	0.970 0.970 0.845 0.995 0.995 0.995 0.995 0.995 0.995 0.995 0.995 0.995 0.995 0.995 0.995 0.995 0.995 0.933 0.934 0.722 0.772 0.765 0.946 0.933 0.934 0.722 0.772 0.765 0.946 0.938 0.926 0.789 0.886 0.886 0.886 0.886 0.845 0.946 0.946 0.937 0.886 0.886 0.946 0.946 0.946 0.946 0.946 0.946 0.946 0.946 0.946 0.957 0.886 0.886 0.946 0.946 0.946 0.946 0.946 0.886 0.926 0.886 0.926 0.886 0.926 0.946 0.946 0.937 0.886 0.926 0.886 0.926 0.886 0.926 0.946 0.946 0.937 0.886 0.946 0.946 0.946 0.946 0.946 0.946 0.946 0.946 0.946 0.959 0.886 0.946 0.976 0.976 0.946 0.976 0.946 0.976 0.976 0.976 0.976 0.976 0.976 0.976 0.976 0.976 0.9776 0.976 0.976 0.976 0.9776 0.9776 0.9776 0.9776 0.9776 0.9766 0.9776			
YsbarbicARDE 01 YshMTE/MTBP E YsbeorXxbpl 01 YsborXxbpl 02 YsborXxbpl 03 YsborXxbpl 04 YsborXxbplx	otemar factor 1 barbitraste-inducible element muxele-specific Mt binding site ×-box-binding protein 1 AhR nuclear translocator homodimers earch Go Bookmarks Tasks Aide Matinspector professional: Re whyb Sox-5 Ghuccorticoid response element Lentiviral Poly A downstream element C-Myb Bacorticoid response element Lentiviral Poly A downstream element G'Huccorticoid response element Beturn restrictive silencer factor gignal transducer and activator of transcription 1 Sox-5 GATA-binding factor 1 Sox-5 GATA-binding factor 1 Brachyauy borneo domain factor Nbx-2.5/C3x, tuman homolog AREB6 (Aptial regulatory element binding factor 6) Tax/CREB complex Brachyauy B4D+4 PAR-type chicken vitellogenin promoter-binding protein. Cdx-2 mammalian caudal related intestinal transcr. factor Barchyauy B4D+4 PAR-type chicken vitellogenin promoter-binding protein. Cdx-2 mammalian c	44 - 58 70 - 78 94 - 110 95 - 110 95 - 110 95 - 110 95 - 110 95 - 110 142 - 150 216 - 225 224 - 239 248 - 263 259 - 276 266 - 286 290 - 310 312 - 325 324 - 347 326 - 333 368 - 382 371 - 394 368 - 382 371 - 394 427 - 441 429 - 439 436 - 456 465 - 476 465 - 476 500 - 513 526 - 572 574 - 589 581 - 597 581 - 592 581 - 592 581 - 602 592 - 606 597 - 620 581 - 667 581 - 667 581 - 667 592 - 606 597 - 620 566 - 680	(+) (-) (-) (-) (-) (-) (-) (-) (-) (-) (-	1.000 1.	0.970 0.970 0.845 0.894 0.894 0.894 0.995 0.986 0.990 0.933 0.933 0.934 0.720 0.772 0.765 0.946 0.772 0.765 0.946 0.772 0.765 0.946 0.772 0.765 0.946 0.775 0.946 0.775 0.946 0.775 0.946 0.750 0.989 0.886 0.821 0.960 0.847 0.886 0.821 0.960 0.847 0.885 0.771 0.986 0.821 0.960 0.847 0.885 0.771 0.986 0.835 0.771 0.986 0.835 0.772 0.847 0.866 0.774 0.835 0.970 0.866 0.784 0.988 0.986 0.866 0.784 0.988 0.986 0.986 0.847 0.986 0.847 0.986 0.847 0.986 0.847 0.986 0.847 0.986 0.847 0.886 0.772 0.986 0.847 0.886 0.772 0.986 0.847 0.866 0.774 0.986 0.835 0.970 0.886 0.835 0.970 0.886 0.866 0.784 0.988 0.866 0.784 0.988 0.866 0.784 0.988 0.866 0.784 0.988 0.866 0.784 0.988 0.866 0.784 0.886 0.866 0.784 0.988 0.866 0.784 0.886 0.866 0.784 0.886 0.866 0.784 0.886 0.866 0.784 0.886 0.866 0.784 0.886 0.866 0.784 0.886 0.			
Y358AR6//6AR6/E 01 Y3HMTE/MTEP E Y3EDOXX8F1 01 Y3CMY/SOX5 02 Y3CMY/SOX7KX2 02 Y3ERAC/BRACH 01 Y3CMP/YABP/YEP 01 Y3KSE/YAR01 Y3KSE/YAR01 Y3KSE/YAR01 Y3KSE/YAR01 Y3KRES/RAF1 01 Y3KARF/RAF1 01 Y3ARE/ARARNT 02 Y3ERE/AREA 01 Y3ERE/AREA 01 Y3ARE/ARARART 01 Y3ERE/ARAR	octmar factor 1 barbitraste-inducible element muxcle-specific Mt binding site &-box-binding protein 1 AhR nuclear translocator homodimers earch Go Bookmarks Tasks Aide Matinspector professional: Re Matinspector professional: Re (~Myb Sox-5 Chicocorticoid response element Lentiviral Poly A downstream element c-Myb Bacard Sax-5 Chicocorticoid response element Lentiviral Poly A downstream element c-Myb beuro-restrictive silencer factor signal transducer and activator of transcription 1 Se-Cys GNA gene transcription activating factor CATA-binding factor 1 Brachyary homeo domain factor Nix-2. SiCax, timman homolog AREB6 (Atpla1 regulatory element binding factor 6) TaxiCREBE complex Brachyary B4BF4 MyT1 zine finger transcription factor involved in primary neurogenesis Bystein-Barv virus transcription factor R Bystein-Barv virus transcription factor R Barchyary E4BF4 MyT1 zine fingert	44 - 58 70 - 78 94 - 110 95 - 110 95 - 110 95 - 110 95 - 110 95 - 110 95 - 110 95 - 110 95 - 110 95 - 110 95 - 110 95 - 110 95 - 110 95 - 110 142 - 150 216 - 225 224 - 239 248 - 263 259 - 276 368 - 382 312 - 325 324 - 347 327 - 339 368 - 382 371 - 3940 380 - 389 421 - 439 427 - 441 427 - 441 427 - 441 427 - 441 470 - 490 477 - 488 526 - 546 542 - 550 552 - 606 552 - 606 559 - 620 551 - 667 658 - 670 658 - 672 559 - 620 551 - 667	(+) (+) (+) (+)	1.000 1.	0.991 0.991 0.845 0.894 0.894 0.894 0.894 0.995 0.995 0.990 0.990 0.933 0.934 0.720 0.772 0.765 0.946 0.772 0.765 0.946 0.898 0.926 0.889 0.926 0.881 0.920 0.881 0.920 0.881 0.920 0.881 0.926 0.881 0.926 0.885 0.926 0.815 0.935 0.815 0.935 0.815 0.935 0.815 0.935 0.815 0.936 0.815 0.935 0.815 0.936 0.815 0.936 0.815 0.952 0.952 0.952 0.952 0.952 0.952 0.952 0.955 0.955 0.955 0.955 0.955 0.956 0.815 0.955 0.955 0.955 0.956 0.815 0.955 0.956 0.815 0.955 0.956 0.815 0.955 0.956 0.955 0.956 0.956 0.956 0.956 0.956 0.957 0.956 0.957 0.956 0.957 0.957 0.957 0.956 0.957 0.957 0.957 0.957 0.957 0.957 0.957 0.957 0.957 0.956 0.957 0.956 0.957 0.956 0.957 0.956 0.957 0.956 0.957 0.957 0.956 0.957 0.956 0.957 0.956 0.957 0.956 0.957 0.956 0.957 0.956 0.957 0.956 0.957 0.957 0.957 0.956 0.9577 0.957 0.957 0.957 0.957 0.9570 0.9570 0.9570 0.95700			

	earch Go Bookmarks Tasks Aide					11:04 🧗 🔌 🚺
	Matinspector professional: R	lesult - Netsca	ape 6			
	And Construction of the C	-00	41 440021	*******	- Ale	Go Search
\$CRBP/CREBP1 01	cAMP-responsive element binding protein 1	711 - 718	(-)	1.000	0.803	tgACGTag
SCREB/CREB 01	cAMP-responsive element binding protein	711 - 718	(-)	1.000	0.962	TGACgtag
CDXF/CDX2 B	Cdx-2 mammalian caudal related intestinal transcr. factor	711 - 729	(-)	1.000	0.878	attttatTTTAtgacgtag
TCFF/TCF11 01	TCF11/KCR-F1/Nrf1 homodimers	715 - 727	(+)	1.000	0.980	GTCAtaaaataaa
CDXF/CDX2 B	Cdx-2 mammalian caudal related intestinal transcr. factor	761 - 779	(-)	1.000	0.868	nanatTTTAnnam
PDX1/PDX1 B	Pdx1 (IDX1/IPF1) pancreatic and intestinal homeodomain TF	765 - 783	(+)	1.000	0.748	aaaataaaaTAATaaaata
RPOA/POLY C	Retroviral Poly A signal	766 - 783	(+)	1.000	0.778	aAATAAAataataaaata
RPOA/LPOLYA B	Lentiviral Poly A signal	809 - 816	(+)	1.000	0.992	aAATAAAg
IRFF/ISRE 01	interferon-stimulated response element	817 - 831	(-)	1.000	0.818	gaggaaagGAAAttg
NFAT/NFAT Q6	Nuclear factor of activated T-cells	817 - 828	(-)	1.000	0.952	gaaagGAAAttg
ETSF/PU1 B	Pu.1 (Pu120) Ets-like transcription factor identified in lymphoid B-cells	820 - 835	(-)	1.000	0.870	cttagaGGAAaggaaa
STAT/STAT 01	signal transducers and activators of transcription	826 - 834	(-)	1.000	0.924	ttagaGGAA.
MINI/MUSCLE INI B	Muscle initiator	834 - 854	(+)	1.000	0.871	ageggeeteCACCcetetece
PAX5/PAX5 01	B-cell-specific activating protein	838 - 865	(-)	0.952	0.823	tcacagGGCAggggagaggggtggagg
IKRS/IK1 01	Tkame 1	898 - 910	(+)	1.000	0.930	cttaGGGAatttc
NFKB/NFKAPPAB 01	NF-kappaB	902 - 911	(+)	1.000	1.000	GGGAatttec
MZF1/MZF1_01	MZF1	909 - 916	(-)	1.000	0.980	cggGGGGa
PAX5/PAX9 B	zebrafish PAX9 binding sites	939 - 962	(-)	1.000	0.796	ggacCGCAgcgaagtgtgcgcagc
ETSFIGABP B	GABP: GA binding protein	960 - 971	(-)	1.000	0.914	gcaGGAAgagga
RELIDIRDRACO OF	Fork head RElated ACtivator-2	972 - 987	(-)	1.000	0.912	agggagTAAAcagaca
PKIDIPREACZ UI						maga
NOLFIOLF1 01	olfactory neuron-specific factor	987 - 1008	(-)	1.000	0.818	CCCagg I U U U Cagcggggccta
NOLFIOLF1 01 MYOD/E47 01	olfactory neuron-specific factor E47	987 - 1008 1027 - 1041	(-)	1.000	0.818	cccagg ICCCCagcggggccta cgcGCAGctggccgg
NOLF/OLF1 01 MYOD/E47 01 AP4R/AP4 06	olfactory neuron-specific factor E47 activator protein 4	987 - 1008 1027 - 1041 1030 - 1039	(-) (-) (-)	1.000 1.000 1.000	0.818 0.924 0.982	cccagg ICCCcagcggggccra cgcGCAGctggccgg cgCAGCtggc
NOLFIOLFI 01 MYODIE47 01 AP4RIAP4 06 NOLFIOLFI 01	olizatory neuron-specific factor E47 activator protein 4 olizetory neuron-specific factor	987 - 1008 1027 - 1041 1030 - 1039 1039 - 1060	(-) (-) (-) (-)	1.000 1.000 1.000 1.000	0.818 0.924 0.982 0.862	cccagg ICCCcagcggggccta cgcGCAGctggccgg cgCAGCtggc cgcAGCtggc
NOLF/OLF1 01 NOLF/OLF1 01 MYOD/E47 01 AP4R/AP4 06 NOLF/OLF1 01 REBY/R 01	olfactory neuron-specific factor E47 activator protein 4 olfactory neuron-specific factor Bpetein-Barr virus transcription factor R	987 - 1008 1027 - 1041 1030 - 1039 1039 - 1060 1072 - 1092	(-) (-) (-) (-) (+)	1.000 1.000 1.000 1.000 1.000	0.818 0.924 0.982 0.862 0.909	croage ICCCcagoggggcom cgcGCAGctggcogg cgCAGCtggc ctggagTCCCcggagtgcogg gcggcogacgcocggGGTGca
FK.HUPPREACE_01 NOLF/OLF1_01 MYOD/E47_01 AP4R/AP4_06 NOLF/OLF1_01 REBV/R_01 EGRF/EGR3_01	olfactory neuron-specific factor E47 activator protein 4 olfactory neuron-specific factor Epstein-Barr virus transcription factor R early growth response gene 3 product	987 - 1008 1027 - 1041 1030 - 1039 1039 - 1060 1072 - 1092 1073 - 1084	(-) (-) (-) (+) (-)	1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000	0.818 0.924 0.982 0.862 0.909 0.791	conage ICCCragereggeotta cgcGCAGctgeorege cgCAGCtgeo ctgsgeTCCCcggagtrgcoge groggrogargcocggGGTGca ggGCGTcggcog
INDERDERACE 01 INDEROLF1 01 IAP4RIAP4 06 INDEROLF1 01 IREBVIR 01 IEGRF/IEGR3 01 IAP2FIAP2 06	Olfactory neuron-specific factor B47 extivator protein 4 olfactory neuron-specific factor Eptetan-Barr virus tenneoription factor R early growth response gene 3 product lacticative protein 2	987 - 1008 1027 - 1041 1030 - 1039 1039 - 1060 1072 - 1092 1073 - 1084 1110 - 1121	(-) (-) (-) (+) (-) (-)	1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000	0.818 0.924 0.982 0.862 0.909 0.791 0.957	pcbcagitCuCcageggggtta ogcGCAGCtgcogg ogcGCAGCtgcogg ofggggtgggggggggggggggggggggggggggggggg
INDLFIGHT REACE 01 INDLFIGLF1 01 MYODIE47 01 AP4RIAP4 06 INDLFIGLF1 01 IREEVIR 01 IEGRFIEGR3 01 IAP2FIAP2 06 INFKB/INFKB 06	Discoursy neuron-specific factor B47 activator protein 4 olfactory neuron-specific factor Epstein-Barr virus transcription factor R early growth response gene 3 product activator protein 2 NHP-KB-Like	987 - 1008 1027 - 1041 1030 - 1039 1039 - 1060 1072 - 1092 1073 - 1084 1110 - 1121 1125 - 1138	(-) (-) (-) (+) (-) (-) (-) (+)	1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000	0.818 0.924 0.982 0.862 0.909 0.791 0.957 0.863	octagi CCCCagregggetria ogrdCAGreggo ogCAGCeggo ofggagCagge ofggagCCCCoggagtogoogo geggoogaegooggGGTGca. gggCGGToggoog ofCCCGooggoo gcGGGAcottocag
INTERPREZE 01 INOLFIGET 01 MYODIE47 01 AP4RIAP4 06 INOLFIGET 01 INFREVIR 01 INFREVIR 01 INFREVINFKE 06 INFKEINFKE 01	olfactory neuron-specific factor E47 activator protein 4 olfactory neuron-specific factor Epstein-Barr virus transcription factor R early growth response gene 3 product activator protein 2 NE-kopeR NE-KB-like NE-Spats	987 - 1008 1027 - 1041 1030 - 1039 1039 - 1060 1072 - 1092 1073 - 1084 1110 - 1121 1125 - 1138 1155 - 1165	(-) (-) (-) (+) (+) (-) (+) (+) (+)	1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000	0.818 0.924 0.982 0.862 0.909 0.791 0.957 0.863 1.000	cotage ICCCagreggerota cgrGCAGotggrogg cgCAGOtggro ctgragTCCCoggagtogrogc grggorogargoroggGGTGca ggCGCGTeggrog crCCGoteggro grGGGAccetrag grgarTCAGca
INCLIFICATE AND A CONTRACT OF A CONTRACT ON	Olfactory neuron-specific factor B47 extivator protein 4 Olfactory neuron-specific factor Bpetein-Barr virus transcription factor R jearly growth response gene 3 product activator protein 2 NF-KB-like NF-KB-like NF-KB-like	987 - 1008 1027 - 1041 1030 - 1039 1039 - 1060 1072 - 1092 1073 - 1084 1110 - 1121 1125 - 1138 1155 - 1165 1166 - 1179	(-) (-) (-) (-) (+) (-) (+) (+) (+) (+)	1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000	0.818 0.924 0.982 0.862 0.909 0.791 0.957 0.863 1.000 0.939	potpage 1000-000000000000000000000000000000000
INTLATERACE 01 INOLFICLE 01 MYOD/E47 01 AP4R/AP4 06 INOLFICLE 01 EEEV/R 01 ECGRFIECERS 01 AP2F/AP2 06 INFKEINFKE 06 AP1F/INFE2 01 SEP1F/SE 01 SEP1F/SE 01	Olfactory neuron-specific factor B47 isotivator protein 4 Olfactory neuron-specific factor Bystein-Barr virus transcription factor R early growth response gene 3 product isotivatory protein 2 NP-kappe8 NP-kappe8 NP-kappe8 OC box elements Stimuliting protein	987 - 1008 1027 - 1041 1030 - 1039 1037 - 1041 1072 - 1092 1073 - 1084 1110 - 1121 1125 - 1138 1155 - 1165 1166 - 1179 1176 - 1188	(+) (-) (-) (+) (+) (+) (+) (+) (+) (+)	1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000	0.818 0.924 0.982 0.862 0.909 0.791 0.957 0.863 1.000 0.939 0.948	pcbcag 1CCCcageggggtota cgcGCACtggcogg cgCAGCtggcogg cgCAGCtggcogg ctgsgstogaccoggGGTGca ggGCGGCGCGC ggGGGGAccotocag gtgaCCGGggcgg ctgCGGCGggccg gtgaCCGCGggccg gtgaCCGCggacg gtgaCCGCggacg
IT.N.D.FRG.L2 01 MYODJE47 01 MYODJE47 01 MAPARAP4 06 MOLFIOLFI 01 WREBV/R 01 WREBV/R 01 WREBV/R 01 WREBV/R 01 WREBV/R 01 SPIF/SPI 06 SPIF/SPI 06 SPIF/SPI 06	Discring neuron-specific factor B47 settivator protein 4 olfactory neuron-specific factor Bystein-Barr virus transcription factor R early growth response gene 3 product activator protein 2 NE-kegaB NF-KB-like NF-KB-like Sp1 Governments stimulating protein 1 Sp1	987 - 1008 1027 - 1041 1030 - 1039 1039 - 1060 1072 - 1092 1073 - 1084 1110 - 1121 1125 - 1138 1155 - 1165 1166 - 1179 1176 - 1188 1190 - 1204	(·) (·) (·) (·) (·) (·) (·) (·) (·) (·)	1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 0.950	0.818 0.924 0.982 0.862 0.909 0.791 0.957 0.863 1.000 0.939 0.948 0.900	octage ICCCCagreggerota ogrCCACtegoogg ogrCACCtegoo orgeograficategoogg orgeorgangooggCGTGca grogorgangooggCGTGca grCGCGCoggoog grCGCGCoggoog grCGCCGgaogg orgeGCCGgaogg grCgCCCggaocg coCCTTAtaaggotog coCCTTAtaaggotog

<u>Figure 33</u> : Résultat de la recherche assistée par ordinateur de sites de fixation de facteurs de transcription dans le promoteur du gène de GSTP1-1.

La séquence promotrice du gène de la GSTP1-1 comprise entre -1224 à +96 pb, a été soumise à une analyse assistée par ordinateur grâce au logiciel Matinspector de Genomatix (<u>http://www.genomatix.de</u>), qui permet une recherche automatique, par comparaison de séquences, de sites potentiels de liaison de facteurs de transcription. Les sites connus (NF- κ B, AP-1 et Sp1) et les sites GATA identifiés sont précisés.

A					
GATA d -1208		NF-kB	AP-1 Sp1	Sp1	→ +1
\downarrow		\downarrow		\downarrow	
	Promoteur	•	Promoteur	basal	Gène GSTP1-1
-1263 pb		-323	-69 -57	-47	

B

aacaagagat.caatatctag.aataaatgga.gatctgcaaa.tcaacagaaa.gtaggcagca aagccaaaga.aaatagccta.aggcacagcc.actaaaagga.acgtgatcat.gtcctttgca gggacatggg.tggagctgga.agccgttagc.ctcagcaaac.tcacacagga.acagaaaacc agcgagaccg.catggtctca.cttataagtg.ggagctgaac.aatgagaaca.catggtcaca tggcggcgat.caacacacac.tggtgcctgt.tgagcggggt.gctggggggg.gagagtacca ggaagaatag.ctaagggata.ctgggcttaa.tacctgggtg.atgggatgat.ctgtacagca aaccatcatg.gcgcacacac.ctatgtaaca.aacctgcaca.tcctgcacat.gtaccccaga acttcaaata.aaagttggac.ggccaggcgt.ggtggctcac.gcctgtaatc.ccagcacttt gggaagccga.ggcgtgcaga.tcacctaagg.tcaggagttc.gagaccagcc.cggccaacat ggtgaaaccc.cgtctctact.aaaaatacaa.aaatcagcca.gatgtggcac.gcacctataa ttccacctac.tcgggaggct.gaagcagaat.tgcttgaacc.cgagaggcgg.aggttgcagt gagccgccga.gatcgcgcca.ctgcactcca.gcctgggcca.cagcgtgaga.ctacgtcata tccacccctc.tcccctgccc.tgtgaagcgg.gtgtgcaagc.tccgggatcg.cagcggtctt agggaatttc.cccccgcgat.gtcccggcgc.gccagttcgc.tgcgcacact.tcgctgcggt cctcttcctg.ctgtctgttt.actccctagg.ccccgctggg.gacctgggaa.agagggaaag gcttccccgg.ccagctgcgc.ggcgactccg.gggactccag.ggcgcccctc.tgcggccgac gcccggggtg.cagcggccgc.cgggggtggg.gccggcggga.gtccgcggga.ccctccagaa gagcggccgg.cgccgtgact.cagcactggg.gcggagcggg_cggggaccac.ccttataagg ctcggaggcc.gcgaggcctt.cgctggagtt.tcgccgccgc.agtcttcgcc.accagtgagt acgcgcggcc.cgctccccgg.ggatggggct.cagagctccc.agcatggggc.caacccgcag

Figure 34 : Le promoteur de la GSTP1-1.

A : Détail des éléments régulateurs du promoteur de la GSTP1-1, accompagnés de leur position respective. **B** : Séquence de la région -1224 à +96. Les sites GATA proximal (<u>-908/-905</u>) et GATA distal (<u>-1211/-1208</u>) sont en gras et soulignés. La tata-box est en gras (-31/-28) et en italique et le site d'initiation de la transcription est en position +1. Les autres sites sont surlignés : 2 sites Sp1 en <u>-47/-39</u> et <u>57/-49</u>, AP-1 en <u>-69/-63</u> et NF-κB en <u>-323/-314</u>.

II. 2- Effet de la différenciation des cellules K562 sur la transactivation d'un gène rapporteur sous le contrôle de sites GATA par transfection transitoire

Nous avons montré dans la partie précédente que le promoteur de la GSTP1-1 contient deux sites GATA. Afin de vérifier que les différents agents, utilisés pour induire la différenciation des cellules K562, sont capables de faire varier l'expression d'un ou plusieurs facteurs GATA, nous avons réalisé des expériences de transfection transitoire. Ces expériences ont été réalisées en utilisant un plasmide rapporteur contenant le gène de la luciférase associé à 3 répétitions du site consensus GATA clonés en amont du promoteur minimal de la métallothionéine dans un vecteur pGL3-basic (pGL3-GATA-luc) et deux plasmides d'expression du facteur GATA-1 : le plasmide pXM-GATA-1 (qui exprime la protéine GATA-1 normale) et le plasmide pXM-GATA-1 Δ 63 (qui exprime une protéine GATA-1 mutée par une délétion de sa partie NH₂ terminale).

Un plasmide exprimant de façon constitutive la luciférase Renilla est co-transfecté dans chaque expérience afin d'obtenir un contrôle de transfection.

II. 2. 1- Effet de la surexpression de la protéine GATA-1

Afin de valider notre modèle et les quantités optimum de plasmide à utiliser, nous avons tout d'abord transfecté des cellules K562 avec 5 μ g de plasmide rapporteur pGL3-GATA-luc et avec des quantités croissantes de plasmides d'expression pXM-GATA-1 (0 ; 0,1 ; 0,5 ; 1 ; 2,5 ; 5 et 10 μ g) ou pXM-GATA-1 Δ 63 (0 ; 0,1 ; 0,5 ; 1 ; 2,5 et 5 μ g).

Les résultats de ces expériences de transfections transitoires sont présentés dans la Figure 35.



<u>Figure 35</u> : Activité transcriptionnelle d'un promoteur sous le contrôle de GATA après la surexpression de concentrations croissantes du facteur GATA-1 ou GATA-1 muté.

Des cellules K562 ont été co-transfectées par électroporation avec 5 μ g de plasmide rapporteur pGL3-GATA-luc et des concentrations croissantes de plasmide d'expression pXM-GATA-1 (A) ou pXM-GATA-1 Δ 63 (B). Après 24 h, les activités luciférase et Renilla sont ensuite mesurées par un luminomètre Berthold grâce au logiciel Simplicity. Les résultats expriment le rapport entre les activités mesurées, ces données représentent la moyenne \pm l'écart-type de trois expériences indépendantes. * et ** correspondent respectivement à p<0,05 et à p<0,01 par rapport au témoin.

146

L'augmentation de l'expression du facteur GATA-1 entraîne une augmentation de l'activité transcriptionnelle du promoteur pGL3-GATA-luc en fonction de la quantité en plasmide pXM-GATA-1 transfectée, avec un maximum d'augmentation de 2,5 fois (p<0,01) par rapport au témoin à partir de 5 μ g (**Figure 35-A**).

En revanche, l'augmentation de l'expression du facteur GATA-1 muté dans sa partie NH₂ terminale et ayant perdu sa capacité transactivatrice, n'induit pas l'activité transcriptionnelle de pGL3-GATA-luc dans les cellules K562. Au contraire, l'activité luciférase est diminuée respectivement de 25 % (p<0,01) et de 45 % (p<0,01) pour des concentrations de 2,5 et 5 μ g de plasmide pXM-GATA-1 Δ 63 transfecté (**Figure 35-B**).

Ensuite, nous avons voulu comparer ces résultats avec l'effet des mêmes cotransfections dans la lignée Jurkat qui n'exprime pas les facteurs GATA-1 et GATA-2.

Les cellules K562 et les cellules Jurkat ont été co-transfectées avec 5 μ g du plasmide pGL3-GATA-luc et 5 μ g des plasmides d'expression pXM-GATA-1 ou pXM-GATA-1 Δ 63.

Les résultats de ces co-transfections dans les cellules K562 et Jurkat sont présentés dans la **Figure 36**.

Ces expériences présentent des résultats similaires avec une augmentation de l'activité luciférase du plasmide pGL3-GATA-luc dans les deux lignées transfectées avec le plasmide pXM-GATA-1. Cependant, l'augmentation observée est plus importante dans le cas de la lignée Jurkat. En ce qui concerne l'activité luciférase mesurée dans le cadre de la transfection du plasmide pXM-GATA-1 Δ 63, celle-ci reste à un niveau basale dans la lignée Jurkat comparée au témoin, alors que l'activité luciférase détectée dans la lignée K562 est diminuée de 45 % (p<0,01) par rapport au témoin.



<u>Figure 36</u> : Activité transcriptionnelle d'un promoteur sous le contrôle de GATA après la surexpression du facteur GATA-1.

Des cellules K562 (A) et des cellules Jurkat (B) ont été co-transfectées par électroporation avec 5 μ g de plasmide rapporteur pGL3-GATA-luc et 5 μ g de plasmide d'expression GATA-1 ou GATA-1 muté (GATA-1-delta). Après 24 h, les activités luciférase et Renilla sont ensuite mesurées par un luminomètre Berthold grâce au logiciel Simplicity. Les résultats sont exprimés comme le rapport entre les activités mesurées, ces données représentent la moyenne \pm l'écart-type de trois expériences indépendantes. ** correspond à p<0,01 par rapport au témoin.

Résultats

II. 2. 2- Effet des traitements différenciants sur la transactivation d'un gène rapporteur sous le contrôle de sites GATA

Afin de poursuivre nos investigations concernant la régulation de l'expression de la GSTP1-1 par le facteur GATA-1, nous avons induit la différenciation de cellules K562 transfectées par le plasmide pGL3-GATA-luc.

Les résultats de ces expériences sont présentés dans **Figure 37**. Nous pouvons observer une augmentation significative de l'activité luciférase dans les cellules traitées par l'acla et la dox de respectivement 2,6 (p<0,01) et 1,4 (p<0,01) fois. Dans le cas de l'hémine, une diminution de 25 % (p<0,01) de l'activité luciférase est observée. Après induction de la différenciation mégacaryocytaire par le TPA, nous observons une très forte induction de 7,7 fois (p<0,01) de l'activité luciférase du plasmide rapporteur. Avec le butyrate à la concentration de 2 mM nous constatons une augmentation de 1,8 fois (p<0,01) de l'activité luciférase alors que la concentration de 1 mM n'a aucun effet sur l'activité de notre promoteur.

En conclusion, le plasmide pGL3-GATA-luc, qui contient les éléments de réponse GATA, présente une activité transcriptionnelle qui peut-être augmentée par la surexpression du facteur GATA-1.

De même, son activité transcriptionnelle peut-être modulée en fonction de l'agent utilisé pour induire la différenciation des cellules K562. Ces résultats suggèrent que les inducteurs utilisés sont capables de moduler l'expression d'un ou de plusieurs facteurs de transcription de la famille GATA.



<u>Figure 37</u> : Activité transcriptionnelle d'un promoteur sous le contrôle de GATA après induction de la différenciation des cellules K562.

Des cellules K562 ont été transfectées par électroporation avec 5 μ g de plasmide rapporteur pGL3-GATA-luc. Après 24 h, les cellules sont traitées pendant 48 h avec un inducteur de la différenciation comme indiqué. Les activités luciférase et Renilla sont ensuite mesurées par un luminomètre Berthold grâce au logiciel Simplicity. Les résultats sont exprimés comme le rapport entre les activités mesurées. Ces données représentent la moyenne ± l'écart-type de trois expériences indépendantes. ** correspond à p<0,01 par rapport au témoin.

II. 3- Etude de la capacité de liaison des facteurs de transcription aux sites GATAd et GATAp du promoteur de la GSTP1-1

Nous avons montré précédemment que les agents utilisés pour induire la différenciation des cellules K562 sont capables de moduler l'expression d'un ou plusieurs facteurs GATA ainsi que l'expression de la GSTP1-1.

Ainsi, nous avons voulu évaluer la fonctionnalité des sites GATA identifiés dans le promoteur du gène de la GSTP1-1 et leurs rôles potentiellement régulateurs dans l'expression de ce gène au cours de la différenciation des cellules K562. Pour mettre en évidence d'éventuelles interactions spécifiques des leucémies entre certains facteurs protéiques nucléaires et les séquences GATA du promoteur du gène de la GSTP1-1, nous avons utilisé la technique de retard de migration sur gel ou gel shift.

II. 3. 1- Activité liante de facteurs de transcription aux séquences GATA dans différentes lignées leucémiques

II. 3. 1. 1- Activité liante des séquences GATA du promoteur de la GSTP1-1 et consensus

Nous avons d'abord vérifié l'existence d'une activité liante, dans différentes lignées leucémiques, sur des séquences correspondant aux sites GATA distal et proximal en utilisant des sondes oligonucléotidiques de 20 paires de bases (pb) correspondant aux régions du promoteur du gène de la GSTP1-1 allant de -897 à -916 pour la sonde GATAd et de -1200 à - 1219 pour la sonde GATAp. Nous avons également utilisé une sonde de 24 pb contenant un site GATA consensus issu du gène tal-1.

Après incubation des sondes radiomarquées avec les extraits nucléaires des lignées Jurkat, U937, Raji ou K562 dans un milieu réactionnel préparé extemporanément, les complexes formés entre les protéines et l'ADN ont été séparés par électrophorèse dans un gel à 5 % de polyacrylamide puis analysés par autoradiographie. L'autoradiogramme présenté dans la **Figure 38** nous permet de mettre en évidence des profils de migration différents en fonction des lignées cellulaires utilisées mais également en fonction du site GATA considéré. Nous notons la présence de deux complexes qui sont uniquement présents dans la lignée K562 et avec les sondes GATAd et GATAc.

Avec les extraits nucléaires des quatre lignées, nous pouvons noter la formation de quatre complexes. Nous nommerons arbitrairement, C1 à C4, ces complexes (**Figure 38**).

- Dans la lignée Jurkat : le complexe C1 a pu être observé avec les trois sondes avec une intensité plus élevée pour les sondes GATAp et GATAc. Le complexe C2 n'apparaît qu'avec les sondes GATAp et GATAc. Les complexes C3 et C4 sont absents.
- Dans la lignée U937 : les complexes C1 et C2 ont pu être observés avec les trois sondes GATAd, GATAp, GATAc.
- Dans la lignée Raji : seul le complexe C1 a pu être observé avec chaque sonde.
- Dans la lignée K562 : les complexes C1, C2, C3 et C4 ont pu être observés. Avec la sonde distale, les complexes C1, C3 et C4 sont observés. L'intensité des bandes est assez variable, mais d'une manière générale C1 est relativement plus faible que les complexes C3 et C4. Toutefois C3 reste nettement majoritaire. Pour la sonde proximale, seuls les complexes C1 et C2 sont présents. En ce qui concerne la sonde consensus, elle présente dans ce type de lignée un profil d'activité liante très comparable à celui de la sonde distale.

II. 3. 1. 2- Activité liante des séquences GATA mutées

Nous avons ensuite étudié le profil de liaison avec des sondes homologues mutées et appelées respectivement GATAdm, GATApm et GATAcm. Ces sondes radiomarquées ont été incubées avec les extraits nucléaires des différentes lignées et les complexes formés entre les protéines et l'ADN ont été séparés par électrophorèse dans un gel à 5 % de polyacrylamide puis analysés par autoradiographie. Les résultats de cette analyse sont présentés sur l'autoradiogramme de la **Figure 39**.

La mutation des différentes sondes utilisées au niveau de leur séquence GATA, entraîne une modification du profil de liaison dans les différentes lignées et ne laisse plus apparaître qu'un seul complexe retardé, le complexe C1, dans les quatre lignées cellulaires.

152



<u>Figure 38</u> : Activité liante des facteurs nucléaires des différentes lignées leucémiques avec les sondes GATA distale, proximale et consensus.

10 μ g d'extraits nucléaires des lignées Jurkat, U937, Raji ou K562, ont été incubés pendant 30 min. à 4°C avec les sondes GATA distale (d), proximale (p) ou consensus (c) radiomarquées. Les interactions protéine-ADN ont été analysées par retard de migration sur gel. Quatre complexes (C1, C2, C3, C4) ont été mis en évidence. Les profils de liaison sont représentatifs de 3 expériences.



<u>Figure 39</u> : Activité liante des facteurs nucléaires des différentes lignées leucémiques avec les sondes GATA mutées.

10 μ g d'extraits nucléaires des lignées Jurkat, U937, Raji ou K562, ont été incubés pendant 30 min. à 4°C avec les sondes GATA distale mutée (dm), proximale mutée (pm) ou consensus mutée (cm) radiomarquées. Un complexe C1 a été mis en évidence. Les interactions protéine-ADN ont été analysées par retard de migration sur gel. Les profils de liaison sont représentatifs de 3 expériences.

En conclusion, ces résultats montrent que les séquences GATA du promoteur du gène de la GSTP1-1 peuvent fixer différents complexes protéiques *in vitro* et qu'il existe des différences entre les profils des lignées leucémiques étudiées.

Le profil de liaison de la lignée K562 présente des complexes (C3 et C4) qui sont absents des autres lignées. De plus, le profil de la sonde GATAd est très semblable à celui de la sonde GATAc. Or la sonde GATAc doit logiquement être capable de fixer des facteurs de la famille GATA. En revanche, ces complexes disparaissent avec les sondes mutées. Au vu de ces résultats, il nous a paru intéressant d'étudier la capacité de liaison des facteurs nucléaires de la lignée K562 en particulier du facteur GATA-1 impliqué dans la différenciation érythroïde de cette lignée.

II. 3. 2- Caractérisation des complexes oligonucléoprotéiques dans les cellules K562

II. 3. 2. 1- Mise au point

Au cours des premières tentatives d'étude de l'activité liante dans la lignée K562 avec la sonde GATAd, nous avons constaté que l'intensité de ces complexes était très faible.

Différentes expériences ont été effectuées, en faisant varier le temps et la température d'incubation du mélange ADN-facteurs nucléaires. Il s'est avéré que cette modulation du signal était corrélée à ces deux paramètres.

Des extraits nucléaires de cellules K562 ont été incubés dans différentes conditions avec la sonde GATAd radiomarquée. L'effet du temps et de la température d'incubation sur l'activité liante est présenté dans la **Figure 40**.

On peut noter une diminution de l'intensité du signal avec l'augmentation de la température d'incubation, mais on remarquera toutefois l'importance du temps d'incubation pour obtenir un signal optimal. En effet, celui-ci ne doit pas être trop prolongé au risque d'avoir une diminution du signal des complexes C3 et C4.

Ainsi, nous avons retenu une incubation de 15 min. à 4°C pour la suite des expériences de retard de migration sur gel.



Figure 40 : Effet du temps et de la température d'incubation sur l'activité liante des protéines nucléaires de la lignée K562.

10 μ g d'extraits nucléaires des cellules K562, ont été incubés avec la sonde GATA distale radiomarquée. L'effet du temps et de la température d'incubation sur l'interaction protéine-ADN ont été analysés par retard de migration sur gel.

II. 3. 2. 2- Mise en évidence de la spécificité des complexes C3/C4 par compétition de sondes

Afin de déterminer plus précisément la spécificité des bandes obtenues avec la sonde GATAd et les extraits des cellules K562, nous avons réalisé des expériences de compétition en ajoutant aux extraits nucléaires un excès molaire d'oligonucléotides froids.

Si une protéine se lie spécifiquement à la sonde, elle va se lier de préférence à la sonde froide présente en excès et par conséquent l'intensité de la bande radioactive que l'on observait sur le gel va diminuer, voire disparaître. Si la liaison est non spécifique, il n'y a pas de compétition et la bande se maintient.

Des extraits nucléaires de la lignée K562, ont été pré-incubés en présence ou non d'un excès molaire de 50 fois de sonde froide GATAd, GATAdm ou GATAc, puis incubés avec la sonde GATA distale radiomarquée.

Les résultats de cette expérience de compétition sont présentés sur l'autoradiogramme de la **Figure 41**. On peut noter une disparition presque totale du signal des complexes C3 et C4 dans le cas des compétitions avec les sondes froides GATAd et GATAc, alors que l'intensité du signal du complexe C1 n'est pratiquement pas affectée par ces compétitions.

En revanche, dans le cas d'une compétition non spécifique, avec la sonde GATAdm, le signal des complexes C3 et C4 ainsi que celui du complexe C1 n'est pratiquement pas affecté.

Ces résultats suggèrent que le complexe C1 n'est pas spécifique alors que les complexes C3 et C4 sont spécifiques de la sonde GATAd.

II. 3. 3- Identification des protéines formant le complexe

Afin d'identifier les facteurs nucléaires de la lignée K562 qui se lient à la sonde GATAd, nous avons réalisé des expériences de supershift. Nous avons dans un premier temps supposé qu'il pouvait s'agir du facteur GATA-1. En effet, ce facteur est assez fortement exprimé dans la lignée K562. Il est connu pour jouer un rôle majeur dans les mécanismes de différenciation du système hématopoïétique et son expression est régulée au cours de ces processus.

Ainsi, 10 μ g d'extraits nucléaires de la lignée K562, ont été pré-incubés en présence ou en absence de 2 μ g d'anticorps anti-GATA-1 puis incubés avec la sonde GATAd ou GATAc radiomarquées dans les conditions préconisées par le fabricant.

Les résultats (**Figure 42-A**) montrent, aussi bien avec la sonde GATAd qu'avec la sonde GATAc, un supershift du complexe C3. Par contre, les complexes C1 et C4 ne sont pas affectés par la présence de l'anticorps anti-GATA-1.

Dans un second temps, nous avons voulu vérifier que les complexes C1 et C4 obtenus avec la sonde GATAd, n'étaient pas dus à d'autres facteurs de transcription de la famille GATA et que le supershift observé est bien spécifique de GATA-1.

Pour cela, 10 μ g d'extraits nucléaires de la lignée K562, ont été pré-incubés en présence ou en absence de 2 μ g de différents anticorps de la famille GATA (anti-GATA-2 et anti-GATA-3) ainsi que d'autres anticorps dirigés contre des facteurs de transcription n'appartenant pas à cette famille (anti-NF- κ B, anti-Sp1, anti-IgG) puis incubés avec la sonde GATAd.

Les résultats (**Figure 42-B**) ne montrent aucune variation significative de l'intensité quelque soit le complexe considéré ou l'anticorps utilisé.

Au vu de ces résultats, nous pouvons conclure que le complexe C1, qui est présent sur chacune des sondes et dans toutes les lignées leucémiques utilisées, correspond à une interaction non spécifique avec le site GATA.

Les complexes C3 et C4 ne sont présents que dans les extraits de la lignée K562 avec la sonde GATAd, ils sont déplacés dans les expériences de compétition (Figure 41). Ces complexes sont donc spécifiques.

Les expériences de supershift ont permis d'identifier le facteur GATA-1 dans le complexe C3.

L'ensemble de ces résultats suggère que le site GATA distal interagit spécifiquement avec le facteur GATA-1, pour former le complexe C3.



Figure 41 : Mise en évidence de la spécificité des complexes C3 et C4 obtenues avec la sonde GATAd et les extraits de cellules K562 par compétition avec des sondes froides.

10 μ g d'extraits nucléaires de la lignée K562, ont été pré-incubés pendant 15 min. à 4°C avec ou non un excès molaire (50 fois) de sonde froide GATA distale (D), distale mutée (Dm) ou consensus (C), puis incubés 15 min. à 4°C avec la sonde GATA distale radiomarquée. Les profils de liaison sont représentatifs de 3 expériences.



<u>Figure 42</u> : Identification des protéines contenues dans les complexes de liaison obtenus avec la sonde GATA distale et les extraits nucléaires de cellules K562.

(A) 10 μ g d'extraits nucléaires de la lignée K562, ont été pré-incubés pendant 15 min. à 4°C en présence ou en absence de 2 μ g d'anticorps anti-GATA-1 puis incubés pendant 15 min. à 4°C avec la sonde GATA distale ou consensus radiomarquées. (B) 10 μ g d'extraits nucléaires de la lignée K562, ont été pré-incubés pendant 15 min. à 4°C en présence ou en absence de 2 μ g de différents anticorps puis incubés pendant 15 min. à 4°C avec la sonde GATA distale. Les profils de liaison présentés sont représentatifs de 3 expériences.

160

II. 4- Etude de la capacité de liaison de GATA-1 aux sites GATAd et GATAp du promoteur de la GSTP1-1 dans les cellules K562 induites à se différencier

Dans la première partie de nos travaux, nous avons mis en évidence des variations de l'expression du gène de la GSTP1-1 au cours de l'induction de la différenciation des cellules K562.

Ensuite, nous avons montré l'existence d'un site GATA dans le promoteur du gène de la GSTP1-1, susceptible de fixer de manière spécifique le facteur GATA-1 dans la lignée cellulaire K562.

Nous avons poursuivi cette étude en examinant si la liaison du facteur GATA-1 sur le nouveau site GATAd du promoteur de la GSTP1-1 pouvait être modulée par des agents différenciants.

II. 4. 1- Etude de la capacité de liaison aux sites GATA après induction de la différenciation érythroïde par les anthracyclines

10 μ g de facteurs nucléaires de cellules K562 traitées par des concentrations différenciantes d'acla (20 nM) ou de dox (40 nM) pendant 6 jours ont été incubés avec la sonde GATAd radiomarquée et analysés par retard de migration sur gel (**Figure 43-A**). La figure montre qu'il n'y a pas de variation importante de l'intensité du complexe C1 ; en revanche, on note des variations importantes dans l'intensité du signal des complexes C3/GATA-1 et C4. La quantification du signal du complexe C3/GATA-1 (**Figure 43-B**) permet de mettre en évidence :

- une induction de 30 à 70 % du complexe C3/GATA-1 dès le premier jour de traitement dans le cas de l'acla,.
- une diminution de 25 à 40 % du complexe C3/GATA-1 au cours du traitement dans le cas de la dox.

De plus, l'induction de la différenciation érythroïde par les anthracyclines ne conduit pas à la formation de nouveaux complexes. L'étude de l'activité liante au niveau de la séquence GATAp, dans de telles conditions de traitement, n'a pas permis de mettre en évidence de variations significatives (résultat non montré).



B



(voir légende page suivante)



С

<u>Figure 43</u> : Modulation de l'activité liante des facteurs nucléaires des cellules K562 au cours de 6 jours d'induction de la différenciation érythroïde par les anthracyclines.

10 μ g d'extraits nucléaires de cellules K562, traitées pendant 1 à 6 jours par des concentrations différenciantes d'acla (20 nM) ou de dox (40 nM), ont été incubés pendant 15 min. à 4°C avec la sonde GATA distale radiomarquée. Les complexes formés ont été analysés par retard de migration sur gel (A). L'intensité de l'activité liante GATA-1 a été analysée par un appareil Kodak (image station 440cf) et quantifiée par le logiciel Kodak 1D image analysis, où l'intensité de chaque témoin est rapportée à 1 (B). 10 μ g d'extraits nucléaires de la lignée K562 traitée ou pas pendant un jour avec 20 nM d'aclarubicine, ont été pré-incubés pendant 15 min. à 4°C en présence ou en absence de 2 μ g d'anticorps anti-GATA-1 puis incubés pendant 15 min. à 4°C avec la sonde GATA distale radiomarquée. Les profils de liaison présentés sont représentatifs de 3 expériences.

Des expériences de supershift avec l'anticorps anti-GATA-1 sur des extraits nucléaires de cellules K562 traitées par l'alcla après un jour d'induction (**Figure 43-C**), ont permis de montrer que l'augmentation observée au niveau du complexe C3 correspond bien à une augmentation de la capacité de liaison du facteur de transcription GATA-1 au site distal.

II. 4. 2- Etude des effets de l'hémine au niveau transcriptionnel et posttranscriptionnel après induction de la différenciation érythroïde

II. 4. 2. 1- Etude de la capacité de liaison aux sites GATA après induction de la différenciation érythroïde par l'hémine

10 μ g de facteurs nucléaires de cellules K562 traitées par l'hémine (30 μ M) pendant 1 à 5 jours, ont été incubés avec la sonde GATAd radiomarquée et analysés par retard de migration sur gel (**Figure 44-A**).

Ces résultats montrent qu'il n'y a pas de variation significative de l'intensité du complexe C1 ; en revanche, nous notons, une augmentation transitoire au premier jour de traitement suivie d'une forte diminution du signal C3/GATA-1 et C4 dès le troisième jour de traitement.

De plus, il n'y a pas de formation de nouveaux complexes suite à l'induction de la différenciation érythroïde par l'hémine.

L'étude de l'activité liante au niveau de la séquence GATA proximale, dans de telles conditions de traitement, n'a pas permis de mettre en évidence de variations significatives (résultat non montré).

Des expériences de supershift avec l'anticorps anti-GATA-1 réalisées sur des extraits nucléaires de cellules K562 traitées par l'hémine (30 μ M) pendant un jour (**Figure 44-B**), ont permis de montrer que l'augmentation observée au niveau du complexe C3 correspond bien à une augmentation de la capacité de liaison du facteur de transcription GATA-1 au site distal.



<u>Figure 44</u> : Modulation de l'activité liante des facteurs nucléaires des cellules K562 au cours de 5 jours d'induction de la différenciation érythroïde par l'hémine.

10 μ g d'extraits nucléaires de cellules K562, cultivées pendant 1 à 5 jours dans du milieu seul ou additionné de 30 μ M d'hémine, ont été incubés pendant 15 min. à 4°C avec la sonde GATA distale radiomarquée. Les complexes formés ont été analysés par retard de migration sur gel (A). 10 μ g d'extraits nucléaires de la lignée traitées ou non avec 30 μ M d'hémine, ont été pré-incubés pendant 15 min. à 4°C en présence ou en absence de 2 μ g d'anticorps anti-GATA-1 puis incubés pendant 15 min. à 4°C avec la sonde GATA distale radiomarquée. Les profils de liaison présentés sont représentatifs de 3 expériences.

II. 4. 2. 2- Effet de l'induction de la différenciation érythroïde par l'hémine sur l'expression de l'ARNm de GATA-1

La différenciation érythroïde des cellules K562 induite par 30 μ M d'hémine a permis de montrer une augmentation de l'expression du gène de GSTP1-1.

Contrairement à ce que nous avons observé avec l'acla, l'activité liante du facteur GATA-1 au site GATAd est augmentée de manière transitoire après un jour de traitement par l'hémine puis diminue fortement en fonction du temps.

Nous nous sommes interrogés sur l'origine de cette diminution et par conséquent si le phénomène observé était dû à une baisse de l'expression du facteur GATA-1 ou à une baisse de sa fixation sans modification de son expression.

Afin de vérifier ces hypothèses, nous avons analysé l'effet de la différenciation érythroïde induite par l'hémine sur l'expression de l'ARNm de GATA-1 par RT-PCR.

Ainsi, 5 μ g d'ARN totaux de cellules K562 traitées pendant 5 jours par 30 μ M d'hémine ont été soumis à une reverse transcription. Les ADNc produits ont été amplifiés par PCR (20 cycles) à l'aide d'amorces spécifiques du gène GATA-1. Le gène S14 a été utilisé comme contrôle interne. Les produits d'amplification ont été séparés par électrophorèse dans un gel d'agarose à 2 % en présence de bromure d'éthidium (**Figure 45-A**).

La quantification des résultats (**Figure 45-B**) montre une diminution de l'expression de l'ARNm de GATA-1 en fonction du temps de traitement par l'hémine.

En conclusion, il existe une corrélation entre la diminution de la capacité de liaison de GATA-1 au promoteur GSTP1-1 et l'expression de l'ARNm de ce facteur au cours de la différenciation érythroïde induite par l'hémine dans les cellules K562.

En revanche, cette diminution de l'expression de GATA-1 n'est pas corrélée à l'augmentation d'expression de GSTP1-1 observée dans ces conditions de traitement.





<u>Figure 45</u> : Expression de l'ARNm de GATA-1 dans les cellules K562 au cours de 5 jours d'induction de la différenciation érythroïde par l'hémine.

Les ARN totaux de cellules K562 cultivées pendant 1 à 5 jours dans du milieu seul ou additionné de 30 μ M d'hémine, ont été soumis à une transcriptase inverse. Les ADNc obtenus ont été soumis à une amplification par PCR (20 cycles) en utilisant les amorces sens et antisens spécifiques du gène GATA-1. Le gène S14 a été amplifié pour contrôler la quantité d'ADNc utilisée dans chaque réaction. Les produits d'amplification ont été séparés par életrophorèse dans un gel d'agarose à 2 % coloré au bromure d'éthidium (A), ces données sont représentatives de trois expériences. Les résultats de la PCR sont exprimés, après analyse par un appareil Kodak (image station 440cf) et quantification par le logiciel Kodak 1D image analysis, comme le ratio entre les signaux d'amplification de GATA-1 et S14 (B), ces données représentent la moyenne \pm l'écart-type de trois expériences indépendantes. * et ** correspondent respectivement à p<0,05 et à p<0,01 par rapport au témoin.

Résultats

<u>II. 4. 2. 3- Etude de la liaison des facteurs NF- κ B et AP-1 au promoteur</u> de la GSTP1-1 après induction de la différenciation érythroïde par l'hémine

Afin de déterminer si l'augmentation d'expression du gène GSTP1-1 (**Figure 18**) pouvait être due à d'autres facteurs de transcription que GATA-1, nous avons étudié la capacité de liaison des extraits nucléaires de cellules K562 aux séquences NF- κ B et AP-1 du promoteur du gène de GSTP1-1 au cours de la différenciation érythroïde induite par l'hémine dans les cellules K562.

10 μ g de facteurs nucléaires de cellules K562 traitées par 30 μ M d'hémine pendant 5 jours, ont été incubés avec les sondes NF-κB-323 (**Figure 46-A**) et AP-1-73 (**Figure 47-A**) radiomarquées et analysées par retard de migration sur gel. Ces résultats montrent que les extraits nucléaires des cellules traitées par l'hémine ne contiennent pas de facteurs protéiques reconnaissant ces séquences.

De plus, il n'y a pas formation de nouveaux complexes après l'induction de la différenciation érythroïde par l'hémine.

Parallèlement, des expériences de supershift avec les anticorps anti-p50 (**Figure 46-B**) et anti-cjun (**Figure 47-B**) sur des facteurs de cellules K562 traitées respectivement avec 10 ng/mL de TNF α (20 min.) et 100 nM de TPA (30 min.), des inducteurs typiques de NF- κ B et AP-1, ont permis d'identifier le complexe qui correspond à la liaison du facteur de transcription considéré au promoteur de la GSTP1-1.

En conclusion, l'étude de l'activité liante au niveau des séquences NF-κB et AP-1 au cours de la différenciation érythroïde induite par l'hémine dans les cellules K562, n'a pas permis de mettre en évidence de variations aux niveaux de leur liaisons respectives.

Ainsi, l'augmentation de l'expression de la GSTP1-1 observée dans de telles conditions de traitement ne peut pas être expliquée par l'activité liante de ces facteurs ni par celle de GATA-1. Ces résultats suggèrent une régulation post-transcriptionnelle de l'expression de la GSTP1-1 par l'hémine.





10 μ g d'extraits nucléaires de cellules K562, cultivées pendant 1 à 5 jours dans du milieu seul ou additionné de 30 μ M d'hémine, ont été incubés pendant 30 min. à 4°C avec la sonde NF- κ B-323 radiomarquée. Les complexes formés ont été analysés par retard de migration sur gel (A). 10 μ g d'extraits nucléaires de la lignée K562 traitées ou non pendant 20 min. avec 10 ng/mL de TNF α , ont été pré-incubés pendant 30 min. à 4°C en présence ou en absence de 2 μ g d'anticorps anti-p50 puis incubés pendant 30 min. à 4°C avec la sonde NF- κ B-323 radiomarquée. Les profils de liaison présentés sont représentatifs de 3 expériences.



<u>Figure 47</u> : Etude de l'activité liante des facteurs nucléaires de cellules K562 à la sonde AP-1-73 au cours de 5 jours d'induction de la différenciation érythroïde par l'hémine.

10 μ g d'extraits nucléaires de cellules K562, cultivées pendant 1 à 5 jours dans du milieu seul ou additionné de 30 μ M d'hémine, ont été incubés pendant 30 min. à 4°C avec la sonde AP-1-73 radiomarquée. Les complexes formés ont été analysés par retard de migration sur gel (A). 10 μ g d'extraits nucléaires de la lignée K562 traitées ou non pendant 30 min. avec 100 nM de TPA, ont été pré-incubés pendant 30 min. à 4°C en présence ou en absence de 2 μ g d'anticorps anti-cjun puis incubés pendant 30 min. à 4°C avec la sonde AP-1-73 radiomarquée. Les profils de liaison présentés sont représentatifs de 3 expériences.

Résultats

II. 4. 2. 4- Etude de la stabilité de l'ARNm de GSTP1-1 au cours de la différenciation érythroïde induite par l'hémine

Le traitement par 30 μ M d'hémine induit la différenciation érythroïde des cellules K562 qui s'accompagne d'une faible augmentation de l'expression du gène de GSTP1-1. Il ne semble pas que cette augmentation puisse être corrélée à une activation de l'activité liante des facteurs de transception GATA-1, NF- κ B et AP-1 sur le promoteur du gène GSTP1-1. Par contre l'accumulation de l'ARNm de GSTP1-1 pourrait résulter d'une augmentation de sa durée de vie.

Pour étudier la stabilité de l'ARNm de GSTP1-1, nous avons utilisé la méthode de l'inhibition de transcription par un inhibiteur de l'ARN polymérase, l'actinomycine D. Dans ces conditions, la dégradation des ARNm n'est plus compensée par la néosynthèse durant la transcription. Il est donc possible d'évaluer leur demi-vie relative et de vérifier si celle-ci est modifiée au cours du traitement par un inducteur.

Nous avons mesuré la demi-vie du transcrit de GSTP1-1 au cours de la différenciation érythroïde des cellules K562 induite par l'hémine. Les ARN totaux sont extraits à différents temps (24, 32, 48, 56 et 72 h) après l'addition de 5 μ g/mL d'actinomycine D aux cellules traitées ou non pendant 48h avec 30 μ M d'hémine. Les ARN ont été analysés par northern blot avec la sonde d'ADNc de GSTP1-1 (**Figure 48-A**).

La quantification des signaux obtenus est présentée dans la **Figure 48-B**. Ces expériences nous ont permis d'évaluer à environ 46 h la demi-vie de l'ARNm de GSTP1-1 dans les cellules K562 non traitées. La demi-vie du transcrit se trouve fortement augmentée dans le cas d'un traitement de 48 h par l'hémine, puisque cette valeur passe de 46 h à environ 83 h.

En conclusion, l'augmentation de la stabilité de l'ARNm de GSTP1-1 permet d'expliquer l'augmentation d'expression de la GSTP1-1 observée au cours de la différenciation érythroïde induite par l'hémine dans les cellules K562.



<u>Figure 48</u> : Etude de la stabilité de l'ARNm de GSTP1-1 dans les cellules K562 après 48 h de traitement par l'hémine.

Les ARN totaux ont été extraits après traitement des cellules K562 pendant 24, 32, 48, 56, 72 h avec 5 μ g/mL d'actinomycine D après 48 h d'induction de la différenciation érythroïde par 30 μ M d'hémine puis ont été analysés par northern blot et hybridés avec la sonde GSTP1-1 (A). Northern blot représentatif de trois expériences indépendantes. Les ARN ribosomiques ont été colorés au bromure d'éthidium et analysés par un appareil Kodak (image station 440cf) et le signal radioactif de la sonde GSTP1-1 a été détecté par un Phosphorimager (Cyclone). Les quantifications ont été réalisées à l'aide du logiciel Kodak 1D image analysis.. Les résultats de ces deux séries sont exprimés en tant que régressions linéaires de la moyenne de trois expériences indépendantes (les écart-types sont présentés) permettant d'évaluer les demi-vies respectives de l'ARNm de GSTP1-1 (B).

II. 4. 3- Etude de la capacité de liaison aux sites GATA après induction de la différenciation mégacaryocytaire par le TPA

 $10 \ \mu g$ d'extraits nucléaires de cellules K562 traitées par 10 nM de TPA pendant 1 à 6 jours, ont été incubés avec la sonde GATAd radiomarquée et analysés par retard de migration sur gel (**Figure 49**).

Ces résultats montrent qu'il n'y a pas de variation significative de l'intensité du complexe C1 ; en revanche, on note une forte diminution du signal C3/GATA-1 et C4.

De plus, il n'y a pas de formation de nouveaux complexes après l'induction de la différenciation mégacaryocytaire par le TPA.

L'étude de l'activité liante au niveau de la séquence GATAp, dans de telles conditions de traitement, n'a pas permis de mettre en évidence de variations significatives (résultat non montré).

En conclusion, au cours de la différenciation mégacaryocytaire induite par le TPA dans les cellules K562, il y a une corrélation entre la diminution de la capacité de liaison de GATA-1 au promoteur de la GSTP1-1 et l'expression de cette enzyme.

II. 4. 4- Etude des effets du butyrate au niveau transcriptionnel et posttranscriptionnel au cours de la différenciation érythroïde

II. 4. 4. 1- Etude de la capacité de liaison aux sites GATA de la GSTP1-1 au cours de la différenciation par le butyrate

10 μ g de facteurs nucléaires de cellules K562 traitées par 1 mM ou 2 mM de butyrate pendant 1 à 6 jours, ont été incubés avec la sonde GATAd radiomarquée et analysés par retard de migration sur gel (**Figure 50**).

Ces résultats montrent une forte diminution du signal C3/GATA-1 et C4 pour les trois premiers jours de traitement. Néanmoins, la baisse observée est plus importante dans le cas de l'induction de la différenciation mégacaryocytaire (2 mM) que dans celui de l'induction de la différenciation érythroïde (1 mM) au cours des trois premiers jours de traitement.


Figure 49 : Modulation de l'activité liante des facteurs nucléaires extraits des cellules K562 après 6 jours d'induction de la différenciation mégacaryocytaire par le TPA.

10 μ g d'extraits nucléaires de cellules K562, cultivées pendant 1 à 6 jours dans un milieu seul ou additionné avec 10 nM de TPA, ont été incubés pendant 15 min. à 4°C avec la sonde GATA distale radiomarquée. Les complexes formés ont été analysés par retard de migration sur gel. Les profils de liaison présentés sont représentatifs de 3 expériences.



<u>Figure 50</u> : Modulation de l'activité liante des facteurs nucléaires des cellules K562 au cours de 6 jours d'induction de la différenciation érythroïde et mégacaryocytaire par le butyrate.

10 μ g d'extraits nucléaires de cellules K562, cultivées pendant 1 à 6 jours dans un milieu seul ou additionné de 1 mM ou 2 mM de butyrate, ont été incubés pendant 15 min. à 4°C avec la sonde GATA distale radiomarquée. Les complexes formés ont été analysés par retard de migration sur gel. Les profils de liaison présentés sont représentatifs de 3 expériences.

En revanche si la diminution de l'activité liante du facteur GATA-1 observée avec la concentration de 2 mM est maintenue au cours du quatrième, cinquième et sixième jours de traitement, cette activité est induite avec la concentration de 1 mM.

Dans des conditions identiques, l'étude de l'activité liante au niveau de la séquence GATAp, n'a pas révélé de variation significative (résultat non montré).

II. 4. 4. 2- Etude de l'induction de la différenciation par le butyrate sur l'expression de l'ARNm de GATA-1 et GATA-2

Les différenciations érythroïde et mégacaryocytaire des cellules K562 induites par le butyrate s'accompagnent d'une diminution de l'expression de l'ARNm du gène de GSTP1-1 avec néanmoins une baisse plus précoce et plus rapide dans le cas de l'induction de la différenciation mégacaryocytaire. Cette diminution d'expression est corrélée à une baisse de l'activité liante GATA-1 sur la sonde distale pour la totalité du temps de traitement par 2 mM de butyrate. En revanche, pour l'induction de la différenciation érythroïde, cette diminution n'est corrélée que durant les trois premiers jours de traitement, puisque une induction de l'activité liante du facteur GATA-1 peut être observée par la suite.

Nous avons donc voulu savoir à quoi était liée cette diminution et par conséquent si le phénomène observé était dû à une baisse de l'expression du facteur GATA-1 ou à une baisse de sa fixation sans modification de son expression.

Afin de vérifier si la baisse de l'activité liante du facteur GATA-1 sur le promoteur de la GSTP1-1 est corrélée à l'expression de son transcrit, nous avons analysé l'effet de la différenciation érythroïde et mégacaryocytaire induite par le butyrate sur l'expression de l'ARNm de GATA-1 par RT-PCR. Nous nous sommes également intéressés à l'expression du transcrit du facteur GATA-2.

Ainsi, 5 μ g d'ARN totaux de cellules K562 traitées pendant 1 à 4 jours par 2 mM de butyrate ou pendant 1 à 3 jours par 1 mM de butyrate ont été soumis à une transcription inverse. Les ADNc produits ont été amplifiés par PCR (20 cycles) à l'aide d'amorces spécifiques des gènes GATA-1 et GATA-2. Le gène S14 a été utilisé comme référence. Les produits d'amplification ont été séparés par électrophorèse dans un gel d'agarose à 2 % en présence de bromure d'éthidium (**Figure 51-A**).

176



B



<u>Figure 51</u> : Expression de l'ARNm de GATA-1 et GATA-2 dans les cellules K562 au cours de l'induction de la différenciation par le butyrate.

Les ARN totaux de cellules K562 cultivées dans du milieu seul ou additionné de 1 mM (pendant 1 à 3 jours) ou 2 mM (pendant 1 à 4 jours) de butyrate, ont été soumis à une transcriptase inverse. Les ADNc obtenus ont été soumis à une amplification par PCR (20 cycles) en utilisant les amorces sens et antisens spécifiques des gènes GATA-1 et GATA-2. Le gène S14 a été amplifié pour contrôler la quantité d'ADNc utilisée dans chaque réaction. Les produits d'amplification ont été séparés par électrophorèse dans un gel d'agarose à 2 % coloré au bromure d'éthidium (A), ces données sont représentatives de trois expériences. Les résultats de la PCR sont exprimés, après analyse par un appareil Kodak (image station 440cf) et quantification par le logiciel Kodak 1D image analysis, comme le ratio entre les signaux d'amplification de GATA-1 ou GATA-2 et S14 (B), ces données représentent la moyenne \pm l'écart-type de trois expériences indépendantes. * et ** correspondent respectivement à p<0,05 et à p<0,01 par rapport au témoin.

La quantification des résultats concernant la différenciation érythroïde induite par le butyrate à 1 mM (**Figure 51-B**) montre une légère diminution en fonction du temps de traitement de l'expression de l'ARNm de GATA-1 qui au deuxième et troisième jour de traitement baisse respectivement de 22 % (p<0.05) et 35 % (p<0.01), sans variation significative de l'expression de l'ARNm de GATA-2.

Pour une concentration de 2 mM de butyrate on observe, en fonction du temps, une diminution de l'expression de l'ARNm de GATA-2 avec une baisse maximale de 75 % (p<0,01) après le quatrième jour de traitement. En ce qui concerne l'expression de GATA-1, une baisse de 45 % (p<0,01) peut également être observée avec ce temps de traitement.

En conclusion, au cours de la différenciation érythroïde et mégacaryocytaire induite par le butyrate, l'expression de GATA-1 dans les cellules K562, n'est pas suffisante pour expliquer les différences observées entre les concentrations de 1 mM et 2 mM au niveau de l'expression de l'ARNm de GSTP1-1.

> <u>II. 4. 4. 3- Etude de la capacité de liaison des facteurs AP-1 et NF-κB</u> <u>au promoteur de la GSTP1-1 après induction de la différenciation par le</u> <u>butyrate</u>

Afin de déterminer si la diminution d'expression du gène GSTP1 au niveau transcriptionnel pouvait être mis en jeu *via* d'autres facteurs de transcription que ceux appartenant à la famille GATA, nous avons étudié l'effet de la différenciation érythroïde et mégacaryocytaire induite par le butyrate dans les cellules K562 sur la capacité de liaison des facteurs de transcriptions NF- κ B et AP-1.

10 μ g de facteurs nucléaires de cellules K562 traitées par 1 ou 2 mM de butyrate pendant 1 à 6 jours, ont été incubés pendant 30 min. à 4°C avec les sondes NF- κ B et AP-1 du gène de la GSTP1-1 et les sondes NF- κ B et AP-1 consensus radiomarquées et analysées par retard de migration sur gel (**Figure 52**).



(voir légende page suivante)



Figure 52 : Modulation de l'activité liante des facteurs nucléaires des cellules K562 au cours de 6 jours d'induction de la différenciation érythroïde et mégacaryocytaire par le butyrate.

10 μ g d'extraits nucléaires de cellules K562, cultivées pendant 1 à 6 jours dans un milieu seul ou additionné de 1 mM ou 2 mM de butyrate, ont été incubés pendant 30 min. à 4°C avec les sondes oligonucléotidiques radiomarquées. Les complexes formés ont été analysés par retard de migration sur gel. Sonde AP1-73 du promoteur du gène de la GSTP1-1 (A), sonde AP1 consensus (B), sonde NF-κB-323 (C), sonde NF-κB consensus (D). Les profils de liaison sont représentatif de deux expériences indépendantes.

Ces résultats montrent que l'induction de la différenciation des cellules K562 par le butyrate n'entraîne pas d'interaction entre les facteurs de transcription AP-1 (**Figure 52-A et B**) et NF-κB (**Figure 52-C et D**) et le promoteur de la GSTP1-1.

De plus, il n'y a pas formation de nouveaux complexes après l'induction de la différenciation érythroïde et mégacaryocytaire par le butyrate.

En conclusion, l'étude de l'activité liante au niveau des séquences NF-KB et AP-1, au cours de l'induction de la différenciation érythroïde et mégacaryocytaire des cellules K562 traitées respectivement par 1 mM et 2 mM de butyrate, n'a pas permis de mettre en évidence de variations aux niveaux de leur activité liante respective.

II. 4. 4 . 4- Etude de la stabilité de l'ARNm de GSTP1-1 au cours de la différenciation induite par le butyrate

Nous avons pu observer que les traitements par le butyrate 1 mM et 2 mM, induisant respectivement la différenciation érythroïde et mégacaryocytaire des cellules K562, conduisent à une diminution de l'expression du gène de GSTP1-1. Cette diminution est partiellement corrélée à l'activité liante du facteur de transcription GATA-1. En effet, le butyrate entraîne une baisse de l'expression de l'ARNm de GATA-1, mais les différences concernant ces diminutions observées entre les concentrations de 1 mM et 2 mM, ne peuvent toutefois pas être totalement expliquées par l'expression du facteur GATA-1.

De même, l'activité liante des facteurs NF-κB et AP-1 sur le promoteur du gène GSTP1-1, ne permet pas d'expliquer les résultats obtenus. Ainsi, nous avons envisagé la possibilité que la diminution de l'ARNm de GSTP1-1 observée soit le résultat d'une déstabilisation de son ARNm. Afin d'étudier la stabilité de l'ARNm de GSTP1-1, nous avons utilisé l'actinomycine D.

Nous avons évalué la demi-vie de l'ARNm de GSTP1-1 au cours de l'induction de la différenciation des cellules K562 par le butyrate. Les ARN totaux ont été extraits à différents temps (8, 24, 32 et 48 h) après l'addition de 5 μ g/mL d'actinomycine D aux cellules traitées ou non pendant 48 h avec 1 ou 2 mM de butyrate. Les ARN ont été analysés par northern blot avec la sonde d'ADNc de GSTP1-1 (**Figure 53-A**).





Les ARN totaux ont été extraits après traitement des cellules K562 pendant 8, 24, 32 et 48 h avec 5 μ g/mL d'actinomycine D suivant 48 h d'induction de la différenciation érythroïde et mégacaryocytaire par le butyrate 1 mM et 2 mM puis ont été analysés par northern blot et hybridés avec la sonde GSTP1-1 (A). Northern blot représentatif de trois expériences indépendantes. Les ARN ribosomiques ont été colorés au bromure d'éthidium et analysés par un appareil Kodak (image station 440cf) et le signal radioactif de la sonde GSTP1-1 a été détecté par un Phosphorimager (Cyclone). Les quantifications ont été réalisées à l'aide du logiciel Kodak 1D image analysis. Les résultats de ces deux séries sont exprimés en tant que régressions linéaires de la moyenne de trois expériences indépendantes (les écart-types sont présentés) permettant d'évaluer les demi-vies respectives de l'ARNm de GSTP1-1 (B).

La quantification des signaux obtenus est présentée dans la **Figure 53-B**. Ces expériences montrent que la demi-vie de l'ARNm de GSTP1-1 dans les cellules K562 n'est que peu affectée dans les cellules traitées par 1 mM de butyrate (38,7 h) par rapport aux cellules non traitées (43,9 h). Par contre, la demi-vie du transcrit se trouve fortement diminuée dans le cas d'un traitement de 48 h par le butyrate 2 mM, puisque celle-ci est de 21,7 h.

En conclusion, c'est une déstabilisation de l'ARNm de GSTP1-1 qui est à l'origine des différences observées dans l'expression de l'ARNm de la GSTP1-1 au cours de la différenciation érythroïde et mégacaryocytaire induite respectivement par le butyrate 1 mM et 2 mM dans les cellules K562.

II. 5- Effet de l'inhibition de la traduction sur l'activité différenciante et sur la synthèse *de novo* de protéines

Nous avons pu observer qu'un traitement par l'acla (20 nM), la dox (40 nM) ou l'hémine (30 μ M) induisant la différenciation érythroïde des cellules K562, entraîne une augmentation de l'expression du gène de GSTP1-1.

Pour déterminer si les mécanismes à l'origine de cette augmentation sont dépendants d'une synthèse *de novo* de protéines, les cellules K562 ont été traitées par ces inducteurs en présence ou non de cycloheximide (CHX), un inhibiteur de la synthèse protéique. Il est donc possible d'évaluer par cette méthode, si un traitement qui entraîne une induction d'expression, passe par une synthèse *de novo* de protéines ou plutôt par une activation éventuelle de protéines régulatrices.

Les cellules K562 ont été traitées par l'acla (20 nM), la dox (40 nM) ou l'hémine (30 μ M) en présence ou en absence de CHX (5 μ g/mL). La durée de traitement a été de un à deux jours pour la dox et de deux à trois jours pour l'acla et l'hémine.

Ces temps de traitement ont été choisis de manière à limiter les effets cytotoxiques liés à la durée des co-traitements inducteur / CHX, tout en étant suffisant pour obtenir des inductions significatives de l'expression de l'ARNm de GSTP1-1. De plus, le CHX a été ajouté au milieu de culture 2 h avant l'addition de l'inducteur de la différenciation afin d'assurer un blocage de la traduction avant d'activer des effets potentiels dus à l'inducteur sur les cellules. La dose de 5 μ g/mL de CHX a été sélectionnée puisque cette dose est connue pour inhiber totalement la traduction sans avoir un effet cytostatique trop important.

II. 5. 1- Effet du CHX sur la différenciation et la prolifération cellulaire

L'effet d'un inhibiteur de la synthèse protéique sur les caractéristiques cellulaires des cellules K562 induites à se différencier par les inducteurs érythroïdes (acla, dox et hémine) est présenté dans le **Tableau 10**.

<u>Tableau 10</u> : Effets du CHX sur la prolifération cellulaire et l'hémoglobinisation des cellules K562 induites à se différencier vers la voie érythroïde.

L'induction de la différenciation des cellules K562 par l'acla (20 nM), la dox (40 nM) ou l'hémine (30 μ M) a été réalisée en présence ou non de CHX (5 μ g/mL) pendant les temps mentionnés. La mortalité cellulaire et l'inhibition de croissance ont été évaluées par comptage des cellules grâce au test au bleu trypan. La différenciation érythroïde est évaluée par le test à la benzidine. Les résultats représentent la moyenne \pm l'écart-type de trois expériences indépendantes.

	Cellules benzidine positives (%)		Inhibition de croissance (%)		Mortalité cellulaire (%)	
Inducteurs	-	CHX	-	CHX	-	CHX
Aucun-jour 1	0,3±0,3	1,8±0,4	-	100	0,4±0,5	1,4±0,4
Aucun-jour 2	$0,6\pm0,4$	4±0,8	-	100	0,5±0,2	2,8±0,5
Aucun-jour 3	$0,5\pm0,5$	3,1±0,7	-	100	0,8±0,4	2,7±0,4
Dox-jour 1	$10,4\pm 2,4$	4,1±1,3	85,7±3,7	100	1,6±0,6	2,7±0,4
Dox-jour 2	36,4±1,9	4,9±1,4	91,7±1,9	100	3,2±1,2	3,5±1,2
Acla-jour 2	37,0±2,3	4,3±0,9	64,9±3,2	100	2,2±0,8	4,6±0,9
Acla-jour 3	65,1±3,6	5,1±1,0	61,9±3,8	100	3±0,6	3,9±1,1
Hémine-jour 2	90,7±1,4	32±6,7	42,0±3,4	100	1,3±0,5	5,0±1,2
Hémine-jour 3	96,7±1,5	36,9±2,3	45,6±3,3	100	3,5±1,2	5,9±1,2

Ces résultats montrent que le CHX seul n'induit pas la production d'hémoglobine. En revanche, l'hémoglobinisation est très fortement inhibée lorsque un inducteur de la différenciation érythroïde est associé au CHX, avec néanmoins une différence en fonction de l'inducteur considéré. En effet, dans le cas de cellules co-traitées par l'acla ou la dox avec le CHX, le pourcentage de cellules K562 hémoglobinisées devient similaire à un traitement par

le CHX seul. Dans le cas d'un traitement par l'hémine, l'inhibition de l'hémoglobinisation n'est pas totale et environ 35 % de cellules gardent la capacité de synthésider de l'hémoglobine.

Dans ces conditions de traitement, l'inhibition de croissance suite à un traitement par le CHX seul ou associé à un inducteur est de 100 % et est associé à une mortalité cellulaire relativement faible (<10 %), témoignant d'un effet cytotoxique faible des co-traitements inducteur / CHX.

II. 5. 2- Effet du CHX sur l'expression de l'ARNm de GSTP1-1 après induction de la différenciation par les anthracyclines et l'hémine

Après 1 à 3 jours de traitement en fonction de l'inducteur de la différenciation érythroïde utilisé (acla, dox, hémine), les ARN totaux sont extraits des cellules et analysés par northern blot (**Figure 54-A**).

La **Figure 54-B** présente le taux d'expression relatif de l'ARNm de GSTP1-1, au cours des différents co-traitements CHX / inducteur. Ces résultats montrent qu'au cours de la différenciation, l'induction de l'expression de l'ARNm de GSTP1-1 est inhibée par le CHX. En effet, on observe que le CHX seul entraîne une augmentation de l'expression de l'ARNm de GSTP1-1 en fonction du temps mais que le traitement associé à l'inducteur n'induit pas d'augmentation de l'expression de l'ARNm de GSTP1-1 supérieure à celle obtenue dans le cas du CHX seul.

En conclusion, nous avons montré que l'acla, la dox et l'hémine entraînent une augmentation de l'expression de l'ARNm de GSTP1-1 et que quelque soit leur mode d'action, ces différentes molécules activent ou requièrent la synthèse *de novo* de protéines qui interviennent ensuite dans la régulation transcriptionnelle ou posttranscriptionnelle des gènes liés au phénotype érythroïde et des gènes impliqués dans l'expression du gène de GSTP1-1. Néanmoins, il semble que dans le cas de l'hémine, une partie de l'induction de l'hémoglobinisation ne soit pas dépendante d'une synthèse *de novo* de protéines.





<u>Figure 54</u> : Effets du CHX sur l'augmentation de l'expression de l'ARNm de GSTP1-1 induite par l'acla, la dox et l'hémine au cours de la différenciation érythroïde des cellules K562.

10 μ g d'ARN totaux de cellules K562 traitées par des concentrations différenciantes d'acla (20 nM, 2 et 3 jours), de dox (40 nM, 1 et 2 jours) ou d'hémine (30 μ M, 2 et 3 jours) en présence ou non de cycloheximide (CHX, 5μ g/mL) ont été analysés par northern blot et hybridés avec la sonde GSTP1-1 (A). Northern blot représentatif de trois expériences indépendantes. Les ARN ribosomiques ont été colorés au bromure d'éthidium et analysés par un appareil Kodak (image station 440cf) et le signal radioactif de la sonde GSTP1-1 a été détecté par un Phosphorimager (Cyclone). Les quantifications ont été réalisées à l'aide du logiciel Kodak 1D image analysis puis rapportées à la sous-unité 18S de l'ARN ribosomique. (B), quantification de l'expression de l'ARNm de GSTP1-1 dans les cellules K562 par rapport au témoin correspondant. Ces données représentent la moyenne ± l'écart-type de trois expériences indépendantes. ** correspond à p<0,01 par rapport au témoin.

En résumé de cette deuxième partie de nos résultats, l'étude assistée par ordinateur de la séquence promotrice du gène de la GSTP1-1, nous a permis de mettre en évidence deux sites GATA. La caractérisation des sites montre que seules des interactions au niveau du site GATA distal avec des facteurs de la lignée cellulaire K562 sont spécifiques et que l'une d'entre elles fait intervenir le facteur GATA-1.

Les expériences de transfections transitoires avec un plasmide contenant un élément de réponse GATA montre que les agents utilisés pour induire la différenciation dans les cellules K562 sont capables de moduler l'expression d'un ou plusieurs facteurs GATA, en plus de moduler l'expression de la GSTP1-1.

L'étude de l'activité liante après induction de la différenciation érythroïde ou mégacaryocytaire des cellules K562, au niveau des sites GATA du promoteur du gène de la GSTP1-1, n'a pas permis de mettre en évidence de variations significatives au niveau de la séquence proximale. En revanche, de fortes variations ont pu être observées avec la séquence distale. De plus, cette partie confirme la non spécificité du complexe C1. Enfin, cette partie permet de mettre en évidence une implication du facteur GATA-1 dans la régulation transcriptionnelle du gène de GSTP1-1 *via* son interaction avec le site GATA distal puisque une corrélation entre l'expression et l'activité liante du facteur, la voie de différenciation induite et l'expression de la GSTP1-1 peut être observée.

En effet, l'induction de la différenciation érythroïde des cellules K562 par les anthracyclines (acla et dox) s'accompagne d'une augmentation de l'expression de GSTP1-1 et d'une une forte augmentation de l'activité liante de GATA-1 au promoteur dans le cas de l'acla et des variations plus faibles qui tendent vers une diminution de l'activité liante de GATA-1 dans le cas de la dox. L'hémine induit une forte diminution de l'activité liante de GATA-1 au promoteur de la GSTP1-1, après une induction transitoire et précoce, qui est corrélée à une baisse de l'expression du facteur. Ainsi, l'augmentation d'expression de la GSTP1-1 observée est liée à un mécanisme de stabilisation de l'ARNm de GSTP1-1.

La différenciation mégacaryocytaire des cellules K562 induite par le TPA entraîne une baisse très importante de l'activité liante du facteur GATA-1, qui est corrélée à la diminution de l'expression de la GSTP1-1. Par ailleurs, après un traitement par le butyrate à 1 mM ou à 2 mM qui induit respectivement la différenciation érythroïde ou mégacaryocytaire, nous avons montré une diminution de l'expression de la GSTP1-1. Toutefois, la diminution est plus importante et plus précoce avec la concentration de 2 mM. La baisse d'expression observée peut être expliquée par une diminution de l'activité liante de GATA-1 au promoteur de la GSTP1-1 et la différence obtenue entre les concentrations utilisées par une déstabilisation de l'ARNm de GATA-1 qui est plus importante à la concentration de 2 mM.

Enfin, l'utilisation du cycloheximide nous a permis de montrer que l'augmentation d'expression du gène de la GSTP1-1 suite à l'induction de la différenciation érythroïde par l'acla, la dox et l'hémine est dépendante d'une synthèse *de novo* de protéines qui interviennent ensuite dans la régulation transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle des gènes liées au phénotype érythroïde et des gènes impliqués dans l'expression du gène de GSTP1-1. En effet, le CHX inhibe la production d'hémoglobine dans les cellules induites à se différencier et semble empêcher l'induction de l'expression de l'ARNm de GSTP1-1.

III- EFFETS DE LA DIFFERENCIATION ERYTHROÏDE INDUITE PAR LA DOX SUR LE TRANSCRIPTOME

Les inducteurs de différenciation que nous avons utilisés, ont un effet sur l'expression du gène de la GSTP1-1 qui n'est pas un gène spécifique des voies érythroïde et mégacaryocytaire. Ainsi, d'autres gènes sont sans doutes modulés par ces inducteurs au cours de la différenciation érythroïde. Nous avons voulu approfondir l'effet de la dox, un médicament anti-tumoral utilisé en clinique, sur un large éventail de gènes. Pour ce faire, nous avons réalisé une approche génomique par des expériences d'hybridations de micropuces.

Des cellules K562 témoin (T) et des cellules K562 traitées par 40 nM de dox (D) pendant 1, 2 ou 3 jours ont été utilisées au cours de cette étude.

Nous avons réalisé l'hybridation de 9 micropuces qui correspondent respectivement aux 9 études comparatives réalisées à partir des 7 échantillons de cette expérience (**Figure 55**). En effet, chaque lot de cellules K562 traité ou non pendant un temps donné, a été comparé à son témoin respectif mais aussi à des cellules traitées ou témoins pendant un temps plus long et pendant un temps plus court. Le fait d'établir un tel plan d'étude, permet de détecter les variations engendrées par un traitement différenciant induit par la dox par rapport à des cellules témoins mais également de mettre en évidence des variations au cours du temps afin de détecter toutes les modifications, que celles-ci soit précoces ou plus tardives.

Les différentes étapes qui conduisent à l'hybridation des micropuces et après une étape analytique, aux résultats de cette étude à partir des différents lots de cellules K562 traitées ou non à la dox sont représentées dans la **Figure 56**.

Les ARN totaux des différents lots cellulaires ont été extraits, puis nous avons vérifié le profil de ces ARN après électrophorèse sur un gel d'agarose et coloration au bromure d'éthidium (**Figure 57**). Leur qualité à également été doublement analysée par puce Agilent et par le système Nanodrop, ces systèmes permettent également leur dosage. La **Figure 58** présente les résultats obtenus sur puces Agilent.



Figure 55 : Schéma expérimental des comparaisons d'expression du transcriptome de cellules K562 induites ou non à se différencier vers la voie érythroïde par la dox pendant 3 jours utilisé dans l'étude par hybridation de micropuces.

L'expression des transcriptomes de cellules K562 témoins (jour 0) et des cellules K562 traitées par 40 nM de dox (D) ou non (T=témoin) pendant 1, 2 ou 3 jours a été analysée par comparaison deux à deux, après marquage à la Cy3 (vert) et à la Cy5 (rouge) des ADNc correspondant aux 7 conditions expérimentales, par 9 hybridations sur des micropuces. Cette étude comporte trois expériences réalisées de manière indépendantes.



Figure 56 : Etapes du protocole d'étude du transcriptome par hybridation d'une lame de micropuce.

Les ADNc, l'un marqué à la Cy3 (vert) et l'autre à la Cy5 (rouge), sont obtenus après RT des ARN totaux extraits de 2 lots cellulaires obtenus dans des conditions expérimentales différentes. Ces ADNc sont hybridés simultanément sur une lame de micropuce. L'analyse de la lame hybridée permet une étude comparative de l'expression du transcriptome dans deux situations différentes.



<u>Figure 57</u> : Vérification de la qualité des ARN totaux extraits de cellules K562 induites à se différencier pendant 3 jours vers la voie érythroïde par la dox par électrophorèse sur gel d'agarose avant étude par micropuce.

2,5 à 5 μ g d'ARN totaux de cellules K562 cultivées pendant 1 à 3 jours dans du milieu seul (T0 à T3) ou additionné de 40 nM de dox (D1 à D3), ont été analysés sur gel d'agarose coloré au bromure d'éthidium. Ces données sont représentatives de trois expériences indépendantes.



<u>Figure 58</u> : Analyse de la qualité des ARN totaux extraits de cellules K562 induites à se différencier pendant 3 jours vers la voie érythroïde par la dox par puce Agilent.

20 à 500 ng d'ARN totaux de cellules K562 cultivées pendant 1 à 3 jours dans du milieu seul ou additionné de 40 nM de dox, ont été analysés sur puce Agilent. Ces données sont représentatives de trois expériences indépendantes. Le ratio des ARNr 28S et 18S est précisé.

L'analyse révèle que la courbe des ARN présente une ligne de base plane, un spectre peu parasitée et un ratio ARNr 28S/18S correct. Tous ces facteurs témoignent d'une bonne qualité des ARN extraits, facteur essentiel pour l'analyse ultérieure par micropuce (car la dégradation des ARN n'est pas linéaire et de ce fait les ARN de grandes tailles tendent à être plus rapidement dégradés).

L'étape de marquage a été réalisée grâce à l'utilisation de deux marqueurs fluorescents, la Cy3 et la Cy5, qui émettent respectivement dans le vert et dans le rouge et qui nous permettent la comparaison des 2 échantillons par hybridation simultanée sur une même lame de micropuce. Pour chaque comparaison, l'hybridation a été réalisée 3 fois de manière indépendante. Au cours de ces trois expériences, les 2 échantillons sont marqués de manière alternée à la Cy3 et à la Cy5, afin d'augmenter la significativité des résultats et de pallier à d'éventuels artefacts d'hybridation qui seraient la conséquence d'une hybridation non spécifique ou d'une mauvaise hybridation révélée par la présence du fluorochrome.

Après l'hybridation des échantillons à comparer sur une lame de micropuce, la lame est lavée puis scannée. La **Figure 59** présente une image type du profil obtenu, sur laquelle on observe des spots d'hybridations d'intensité et de couleurs qui varient du rouge au vert en passant par le jaune, avec toutes les nuances intermédiaires qui résultent du mélange de ces deux couleurs.

Les résultats donnés par le logiciel d'acquisition et d'analyse d'image Gene PixPro 4.0 sont obtenus en comparant l'intensité de la coloration verte du premier échantillon par rapport à la coloration rouge du second échantillon. Les résultats obtenus à partir de ces expériences montrent que de nombreux gènes sont régulés par la dox et au cours du temps de traitement. Les analyses statistiques de ces résultats indiquent que sur plus de 22000 gènes humains qui composent la lame de micropuce hybridée, 553 montrent des modifications d'expression significatives entre les cellules non-traitées (T) et les cellules traitées à la dox à un temps donné.



<u>Figure 59</u> : Hybridation d'une lame de micropuce avec les ADNc de cellules K562 induites à se différenciées ou pas vers la voie érythroïde par la dox.

Une lame de micropuce est hybridée simultanément pendant 3 jours avec les ADNc de cellules K562 traitées ou non à la dox (40 nM) pendant 3 jours, marquées respectivement à la Cy3 et à la Cy5. Après lavage, la lame de micropuce est scannée grâce au scanner Axon GenePix 4000B et au logiciel GenePixPro 4.0. L'image obtenue est présentée sur le panneau de gauche avec un agrandissement sur lequel on peut observer les spots d'hybridations (panneau de droite).

L'analyse globale des résultats révèle un certain nombre de variations liées à l'induction de la différenciation érythroïde des cellules K562 par la dox (40 nM). Parmi ces variations, nous pouvons noter tout d'abord des données qui confirment les résultats obtenus précédemment, qui sont :

- des augmentations en relation directe avec la différenciation érythroïde comme l'augmentation des globines zeta et delta
- l'augmentation de la GSTP1-1 (également obtenue par northern blot), mais aussi une de deux autres GST : GSTM3 et GSTA2

L'analyse de l'ensemble des variations significatives permet de faire ressortir un certain nombre de faits évidents :

- les variations, augmentations ou diminutions, les plus importantes apparaissent majoritairement après deux jours de traitement
- quand l'expression d'un gène diminue le premier jour de traitement, dans la grande majorité des cas, elle se poursuit aux deuxième et troisième jours de traitement
- les diminutions les plus reproductibles concernent la régulation des gènes codant pour les histones
- des variations importantes de gènes qui codent pour des protéines en relation avec le système nerveux. En effet, au deuxième jour de traitement trois augmentations sur les dix plus significatives concernent ce type de gène (neurotensine, midkine, amphireguline)

Les variations les plus importantes au deuxième jour de traitement sont présentées dans la **Figure 60**.

En conclusion, cette troisième partie nous permet de montrer, qu'au cours de la différenciation érythroïde des cellules K562 induites par la dox (40 nM), un nombre élevé de gènes est régulé et que la majorité des modifications survient après deux jours de traitement. Plus particulièrement, des protéines impliquées dans le développement du système nerveux sont augmentées alors que les protéines liées aux histones sont réprimées. Cette étude nous permet également de confirmer l'augmentation d'expression de l'ARNm de GSTP1-1 et de globines.



1) neurotensin; 2) insulin-like growth factor binding protein 4 ; 3) hypothetical protein FLJ20920 ; 4) proteoglycan 2, bone marrow ; 5) midkine (neurite growth-promoting factor 2) ; 6) amphiregulin (schwannoma-derived growth factor) ; 7) hypothetical protein FLJ30213 ; 8) maternally expressed 3 ; 9) platelet-derived growth factor beta polypeptide ; 10) enoyl-Coenzyme A, hydratase/3-hydroxyacyl Coenzyme A dehydrogenase 11) chloride channel, calcium activated, family member 1 ; 12) B-cell translocation gene 1, anti-proliferative ; 13) serum-inducible kinase ; 14) lectin, galactoside-binding, soluble, 1 (galectin 1) ; 15) cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57, Kip2) ; 16) BTG family, member 2 ; 17) serine protease inhibitor, Kazal type 4 ; 18) thrombospondin 1 ; 19) RNA, U12 small nuclear ; 20) prostate differentiation factor

(voir légende page suivante)



1) histone 1, H4c; 2) histone 1, H2aj; 3) endometrial bleeding associated factor; 4) histone 1, H1d; 5) histone 1, H4a; 6) olfactory receptor, family 6, subfamily A, member 1; 7) zinc finger protein 134; 8) fucosyltransferase 7; 9) RAB5C, member RAS oncogene family; 10) Human ribosomal S1 protein mRNA, partial cds 11) WW domain binding protein 1; 12) distal-less homeo box 2; 13) fructose-1,6-bisphosphatase 1; 14) collagen, type IV, alpha 6; 15) histone 1, H1b; 16) fms-related tyrosine kinase 3 ligand; 17) asparagine synthetase; 18) prostaglandin I2 (prostacyclin) receptor (IP); 19) tumor-associated calcium signal transducer 1; 20) opioid receptor, delta 1

<u>Figure 60</u> : Résultats de l'hybridation d'une lame de micropuce avec les ADNc de cellules K562 induites à se différenciées ou pas vers la voie érythroïde par la dox.

Une lame de micropuce est hybridée simultanément pendant 3 jours avec les ADNc de cellules K562 traitées ou non à la dox (40 nM) pendant 3 jours, marquées respectivement à la Cy3 et à la Cy5. Après lavage, la lame de micropuce est scannée grâce au scanner GenePix 4000B et au logiciel GenePixPro 4.0. Les résultats sont ensuite exprimés comme une comparaison entre l'échantillon traité par rapport à l'échantillon témoin et cela pour chaque jour de traitement. A, représentation des 20 augmentations les plus significatives. B, représentation des 20 diminutions les plus significatives. Les résultats sont exprimés comme la moyenne de trois expériences indépendantes.

۵ DISCUSSION

Discussion

I- CHOIX DU SYSTEME D'ETUDE

La croissance et la différenciation cellulaire sont des processus finement régulés. Une dérégulation peut entraîner un désequilibre entre les deux processus et conduire à la cancérisation. Une série de molécules contrôlent le cycle cellulaire, telles que les cyclines, les protéines kinases cycline-dépendante (CDK pour cyclin-dependant protein kinase) et les inhibiteurs de CDK (Sherr and Roberts, 1995). La perte de la capacité de différenciation est un point important dans la pathologie cancéreuse, le cas le mieux documenté est celui de la leucémie aiguë myéloblastique (LAM) (Tenen, 2003).

Une alternative par rapport à la thérapie anticancéreuse classique consiste à induire la différenciation des cellules en utilisant des doses subtoxiques de médicaments : la thérapie différenciante (Beere and Hickman, 1993 ; Degos, 1990 ; Leszczyniecka *et al.*, 2001 ; Paquette and Koeffler, 1992). En effet, les cellules tumorales partagent certaines caractéristiques avec les cellules progénitrices immatures à haut potentiel de différenciation terminale. Il apparaît donc logique de penser que les cellules tumorales peuvent être induites à se réengager dans un processus de différenciation cellulaire, du moins de manière partielle.

Des résultats cliniques ont été obtenus dans le cas des leucémies aiguës promyélocytaires (LAM 3) traitées grâce à l'acide rétinoïque tout trans (ATRA) (Degos, 1994), avec un taux de rémission complète supérieur à 90 % (Degos and Wang, 2001). Cet acide a notamment pour effet majeur de permettre aux cellules souches d'arriver à maturité. Cependant, de fréquentes rechutes dues probablement à un phénomène de résistance acquise, sont observées chez ces patients, malgré un traitement d'entretien par l'acide rétinoïque (Cornic *et al.*, 1994 ; Muindi *et al.*, 1992).

Il apparaît donc important de vérifier par la suite si ce type d'approche, utilisée seule ou de manière combinée à la chimiothérapie classique peut induire la résistance des cellules cancéreuses. En effet, le traitement peut avoir pour conséquence une augmentation de la détoxication cellulaire par les GST ou au contraire participer à une inhibition des mécanismes de détoxication.

Notre objectif est de progresser dans la compréhension des mécanismes de régulation de la différenciation et de déterminer si l'expression d'un mécanisme de détoxication

cellulaire participant au développement des mécanismes de résistance aux anticancéreux, est régulé de manière spécifique d'une des voies de différenciation possibles.

Nous nous sommes intéressés aux régulations qui permettent de contrôler l'expression du gène de la GSTP1-1 dans le cadre de la différenciation hématopoïétique des voies érythroide et mégacaryocytaire induite par des agents pharmacologiques. Nous voulions plus particulièrement savoir s'il existe une corrélation entre l'expression de cette enzyme et l'induction de la différenciation.

En effet, cette enzyme est particulièrement impliquée dans la cancérogènèse et la progression tumorale (Duvoix *et al.*, 2003b ; Henderson *et al.*, 1998 ; Sato, 1989) et est surexprimée dans de nombreux cancers associés à un large éventail de tissus dont l'estomac (Monden *et al.*, 1997), le côlon (Ranganathan and Tew, 1991), le poumon (Boss *et al.*, 2001) et plus particulièrement dans le cas des leucémies (Sauerbrey *et al.*, 1994 ; Schisselbauer *et al.*, 1990). Des taux très élevés de GSTP1-1 constituent un mauvais prognostic pour la survie des patients (Clapper and Szarka, 1998). De plus, la GSTP1-1 est impliquée dans la résistance aux anticancéreux (Duvoix *et al.*, 2003b ; Puchalski and Fahl, 1990 ; Tew, 1994) et inhibe l'apoptose en se liant à la JNK (Adler *et al.*, 1999 ; Yin Z *et al.*, 2000).

Dans ce travail, nous avons principalement utilisé la lignée leucémique humaine K562. Cette lignée multipotente peut être induite à se différencier vers différentes voies de l'hématopoïèse en fonction de l'inducteur de différenciation choisi. En effet, ces cellules sont bloquées à un stade immature de différenciation, mais restent capables de s'orienter vers l'une des trois lignées circulantes (érythroïde, mégacaryocytaire ou monocytaire) en présence d'inducteurs appropriés (Sutherland *et al.*, 1986 ; Tsiftsoglou *et al.*, 2003 ; Vainchenker *et al.*, 1981). Cette lignée cellulaire humaine coexprime donc des gènes marqueurs des voies de différenciation érythoïde et mégacaryocytaire.

Ainsi, les cellules K562 sont utilisées couramment comme modèle cellulaire pour étudier les processus moléculaires et les aspects de la différenciation hématopoïétique.

II- INDUCTION DE LA DIFFERENTIATION

Dans la première partie du travail, nous avons utilisé différents agents capables d'induire la différenciation des cellules K562 vers la voie érythroïde ou mégacaryocytaire. Pour induire la différenciation érythroïde, nous avons utilisé : l'acla (Chenais *et al.*, 1999 ; Gillet *et al.*, 2002 ; Morceau *et al.*, 1996a), la dox (Aries *et al.*, 1996 ; Kodym *et al.*, 2001 ;

Morceau *et al.*, 1996b) et l'hémine (Leppa *et al.*, 1997 ; Nakajima *et al.*, 1997). Nous avons testé l'ester de phorbol TPA en tant qu'agent capable d'induire la différenciation mégacaryocytaire (Aro *et al.*, 2002 ; Whalen *et al.*, 1997) et enfin le butyrate, un inducteur qui présente la particularité de pouvoir induire la lignée K562 vers les deux voies en fonction de la concentration utilisée (Dalyot *et al.*, 1993 ; Davis *et al.*, 2000 ; Xie *et al.*, 2000 ; Xie *et al.*, 1999 ; Yang J *et al.*, 2001). Pour induire la différenciation, ces molécules sont utilisées à des concentrations subtoxiques sur plusieurs jours.

II. 1- Induction de la différenciation érythroïde

L'acla et la dox appartiennent à une classe de médicaments, les anthracyclines, qui sont largement utilisées en cancérologie. En effet, ces médicaments sont prescrits aussi bien dans les leucémies aiguës et les lymphomes de Hodgkin (Hempel *et al.*, 2002 ; Raina *et al.*, 2003) que dans les tumeurs solides chez l'enfant (sarcome d'Ewing) (Hawkins *et al.*, 2002) ou chez l'adulte (sarcomes, adénocarcinomes) (Bar Sela *et al.*, 2002 ; DeRegis *et al.*, 2003). Cependant, les mécanismes responsables de leur activité antitumorale ne sont pas encore clairement définis. Ils sont connus comme des agents intercalants de l'ADN, mais également d'autres cibles ont pu être identifiées comme par exemple les topoisomérases (Sorensen *et al.*, 1994), la membrane cellulaire (Tokes *et al.*, 1982) ou des enzymes qui interviennent dans le métabolisme qui génère des ions superoxydes (Doroshow, 1983). Ces molécules sont également capables d'induire la différenciation *in vitro* de cellules leucémiques et de tumeurs solides. Cette induction de différenciation a également été observée dans des modèles de tumeurs animales et chez l'homme. Mais dans ces situations il est difficile de distinguer la part liée à l'effet cytotoxique de celle liée à l'effet différenciant.

L'hémoglobinisation des cellules K562 induite par les anthracyclines atteint son maximum pour des concentrations d'acla et de dox qui sont respectivement de 20 et 40 nM. Cette induction ne provoque qu'une inhibition de croissance partielle de l'ordre de 50 à 60 % pendant les six jours de traitement par l'acla, alors que la dox entraîne une inhibition supérieure à 90 %. De plus, dans les deux cas, cette inhibition s'accompagne d'une augmentation de l'hémoglobinisation qui atteint 60 et 70 %, respectivement pour la dox et l'acla après six jours de traitement.

201

L'hémine, une forme oxydée de l'hème, est l'inducteur de référence de la lignée K562. L'hémine a d'importants effets sur la maturation des cellules vers la voie érythroide et induit la synthèse d'hémoglobine fœtale dans les progéniteurs cultivés *in vitro* (Fibach *et al.*, 1995). L'hémine est utilisée comme agent thérapeutique (Normosang ®) dans le traitement des porphyries (Balla *et al.*, 2000 ; Mustajoki and Nordmann, 1993 ; Tenhunen and Mustajoki, 1998). L'hémine en tant que précurseur métabolique de la voie de synthèse de l'hémoglobine, est utilisée pour la correction du déficit en hème, ce qui entraîne une répression par rétrocontrôle de la delta-amino-levulinique synthétase, une enzyme-clé de la synthèse des porphyrines ainsi qu'une normalisation des taux d'hémoprotéines et de pigments respiratoires. Ainsi, le composé corrige les anomalies biologiques observées chez les patients atteints de porphyrie (Sassa, 2000).

Comme attendu, cet inducteur permet d'obtenir rapidement un fort taux de cellules différenciées dès le premier jour de traitement (60 %) et ce taux continue à augmenter en fonction du temps de traitement, pour atteindre des valeurs proches de 100 %. De plus, l'hémoglobinisation induite par une dose de 30 μ M d'hémine, n'entraîne pas de mortalité importante.

II. 2- Induction de la différenciation mégacaryocytaire

Le phorbol-12 myristate-13 acétate (ou TPA) est un puissant modulateur de l'hématopoïèse. En effet, le TPA différencie les cellules U937 (Kaneko *et al.*, 1999 ; Sordet *et al.*, 2002) et les cellules leucémiques promyélocytiques HL60 en monocytes-macrophages (Das *et al.*, 2000 ; Trayner *et al.*, 1998). Il induit la différenciation des cellules leucémiques mégacaryoblastiques MEG01 (Deutsch *et al.*, 2000) mais il a un effet inhibiteur sur la différenciation de toutes les lignées érythroïdes (Mignotte *et al.*, 1990).

Cet effet inhibiteur sur la lignée rouge s'accompagne souvent d'une augmentation de l'expression des marqueurs de la lignée plaquettaire. Ainsi les cellules K562 exposées au TPA se différencient vers la lignée mégacaryocytaire comme le prouve l'apparition de marqueurs de surface plaquettaires comme les marqueurs de surface CD41 (GPIIb) (Cavalloni *et al.*, 2000) ou CD61 (intégrine β 3 ou GPIIIa) (Le Naour *et al.*, 1997) que nous avons utilisé pour notre étude. La concentration de 10 nM en TPA permet d'obtenir les meilleurs résultats de différenciation tout en conservant un taux de mortalité cellulaire faible. Pour cet inducteur, il y a également un effet d'inhibition de croissance en fonction du temps de traitement

différenciant qui atteint une valeur proche de 100 %. Ces résultats sont en accord avec d'autres études, qui ont montré que la différenciation induite par le TPA conduit à la production des mêmes cytokines que les mégacaryocytes, à l'arrêt du cycle cellulaire et à des changements morphologiques caractéristiques de la thrombopoïèse (Racke *et al.*, 1997).

Les voies de transduction qui conduisent à la différenciation des cellules K562 sont encore mal connues. Néanmoins, le TPA est un activateur de la PKC (protéine kinase C) et la première hypothèse est que la PKC agit sur la différenciation de ces cellules en plaquettes par une cascade de signaux passant par la voie Ras-> Raf-1-> MEK (MAPK/ERK kinase)1-> ERK (extracellular signal-regulated kinase). En effet, il semble que la modulation de l'activité des différentes isoformes de PKC, ainsi que les variations de localisation subcellulaire de cette kinase soient à l'origine de la transduction du signal de la voie des PKC, en particulier dans le cas de la différenciation des cellules hématopoïétiques (Rosson and O'Brien, 1995b). Certaines équipes ont étudié les facteurs de transcription mis en jeu par le TPA et qui sont susceptibles d'intervenir dans la différenciation des cellules. Ces études ont mis en évidence que le traitement des cellules K562 par le TPA conduit à une augmentation de la liaison de AP-1 sur le promoteur de gènes spécifiques de la lignée érythroïde et une diminution de la liaison de NF-E2 (Mignotte et al., 1990; Rosson and O'Brien, 1998; Solomon et al., 1993). L'activité relative de chacun de ces facteurs de transcription, qui est définie par le niveau cellulaire de chaque facteur et leur état de phosphorylation, détermine vers quelle lignée érythroïde ou mégacaryocytaire vont se différencier les cellules K562. La prédominance de NF-E2 conduit à une différenciation érythroïde, alors que la prédominance de AP-1, stimulée par le TPA, différencie les cellules K562 vers les mégacaryocytes (Rosson and O'Brien, 1995a; Rosson and O'Brien, 1998).

Bien évidemment, la différenciation est un phénomène soumis à des paramètres plus complexes qu'une simple modulation NF-E2/AP-1. En effet, des souris Knock-out pour NF-E2, qui devraient présenter des troubles de la lignée rouge, meurent de thrombocytopénie alors que l'érythropoïèse est peu affectée (Shivdasani and Orkin, 1995).

II. 3- Induction de la différenciation par le butyrate

Enfin, nous avons utilisé un inhibiteur des histone désacétylases (HDAC), le butyrate. Comparé aux autres inducteurs de la différenciation qui montrent une spécificité en fonction de la voie de différenciation, le butyrate a des propriétés de différenciation qui dépendent de la concentration utilisée. Dans nos expériences nous avons déterminé que les concentrations

Discussion

de 1 mM et de 2 mM étaient les doses qui induisaient respectivement les plus forts taux de différenciation érythroïde et mégacaryocytaire avec une inhibition de croissance de l'ordre de 40 et 60 %. Nos résultats sont confirmés par différents travaux individuels ou le butyrate est utilisé comme un agent érythrodifférenciant (Witt *et al.*, 2000 ; Yang J *et al.*, 2001) où comme un inducteur de la différenciation mégacaryocytaire (Xie *et al.*, 2000 ; Xie *et al.*, 1999) des cellules K562. En effet, de faibles concentrations comprises entre 0,5 et 1 mM activent la différenciation érythroïde alors que des concentrations supérieures à 2 mM induisent la différenciation mégacaryocytaire.

Comme pour les autres inducteurs, nous avons pu mesurer une continuité dans le processus de différenciation. Toutefois, parmi les inducteurs utilisés dans cette étude, le butyrate est celui qui induit le plus faible taux de différenciation des cellules K562.

Witt *et al.* ont publié que l'induction de la différenciation par le phénylbutyrate (un dérivé du butyrate) peut être inhibée par un inhibiteur spécifique de la p38 kinase. Ces résultats montrent que le butyrate induit la voie de la kinase p38 alors que parallèlement, il est également connu comme inhibiteur des voies ERK et JNK (Witt *et al.*, 2000) (**Figure 61**). De plus, cette induction de la différenciation par le butyrate peut être potentialisée par la génération d'un stress dans des cellules leucémiques *in vitro* (Witt *et al.*, 2001).

Ainsi, certains auteurs ont suggéré que ces résultats pourraient être utilisés de manière combinée en clinique, en utilisant d'autres cibles moléculaires impliquées dans les voies de signalisation du stress comme des flavonoïdes ou en utilisant de la chimiothérapie conventionelle et/ou des radiations (Davidson and Morange, 2000). Par conséquent, le butyrate et ses dérivés peuvent servir comme agent différenciant et être combinés à d'autres modalités pour le rendre plus efficace dans les traitement cliniques.

Gottlicher *et al.* ont montré qu'un autre inhibiteur des HDAC, l'acide valproïque, est capable d'induire la différenciation de divers tissus dont les progéniteurs hématopoïètiques et les cellules leucémiques de patients avec une LAM (Gottlicher *et al.*, 2001). De la même manière, l'azacytidine, un inhibiteur de méthyltransferases, induit la différenciation des cellules HL60 (leucemie promyelocitaire) (Christman *et al.*, 1983) et peut agir en synergie avec un autre inhibiteur des HDAC, la trichostatine A (TSA) pour induire la différenciation (Cameron *et al.*, 1999).

204



Figure 61 : Représentation schématique des voies MAP kinases et de leurs régulation par le butyrate dans les cellules K562 (adapté de Witt *et al.*, 2000).

Cette figure donne une vue générale sur les trois principales voies MAPK : ERK, JNK et p38.

En ce qui concerne l'effet du butyrate sur le couple croissance cellulaire et différenciation, ce composé produit des résultats semblables à ceux obtenus avec les anthracyclines qui mènent à un ralentissement important de la croissance pour entrer dans un processus de différenciation. Le TPA induit un arrêt pratiquement total de la croissance cellulaire contrairement à l'hémine qui n'entraîne qu'un ralentissement partiel de cette croissance.

III- ETUDE DE L'EXPRESSION DU GENE GSTP1-1 AU COURS DE LA DIFFERENCIATION

Après avoir induit la différenciation des cellules K562 avec des agents chimiques, nous avons étudié la capacité de ces inducteurs de la différenciation à réguler l'expression du gène de la GSTP1-1. La GSTP1-1 est une enzyme de phase II du métabolisme des médicaments et conduit à une augmentation de la chimiorésistence des cellules leucémiques (Tew, 1994). De plus l'isoforme GSTP de souris a été décrite comme interagissant avec la JNK et entraînant la résistance à l'apoptose (Adler *et al.*, 1999).

III. 1- Effet de l'induction de la différenciation érythroïde par les anthracyclines sur l'expression de la GSTP1-1

Le traitement différenciant des cellules K562 par des anthracyclines telles que l'acla et la dox, induit une augmentation de l'expression de l'ARNm de GSTP1-1 ainsi que de la protéine correspondante. L'augmentation observée pour l'ARNm avec l'acla est la plus élevée aux jours 1 et 2 de traitement respectivement de 3,8 et 7,5 fois. Dans le cas de l'induction par la dox, l'augmentation est beaucoup plus faible d'environ deux fois au maximum au jour 2. En revanche, bien que plus faible, les augmentations observées au niveau de l'expression de la protéine, sont assez similaires pour les deux anthracyclines. Cette augmentation est progressive jusqu'au quatrième jour d'induction pour atteindre des augmentations de l'ordre de 70 %.

Il est bien établi que la GSTP1-1 peut être à l'origine de la résistance aux agents anticancéreux seule ou en coopération avec un autre système de résistance comme la MRP1 (O'Brien *et al.*, 2000). En particulier, dans les cellules leucémiques K562 (Kalinina *et al.*, 2001) et dans les cellules de carcinome du sein (MCF7) (Wang *et al.*, 1999), une surexpression de la GSTP1-1 peut-être liée à une résistance à la dox. Kalinina *et al.* ont

observé également après traitement à la dox, une augmentation du transport nucléaire de la GSTP1-1 (Kalinina *et al.*, 2001), ce qui aurait pour but de protéger l'ADN contre les médicaments anticancéreux (Goto *et al.*, 2001). De plus, le traitement des cellules par un inhibiteur du transport de la GSTP1-1, permet de restaurer leur sensibilité à un traitement par la dox. Par contre, la survie d'un patient atteint de LAM présentant le génotype GSTM1 est diminuée alors que la survie d'un patient avec le génotype GSTP1-1 n'est pas affectée (Autrup *et al.*, 2002). De plus, dans des cellules de carcinome hépatique (Hep2A), l'acquisition de la résistance est corrélée à une expression accrue de la GSTP1-1 et non à d'autres isoformes (Harbottle *et al.*, 2001). Il a également été décrit qu'un conjugué GSH-dox peut induire l'expression de la GSTP1-1 de manière transitoire et que la surexpression d'un tel conjugué rend les cellules d'hépatome de rat AH66 moins sensibles à la dox (Asakura *et al.*, 2001; Tashiro *et al.*, 2001). Enfin, il a été montré qu'une surexpression de la GSTA4 protège les cellules cardiaques H9C2 de la mort induite pas les anthracyclines, en protégeant les cellules des espèces réactives de l'oxygène (ERO) générées (L'Ecuyer *et al.*, 2004).

III. 2- Effet de l'induction de la différenciation érythroïde par l'hémine sur l'expression de la GSTP1-1

L'induction de la différenciation érythroïde par l'hémine a permis de mettre en évidence une augmentation progressive et significative de l'expression de l'ARNm de la GSTP1-1 dans les cellules K562. Cette augmentation est d'environ 10 % après le premier jour de traitement et atteint 40 % (p<0,01) après le cinquième jour. Par ailleurs, l'expression de la protéine GSTP1-1, analysée par western blot, montre également une augmentation lente et progressive de l'expression de la protéine GSTP1-1 parallèlement à l'hémoglobinisation des cellules K562. L'expression de la protéine est corrélée à l'expression de l'ARNm. En effet, après un jour d'induction, l'expression est augmentée d'environ 10 % et cette augmentation atteint la valeur de 30 % au bout du cinquième jour de traitement.

Ainsi, quelque soit l'inducteur de différenciation érythroïde utilisé, nous mesurons une augmentation de l'expression de la GSTP1-1. Les anthracyclines sont des médicaments anticancéreux largement utilisés en chimiothérapie dans le traitement de tumeurs solides et de certains types de leucémies. Elles sont connues, entre autres, pour générer des radicaux libres dans la cellule comme par exemple des radicaux semiquinone et des ERO (Keizer *et al.*, 1990 ; Powis, 1989). Ces espèces sont à l'origine d'un stress oxydant qui est impliqué dans des

processus variés et est à l'origine de la cardiotoxicité des anthracyclines (Fogli *et al.*, 2004 ; Singal *et al.*, 1997). Chenais *et al.* ont suggéré que le stress oxydant généré par les inducteurs de la différenciation incluant l'acla et la dox sont impliqués dans les premières étapes du processus de différenciation des cellules K562 vers la lignée érythroïde (Chenais *et al.*, 2000). L'hémine est également considérée comme étant un inducteur de stress oxydant dans le foie de rat (Suliman *et al.*, 2002).

La GSTP1-1 est impliquée dans des mécanismes de détoxication cellulaire et participe à la protection contre le stress oxydant et les ERO (Yin Z *et al.*, 2000). L'induction du gène codant pour la GSTP1-1 que nous avons observé, pourrait constituer une réponse au stress oxydant généré au cours du processus d'induction de la différenciation. Néanmoins, cette induction entraînerait potentiellement une résistance aux anticancéreux.

III. 3- Effet de l'induction de la différenciation mégacaryocytaire par le TPA sur l'expression de la GSTP1-1

Par contre, nous avons induit la différenciation des cellules K562, par un autre inducteur, le TPA, qui est un générateur de stress oxydant mais aussi un inducteur de la différenciation des cellules K562 vers la voie mégacaryocytaire.

Dans de telles conditions, nous avons observé une forte diminution de 50 à 60 % de l'expression du transcrit de GSTP1-1. Cette baisse de l'ARNm est également accompagnée d'une diminution au niveau de la protéine d'environ 30%.

Pourtant, cette diminution de l'expression de la GSTP1-1 semble contradictoire avec la présence d'un site TRE dans le promoteur du gène (Morrow *et al.*, 1992). Cependant, Lin *et al.*, ont montré que le TPA n'est pas suffisant pour activer la GSTP dans la muqueuse buccale du hamster (Lin *et al.*, 1999). De plus, il a été démontré que l'exposition des cellules K562 au TPA, au cours de la différenciation, entraîne une diminution de la transcription du promoteur de la γ -globine et une diminution de la stabilité des ARNm de la globine (Solomon *et al.*, 1993), un gène qui est connu pour être régulé au cours de la différenciation érythroïde.

Morrow *et al.* ont montré que la GSTP1-1 ou la GSTA1-1, dans des cellules MCF7, pouvaient agir en synergie avec une autre protéine de détoxication, la MRP, conduisant à une potentialisation du phénomène de résistance vis-à-vis de certains médicaments (Morrow *et al.*, 1998a ; Morrow *et al.*, 1998b). En revanche, Marks *et al.* ont montré dans des cellules

K562 induites à se différencier par le TPA, une augmentation d'une autre protéine de détoxication, la glycoprotéine-P (P-gp) (Marks *et al.*, 1995).

Ces résultats suggèrent que la régulation de l'expression de la GSTP1-1 au cours de la différenciation n'est pas la conséquence de la génération d'un stress oxydant par les inducteurs utilisés mais serait plutôt corrélée à une régulation en fonction de la voie de différenciation induite.

III. 4- Effet de l'induction de la différenciation par le butyrate sur l'expression de la GSTP1-1

Pour la suite de nos travaux, nous avons voulu confirmer nos résultats pour généraliser la régulation de l'expression de la GSTP1-1 en fonction de la voie de différenciation induite. Pour répondre à cet objectif, nous avons utilisé le butyrate qui est capable d'induire la différenciation des K562 vers les voies érythroïde et mégacaryocytaire en fonction de la concentration en inducteur utilisé.

L'induction de la différenciation par le butyrate entraîne une baisse de l'expression de l'ARNm de GSTP1-1 après induction à la fois de la différenciation érythroïde (1 mM) ou de la différenciation mégacaryocytaire (2 mM) en fonction du temps de traitement. Cependant, la diminution observée avec la concentration de 2 mM de butyrate est plus précoce et beaucoup plus marquée que celle observée avec 1 mM de butyrate.

Ces résultats sont inattendus par rapport à d'autres travaux. En effet, il a été montré une augmentation de l'expression de GSTP1-1 après induction de la différenciation par le butyrate dans des cellules épithéliales non parenchymateuses de foie de rat (Utesch *et al.*, 1993).

De la même manière, dans les cellules cancéreuses du colon HT-29, la différenciation par le butyrate active la voie de signalisation ERK1/2 conduisant à une augmentation de l'expression de GSTP1-1 et de son activité chimioprotectrice (Ebert *et al.*, 2001). De plus, des cellules Caco-2 qui sont des cellules étroitement liées aux entérocytes humains normaux peuvent être différenciées par le butyrate. Ainsi, après stimulation par cet inducteur de la différenciation, les cellules expriment de forts taux de GSTP1-1 contribuant à une stimulation de la détoxication dans l'intestin (Stein *et al.*, 1996).

209
La réduction de l'expression de GSTP1-1 suite à l'induction par le butyrate peut néanmoins être expliquée par les voies de signalisation cellulaire qui sont spécifiquement activées dans les cellules K562. En effet, les kinases ERK et JNK sont déphosphorylées et donc inhibés, alors que la kinase p38 est phosphorylée après une exposition au butyrate (Witt *et al.*, 2000). La littérature ne permet pas d'impliquer les kinases ERK et p38 dans l'expression de la GSTP1-1, mais nous avons montré récemment au laboratoire que des inhibiteurs de JNK dont la curcumine diminuent l'expression de l'ARNm de GSTP1-1 (Duvoix *et al.*, 2003a), ainsi que l'activité liante de AP-1 (Duvoix *et al.*, 2004). De plus, d'autres inducteurs de la différenciation des cellules K562 comme la dox induisent la synthèse de l'ARNm de GSTP1-1 (travaux montrés dans cette thèse), en activant la JNK et en conduisant à une augmentation de l'activité liante de AP-1 (Duvoix *et al.*, 2003a).

Par conséquent l'inhibition de la GSTP1-1 *via* la JNK par le butyrate est en accord avec des données précédemment publiées et contribue à expliquer l'inhibition de la synthèse de l'ARNm de GSTP1-1. De plus, le butyrate est capable d'inhiber l'activation de NF- κ B par le TNF α (Yin L *et al.*, 2001). Nous avons montré récemment que des dimères de NF- κ B régulent positivement l'expression de la GSTP1-1 ainsi que la voie de signalisation TNF α -> TNF-receptor (TNF-R)1 -> TNF receptor associated factor (TRAF) -> NF- κ B inducing kinase (NIK) -> IKK (Morceau *et al.*, 2004). La suppression de la voie de signalisation du TNF α par le butyrate contribue ainsi à diminuer l'expression de l'ARNm de GSTP1-1 dans des cellules leucémiques humaines.

Il est important de souligner que les doses de butyrate utilisées pour traiter les cellules K562, n'induisent pas strictement la voie de différenciation souhaitée. Ainsi, la population cellulaire obtenue après induction de la différenciation, présente une prédominance de cellules différenciées vers la voie souhaitée en fonction de la concentration en inducteur, plutôt qu'une population unique engagée dans une voie de différenciation. Par exemple, les cellules traitées avec 2 mM de butyrate pour induire la différenciation mégacaryocytaire, se différencient également dans des proportions plus faibles vers la voie érythroïde.

L'ensemble de ces résultats sur la régulation de l'expression de la GSTP1-1 en fonction de la voie de différenciation induite, suggère que l'induction de la différenciation érythroïde tend à entraîner une surexpression de l'ARNm de GSTP1-1 indépendamment du type d'inducteur utilisé (anthracyclines ou hémine), alors que l'entrée vers la voie mégacaryocytaire, dans ces mêmes cellules K562 diminue l'expression de l'ARNm GSTP1-1. Ces variations sont corrélées à l'induction de la différenciation au cours du temps. Le butyrate joue un rôle particulièrement intéressant dans la mesure où cet inducteur n'entraîne pas d'induction d'expression de la GSTP1-1, ni lors de la différenciation érythroïde ni lors de la différenciation mégacaryocytaire.

III. 5- Effet des agents différenciants sur l'expression de l'ARNm de GSTP1-1 dans la lignée Jurkat

Afin de confirmer que les variations d'expression de la GSTP1-1 observées sont spécifiques de la voie de différenciation induite et non de la molécule utilisée, nous avons étudié l'effet de traitements identiques sur la lignée leucémique humaine à cellules T, Jurkat. Cette lignée représente un témoin négatif de différenciation puisqu'elle ne possède pas la capacité de se différencier vers les voies érythroïde ou mégacaryocytaire.

Ainsi, les cellules Jurkat ont été traitées dans des conditions similaires à celles permettant d'induire la différenciation des cellules K562. Les résultats obtenus montrent que les différents agents utilisés TPA (10 nM), acla (20 nM), dox (40 nM) ou hémine (30 μ M), n'induisent pas la différenciation et que les inhibitions de croissance observées avec les différents inducteurs sont plus faibles que celles obtenues après traitement des cellules K562. En ce qui concerne l'expression de l'ARNm de GSTP1-1, aucune variation significative n'a été mise en évidence.

Ces résultats suggèrent que la régulation de l'expression de la GSTP1-1, n'est pas liée à l'inducteur utilisé mais à la voie de différenciation induite dans des cellules qui ont la capacité de se différencier.

Nos résultats ajoutent la GSTP1-1 aux gènes de défense contre le stress régulés pendant la différenciation. En effet, la différenciation est également connue pour réguler l'expression de protéines impliquées dans le stress ou la résistance aux médicaments anticancéreux, incluant les gènes qui codent pour le heat shock factor 2 (HSF2) (Pirkkala *et al.*, 1999) et le heat shock factor 70 (HSF70) (Theodorakis *et al.*, 1989). De plus le gène de résistance multiple aux médicaments (MDR pour multi-drug resistance) codant pour la protéine P170/P-gp est induite durant la différenciation des cellules K562 (Marks *et al.*, 1995)

alors que la γ-glutamyltransférase (GGT), une autre enzyme du métabolisme du glutathion, est augmentée durant la différenciation des cellules leucémiques U937 et HL60 induites à se différencier par l'acide rétinoïque (el Yaagoubi *et al.*, 1995).

La modulation de l'expression de la GSTP1-1 au cours des processus de différenciation des cellules K562 soulève un nouveau rôle intéressant de la GSTP1-1 dans les processus physiologiques de différenciation afin d'éviter le développement de cellules différenciées mais chimiorésistantes par le biais d'une surexpression de GSTP1-1.

IV- MECANISMES MOLECULAIRES LIANT L'EXPRESSION DE LA GSTP1-1 A LA DIFFERENCIATION

IV. 1- Mise en évidence de sites GATA dans le promoteur de la GSTP1-1

Dans les deux parties précédentes de cette thèse, nous avons mis en évidence une variation de l'expression du gène de la GSTP1-1 qui est souvent corrélée à la voie de différenciation induite dans des cellules K562. Ainsi, pour déterminer les mécanismes moléculaires sous-jacents à l'expression du gène de GSTP1-1 au cours des voies de différenciation, nous nous sommes intéressés à la régulation transcriptionnelle des gènes spécifiques des voies érythroïde et mégacaryocytaire et à leur éventuelle implication dans la régulation du gène de GSTP1-1.

Par ailleurs, notre équipe a montré précédemment l'existence d'une corrélation entre la sous-unité p45 de NF-E2 et l'induction du gène de la GSTP1-1 par le TPA (Borde-Chiché *et al.*, 2001a). Nous avons recherché la présence potentielle d'autres sites pour des facteurs de transcription spécifiques de la différenciation érythroïde ou mégacaryocytaire dans le promoteur du gène de GSTP1. Afin d'atteindre cet objectif, la séquence promotrice du gène de la GSTP1-1 comprise entre -1224 et +96 pb a été soumise à une analyse assistée par ordinateur afin de rechercher des sites potentiels de liaisons de facteurs de transcription. Deux sites nous ont paru intéressant, puisqu'il s'agissait de deux séquences GATA, que l'on a arbitrairement appelé GATA proximal situé en -908/-905 et GATA distal situé -1211/-1208 par rapport au site d'initiation de la transcription du promoteur du gène de GSTP1-1.

La famille des facteurs de transcription GATA est composée de six membres. Ils reconnaissent la séquence consensus (A/T)GATA(A/G) par l'intermédiaire d'un doigt de

zinc. GATA-1 et GATA-2 sont exprimés dans les érythrocytes, les mégacaryocytes, les mastocytes, les basophiles et dans les éosinophiles ainsi que dans les testicules (Tsai *et al.*, 1989 ; Weiss and Orkin, 1995). GATA-2 est exprimé en plus dans les neutrophiles (Orkin *et al.*, 1998) et GATA-3 est exprimé dans les lymphocytes T. Le facteur GATA-1 pourrait être impliqué dans la régulation de l'expression de la GSTP1-1 puisqu'il est surexprimé dans les cellules érythroïdes et réprimé dans les cellules mégacaryocytaires. De plus, les cellules Jurkat qui n'expriment ni GATA-1 ni GATA-2 (Yang D *et al.*, 2000) ne montrent pas de variation de l'expression de la GSTP1-1 dans des conditions de traitement induisant la différenciation des cellules K562.

IV. 2- Effet des inducteurs de différenciation K562 sur la transactivation d'un gène rapporteur sous le contrôle de sites GATA

Le promoteur de la GSTP1-1 contient deux sites GATA. Afin de vérifier que les inducteurs de la différenciation des cellules K562 sont capables de moduler l'expression d'un ou plusieurs facteurs GATA, nous avons réalisé des expériences de transfection transitoire. Ces expériences ont été réalisées en utilisant un plasmide contenant les éléments de réponses GATA et les plasmides d'expression d'une protéine GATA-1 normale ou GATA-1 mutée par une délétion de sa partie NH₂ terminale qui permet la fixation mais pas l'activité transactivatrice.

Dans ces expériences, nous avons montré que la transfection d'un vecteur d'expression de GATA-1 dans les cellules K562 ou dans les cellules Jurkat, qui n'exprime ni GATA-1 ni GATA-2, induit l'activité transcriptionnelle du promoteur pGL3-GATA-luc. De plus, nous avons montré que la surexpression d'une protéine GATA mutée, n'induit pas ce même plasmide rapporteur et cela dans les deux lignées utilisées. Dans le cas des cellules K562, nous pouvons même observer une diminution de 50% de l'activité luciférase par rapport à l'activité basale. Ceci peut s'expliquer par une compétition pour la fixation sur le promoteur pGL3-GATA-luc entre le facteur GATA-1 endogène et le facteur surexprimé muté qui, malgré une perte de l'activité transactivatrice, a conservé sa capacité de liaison à l'ADN.

Enfin, nous avons réalisé des expériences d'induction de la différenciation par les différents inducteurs utilisés pour étudier l'expression de la GSTP1-1 sur des cellules K562 transfectées par le plasmide pGL3-GATA-luc. Ces expériences nous ont permis de vérifier les

résultats obtenus dans le cas de la différenciation érythroïde induite par l'acla, la dox ou l'hémine. En effet, nous observons une augmentation de l'activité luciférase avec l'acla et la dox, avec néanmoins une augmentation plus faible dans le cas de la dox. Ces résultats sont corrélés avec l'expression de la GSTP1-1.

De plus, les résultats obtenus avec l'acla sont en accord avec ceux obtenus par Aries *et al.* (Aries *et al.*, 1996). D'autres résultats obtenus montrent que la dox induit une augmentation de la stabilité de l'ARNm de GATA-1, alors que l'acla induit une augmentation de son expression (Morceau *et al.*, 1996b). Dans le cas de l'hémine nous pouvons observer un faible diminution de l'activité luciférase qui est en adéquation avec les résultats obtenus concernant l'expression et l'activité liante au promoteur de la GSTP1-1 du facteur GATA-1, après ce type de traitement.

Pour ce qui est des agents utilisés pour induire la différenciation mégacaryocytaire, les résultats semblent plus contradictoires. En effet, le TPA qui diminue l'expression de la GSTP1-1 et la fixation de GATA-1 à son promoteur, est connu pour induire un arrêt de la différenciation érythroïde et une baisse de l'expression de GATA-1 (Kamesaki *et al.*, 1996). Le TPA entraîne dans nos expériences une très forte induction de l'activité luciférase du plasmide rapporteur mais le plasmide pGL3-GATA-luc contient trois motifs GATA. Or cette séquence est décrite comme pouvant fixer les différents membres de la famille GATA (Ko and Engel, 1993). D'autre part, il est bien établi que le TPA en tant qu'inducteur de la différenciation mégacaryocytaire des cellules K562, induit au cours de ce processus une augmentation de l'expression du facteur GATA-2 (Kamesaki *et al.*, 1996 ; Yi *et al.*, 2004). Ainsi, ces éléments expliqueraient l'augmentation de l'activité du promoteur observée en relation avec l'augmentation du facteur GATA-2.

IV. 3- Etude de l'activité liante des sites GATA identifiés dans le promoteur de la GSTP1-1

Pour mettre en évidence d'éventuelles interactions spécifiques des leucémies entre des facteurs protéiques nucléaires et les séquences GATA du promoteur du gène de la GSTP1-1, nous avons utilisé la technique de retard de migration sur gel avec les séquences correspondantes aux sites GATA identifiés et les facteurs nucléaires de différentes lignées cellulaires : les cellules K562, des cellules Raji qui n'expriment pas la GSTP1-1 (Borde-Chiché *et al.*, 2001b), des cellules Jurkat qui n'expriment pas GATA-1 ni GATA-2 (Yang D

et al., 2000) et des cellules U937 (Sordet *et al.*, 1999) qui peuvent se différencier vers des voies autres que l'érythropoïèse et la mégacaryopoïèse.

Ces expériences ont mis en évidence des profils de liaison différents à la fois en fonction de la lignée mais également en fonction de la sonde considérée et ont permis d'identifier la formation de quatre complexes retardés avec l'ensemble des lignées. Par des expériences de compétition et de supershift, nous avons montré une activité liante du facteur de transcription GATA-1 qui correspond au complexe C3. Par contre, les facteurs GATA-2 ou GATA-3 ne se fixent pas au site GATA distal du promoteur de la GSTP1-1. Le complexe C4, le moins retardé, pourrait être constitué d'une isoforme du facteur GATA-1 (Calligaris *et al.*, 1995) ou d'un produit de dégradation du facteur GATA-1 (Gillet *et al.*, 2002). Alors que le complexe C1, le plus retardé, pourrait être formé d'un facteur non spécifique du site GATA. Le complexe C2 n'a pas pu être mis en évidence dans la lignée K562. La séquence GATA proximale quant à elle ne fixe pas ce facteur.

IV. 4- Etude de l'activité liante du site GATAd au cours de la différenciation

Le profil d'activité liante et la nature du complexe C3 (formé par GATA-1) observé dans les cellules K562, nous ont incité à poursuivre nos investigations avec cette lignée. Nous avons donc étudié, par gel retard, l'activité liante du facteur de transcription GATA-1 aux sites GATA distal et proximal du promoteur de la GSTP1-1 au cours de l'induction de la différenciation des cellules K562 par les différents inducteurs décrits précédemment.

Dans la différenciation érythroïde médiée par l'acla, l'augmentation de GSTP1-1 et de l'activité liante du facteur GATA-1 à l'ADN sont corrélées. En revanche, la dox n'induit pas l'activité liante de GATA-1 au site localisée en -1208 du promoteur de la GSTP1-1. Mais cette anthracycline a été décrite pour réguler l'expression de gènes érythroïdes par une stabilisation de l'ARNm (Morceau *et al.*, 1996b) plutôt que par une activation de l'initiation de la transcription *via* GATA-1. Ces données sont en accord avec nos résultats décrivant une augmentation de l'ARNm de GSTP1-1 par la dox puisque l'induction est plus faible que celle de l'acla. D'autres expériences sont nécessaires pour déterminer plus précisément le rôle de la dox dans la stabilisation de l'ARNm de GSTP1-1 ou dans d'autres mécanismes de régulation post-transcriptionnels.

Durant la différenciation mégacaryocytaire induite par l'ester de phorbol TPA, par contre, nous observons une forte diminution de l'expression de GSTP1-1 corrélée à une importante perte de l'activité liante de GATA-1 à l'ADN.

Les résultats obtenus avec le TPA sont comparables à ceux obtenus avec le butyrate à la concentration de 2 mM permettant d'induire la différenciation mégacaryocytaire. En effet, la baisse d'expression de l'ARNm de GSTP1-1 en fonction du temps est corrélée à une baisse de l'activité liante de la protéine GATA-1 à la séquence distale du promoteur de la GSTP1-1. Nous pouvons également observer une baisse en fonction du temps de l'activité liante du facteur GATA-1 avec la concentration de 1 mM. Cette diminution est moins importante et plus lente que dans le cas de l'induction par le butyrate à 2 mM. Ces résultats sont en adéquation avec d'autres travaux qui ont montré une déplétion du transcrit de GATA-1 dans des cellules érythroleucémiques J2E traitées au butyrate (Busfield *et al.*, 1995).

En revanche, dans le cas de l'induction de la différenciation médiée par l'hémine, nous observons une augmentation transitoire de l'activité liante GATA-1 au premier jour de traitement. Cette augmentation est suivie, à partir du deuxième jour, d'une diminution progressive de l'activité liante en fonction du temps. Ces résultats semblent plus délicats à interpréter, puisqu'il n'y pas de corrélation entre l'activité liante de GATA-1 au promoteur du gène de la GSTP1-1 et l'expression de l'ARNm correspondant à ce gène, malgré une expression corrélée à la voie de différenciation induite. Une étude plus approfondie de l'interaction entre GATA-1 et le promoteur du gène qui code pour la GSTP1-1 pourrait probablement être réalisé *in vivo* par la technique d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP).

Aucune variation de l'activité liante du complexe le plus retardé et formé avec la sonde GATA distale et présent également avec la sonde GATA proximale, n'ont pu être mis en évidence. Ces résultats ajoutent des arguments en faveur de la non spécificité de ce complexe formé avec les différentes sondes utilisées incluant les séquences mutées et avec les différentes lignées testées.

Nos résultats nous permettent de décrire l'implication du facteur de transcription GATA-1 dans la régulation de l'expression du gène GSTP1-1 spécifique de la voie de différenciation érythroïde dans les cellules K562. L'expression de la GSTP1-1 pourrait être liée à la différenciation dans la mesure où l'on observe une augmentation (différenciation érythroïde) et une diminution (différenciation mégacaryocytaire). Toutefois, l'augmentation dans les cellules induites à se différencier vers la voie érythroïde n'est pas systématique et semble être dépendante de GATA-1.

Le facteur de transcription GATA-1 est un médiateur central dans l'expression des gènes érythroïdes en interagissant avec de multiples protéines telles que FOG-1, EKLF, Sp1, CBP/p300 et PU.1.

Les mécanismes par lesquels ces interactions influencent les fonctions de GATA-1 ne sont pas complètement connus. GATA-1 peut interagir physiquement avec FOG-1, ce qui est nécessaire pour une maturation érythroïde et mégacaryocytaire normale *in vivo* (Crispino *et al.*, 1999 ; Fox *et al.*, 1999 ; Tsang *et al.*, 1997).

GATA-1 peut également interagir avec PU.1, un facteur de la famille ETS spécifique des voies myéloïde et lymphoïde. Par cette interaction, PU.1 réprime GATA-1, ce qui entraîne un blocage évident de la différenciation érythroïde (Rekhtman *et al.*, 2003 ; Rekhtman *et al.*, 1999 ; Walsh *et al.*, 2002 ; Zhang *et al.*, 2000).

Plus récemment, il a été montré que GATA-1 pouvait être réprimé par une augmentation de c-Jun *via* une interaction avec un effecteur de la voie de signalisation Notch, le facteur HERP2 (hairy-enhancer-of-split-related factor) activé par c-Jun (Elagib *et al.*, 2004). c-Jun est surexprimé dans de nombreux cancers et notamment dans les leucémies (Racke *et al.*, 2001 ; Rangatia *et al.*, 2003). Mais tous les membres de la famille Jun sont également augmentés (Prochownik *et al.*, 1990) et inhibent la différenciation érythroïde.

Toutes les modifications de l'activité liante de GATA-1 et ses interactions avec différents partenaires et cofacteurs pourraient expliquer les différences observées au niveau de la régulation de l'expression de la GSTP1-1. De plus, la différenciation des cellules K562, vers la voie érythroïde par les anthracyclines, s'accompagne pour la dox, de modifications au niveau post-transcriptionnel en augmentant la demi-vie des ARNm de gènes érythroïdes tels que la PBGD et GATA-1, contrairement à l'acla qui agit sur l'activation du facteur GATA-1, activant ainsi la transcription des gènes de γ -globine, de PBGD (Gillet *et al.*, 2002 ; Morceau *et al.*, 1996a ; Morceau *et al.*, 1996b). Ce sont ces propriétés sur la transcription qui pourrait être à l'origine des variations observées sur l'expression du gène de GSTP1-1.

V- ETUDE DES MECANISMES POST-TRANSCRIPTIONNELS IMPLIQUES DANS LA REGULATION DE L'EXPRESSION DE LA GSTP1-1

V. 1- Etude de la stabilité de l'ARNm de GSTP1-1 après traitement par l'hémine

La différenciation érythroïde des cellules K562 induite par 30 μ M d'hémine a permis de montrer une augmentation de l'expression du gène de GSTP1-1 mais à l'opposé de ce que nous avons observé avec l'acla, l'activité liante du facteur GATA-1 sur le site GATAd n'est induite que de manière transitoire par l'hémine.

En étudiant l'expression de l'ARNm de GATA-1, nous avons mis en évidence une diminution au cours du temps corrélée à l'activité liante de la protéine correspondante sur le site distal.

Les effets moléculaires de l'hémine au niveau transcriptionnel ont préablablement été démontrés par Partington et Patient (Partington and Patient, 1999). En effet, l'activité liante de GATA-1 au promoteur du gène d' α -globine augmente après induction de la différenciation érythroïde par 50 μ M d'hémine. Nos résultats confirment en partie ces données puisque nous avons observé une augmentation initiale de l'activité liante à GATAd après 24 h de traitement. Nos résultats obtenus avec une concentration différenciante de 30 μ M montrent qu'un traitement prolongé par l'hémine induit une réduction de l'expression de l'ARNm de GATA-1 ainsi que de l'activité liante du facteur de transcription au site GATAd. Les différences au niveau des sites spécifiques GATA de l' α -globine et de la GSTP1-1 ainsi que les modifications post-traductionnelles et notamment le taux différentiel de phosphorylation du facteur GATA-1 permettent d'expliquer l'affinité du facteur GATA-1 au promoteur du gène du GSTP1-1. Néanmoins, d'autres mécanismes de régulation post-transcriptionnels doivent être pris en considération pour une meilleure compréhension de l'expression régulée de GSTP1-1.

En effet, l'ARNm de GSTP1-1 apparaît être très stable dans les cellules leucémiques K562 avec une demi-vie de 40 h qui est augmentée jusqu'à 92 h après la différenciation érythroïde induite par un traitement à l'hémine. La demi-vie de l'ARNm des GST dépend du modèle cellulaire et de l'isoforme exprimée. Benbrahim-Tallaa *et al.* ont rapporté que la

demi-vie de l'ARNm est de 18 h pour la GST- α dans les cellules de Sertoli et n'est pas affectée par la présence de TNF- α alors que la follicle stimulating hormone (FSH) augmente le niveau d'expression de l'ARNm de GST- α en augmentant sa demi-vie à 119 h (Benbrahim-Tallaa *et al.*, 2002). En accord avec Rogieres *et al.*, la demie vie de l'ARNm de GSTA1/A2 de rat est de 3,6 h dans des animaux contrôle alors qu'il est augmenté à 10,2 h dans les animaux traités au phénobarbital (Rogiers *et al.*, 1995). Schwartz et Norris ont démontré que hGSTYBX, un gène de la classe μ des GST est exprimé dans la lignée cellulaire de hamster DDT1MF-2 (tumeur de muscles lisses) (Schwartz and Norris, 1992). L'induction par les glucocorticoïdes stabilise l'ARNm correspondant avec une demie vie de plus de 48 h. De plus Jhaveri *et al.* ont montré qu'il existe une plus grande stabilité de l'ARNm de GSTP1-1 dans les cellules ER – HS578T comparées à des cellules ER + MCF7 de cellules de cancer du sein (Jhaveri *et al.*, 1997).

Nos résultats ajoutent la GSTP1-1 à l'ensemble des gènes qui sont stabilisés lors de la différenciation. Cette stabilisation de l'ARNm durant la maturation érythroïde suggère un rôle important de la GSTP1-1 en tant que cytoprotecteur des érythrocytes matures énucléés dans lesquels celle-ci est l'isoforme majoritairement exprimée (Guthenberg and Mannervik, 1981). En effet, durant la différenciation des cellules érythroïdes une maturation se met en place conduisant à l'élimination d'organelles cellulaires incluant le noyau. Afin d'assurer la régulation d'expression de protéines vitales, la stabilisation de l'ARNm est connue pour contribuer au maintien des fonctions physiologiques des cellules rouges du sang.

Un autre exemple de stabilisation de l'ARNm par l'hémine a été observé dans le cas de l'ARNm de globine (Bonanou-Tzedaki *et al.*, 1984). De plus, durant la différenciation érythroïde des cellules K562 médiée par l'hémine, une augmentation de l'expression de la heat shock protein (HSP) 70 a été observée (Theodorakis *et al.*, 1989). De plus, Pirkkala *et al.* ont montré de multiples processus de régulation de l'expression du heat shock transcription factor 2 (HSF2) (Pirkkala *et al.*, 1999). En effet, l'augmentation du taux de protéines HSF2 est précédée par une induction transcriptionnelle du gène HSF2, accompagnée d'une augmentation de la stabilité de l'ARNm de l'HSF2 durant la différenciation érythroïde induite par l'hémine. Cette augmentation conduit à l'induction de l'interaction HSF-HSP.

D'autres inducteurs de la différenciation érythroïde ont été décrits pour réguler des gènes spécifiques au niveau posttranscriptionnel. Outre l'effet stabilisateur de la dox (Morceau *et al.*, 1996b), il a été démontré qu'un traitement par le GTP conduit à une importante augmentation de la demi-vie de l'ARNm de γ -globine. Cette stabilisation produite par le GTP est médiée par la région non traduite en 3' (3'-NT) de l'ARNm de γ -globine. Dans ce modèle cellulaire, une activation précoce de la transcription du gène de la γ -globine est suivie par une stabilisation de son ARNm (Morceau *et al.*, 2000).

Les déterminants moléculaires de l'augmentation de la stabilité des ARNm ont été préalablement décrits pour des gènes spécifiques de la voie érythroïde incluant l'ARNm de globine humaine (Bonanou-Tzedaki *et al.*, 1984 ; Yu and Russell, 2001).

Les régions 3' UTR des ARNm de la 15-lipoxygénase (LOX) (Ostareck-Lederer *et al.*, 1994) et de la 5-aminolevulinate synthétase (eALAS) se révélent suffisantes pour permettre le contrôle traductionnel d'un ARNm rapporteur dans les cellules érythroleucémiques murines (MEL) transfectées (Melefors *et al.*, 1993). La GGT, une autre enzyme du métabolisme du glutathion, a été décrite pour être régulée au niveau post-transcriptionnel (Chobert *et al.*, 1996; Diederich *et al.*, 1993). La région 3'-NT de l'ARNm de la GSTP1-1 comporte une région de 76 nucléotides incluant une région de 13 nucléotides, riches en pyrimidines. Une région similaire est impliquée dans la régulation de la stabilisation de l'ARNm d' α -globine par la (PolyC) binding protein α CP (Kong *et al.*, 2003). Cependant le type de séquences qui régule l'augmentation de la stabilité de l'ARNm de la GSTP1-1 reste à être élucidé.

V. 2- Stabilité de l'ARNm de GSTP1-1 après traitement par le butyrate

La différenciation des cellules K562 induite par le butyrate a permis de montrer une diminution de l'expression du gène de GSTP1-1 au cours du temps. L'activité liante du facteur GATA-1 sur le site GATA distal est également fortement diminuée. En étudiant l'expression de l'ARNm de GATA-1, nous avons mis en évidence une diminution de l'expression de l'ARNm au cours du temps corrélée à l'activité liante de la protéine correspondante sur le site distal. Néanmoins, l'expression du facteur GATA-1 et son activité liante ne peuvent pas à elles seules expliquer les différences observées entre les concentrations de 1 mM et 2 mM au niveau de l'expression de l'ARNm de GSTP1-1. En

effet, pour des temps équivalents de traitement, la diminution est plus rapide avec la concentration de 2 mM, ce qui suggère une accélération de la dégradation du messager.

Nous avons alors évalué l'effet des différentes concentrations de butyrate sur la stabilité de l'ARNm de GSTP1-1. Nos résultats montrent que la plus forte concentration de butyrate affecte, en plus, la demi-vie de l'ARNm de GSTP1-1. Ainsi, la diminution de la stabilité de l'ARNm explique la réduction importante de l'ARNm de la GSTP1-1 à la concentration de 2 mM de butyrate par rapport à celle de 1 mM.

Les voies conduisant à ces déstabilisations restent à être élucidées mais ces résultats sont confirmés par différents travaux où un traitement par le butyrate réduit la demi-vie de différents ARNm incluant celui de DAF (decay-accelerating factor) dans les cellules de cancers du colon (Andoh *et al.*, 2002), l'ARNm de la cholestérol acétyl transférase dans des cellules HepG2 (Skretting *et al.*, 1997) et les ARNm des protéines A, B et C du surfactant qui sont exprimées dans les poumons de rats fœtaux (Peterec *et al.*, 1994).

En conclusion, ces données démontrent que l'expression de GSTP1-1 ne dépend pas seulement de la voie de différenciation mais essentiellement de la nature et de la concentration de l'inducteur et de la voie de signalisation activée ou inhibée. Ainsi, la diminution de l'expression de la GSTP1-1 est corrélée à une réduction de l'interaction de son promoteur avec GATA-1 et à une dégradation plus rapide de l'ARNm.

<u>V. 3- Effet de l'inhibition de la traduction sur l'activité différenciante et sur la</u> <u>synthèse *de novo* de protéines</u>

L'expérience d'inhibition de la traduction par le CHX de cellules K562 induites à se différencier vers la voie érythroïde par l'acla, la dox ou l'hémine montre que l'augmentation d'expression de la GSTP1-1 nécessite, quelque soit le mode d'action de ces différents inducteurs, une synthèse *de novo* de protéines. En effet, l'inhibition de la synthèse *de novo* de protéines entraîne une supression de la capacité des inducteurs à différencier les cellules et en même temps une inhibition de la surexpression de l'ARNm de la GSTP1-1.

Ces protéines dont la synthèse est induite, pourraient ainsi intervenir dans la régulation transcriptionnelle et / ou post-transcriptionnelle des gènes liées au phénotype érythroïde et des gènes impliqués dans l'expression du gène de GSTP1-1.

Cependant, il est intéressant de noter que dans le cas de l'hémine, il semble qu'une partie de l'induction de l'hémoglobinisation ne soit pas dépendante d'une synthèse *de novo* de protéines.

<u>VI- EFFETS DE LA DIFFERENCIATION ERYTHROÏDE INDUITE PAR LA DOX</u> <u>SUR LE TRANSCRIPTOME</u>

Nous avons voulu approfondir l'effet de la dox, un médicament anti-tumoral utilisé en clinique, sur un large éventail de gènes. Afin d'évaluer si d'autres gènes non spécifiques des voies érythroïde et mégacaryocytaire peuvent être modulés au cours de la différenciation, nous avons réalisé une approche génomique par des expériences d'hybridations de micropuces.

Les résultats nous ont permis de mettre en évidence des variations d'expression de 550 gènes, particulièrement au deuxième jour de traitement par la dox. Parmi ces variations, nous avons pu constater que la majorité des gènes en relation avec le système nerveux sont surexprimés. Ainsi, sur quinze gènes identifiés comme tels, treize présentent des facteurs positifs de modification compris entre 1,56 et 8,86 alors que deux seulement semblent légèrement réprimés.

L'expression de tels gènes dans une lignée hématopoïétique, transformée et induite à se différencier par un anticancéreux puissant, nous a semblé particulièrement intéressant. En effet, des travaux ont montré que les cellules souches hématopoïétiques et neuropoïétiques peuvent partager dans certaines conditions des caractéristiques communes. Notamment, des études *in vitro* ont démontré que des cellules hématopoïétiques pouvaient être induites à exprimer des marqueurs de cellules nerveuses. Ainsi, Sanchez-Ramos *et al.*, ont découvert que des cellules stromales de moelle osseuse en culture pouvaient exprimer la nestine, un marqueur de cellule souche nerveuse, ainsi que des antigènes spécifiques des astrocytes et des neurones lorsqu'elles sont exposées aux facteurs EGF (epidermal growth factor) et BDNF (brain-derived neurotrophic factor) ou lorsqu'elles sont cultivées en présence de cellules fœtales mesencéphaliques ou de cellules striatales (Sanchez-Ramos *et al.*, 2000). De plus, il a été montré que des cellules souches nerveuses de souris transplantées dans des souris irradiées, pouvaient donner naissance, dans la rate et dans la moelle osseuse, à des cellules qui présentent des caractéristiques morphologiques de cellules hématopoïétiques (granulocytes, macrophages, mégacaryocytes et lymphocytes B) (Bjornson *et al.*, 1999). Enfin, l'antigène de

cellule souche hématopoïétique AC133 est en fait également exprimé dans les cellules neuropoïétiques (Uchida *et al.*, 2000).

A notre connaissance, aucune étude n'a été publiée concernant l'expression de gènes caractéristiques du système nerveux dans des lignées transformées hématopoïétiques, ni dans des cellules cancéreuses traitées par la dox. Nos résultats de micropuces, relatifs à ces gènes et à nos conditions spécifiques de traitements, seront approfondis par une étude de l'expression des ARNm et des protéines.

Par ailleurs, nous avons constaté la répression d'un grand nombre de gènes. Notamment, les ARNm des différentes classes d'histones présentes sur la puce à ADN révélent une inhibition de leur expression au cours des traitements différenciants des cellules K562 par la dox. Il serait intéressant de vérifier qu'une corrélation existe entre ce phénomène et l'effet cytostatique de la dox à la concentration de 40 nM et le blocage du cycle cellulaire en phase G2 qu'elle provoque (Gorisse *et al.*, 1990).

Enfin, certains résultats apportés par les micropuces vont dans le sens de données déjà connues. La dox, inducteur de la différenciation érythroïde des cellules K562, induit l'expression de deux gènes de globines autres que γ et α . Le gène de la δ -globine qui est normalement minoritaire à l'état adulte chez l'homme et le gène de la ζ -globine qui est une forme embryonnaire sont effectivement surexprimés. D'autre part, le gène de la GSTP1-1, ainsi que deux autres GST (GSTM3 et GSTA2), confortent les résultats présentés dans cette thèse et obtenus par northern blot.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

I- CONCLUSION

Les mécanismes de détoxication font partie des processus vitaux de la survie cellulaire. Néanmoins, l'aspect positif que représentent ces mécanismes de défense cellulaire peut se révéler être un obstacle dans le cas de la pathologie cancéreuse. Ces mécanismes participent alors au développement de la résistance aux agents utilisés.

La recherche et le développement de nouvelles stratégies anticancéreuses qui sont plus spécifiques et qui sont capables de contourner ou de diminuer ces conséquences sont primordiaux. La thérapie différenciante s'inscrit dans cet objectif.

Ainsi, l'étude des mécanismes de régulation des systèmes de défense cellulaire qui conduisent à la résistance au cours de ce type de stratégie anticancéreuse semble être un point important pour développer des protocoles thérapeutiques ne favorisant pas ces mécanismes de résistance. Cette approche thérapeutique est d'autant plus intéressante, dans le cas des leucémies, qu'elles ne peuvent pas être traitées par chirurgie.

Nous avons mis en évidence une régulation de l'expression de la GSTP1-1 dans la lignée leucémique K562 qui est dépendante de l'induction de la différenciation hématopoïétique :

- L'utilisation d'inducteurs de la différenciation érythroïde (acla, dox, hémine), évaluée par le taux de cellules benzidine positives, conduit à une augmentation de l'expression de la GSTP1-1, alors que le TPA en tant qu'inducteur de la différenciation mégacaryocytaire, évaluée par le taux d'expression du marqueur de surface plaquettaire CD61, entraîne une diminution de son expression dans les cellules K562.
- En même temps, ces inducteurs de la différenciation des cellules K562, utilisés pour traiter les cellules Jurkat qui ne sont pas capables de se différencier, n'entraînent aucune modification de l'expression de l'ARNm de GSTP1-1 dans ces cellules.

Ces résultats nous ont amené à étudier l'implication de facteurs de transcription spécifiques des voies de régulation de l'hématopoïèse dans la régulation de la GSTP1-1 :

- L'étude du promoteur du gène codant pour la GSTP1-1 a révélé l'existence de 2 sites GATA et les expériences de transfection transitoires nous ont permis de montrer que les inducteurs de la différenciation des cellules K562 utilisés sont capables de faire varier l'expression de facteurs GATA.
- L'étude de ces sites GATA montre que le site GATA distal est capable de fixer de manière spécifique le facteur GATA-1. De plus, il existe une corrélation entre la modulation de l'activité liante du facteur GATA-1, à ce site, par les inducteurs de différenciation et l'expression du gène de la GSTP1-1. Ces observations suggèrent fortement une régulation de la GSTP1-1 au niveau transcriptionnel *via* une interaction entre le facteur GATA-1 et le site GATA distal de son promoteur. Cette régulation semble être étroitement liée aux processus de différenciation qui impliquent le facteur clé de la différenciation érythroïde et mégacaryocytaire. En revanche, le site GATA proximal ne semble pas être fonctionnel.

Ces résultats nous ont amené à étudier les mécanismes post-transcriptionnels de la GSTP1-1 :

 Nos résultats montrent que lorsque l'expression de la GSTP1-1 ne peut être corrélée à l'expression du facteur GATA-1, il existe une régulation post-transcriptionnelle qui permet d'expliquer les différences observées. En effet, l'hémine qui induit une augmentation transitoire puis une baisse de l'activité liante du facteur GATA-1, entraîne en même temps une stabilisation de l'ARNm de GSTP1-1. De même, les différences d'expression observées après induction par le butyrate peuvent s'expliquer au niveau de la stabilité de l'ARNm de GSTP1-1.

Nous avons essayé, au cours de nos travaux, d'appréhender les mécanismes de la régulation de l'expression de la GSTP1-1 au cours de l'induction de la différenciation des cellules leucémiques K562. Nous avons vu que des mécanismes complexes entrent en jeu. L'ensemble de ces résultats est résumé sous forme d'un schéma (Figure 62).



<u>Figure 62</u> : Représentation schématique des mécanismes de régulation transcriptionnelle par GATA-1 et de régulation post-transcriptionnelle de l'expression de la GSTP1-1 au cours de l'induction de la différenciation érythroïde et mégacaryocytaire des cellules K562.

II- PERSPECTIVES

Afin de préciser la régulation de l'expression de la GSTP1-1 au cours des différentes voies de différenciation, des expériences complémentaires sont nécessaires pour répondre à plusieurs questions qui ne sont pas encore résolues.

D'abord, l'étude menée sur la régulation de l'expression de la GSTP1-1 au cours des voies de différenciation érythroïde et mégacaryocytaire peut être complétée et étendue à d'autres voies de l'hématopoïèse. Pour cela, nous pourrons utiliser d'autres inducteurs de la différenciation des cellules K562 mais aussi d'autres lignées cellulaires capables de se différencier vers la voie érythroïde et/ou mégacaryocytaire. De même, nous pourrons induire la différenciation de lignées cellulaires vers d'autres voies de l'hématopoïèse.

Les sites GATA du promoteur du gène codant pour la GSTP1-1 seront étudiés par transfection de vecteurs recombinants associant différentes régions du promoteur de la GSTP1-1 et le gène rapporteur de la luciférase. Ces constructions associant le ou les sites GATA sauvages ou mutés permettraient de mettre en évidence le rôle de ces sites.

La transfection de vecteurs d'expression du facteur de transcription GATA-1 permettrait d'affiner le rôle de ce facteur de transcription par rapport à l'expression du gène codant pour la GSTP1-1. En effet, des co-transfections de vecteurs associant les différentes parties du promoteur de la GSTP1-1 et du plasmide d'expression de GATA-1 dans une lignée cellulaire qui n'exprime pas GATA-1 permettraient de confirmer l'implication de GATA-1 dans la régulation de l'expression de la GSTP1-1.

Cette étude permettra de déterminer la nécessité ou non de l'un ou de l'autre des deux sites GATA pour l'expression du gène de la GSTP1-1 à travers l'expression du gène rapporteur. Cette étude expliquera comment l'induction de la différenciation peut agir sur l'activation transcriptionnelle du gène de la GSTP1-1 *via* GATA-1. De plus, nous pourrons corréler l'activation des facteurs de transcription GATA à celle du promoteur du gène de la GSTP1-1 lors de l'induction de la différenciation des cellules transfectées. Il serait aussi très intéressant de voir quelle est l'importance de l'environnement du site GATA dans la régulation de ce site. Ceci sera possible grâce à des mutations à l'extérieur du site, suivi de transfections.

Concernant l'interaction entre le facteur GATA-1 et le promoteur de la GSTP1-1, nos résultats peuvent être confirmés par d'autres approches expérimentales. Une analyse par Footprint à la DNase ou par ChIP assay permettrait de voir si les sites GATA du gène de la GSTP1-1 sont accessibles dans la cellule, de localiser précisément les sites de fixation et d'identifier le ou les facteurs de transcription capables de se lier *in vivo*.

En outre, l'implication de co-facteurs de GATA-1 qui jouent un rôle déterminant dans la régulation des processus de différenciation, comme PU.1, FOG-1, Fli1, HERP2, pourraîent être étudié sur l'expression de la GSTP1-1 dans les lignées leucémiques humaines induites à se différencier.

Finalement, dans une approche par micropuce, après induction de la différenciation érythroïde des cellules K562 par la dox, nous avons observé un certain nombre de modifications et particulièrement un effet inhibiteur de la dox sur l'expression des ARNm des histones. L'ensemble de ces résultats devra être confirmé par RT-PCR en temps réel afin de mettre en évidence de nouvelles cibles de la dox après induction de la différenciation.

Bibliographie

G

BIBLIOGRAPHIE

C

Adler V, and Pincus MR. Effector peptides from glutathione-S-transferase-pi affect the activation of jun by jun-

N-terminal kinase. Ann Clin Lab Sci, 34 (1), 2004, 35-46.

Adler V, Yin Z, Fuchs SY, Benezra M, Rosario L, Tew KD, Pincus MR, Sardana M, Henderson CJ, Wolf CR, Davis RJ, and Ronai Z. Regulation of JNK signaling by GSTp. *Embo J*, **18** (**5**), 1999, 1321-34.

Ali-Osman F, Stein DE, and Renwick A. Glutathione content and glutathione-S-transferase expression in 1,3bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea-resistant human malignant astrocytoma cell lines. *Cancer Res*, **50** (**21**), 1990, 6976-80.

Alitalo R, Partanen J, Pertovaara L, Holtta E, Sistonen L, Andersson L, and Alitalo K. Increased erythroid potentiating activity/tissue inhibitor of metalloproteinases and jun/fos transcription factor complex characterize tumor promoter-induced megakaryoblastic differentiation of K562 leukemia cells. *Blood*, **75** (**10**), 1990, 1974-82.

Ammendola R, Mesuraca M, Russo T, and Cimino F. The DNA-binding efficiency of Sp1 is affected by redox changes. *Eur J Biochem*, **225** (1), 1994, 483-9.

Anderson KP, Kern CB, Crable SC, and Lingrel JB. Isolation of a gene encoding a functional zinc finger protein homologous to erythroid Kruppel-like factor: identification of a new multigene family. *Mol Cell Biol*, **15** (**11**), 1995, 5957-65.

Anderson ME. Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. *Chem Biol Interact*, **111-112** 1998, 1-14.

Andoh A, Shimada M, Araki Y, Fujiyama Y, and Bamba T. Sodium butyrate enhances complement-mediated cell injury via down-regulation of decay-accelerating factor expression in colonic cancer cells. *Cancer Immunol Immunother*, **50** (**12**), 2002, 663-72.

Andrews NC. The NF-E2 transcription factor. Int J Biochem Cell Biol, **30** (4), 1998, 429-32.

Andrews NC, Kotkow KJ, Ney PA, Erdjument-Bromage H, Tempst P, and Orkin SH. The ubiquitous subunit of erythroid transcription factor NF-E2 is a small basic-leucine zipper protein related to the v-maf oncogene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90** (24), 1993, 11488-92.

Aplan PD, Nakahara K, Orkin SH, and Kirsch IR. The SCL gene product: a positive regulator of erythroid differentiation. *Embo J*, **11** (**11**), 1992, 4073-81.

Arca P, Garcia P, Hardisson C, and Suarez JE. Purification and study of a bacterial glutathione S-transferase. *FEBS Lett*, **263** (1), 1990, 77-9.

Arcamone F, Franceschi G, Penco S, and Selva A. Adriamycin (14-hydroxydaunomycin), a novel antitumor antibiotic. *Tetrahedron Lett*, **13** 1969, 1007-10.

Arceci RJ, King AA, Simon MC, Orkin SH, and Wilson DB. Mouse GATA-4: a retinoic acid-inducible GATAbinding transcription factor expressed in endodermally derived tissues and heart. *Mol Cell Biol*, **13** (**4**), 1993, 2235-46.

Aries A, Trentesaux C, Ottolenghi S, Jardillier JC, Jeannesson P, and Doubeikovski A. Activation of erythroidspecific promoters during anthracycline-induced differentiation of K562 cells. *Blood*, **87** (7), 1996, 2885-90.

Armstrong RN. Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chem Res Toxicol*, **10** (1), 1997, 2-18.

Aro AL, Savikko J, Pulkkinen V, and von Willebrand E. Expression of insulin-like growth factors IGF-I and IGF-II, and their receptors during the growth and megakaryocytic differentiation of K562 cells. *Leuk Res*, **26** (9), 2002, 831-7.

Arola OJ, Saraste A, Pulkki K, Kallajoki M, Parvinen M, and Voipio-Pulkki LM. Acute doxorubicin cardiotoxicity involves cardiomyocyte apoptosis. *Cancer Res*, **60** (7), 2000, 1789-92.

Asakura T, Hashizume Y, Tashiro K, Searashi Y, Ohkawa K, Nishihira J, Sakai M, and Shibasaki T. Suppression of GST-P by treatment with glutathione-doxorubicin conjugate induces potent apoptosis in rat hepatoma cells. *Int J Cancer*, **94** (2), 2001, 171-7.

Asano H, Li XS, and Stamatoyannopoulos G. FKLF, a novel Kruppel-like factor that activates human embryonic and fetal beta-like globin genes. *Mol Cell Biol*, **19** (**5**), 1999, 3571-9.

Asano H, Li XS, and Stamatoyannopoulos G. FKLF-2: a novel Kruppel-like transcriptional factor that activates globin and other erythroid lineage genes. *Blood*, **95** (11), 2000, 3578-84.

Atkins WM, Wang RW, Bird AW, Newton DJ, and Lu AY. The catalytic mechanism of glutathione S-transferase (GST). Spectroscopic determination of the pKa of Tyr-9 in rat alpha 1-1 GST. *J Biol Chem*, **268** (**26**), 1993, 19188-91.

Autrup JL, Hokland P, Pedersen L, and Autrup H. Effect of glutathione S-transferases on the survival of patients with acute myeloid leukaemia. *Eur J Pharmacol*, **438** (1-2), 2002, 15-8.

Bacolod MD, Johnson SP, Ali-Osman F, Modrich P, Bullock NS, Colvin OM, Bigner DD, and Friedman HS. Mechanisms of resistance to 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea in human medulloblastoma and rhabdomyosarcoma. *Mol Cancer Ther*, **1** (9), 2002, 727-36.

Balla J, Balla G, Jeney V, Kakuk G, Jacob HS, and Vercellotti GM. Ferriporphyrins and endothelium: a 2-edged sword-promotion of oxidation and induction of cytoprotectants. *Blood*, **95** (**11**), 2000, 3442-50.

Bar Sela G, Tsalic M, Gaitini D, Steiner M, and Haim N. Etoposide, doxorubicin and cisplatin alternating with 5-fluorouracil, doxorubicin and high-dose methotrexate in patients with advanced adenocarcinoma of the stomach or the gastroesophageal junction. *J Chemother*, **14** (6), 2002, 623-6.

Beaumont PO, Moore MJ, Ahmad K, Payne MM, Lee C, and Riddick DS. Role of glutathione S-transferases in the resistance of human colon cancer cell lines to doxorubicin. *Cancer Res*, **58** (**5**), 1998, 947-55.

Beere HM, and Hickman JA. Differentiation: a suitable strategy for cancer chemotherapy? *Anticancer Drug Des*, **8** (4), 1993, 299-322.

Benbrahim-Tallaa L, Tabone E, Tosser-Klopp G, Hatey F, and Benahmed M. Glutathione S-transferase alpha expressed in porcine Sertoli cells is under the control of follicle-stimulating hormone and testosterone. *Biol Reprod*, **66** (6), 2002, 1734-42.

Benderra Z, Trussardi A, Morjani H, Villa AM, Doglia SM, and Manfait M. Regulation of cellular glutathione modulates nuclear accumulation of daunorubicin in human MCF7 cells overexpressing multidrug resistance associated protein. *Eur J Cancer*, **36** (**3**), 2000, 428-34.

Bergelson S, Pinkus R, and Daniel V. Induction of AP-1 (Fos/Jun) by chemical agents mediates activation of glutathione S-transferase and quinone reductase gene expression. *Oncogene*, **9** (2), 1994, 565-71.

Bjornson CR, Rietze RL, Reynolds BA, Magli MC, and Vescovi AL. Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science*, **283** (**5401**), 1999, 534-7.

Blackburn AC, Woollatt E, Sutherland GR, and Board PG. Characterization and chromosome location of the gene GSTZ1 encoding the human Zeta class glutathione transferase and maleylacetoacetate isomerase. *Cytogenet Cell Genet*, **83** (1-2), 1998, 109-14.

Blank V, and Andrews NC. The Maf transcription factors: regulators of differentiation. *Trends Biochem Sci*, **22** (**11**), 1997, 437-41.

Blobel GA, Nakajima T, Eckner R, Montminy M, and Orkin SH. CREB-binding protein cooperates with transcription factor GATA-1 and is required for erythroid differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95** (5), 1998, 2061-6.

Board PG, Baker RT, Chelvanayagam G, and Jermiin LS. Zeta, a novel class of glutathione transferases in a range of species from plants to humans. *Biochem J*, **328** (**Pt 3**) 1997, 929-35.

Board PG, Coggan M, Chelvanayagam G, Easteal S, Jermiin LS, Schulte GK, Danley DE, Hoth LR, Griffor MC, Kamath AV, Rosner MH, Chrunyk BA, Perregaux DE, Gabel CA, Geoghegan KF, and Pandit J. Identification, characterization, and crystal structure of the Omega class glutathione transferases. *J Biol Chem*, **275** (**32**), 2000, 24798-806.

Board PG, and Webb GC. Isolation of a cDNA clone and localization of human glutathione S-transferase 2 genes to chromosome band 6p12. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84** (8), 1987, 2377-81.

Bonanou-Tzedaki SA, Sohi MK, and Arnstein HR. The effect of haemin on RNA synthesis and stability in differentiating rabbit erythroblasts. *Eur J Biochem*, **144** (**3**), 1984, 589-96.

Bonnet D, and Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*, **3** (7), 1997, 730-7.

Borde-Chiché P, Diederich M, Morceau F, Wellman M, and Dicato M. Phorbol ester responsiveness of the glutathione S-transferase P1 gene promoter involves an inducible c-jun binding in human K562 leukemia cells. *Leuk Res*, **25** (3), 2001a, 241-7.

Borde-Chiché P, Diederich M, Morceau F, Puga A, Wellman M, and Dicato M. Regulation of transcription of the glutathione S-transferase P1 gene by methylation of the minimal promoter in human leukemia cells. *Biochem Pharmacol*, **61** (**5**), 2001b, 605-12.

Boss EA, Peters WH, Roelofs HM, Boonstra H, Steegers EA, and Massuger LF. Glutathione S-transferases P1-1 and A1-1 in ovarian cyst fluids. *Eur J Gynaecol Oncol*, **22** (6), 2001, 427-32.

Boyes J, Byfield P, Nakatani Y, and Ogryzko V. Regulation of activity of the transcription factor GATA-1 by acetylation. *Nature*, **396** (6711), 1998, 594-8.

Brabender J, Lord RV, Wickramasinghe K, Metzger R, Schneider PM, Park JM, Holscher AH, DeMeester TR, Danenberg KD, and Danenberg PV. Glutathione S-transferase-pi expression is downregulated in patients with Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma. *J Gastrointest Surg*, **6** (3), 2002, 359-67.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72** 1976, 248-54.

Broo K, Larsson AK, Jemth P, and Mannervik B. An ensemble of theta class glutathione transferases with novel catalytic properties generated by stochastic recombination of fragments of two mammalian enzymes. *J Mol Biol*, **318** (1), 2002, 59-70.

Brown LA. Glutathione protects signal transduction in type II cells under oxidant stress. *Am J Physiol*, **266** (2 Pt 1), 1994, L172-7.

Busfield SJ, Spadaccini A, Riches KJ, Tilbrook PA, and Klinken SP. The major erythroid DNA-binding protein GATA-1 is stimulated by erythropoietin but not by chemical inducers of erythroid differentiation. *Eur J Biochem*, **230** (2), 1995, 475-80.

Calligaris R, Bottardi S, Cogoi S, Apezteguia I, and Santoro C. Alternative translation initiation site usage results in two functionally distinct forms of the GATA-1 transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92** (25), 1995, 11598-602.

Cameron EE, Bachman KE, Myohanen S, Herman JG, and Baylin SB. Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nat Genet*, **21** (1), 1999, 103-7.

Campbell E, Takahashi Y, Abramovitz M, Peretz M, and Listowsky I. A distinct human testis and brain mu-class glutathione S-transferase. Molecular cloning and characterization of a form present even in individuals lacking hepatic type mu isoenzymes. *J Biol Chem*, **265** (**16**), 1990, 9188-93.

Cantor AB, Katz SG, and Orkin SH. Distinct domains of the GATA-1 cofactor FOG-1 differentially influence erythroid versus megakaryocytic maturation. *Mol Cell Biol*, **22** (**12**), 2002, 4268-79.

Cantor AB, and Orkin SH. Hematopoietic development: a balancing act. *Curr Opin Genet Dev*, **11** (5), 2001, 513-9.

Carducci MA, Nelson JB, Chan-Tack KM, Ayyagari SR, Sweatt WH, Campbell PA, Nelson WG, and Simons JW. Phenylbutyrate induces apoptosis in human prostate cancer and is more potent than phenylacetate. *Clin Cancer Res*, **2** (2), 1996, 379-87.

Cavalloni G, Dane A, Piacibello W, Bruno S, Lamas E, Brechot C, and Aglietta M. The involvement of humannuc gene in polyploidization of K562 cell line. *Exp Hematol*, **28** (**12**), 2000, 1432-40.

Chenais B, Andriollo M, Guiraud P, Belhoussine R, and Jeannesson P. Oxidative stress involvement in chemically induced differentiation of K562 cells. *Free Radic Biol Med*, **28** (1), 2000, 18-27.

Chenais B, Molle I, and Jeannesson P. Inhibitory effect of nitric oxide on chemically induced differentiation of human leukemic K562 cells. *Biochem Pharmacol*, **58** (**5**), 1999, 773-8.

Chiba T, Ikawa Y, and Todokoro K. GATA-1 transactivates erythropoietin receptor gene, and erythropoietin receptor-mediated signals enhance GATA-1 gene expression. *Nucleic Acids Res*, **19** (**14**), 1991, 3843-8.

Chobert MN, Grondin G, Brouillet A, Laperche Y, and Beaudoin AR. Control of gamma-glutamyl transpeptidase expression by glucocorticoids in the rat pancreas. Correlation with granule formation. *J Biol Chem*, **271** (**21**), 1996, 12431-7.

Choi J, Liu RM, and Forman HJ. Adaptation to oxidative stress: quinone-mediated protection of signaling in rat lung epithelial L2 cells. *Biochem Pharmacol*, **53** (7), 1997, 987-93.

Christman JK, Mendelsohn N, Herzog D, and Schneiderman N. Effect of 5-azacytidine on differentiation and DNA methylation in human promyelocytic leukemia cells (HL-60). *Cancer Res*, **43** (2), 1983, 763-9.

Clapper ML, and Szarka CE. Glutathione S-transferases--biomarkers of cancer risk and chemopreventive response. *Chem Biol Interact*, **111-112** 1998, 377-88.

Collavin L, Gostissa M, Avolio F, Secco P, Ronchi A, Santoro C, and Del Sal G. Modification of the erythroid transcription factor GATA-1 by SUMO-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101** (**24**), 2004, 8870-5.

Commandeur JN, Stijntjes GJ, and Vermeulen NP. Enzymes and transport systems involved in the formation and disposition of glutathione S-conjugates. Role in bioactivation and detoxication mechanisms of xenobiotics. *Pharmacol Rev*, **47** (2), 1995, 271-330.

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

Cornic M, Agadir A, Degos L, and Chomienne C. Retinoids and differentiation treatment: a strategy for treatment in cancer. *Anticancer Res*, **14** (**6A**), 1994, 2339-46.

Cotgreave IA, and Gerdes RG. Recent trends in glutathione biochemistry--glutathione-protein interactions: a molecular link between oxidative stress and cell proliferation? *Biochem Biophys Res Commun*, **242** (1), 1998, 1-9.

Court EL, Smith MA, Avent ND, Hancock JT, Morgan LM, Gray AG, and Smith JG. DNA microarray screening of differential gene expression in bone marrow samples from AML, non-AML patients and AML cell lines. *Leuk Res*, **28** (7), 2004, 743-53.

Crispino JD, Lodish MB, MacKay JP, and Orkin SH. Use of altered specificity mutants to probe a specific protein-protein interaction in differentiation: the GATA-1:FOG complex. *Mol Cell*, **3** (2), 1999, 219-28.

Crossley M, and Orkin SH. Phosphorylation of the erythroid transcription factor GATA-1. *J Biol Chem*, **269** (24), 1994, 16589-96.

Crossley M, Tsang AP, Bieker JJ, and Orkin SH. Regulation of the erythroid Kruppel-like factor (EKLF) gene promoter by the erythroid transcription factor GATA-1. *J Biol Chem*, **269** (**22**), 1994, 15440-4.

Crossley M, Whitelaw E, Perkins A, Williams G, Fujiwara Y, and Orkin SH. Isolation and characterization of the cDNA encoding BKLF/TEF-2, a major CACCC-box-binding protein in erythroid cells and selected other cells. *Mol Cell Biol*, **16** (4), 1996, 1695-705.

Dalyot N, Fibach E, Ronchi A, Rachmilewitz EA, Ottolenghi S, and Oppenheim A. Erythropoietin triggers a burst of GATA-1 in normal human erythroid cells differentiating in tissue culture. *Nucleic Acids Res*, **21** (**17**), 1993, 4031-7.

Das D, Pintucci G, and Stern A. MAPK-dependent expression of p21(WAF) and p27(kip1) in PMA-induced differentiation of HL60 cells. *FEBS Lett*, **472** (1), 2000, 50-2.

Davidson SM, and Morange M. Hsp25 and the p38 MAPK pathway are involved in differentiation of cardiomyocytes. *Dev Biol*, **218** (2), 2000, 146-60.

Davis MG, Kawai Y, and Arinze IJ. Involvement of Gialpha2 in sodium butyrate-induced erythroblastic differentiation of K562 cells. *Biochem J*, **346 Pt 2** 2000, 455-61.

Day RM, Suzuki YJ, Lum JM, White AC, and Fanburg BL. Bleomycin upregulates expression of gammaglutamylcysteine synthetase in pulmonary artery endothelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, **282** (6), 2002, L1349-57.

Degos L. Differentiating agents in the treatment of leukemia. Leuk Res, 14 (8), 1990, 717-9.

Degos L. Is acute promyelocytic leukemia a curable disease? Treatment strategy for a long-term survival. *Leukemia*, **8** (6), 1994, 911-3.

Degos L. Differentiation therapy in acute promyelocytic leukemia: European experience. *J Cell Physiol*, **173** (2), 1997, 285-7.

Degos L, and Wang ZY. All trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemia. Oncogene, 20 (49), 2001, 7140-5.

DeRegis CJ, Moore AS, Rand WM, and Berg J. Cisplatin and doxorubicin toxicosis in dogs with osteosarcoma. *J Vet Intern Med*, **17** (**5**), 2003, 668-73.

Derjuga A, Gourley TS, Holm TM, Heng HH, Shivdasani RA, Ahmed R, Andrews NC, and Blank V. Complexity of CNC transcription factors as revealed by gene targeting of the Nrf3 locus. *Mol Cell Biol*, **24** (8), 2004, 3286-94.

Deutsch V, Bitan M, Friedmann Y, Eldor A, and Vlodavsky I. Megakaryocyte maturation is associated with expression of the CXC chemokine connective tissue-activating peptide CTAP III. *Br J Haematol*, **111** (**4**), 2000, 1180-9.

Dhakshinamoorthy S, and Jaiswal AK. Small maf (MafG and MafK) proteins negatively regulate antioxidant response element-mediated expression and antioxidant induction of the NAD(P)H:Quinone oxidoreductase1 gene. *J Biol Chem*, **275** (**51**), 2000, 40134-41.

Diederich M, Wellman M, Visvikis A, Puga A, and Siest G. The 5' untranslated region of the human gammaglutamyl transferase mRNA contains a tissue-specific active translational enhancer. *FEBS Lett*, **332** (1-2), 1993, 88-92. Dirr H, Reinemer P, and Huber R. X-ray crystal structures of cytosolic glutathione S-transferases. Implications for protein architecture, substrate recognition and catalytic function. *Eur J Biochem*, **220** (3), 1994, 645-61.

Dixon DP, Cummins L, Cole DJ, and Edwards R. Glutathione-mediated detoxification systems in plants. *Curr Opin Plant Biol*, **1** (**3**), 1998, 258-66.

Domen J. The role of apoptosis in regulating hematopoietic stem cell numbers. Apoptosis, 6 (4), 2001, 239-52.

Dontu G, Al-Hajj M, Abdallah WM, Clarke MF, and Wicha MS. Stem cells in normal breast development and breast cancer. *Cell Prolif*, **36 Suppl 1** 2003, 59-72.

Dorfman DM, Wilson DB, Bruns GA, and Orkin SH. Human transcription factor GATA-2. Evidence for regulation of preproendothelin-1 gene expression in endothelial cells. *J Biol Chem*, **267** (**2**), 1992, 1279-85.

Doroshow JH. Anthracycline antibiotic-stimulated superoxide, hydrogen peroxide, and hydroxyl radical production by NADH dehydrogenase. *Cancer Res*, **43** (**10**), 1983, 4543-51.

Duggan DJ, Bittner M, Chen Y, Meltzer P, and Trent JM. Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat Genet*, **21** (1 Suppl), 1999, 10-4.

Duvoix A, Delhalle S, Blasius R, Schnekenburger M, Morceau F, Fougere M, Henry E, Galteau MM, Dicato M, and Diederich M. Effect of chemopreventive agents on glutathione S-transferase P1-1 gene expression mechanisms via activating protein 1 and nuclear factor kappaB inhibition. *Biochem Pharmacol*, **68** (6), 2004, 1101-11.

Duvoix A, Morceau F, Delhalle S, Schmitz M, Schnekenburger M, Galteau MM, Dicato M, and Diederich M. Induction of apoptosis by curcumin: mediation by glutathione S-transferase P1-1 inhibition. *Biochem Pharmacol*, **66** (8), 2003a, 1475-83.

Duvoix A, Schmitz M, Schnekenburger M, Dicato M, Morceau F, Galteau MM, and Diederich M. Transcriptional regulation of glutathione S-transferase P1-1 in human leukemia. *Biofactors*, **17** (1-4), 2003b, 131-8.

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

el Yaagoubi M, Hachad H, Leh H, Siest G, and Wellman M. gamma-Glutamyltransferase expression during all-trans retinoic acid-induced differentiation of hematopoietic cell lines. *FEBS Lett*, **369** (**2-3**), 1995, 183-6.

Elagib KE, Xiao M, Hussaini IM, Delehanty LL, Palmer LA, Racke FK, Birrer MJ, Shanmugasundaram G, McDevitt MA, and Goldfarb AN. Jun blockade of erythropoiesis: role for repression of GATA-1 by HERP2. *Mol Cell Biol*, **24** (**17**), 2004, 7779-94.

Elefanty AG, Antoniou M, Custodio N, Carmo-Fonseca M, and Grosveld FG. GATA transcription factors associate with a novel class of nuclear bodies in erythroblasts and megakaryocytes. *Embo J*, **15** (2), 1996, 319-33.

Enver T, and Greaves M. Loops, lineage, and leukemia. Cell, 94 (1), 1998, 9-12.

Evans T, and Felsenfeld G. The erythroid-specific transcription factor Eryf1: a new finger protein. *Cell*, **58** (**5**), 1989, 877-85.

Evans T, and Felsenfeld G. trans-Activation of a globin promoter in nonerythroid cells. *Mol Cell Biol*, **11** (2), 1991, 843-53.

Evans T, Reitman M, and Felsenfeld G. An erythrocyte-specific DNA-binding factor recognizes a regulatory sequence common to all chicken globin genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85** (16), 1988, 5976-80.

Fibach E, Kollia P, Schechter AN, Noguchi CT, and Rodgers GP. Hemin-induced acceleration of hemoglobin production in immature cultured erythroid cells: preferential enhancement of fetal hemoglobin. *Blood*, **85** (10), 1995, 2967-74.

Filomeni G, Rotilio G, and Ciriolo MR. Cell signalling and the glutathione redox system. *Biochem Pharmacol*, **64** (**5-6**), 2002, 1057-64.

Fogli S, Nieri P, and Breschi MC. The role of nitric oxide in anthracycline toxicity and prospects for pharmacologic prevention of cardiac damage. *Faseb J*, **18** (6), 2004, 664-75.

Fossett N, and Schulz RA. Functional conservation of hematopoietic factors in Drosophila and vertebrates. *Differentiation*, **69** (2-3), 2001, 83-90.

Fourcade A, Farhi JJ, Bennoun M, Goldschmidt E, and Tapiero H. Fate of aclacinomycin-A and its metabolites effect on cell growth and macromolecular synthesis. *Biochem Pharmacol*, **32** (**12**), 1983, 1819-24.

Fox AH, Liew C, Holmes M, Kowalski K, Mackay J, and Crossley M. Transcriptional cofactors of the FOG family interact with GATA proteins by means of multiple zinc fingers. *Embo J*, **18** (**10**), 1999, 2812-22.

Frampton J, Walker M, Plumb M, and Harrison PR. Synergy between the NF-E1 erythroid-specific transcription factor and the CACCC factor in the erythroid-specific promoter of the human porphobilinogen deaminase gene. *Mol Cell Biol*, **10** (7), 1990, 3838-42.

Franco AA, Odom RS, and Rando TA. Regulation of antioxidant enzyme gene expression in response to oxidative stress and during differentiation of mouse skeletal muscle. *Free Radic Biol Med*, **27** (**9-10**), 1999, 1122-32.

Fratelli M, Demol H, Puype M, Casagrande S, Eberini I, Salmona M, Bonetto V, Mengozzi M, Duffieux F, Miclet E, Bachi A, Vandekerckhove J, Gianazza E, and Ghezzi P. Identification by redox proteomics of glutathionylated proteins in oxidatively stressed human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99** (6), 2002, 3505-10.

Gate L, and Tew KD. Glutathione S-transferases as emerging therapeutic targets. *Expert Opin Ther Targets*, **5** (4), 2001, 477-489.

George KM, Leonard MW, Roth ME, Lieuw KH, Kioussis D, Grosveld F, and Engel JD. Embryonic expression and cloning of the murine GATA-3 gene. *Development*, **120** (9), 1994, 2673-86.

Gewirtz DA. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol*, **57** (7), 1999, 727-41.

Gilbert J, Baker SD, Bowling MK, Grochow L, Figg WD, Zabelina Y, Donehower RC, and Carducci MA. A phase I dose escalation and bioavailability study of oral sodium phenylbutyrate in patients with refractory solid tumor malignancies. *Clin Cancer Res*, **7** (8), 2001, 2292-300.

Gilbert L, Elwood LJ, Merino M, Masood S, Barnes R, Steinberg SM, Lazarous DF, Pierce L, d'Angelo T, Moscow JA, and et al. A pilot study of pi-class glutathione S-transferase expression in breast cancer: correlation with estrogen receptor expression and prognosis in node-negative breast cancer. *J Clin Oncol*, **11** (1), 1993, 49-58.

Gillemans N, Tewari R, Lindeboom F, Rottier R, de Wit T, Wijgerde M, Grosveld F, and Philipsen S. Altered DNA-binding specificity mutants of EKLF and Sp1 show that EKLF is an activator of the beta-globin locus control region in vivo. *Genes Dev*, **12** (**18**), 1998, 2863-73.

Gillet R, Bobichon H, and Trentesaux C. Nuclear transcription factor GATA-1 is activated during aclacinomycin-induced erythroid differentiation. *Biol Cell*, **94** (**4-5**), 2002, 267-73.

Godwin AK, Meister A, O'Dwyer PJ, Huang CS, Hamilton TC, and Anderson ME. 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*, **89** (7), 1992, 3070-4.

Goh M, Chen F, Paulsen MT, Yeager AM, Dyer ES, and Ljungman M. Phenylbutyrate attenuates the expression of Bcl-X(L), DNA-PK, caveolin-1, and VEGF in prostate cancer cells. *Neoplasia*, **3** (**4**), 2001, 331-8.

Gorisse MC, Carpentier Y, Joly P, Comoe L, and Desoize B. Alterations of growth fraction and DNA content in K562 cells by differentiating agents. *Cytometry*, **11** (8), 1990, 888-93.

Goto S, Ihara Y, Urata Y, Izumi S, Abe K, Koji T, and Kondo T. Doxorubicin-induced DNA intercalation and scavenging by nuclear glutathione S-transferase pi. *Faseb J*, **15** (**14**), 2001, 2702-14.

Goto S, Kamada K, Soh Y, Ihara Y, and Kondo T. Significance of nuclear glutathione S-transferase pi in resistance to anti-cancer drugs. *Jpn J Cancer Res*, **93** (9), 2002, 1047-56.

Gottgens B, Nastos A, Kinston S, Piltz S, Delabesse EC, Stanley M, Sanchez MJ, Ciau-Uitz A, Patient R, and Green AR. Establishing the transcriptional programme for blood: the SCL stem cell enhancer is regulated by a multiprotein complex containing Ets and GATA factors. *Embo J*, **21** (**12**), 2002, 3039-50.

Gottlicher M, Minucci S, Zhu P, Kramer OH, Schimpf A, Giavara S, Sleeman JP, Lo Coco F, Nervi C, Pelicci PG, and Heinzel T. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *Embo J*, **20** (**24**), 2001, 6969-78.

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

Graf T. Differentiation plasticity of hematopoietic cells. *Blood*, 99 (9), 2002, 3089-101.

Green JA, Robertson LJ, and Clark AH. Glutathione S-transferase expression in benign and malignant ovarian tumours. *Br J Cancer*, **68** (2), 1993, 235-9.

Gregory RC, Taxman DJ, Seshasayee D, Kensinger MH, Bieker JJ, and Wojchowski DM. Functional interaction of GATA1 with erythroid Kruppel-like factor and Sp1 at defined erythroid promoters. *Blood*, **87** (**5**), 1996, 1793-801.

Gudmundsdottir K, Tryggvadottir L, and Eyfjord JE. GSTM1, GSTT1, and GSTP1 genotypes in relation to breast cancer risk and frequency of mutations in the p53 gene. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **10** (**11**), 2001, 1169-73.

Guthenberg C, and Mannervik B. Glutathione S-transferase (transferase pi) from human placenta is identical or closely related to glutathione S-transferase (transferase rho) from erythrocytes. *Biochim Biophys Acta*, **661** (2), 1981, 255-60.

Guthenberg C, Warholm M, Rane A, and Mannervik B. Two distinct forms of glutathione transferase from human foetal liver. Purification and comparison with isoenzymes isolated from adult liver and placenta. *Biochem* J, 235 (3), 1986, 741-5.

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

Hallier E, Langhof T, Dannappel D, Leutbecher M, Schroder K, Goergens HW, Muller A, and Bolt HM. Polymorphism of glutathione conjugation of methyl bromide, ethylene oxide and dichloromethane in human blood: influence on the induction of sister chromatid exchanges (SCE) in lymphocytes. *Arch Toxicol*, **67** (3), 1993, 173-8.

Hamilton D, Wu JH, Alaoui-Jamali M, and Batist G. A novel missense mutation in the gamma-glutamylcysteine synthetase catalytic subunit gene causes both decreased enzymatic activity and glutathione production. *Blood*, **102** (2), 2003, 725-30.

Hannon R, Evans T, Felsenfeld G, and Gould H. Structure and promoter activity of the gene for the erythroid transcription factor GATA-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88** (8), 1991, 3004-8.

Hansen LA, Sigman CC, Andreola F, Ross SA, Kelloff GJ, and De Luca LM. Retinoids in chemoprevention and differentiation therapy. *Carcinogenesis*, **21** (7), 2000, 1271-9.

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

Hawkins DS, Felgenhauer J, Park J, Kreissman S, Thomson B, Douglas J, Rowley SD, Gooley T, Sanders JE, and Pendergrass TW. Peripheral blood stem cell support reduces the toxicity of intensive chemotherapy for children and adolescents with metastatic sarcomas. *Cancer*, **95** (6), 2002, 1354-65.

Hayes JD, and Mantle TJ. Use of immuno-blot techniques to discriminate between the glutathione S-transferase Yf, Yk, Ya, Yn/Yb and Yc subunits and to study their distribution in extrahepatic tissues. Evidence for three immunochemically distinct groups of transferase in the rat. *Biochem J*, **233** (3), 1986, 779-88.

Hayes JD, and Pulford DJ. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, **30** (6), 1995, 445-600.

Hayes JD, and Strange RC. Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences. *Pharmacology*, **61** (**3**), 2000, 154-66.

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

Hempel G, Flege S, Wurthwein G, and Boos J. Peak plasma concentrations of doxorubicin in children with acute lymphoblastic leukemia or non-Hodgkin lymphoma. *Cancer Chemother Pharmacol*, **49** (**2**), 2002, 133-41.

Henderson CJ, Smith AG, Ure J, Brown K, Bacon EJ, and Wolf CR. Increased skin tumorigenesis in mice lacking pi class glutathione S-transferases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95** (9), 1998, 5275-80.

Hengstler JG, Arand M, Herrero ME, and Oesch F. Polymorphisms of N-acetyltransferases, glutathione S-transferases, microsomal epoxide hydrolase and sulfotransferases: influence on cancer susceptibility. *Recent Results Cancer Res*, **154** 1998, 47-85.

Howie AF, Douglas JG, Fergusson RJ, and Beckett GJ. Measurement of glutathione S-transferase pi isoenzyme in plasma, a possible marker for adenocarcinoma of the lung. *Clin Chem*, **36** (**3**), 1990, 453-6.

Huang CS, Chang LS, Anderson ME, and Meister A. Catalytic and regulatory properties of the heavy subunit of rat kidney gamma-glutamylcysteine synthetase. *J Biol Chem*, **268** (**26**), 1993, 19675-80.

Huang HC, Nguyen T, and Pickett CB. Regulation of the antioxidant response element by protein kinase C-mediated phosphorylation of NF-E2-related factor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97** (23), 2000, 12475-80.

Huang J, Tan PH, Tan BK, and Bay BH. GST-pi expression correlates with oxidative stress and apoptosis in breast cancer. *Oncol Rep*, **12** (**4**), 2004, 921-5.

Huang J, Tan PH, Thiyagarajan J, and Bay BH. Prognostic significance of glutathione S-transferase-pi in invasive breast cancer. *Mod Pathol*, **16** (6), 2003, 558-65.

Hubatsch I, Ridderstrom M, and Mannervik B. Human glutathione transferase A4-4: an alpha class enzyme with high catalytic efficiency in the conjugation of 4-hydroxynonenal and other genotoxic products of lipid peroxidation. *Biochem J*, **330** (**Pt 1**) 1998, 175-9.

Ikonomi P, Noguchi CT, Miller W, Kassahun H, Hardison R, and Schechter AN. Levels of GATA-1/GATA-2 transcription factors modulate expression of embryonic and fetal hemoglobins. *Gene*, **261** (**2**), 2000a, 277-87.

Ikonomi P, Rivera CE, Riordan M, Washington G, Schechter AN, and Noguchi CT. Overexpression of GATA-2 inhibits erythroid and promotes megakaryocyte differentiation. *Exp Hematol*, **28** (**12**), 2000b, 1423-31.

Inoue H, Takemura H, Kawai Y, Yoshida A, Ueda T, and Miyashita T. Dexamethasone-resistant human Pre-B leukemia 697 cell line evolving elevation of intracellular glutathione level: an additional resistance mechanism. *Jpn J Cancer Res*, **93** (5), 2002, 582-90.

Inoue T, Ishida T, Sugio K, Maehara Y, and Sugimachi K. Glutathione S transferase Pi is a powerful indicator in chemotherapy of human lung squamous-cell carcinoma. *Respiration*, **62** (4), 1995, 223-7.

Inskip A, Elexperu-Camiruaga J, Buxton N, Dias PS, MacIntosh J, Campbell D, Jones PW, Yengi L, Talbot JA, Strange RC, and et al. Identification of polymorphism at the glutathione S-transferase, GSTM3 locus: evidence for linkage with GSTM1*A. *Biochem J*, **312** (**Pt 3**) 1995, 713-6.

Ishikawa T. The ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump. *Trends Biochem Sci*, **17** (**11**), 1992, 463-8.

Ishikawa T, and Ali-Osman F. Glutathione-associated cis-diamminedichloroplatinum(II) metabolism and ATP-dependent efflux from leukemia cells. Molecular characterization of glutathione-platinum complex and its biological significance. *J Biol Chem*, **268** (27), 1993, 20116-25.

Itamochi H, Kigawa J, Sultana H, Iba T, Akeshima R, Kamazawa S, Kanamori Y, and Terakawa N. Sensitivity to anticancer agents and resistance mechanisms in clear cell carcinoma of the ovary. *Jpn J Cancer Res*, **93** (6), 2002, 723-8.

Ito E, Toki T, Ishihara H, Ohtani H, Gu L, Yokoyama M, Engel JD, and Yamamoto M. Erythroid transcription factor GATA-1 is abundantly transcribed in mouse testis. *Nature*, **362** (**6419**), 1993, 466-8.

Jansen BA, Brouwer J, and Reedijk J. Glutathione induces cellular resistance against cationic dinuclear platinum anticancer drugs. *J Inorg Biochem*, **89** (3-4), 2002, 197-202.

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

Jhaveri MS, Stephens TE, and Morrow CS. Role of posttranscriptional processes in the regulation of glutathione S-transferase P1 gene expression in human breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **237** (**3**), 1997, 729-34.

Jin J, Huang M, Wei HL, and Liu GT. Mechanism of 5-fluorouracil required resistance in human hepatocellular carcinoma cell line Bel(7402). *World J Gastroenterol*, **8** (6), 2002, 1029-34.

Jowsey IR, Thomson AM, Flanagan JU, Murdock PR, Moore GB, Meyer DJ, Murphy GJ, Smith SA, and Hayes JD. Mammalian class Sigma glutathione S-transferases: catalytic properties and tissue-specific expression of human and rat GSH-dependent prostaglandin D2 synthases. *Biochem J*, **359** (Pt 3), 2001, 507-16.

Joyce-Brady M, Jean JC, and Hughey RP. gamma -glutamyltransferase and its isoform mediate an endoplasmic reticulum stress response. *J Biol Chem*, **276** (**12**), 2001, 9468-77.

Juronen E, Tasa G, Uuskula M, Pooga M, and Mikelsaar AV. Purification, characterization and tissue distribution of human class theta glutathione S-transferase T1-1. *Biochem Mol Biol Int*, **39** (1), 1996, 21-9.

Kaczynski J, Cook T, and Urrutia R. Sp1- and Kruppel-like transcription factors. Genome Biol, 4 (2), 2003, 206.

Kadonaga JT, Carner KR, Masiarz FR, and Tjian R. Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain. *Cell*, **51** (6), 1987, 1079-90.

Kadonaga JT, and Tjian R. Affinity purification of sequence-specific DNA binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83** (16), 1986, 5889-93.

Kalinina E, Novichkova M, Scherbak NP, Solomka V, and Saprin AN. GSH-dependent redox regulation and antioxidant enzymes in the formation of resistance to doxorubicin in K562 human erythroleukemia cells. *Adv Exp Med Biol*, **500** 2001, 241-4.

Kamesaki H, Michaud GY, Irving SG, Suwabe N, Kamesaki S, Okuma M, and Cossman J. TPA-induced arrest of erythroid differentiation is coupled with downregulation of GATA-1 and upregulation of GATA-2 in an erythroid cell line SAM-1. *Blood*, **87** (3), 1996, 999-1005.

Kanbagli O, Ozdemirler G, Bulut T, Yamaner S, Aykac-Toker G, and Uysal M. Mitochondrial lipid peroxides and antioxidant enzymes in colorectal adenocarcinoma tissues. *Jpn J Cancer Res*, **91** (**12**), 2000, 1258-63.

Kaneko YS, Ikeda K, and Nakanishi M. Phorbol ester inhibits DNA damage-induced apoptosis in U937 cells through activation of protein kinase C. *Life Sci*, **65** (21), 1999, 2251-8.

Kang YJ, Zhou ZX, Wang GW, Buridi A, and Klein JB. Suppression by metallothionein of doxorubicin-induced cardiomyocyte apoptosis through inhibition of p38 mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem*, **275** (18), 2000, 13690-8.

Karis A, Pata I, van Doorninck JH, Grosveld F, de Zeeuw CI, de Caprona D, and Fritzsch B. Transcription factor GATA-3 alters pathway selection of olivocochlear neurons and affects morphogenesis of the ear. *J Comp Neurol*, **429** (**4**), 2001, 615-30.

Kearns PR, Chrzanowska-Lightowlers ZM, Pieters R, Veerman A, and Hall AG. Mu class glutathione S-transferase mRNA isoform expression in acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*, **120** (1), 2003, 80-8.

Keijzer R, van Tuyl M, Meijers C, Post M, Tibboel D, Grosveld F, and Koutsourakis M. The transcription factor GATA6 is essential for branching morphogenesis and epithelial cell differentiation during fetal pulmonary development. *Development*, **128** (4), 2001, 503-11.

Keizer HG, Pinedo HM, Schuurhuis GJ, and Joenje H. Doxorubicin (adriamycin): a critical review of free radical-dependent mechanisms of cytotoxicity. *Pharmacol Ther*, **47** (**2**), 1990, 219-31.

Kelders WP, Oude Ophuis MB, Roelofs HM, Peters WH, and Manni JJ. The association between glutathione S-transferase P1 genotype and plasma level in head and neck cancer. *Laryngoscope*, **112** (**3**), 2002, 462-6.

Kim Y, Ma AG, Kitta K, Fitch SN, Ikeda T, Ihara Y, Simon AR, Evans T, and Suzuki YJ. Anthracyclineinduced suppression of GATA-4 transcription factor: implication in the regulation of cardiac myocyte apoptosis. *Mol Pharmacol*, **63** (2), 2003, 368-77.

Klys HS, Whillis D, Howard G, and Harrison DJ. Glutathione S-transferase expression in the human testis and testicular germ cell neoplasia. *Br J Cancer*, **66** (**3**), 1992, 589-93.

Ko LJ, and Engel JD. DNA-binding specificities of the GATA transcription factor family. *Mol Cell Biol*, **13** (7), 1993, 4011-22.

Kodym R, Calkins PR, and Story MD. Anthracycline-induced erythroid differentiation of K562 cells is inhibited by p28, a novel mammalian glutathione-binding stress protein. *Leuk Res*, **25** (2), 2001, 151-6.

Koeffler HP, and Golde DW. Human myeloid leukemia cell lines: a review. Blood, 56 (3), 1980, 344-50.

Kong J, Ji X, and Liebhaber SA. The KH-domain protein alpha CP has a direct role in mRNA stabilization independent of its cognate binding site. *Mol Cell Biol*, **23** (**4**), 2003, 1125-34.

Koomagi R, Mattern J, and Volm M. Up-regulation of resistance-related proteins in human lung tumors with poor vascularization. *Carcinogenesis*, **16** (9), 1995, 2129-33.

Kowalski DP, Feeley RM, and Jones DP. Use of exogenous glutathione for metabolism of peroxidized methyl linoleate in rat small intestine. *J Nutr*, **120** (9), 1990, 1115-21.

Kowalski K, Liew CK, Matthews JM, Gell DA, Crossley M, and Mackay JP. Characterization of the conserved interaction between GATA and FOG family proteins. *J Biol Chem*, **277** (**38**), 2002, 35720-9.

Kumano K, Chiba S, Shimizu K, Yamagata T, Hosoya N, Saito T, Takahashi T, Hamada Y, and Hirai H. Notch1 inhibits differentiation of hematopoietic cells by sustaining GATA-2 expression. *Blood*, **98** (**12**), 2001, 3283-9.

L'Ecuyer T, Allebban Z, Thomas R, and Vander Heide R. Glutathione S-transferase overexpression protects against anthracycline-induced H9C2 cell death. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **286** (6), 2004, H2057-64.

Labbaye C, Valtieri M, Barberi T, Meccia E, Masella B, Pelosi E, Condorelli GL, Testa U, and Peschle C. Differential expression and functional role of GATA-2, NF-E2, and GATA-1 in normal adult hematopoiesis. *J Clin Invest*, **95** (5), 1995, 2346-58.

Landi S. Mammalian class theta GST and differential susceptibility to carcinogens: a review. *Mutat Res*, **463** (3), 2000, 247-83.

Le Naour F, Francastel C, Prenant M, Lantz O, Boucheix C, and Rubinstein E. Upregulation of CD9 expression during TPA treatment of K562 cells. *Leukemia*, **11** (8), 1997, 1290-7.

Leonard M, Brice M, Engel JD, and Papayannopoulou T. Dynamics of GATA transcription factor expression during erythroid differentiation. *Blood*, **82** (**4**), 1993, 1071-9.

Leppa S, Pirkkala L, Saarento H, Sarge KD, and Sistonen L. Overexpression of HSF2-beta inhibits hemininduced heat shock gene expression and erythroid differentiation in K562 cells. *J Biol Chem*, **272** (**24**), 1997, 15293-8.

Leslie EM, Haimeur A, and Waalkes MP. Arsenic transport by the human multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1). Evidence that a tri-glutathione conjugate is required. *J Biol Chem*, **279** (**31**), 2004, 32700-8.

Leszczyniecka M, Roberts T, Dent P, Grant S, and Fisher PB. Differentiation therapy of human cancer: basic science and clinical applications. *Pharmacol Ther*, **90** (2-3), 2001, 105-56.

Li J, Xu LZ, Yao JJ, Guo WJ, Xia P, and Chen Y. Reversal effects of droloxifene on multidrug resistance in adriamycin-resistant K562 cell line. *Acta Pharmacol Sin*, **22** (**11**), 2001, 1023-7.

Li YJ, Oliveira SA, Xu P, Martin ER, Stenger JE, Scherzer CR, Hauser MA, Scott WK, Small GW, Nance MA, Watts RL, Hubble JP, Koller WC, Pahwa R, Stern MB, Hiner BC, Jankovic J, Goetz CG, Mastaglia F, Middleton LT, Roses AD, Saunders AM, Schmechel DE, Gullans SR, Haines JL, Gilbert JR, Vance JM, and Pericak-Vance MA. Glutathione S-transferase omega-1 modifies age-at-onset of Alzheimer disease and Parkinson disease. *Hum Mol Genet*, **12** (24), 2003, 3259-67.

Liebermann DA, Gregory B, and Hoffman B. AP-1 (Fos/Jun) transcription factors in hematopoietic differentiation and apoptosis. *Int J Oncol*, **12** (**3**), 1998, 685-700.

Lin CC, Chen YK, and Lin LM. Placental glutathione S-transferase isoenzyme expression during promotion of two-stage hamster cheek-pouch carcinogenesis. *Arch Oral Biol*, **44** (6), 1999, 525-9.

Liu S, Stoesz SP, and Pickett CB. Identification of a novel human glutathione S-transferase using bioinformatics. *Arch Biochem Biophys*, **352** (2), 1998, 306-13.

Lowry JA, and Atchley WR. Molecular evolution of the GATA family of transcription factors: conservation within the DNA-binding domain. *J Mol Evol*, **50** (2), 2000, 103-15.

Lozzio CB, and Lozzio BB. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood*, **45** (**3**), 1975, 321-34.

Lu SJ, Rowan S, Bani MR, and Ben-David Y. Retroviral integration within the Fli-2 locus results in inactivation of the erythroid transcription factor NF-E2 in Friend erythroleukemias: evidence that NF-E2 is essential for globin expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91** (**18**), 1994, 8398-402.

Lutzky J, Astor MB, Taub RN, Baker MA, Bhalla K, Gervasoni JE, Jr., Rosado M, Stewart V, Krishna S, and Hindenburg AA. Role of glutathione and dependent enzymes in anthracycline-resistant HL60/AR cells. *Cancer Res*, **49** (**15**), 1989, 4120-5.

Manfait M, Alix AJ, Jeannesson P, Jardillier JC, and Theophanides T. Interaction of adriamycin with DNA as studied by resonance Raman spectroscopy. *Nucleic Acids Res*, **10** (**12**), 1982, 3803-16.

Mannervik B, Awasthi YC, Board PG, Hayes JD, Di Ilio C, Ketterer B, Listowsky I, Morgenstern R, Muramatsu M, and Pearson WR. Nomenclature for human glutathione transferases. *Biochem J*, **282** (**Pt 1**) 1992, 305-6.

Marks DC, Davey MW, Davey RA, and Kidman AD. Expression of multidrug resistance in response to differentiation in the K562 human leukaemia cell line. *Biochem Pharmacol*, **50** (**4**), 1995, 475-80.

Marks PA, Richon VM, and Rifkind RA. Histone deacetylase inhibitors: inducers of differentiation or apoptosis of transformed cells. *J Natl Cancer Inst*, **92** (15), 2000, 1210-6.

Martin DI, Tsai SF, and Orkin SH. Increased gamma-globin expression in a nondeletion HPFH mediated by an erythroid-specific DNA-binding factor. *Nature*, **338** (**6214**), 1989, 435-8.

Martin DI, Zon LI, Mutter G, and Orkin SH. Expression of an erythroid transcription factor in megakaryocytic and mast cell lineages. *Nature*, **344** (**6265**), 1990, 444-7.

Masanek U, Stammler G, and Volm M. Messenger RNA expression of resistance proteins and related factors in human ovarian carcinoma cell lines resistant to doxorubicin, taxol and cisplatin. *Anticancer Drugs*, **8** (2), 1997, 189-98.

Matsumoto N, Laub F, Aldabe R, Zhang W, Ramirez F, Yoshida T, and Terada M. Cloning the cDNA for a new human zinc finger protein defines a group of closely related Kruppel-like transcription factors. *J Biol Chem*, **273** (**43**), 1998, 28229-37.

Matsumura I, Kawasaki A, Tanaka H, Sonoyama J, Ezoe S, Minegishi N, Nakajima K, Yamamoto M, and Kanakura Y. Biologic significance of GATA-1 activities in Ras-mediated megakaryocytic differentiation of hematopoietic cell lines. *Blood*, **96** (7), 2000, 2440-50.

McGahon A, Bissonnette R, Schmitt M, Cotter KM, Green DR, and Cotter TG. BCR-ABL maintains resistance of chronic myelogenous leukemia cells to apoptotic cell death. *Blood*, **83** (5), 1994, 1179-87.

McLellan LI, and Wolf CR. Glutathione and glutathione-dependent enzymes in cancer drug resistance. Drug Resist Updat, 2 (3), 1999, 153-164.

McMahon M, Itoh K, Yamamoto M, Chanas SA, Henderson CJ, McLellan LI, Wolf CR, Cavin C, and Hayes JD. The Cap'n'Collar basic leucine zipper transcription factor Nrf2 (NF-E2 p45-related factor 2) controls both constitutive and inducible expression of intestinal detoxification and glutathione biosynthetic enzymes. *Cancer Res*, **61** (8), 2001, 3299-307.

Mead PE, Deconinck AE, Huber TL, Orkin SH, and Zon LI. Primitive erythropoiesis in the Xenopus embryo: the synergistic role of LMO-2, SCL and GATA-binding proteins. *Development*, **128** (**12**), 2001, 2301-8.

Meister A, and Anderson ME. Glutathione. Annu Rev Biochem, 52 1983, 711-60.

Melefors O, Goossen B, Johansson HE, Stripecke R, Gray NK, and Hentze MW. Translational control of 5aminolevulinate synthase mRNA by iron-responsive elements in erythroid cells. *J Biol Chem*, **268** (8), 1993, 5974-8.

Merika M, and Orkin SH. Functional synergy and physical interactions of the erythroid transcription factor GATA-1 with the Kruppel family proteins Sp1 and EKLF. *Mol Cell Biol*, **15** (**5**), 1995, 2437-47.

Mignotte V, Eleouet JF, Raich N, and Romeo PH. Cis- and trans-acting elements involved in the regulation of the erythroid promoter of the human porphobilinogen deaminase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86** (17), 1989a, 6548-52.

Mignotte V, Navarro S, Eleouet JF, Zon LI, and Romeo PH. The extinction of erythroid genes after tetradecanoylphorbol acetate treatment of erythroleukemic cells correlates with down-regulation of the tissue-specific factors NF-E1 and NF-E2. *J Biol Chem*, **265** (**36**), 1990, 22090-2.

Mignotte V, Wall L, deBoer E, Grosveld F, and Romeo PH. Two tissue-specific factors bind the erythroid promoter of the human porphobilinogen deaminase gene. *Nucleic Acids Res*, **17** (**1**), 1989b, 37-54.

Millar DS, Paul CL, Molloy PL, and Clark SJ. A distinct sequence (ATAAA)n separates methylated and unmethylated domains at the 5'-end of the GSTP1 CpG island. *J Biol Chem*, **275** (**32**), 2000, 24893-9.

Miller IJ, and Bieker JJ. A novel, erythroid cell-specific murine transcription factor that binds to the CACCC element and is related to the Kruppel family of nuclear proteins. *Mol Cell Biol*, **13** (**5**), 1993, 2776-86.

Miller WH, Jr., Schipper HM, Lee JS, Singer J, and Waxman S. Mechanisms of action of arsenic trioxide. *Cancer Res*, **62** (14), 2002, 3893-903.

Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, and Gianni L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev*, **56** (2), 2004, 185-229.

Miyanishi K, Takayama T, Ohi M, Hayashi T, Nobuoka A, Nakajima T, Takimoto R, Kogawa K, Kato J, Sakamaki S, and Niitsu Y. Glutathione S-transferase-pi overexpression is closely associated with K-ras mutation during human colon carcinogenesis. *Gastroenterology*, **121** (**4**), 2001, 865-74.

Miyazaki M, Kohno K, Saburi Y, Matsuo K, Ono M, Kuwano M, Tsuchida S, Sato K, Sakai M, and Muramatsu M. Drug resistance to cis-diamminedichloroplatinum (II) in Chinese hamster ovary cell lines transfected with glutathione S-transferase pi gene. *Biochem Biophys Res Commun*, **166** (3), 1990, 1358-64.

Mizutani H, Oikawa S, Hiraku Y, Murata M, Kojima M, and Kawanishi S. Distinct mechanisms of site-specific oxidative DNA damage by doxorubicin in the presence of copper(II) and NADPH-cytochrome P450 reductase. *Cancer Sci*, **94** (8), 2003, 686-91.

Moffat GJ, McLaren AW, and Wolf CR. Involvement of Jun and Fos proteins in regulating transcriptional activation of the human pi class glutathione S-transferase gene in multidrug-resistant MCF7 breast cancer cells. *J Biol Chem*, **269** (**23**), 1994, 16397-402.

Moffat GJ, McLaren AW, and Wolf CR. Functional characterization of the transcription silencer element located within the human Pi class glutathione S-transferase promoter. *J Biol Chem*, **271** (**34**), 1996a, 20740-7.

Moffat GJ, McLaren AW, and Wolf CR. Sp1-mediated transcriptional activation of the human Pi class glutathione S-transferase promoter. *J Biol Chem*, **271** (2), 1996b, 1054-60.

Mohammadzadeh GS, Nasseri Moghadam S, Rasaee MJ, Zaree AB, Mahmoodzadeh H, and Allameh A. Measurement of glutathione S-transferase and its class-pi in plasma and tissue biopsies obtained after laparoscopy and endoscopy from subjects with esophagus and gastric cancer. *Clin Biochem*, **36** (4), 2003, 283-8.

Molkentin JD. The zinc finger-containing transcription factors GATA-4, -5, and -6. Ubiquitously expressed regulators of tissue-specific gene expression. *J Biol Chem*, **275** (**50**), 2000, 38949-52.

Monden N, Abe S, Sutoh I, Hishikawa Y, Kinugasa S, and Nagasue N. Prognostic significance of the expressions of metallothionein, glutathione-S-transferase-pi, and P-glycoprotein in curatively resected gastric cancer. *Oncology*, **54** (**5**), 1997, 391-9.

Morceau F, Aries A, Lahlil R, Devy L, Jardillier JC, Jeannesson P, and Trentesaux C. Evidence for distinct regulation processes in the aclacinomycin- and doxorubicin-mediated differentiation of human erythroleukemic cells. *Biochem Pharmacol*, **51** (6), 1996a, 839-45.

Morceau F, Chenais B, Gillet R, Jardillier JC, Jeannesson P, and Trentesaux C. Transcriptional and posttranscriptional regulation of erythroid gene expression in anthracycline-induced differentiation of human erythroleukemic cells. *Cell Growth Differ*, **7** (8), 1996b, 1023-9.

Morceau F, Dupont C, Palissot V, Borde-Chiché P, Trentesaux C, Dicato M, and Diederich M. GTP-mediated differentiation of the human K562 cell line: transient overexpression of GATA-1 and stabilization of the gamma-globin mRNA. *Leukemia*, **14** (9), 2000, 1589-97.

Morceau F, Duvoix A, Delhalle S, Schnekenburger M, Dicato M, and Diederich M. Regulation of glutathione Stransferase P1-1 gene expression by NF-kappaB in tumor necrosis factor alpha-treated K562 leukemia cells. *Biochem Pharmacol*, **67** (7), 2004, 1227-38.

Morel F, Rauch C, Petit E, Piton A, Theret N, Coles B, and Guillouzo A. Gene and protein characterization of the human glutathione S-transferase kappa and evidence for a peroxisomal localization. *J Biol Chem*, **279** (16), 2004, 16246-53.

Morrow CS, Chiu J, and Cowan KH. Posttranscriptional control of glutathione S-transferase pi gene expression in human breast cancer cells. *J Biol Chem*, **267** (**15**), 1992, 10544-50.

Morrow CS, Cowan KH, and Goldsmith ME. Structure of the human genomic glutathione S-transferase-pi gene. *Gene*, **75** (1), 1989, 3-11.

Morrow CS, Smitherman PK, Diah SK, Schneider E, and Townsend AJ. Coordinated action of glutathione S-transferases (GSTs) and multidrug resistance protein 1 (MRP1) in antineoplastic drug detoxification. Mechanism of GST A1-1- and MRP1-associated resistance to chlorambucil in MCF7 breast carcinoma cells. *J Biol Chem*, **273** (**32**), 1998a, 20114-20.

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

Morrow CS, Smitherman PK, and Townsend AJ. Role of multidrug-resistance protein 2 in glutathione S-transferase P1-1-mediated resistance to 4-nitroquinoline 1-oxide toxicities in HepG2 cells. *Mol Carcinog*, **29** (**3**), 2000, 170-8.

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

Motohashi H, O'Connor T, Katsuoka F, Engel JD, and Yamamoto M. Integration and diversity of the regulatory network composed of Maf and CNC families of transcription factors. *Gene*, **294** (**1-2**), 2002, 1-12.

Mouthon MA, Bernard O, Mitjavila MT, Romeo PH, Vainchenker W, and Mathieu-Mahul D. Expression of tal-1 and GATA-binding proteins during human hematopoiesis. *Blood*, **81** (3), 1993, 647-55.

Muindi J, Frankel SR, Miller WH, Jr., Jakubowski A, Scheinberg DA, Young CW, Dmitrovsky E, and Warrell RP, Jr. Continuous treatment with all-trans retinoic acid causes a progressive reduction in plasma drug concentrations: implications for relapse and retinoid "resistance" in patients with acute promyelocytic leukemia. *Blood*, **79** (2), 1992, 299-303.

Muller MM, Schreiber E, Schaffner W, and Matthias P. Rapid test for in vivo stability and DNA binding of mutated octamer binding proteins with 'mini-extracts' prepared from transfected cells. *Nucleic Acids Res*, **17** (**15**), 1989, 6420.

Mustajoki P, and Nordmann Y. Early administration of heme arginate for acute porphyric attacks. *Arch Intern Med*, **153** (**17**), 1993, 2004-8.

Nakajima O, Iwasaki S, and Hashimoto Y. Hemin-induced erythroid differentiation of human myeloleukemia K562 cell line and its modification by bioresponse modifiers. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, **43** (**1**), 1997, 115-34.

Nakajima T, Takayama T, Miyanishi K, Nobuoka A, Hayashi T, Abe T, Kato J, Sakon K, Naniwa Y, Tanabe H, and Niitsu Y. Reversal of multiple drug resistance in cholangiocarcinoma by the glutathione S-transferase-pispecific inhibitor O1-hexadecyl-gamma-glutamyl-S-benzylcysteinyl-D-phenylglycine ethylester. *J Pharmacol Exp Ther*, **306** (3), 2003, 861-9.
Nakamura Y, Ohigashi H, Masuda S, Murakami A, Morimitsu Y, Kawamoto Y, Osawa T, Imagawa M, and Uchida K. Redox regulation of glutathione S-transferase induction by benzyl isothiocyanate: correlation of enzyme induction with the formation of reactive oxygen intermediates. *Cancer Res*, **60** (2), 2000, 219-25.

Nakano T. Hematopoietic stem cells: generation and manipulation. Trends Immunol, 24 (11), 2003, 589-94.

Nerlov C, Querfurth E, Kulessa H, and Graf T. GATA-1 interacts with the myeloid PU.1 transcription factor and represses PU.1-dependent transcription. *Blood*, **95** (8), 2000, 2543-51.

Ney PA, Andrews NC, Jane SM, Safer B, Purucker ME, Weremowicz S, Morton CC, Goff SC, Orkin SH, and Nienhuis AW. Purification of the human NF-E2 complex: cDNA cloning of the hematopoietic cell-specific subunit and evidence for an associated partner. *Mol Cell Biol*, **13** (9), 1993, 5604-12.

Ney PA, Sorrentino BP, Lowrey CH, and Nienhuis AW. Inducibility of the HS II enhancer depends on binding of an erythroid specific nuclear protein. *Nucleic Acids Res*, **18** (**20**), 1990, 6011-7.

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

Nichols KE, Crispino JD, Poncz M, White JG, Orkin SH, Maris JM, and Weiss MJ. Familial dyserythropoietic anaemia and thrombocytopenia due to an inherited mutation in GATA1. *Nat Genet*, **24** (**3**), 2000, 266-70.

Nicolis S, Bertini C, Ronchi A, Crotta S, Lanfranco L, Moroni E, Giglioni B, and Ottolenghi S. An erythroid specific enhancer upstream to the gene encoding the cell-type specific transcription factor GATA-1. *Nucleic Acids Res*, **19** (**19**), 1991, 5285-91.

Nishimura T, Newkirk K, Sessions RB, Andrews PA, Trock BJ, Rasmussen AA, Montgomery EA, Bischoff EK, and Cullen KJ. Immunohistochemical staining for glutathione S-transferase predicts response to platinum-based chemotherapy in head and neck cancer. *Clin Cancer Res*, **2** (11), 1996, 1859-65.

O'Brien M, Kruh GD, and Tew KD. The influence of coordinate overexpression of glutathione phase II detoxification gene products on drug resistance. *J Pharmacol Exp Ther*, **294** (2), 2000, 480-7.

Ohneda K, and Yamamoto M. Roles of hematopoietic transcription factors GATA-1 and GATA-2 in the development of red blood cell lineage. *Acta Haematol*, **108** (4), 2002, 237-45.

Oki T, Matsuzawa Y, Yoshimoto A, Numata K, and Kitamura I. New antitumor antibiotics aclacinomycins A and B. J Antibiot (Tokyo), 28 (10), 1975, 830-4.

Okuno S, Sato H, Kuriyama-Matsumura K, Tamba M, Wang H, Sohda S, Hamada H, Yoshikawa H, Kondo T, and Bannai S. Role of cystine transport in intracellular glutathione level and cisplatin resistance in human ovarian cancer cell lines. *Br J Cancer*, **88** (6), 2003, 951-6.

Orkin SH. GATA-binding transcription factors in hematopoietic cells. *Blood*, **80** (3), 1992, 575-81.

Orkin SH, Shivdasani RA, Fujiwara Y, and McDevitt MA. Transcription factor GATA-1 in megakaryocyte development. *Stem Cells*, **16 Suppl 2** 1998, 79-83.

Orkin SH, Swan D, and Leder P. Differential expression of alpha- and beta-globin genes during differentiation of cultured erythroleukemic cells. *J Biol Chem*, **250** (**22**), 1975, 8753-60.

Ostareck-Lederer A, Ostareck DH, Standart N, and Thiele BJ. Translation of 15-lipoxygenase mRNA is inhibited by a protein that binds to a repeated sequence in the 3' untranslated region. *Embo J*, **13** (6), 1994, 1476-81.

Owuor ED, and Kong AN. Antioxidants and oxidants regulated signal transduction pathways. *Biochem Pharmacol*, **64** (5-6), 2002, 765-70.

Paquette RL, and Koeffler HP. Differentiation therapy. Hematol Oncol Clin North Am, 6 (3), 1992, 687-706.

Pardal R, Clarke MF, and Morrison SJ. Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat Rev Cancer*, **3** (12), 2003, 895-902.

Partington GA, and Patient RK. Phosphorylation of GATA-1 increases its DNA-binding affinity and is correlated with induction of human K562 erythroleukaemia cells. *Nucleic Acids Res*, **27** (**4**), 1999, 1168-75.

Passegue E, Jamieson CH, Ailles LE, and Weissman IL. Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100 Suppl 1** 2003, 11842-9.

Pastore A, Federici G, Bertini E, and Piemonte F. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin Chim Acta*, **333** (1), 2003, 19-39.

Patient RK, and McGhee JD. The GATA family (vertebrates and invertebrates). *Curr Opin Genet Dev*, **12** (4), 2002, 416-22.

Pemble S, Schroeder KR, Spencer SR, Meyer DJ, Hallier E, Bolt HM, Ketterer B, and Taylor JB. Human glutathione S-transferase theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. *Biochem J*, **300** (**Pt 1**) 1994, 271-6.

Pemble SE, Wardle AF, and Taylor JB. Glutathione S-transferase class Kappa: characterization by the cloning of rat mitochondrial GST and identification of a human homologue. *Biochem J*, **319** (**Pt 3**) 1996, 749-54.

Pendyala L, Perez R, Weinstein A, Zdanowicz J, and Creaven PJ. Effect of glutathione depletion on the cytotoxicity of cisplatin and iproplatin in a human melanoma cell line. *Cancer Chemother Pharmacol*, **40** (1), 1997, 38-44.

Perkins AC, Sharpe AH, and Orkin SH. Lethal beta-thalassaemia in mice lacking the erythroid CACCC-transcription factor EKLF. *Nature*, **375** (6529), 1995, 318-22.

Peterec SM, Nichols KV, Dynia DW, Wilson CM, and Gross I. Butyrate modulates surfactant protein mRNA in fetal rat lung by altering mRNA transcription and stability. *Am J Physiol*, **267** (**1 Pt 1**), 1994, L9-15.

Petrini M, Di Simone D, Favati A, Mattii L, Valentini P, and Grassi B. GST-pi and P-170 co-expression in multiple myeloma. *Br J Haematol*, **90** (2), 1995, 393-7.

Pevny L, Lin CS, D'Agati V, Simon MC, Orkin SH, and Costantini F. Development of hematopoietic cells lacking transcription factor GATA-1. *Development*, **121** (1), 1995, 163-72.

Pevny L, Simon MC, Robertson E, Klein WH, Tsai SF, D'Agati V, Orkin SH, and Costantini F. Erythroid differentiation in chimaeric mice blocked by a targeted mutation in the gene for transcription factor GATA-1. *Nature*, **349** (6306), 1991, 257-60.

Pirkkala L, Alastalo TP, Nykanen P, Seppa L, and Sistonen L. Differentiation lineage-specific expression of human heat shock transcription factor 2. *Faseb J*, **13** (9), 1999, 1089-98.

Platz EA, Krithivas K, Kantoff PW, Stampfer MJ, and Giovannucci E. ATAAA repeat upstream of glutathione S-transferase P1 and prostate cancer risk. *Urology*, **59** (1), 2002, 159-64.

Powis G. Free radical formation by antitumor quinones. *Free Radic Biol Med*, 6 (1), 1989, 63-101.

Prochownik EV, Smith MJ, Snyder K, and Emeagwali D. Amplified expression of three jun family members inhibits erythroleukemia differentiation. *Blood*, **76** (**9**), 1990, 1830-7.

Puchalski RB, and Fahl WE. Expression of recombinant glutathione S-transferase pi, Ya, or Yb1 confers resistance to alkylating agents. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87** (7), 1990, 2443-7.

Pulvertaft JV. Cytology of Burkitt's Tumour (African Lymphoma). Lancet, 39 1964, 238-40.

Racke FK, Lewandowska K, Goueli S, and Goldfarb AN. Sustained activation of the extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase pathway is required for megakaryocytic differentiation of K562 cells. *J Biol Chem*, **272** (**37**), 1997, 23366-70.

Racke FK, Wang D, Zaidi Z, Kelley J, Visvader J, Soh JW, and Goldfarb AN. A potential role for protein kinase C-epsilon in regulating megakaryocytic lineage commitment. *J Biol Chem*, **276** (**1**), 2001, 522-8.

Raina V, Sharma A, Mohanti BK, Kumar R, Dawar R, and Rath GK. Etoposide, vinblastine, adriamycin and prednisolone (EVAP) combination chemotherapy as first-line treatment for Hodgkin's disease. *Natl Med J India*, **16** (4), 2003, 199-203.

Randolph JB, and Waggoner AS. Stability, specificity and fluorescence brightness of multiply-labeled fluorescent DNA probes. *Nucleic Acids Res*, **25** (14), 1997, 2923-9.

Ranganathan S, and Tew KD. Immunohistochemical localization of glutathione S-transferases alpha, mu, and pi in normal tissue and carcinomas from human colon. *Carcinogenesis*, **12** (**12**), 1991, 2383-7.

Rangatia J, Vangala RK, Singh SM, Peer Zada AA, Elsasser A, Kohlmann A, Haferlach T, Tenen DG, Hiddemann W, and Behre G. Elevated c-Jun expression in acute myeloid leukemias inhibits C/EBPalpha DNA binding via leucine zipper domain interaction. *Oncogene*, **22** (**30**), 2003, 4760-4.

Ranson H, Prapanthadara L, and Hemingway J. Cloning and characterization of two glutathione S-transferases from a DDT-resistant strain of Anopheles gambiae. *Biochem J*, **324** (**Pt 1**) 1997, 97-102.

Rao G, Rekhtman N, Cheng G, Krasikov T, and Skoultchi AI. Deregulated expression of the PU.1 transcription factor blocks murine erythroleukemia cell terminal differentiation. *Oncogene*, **14** (**1**), 1997, 123-31.

Rebbeck TR. Molecular epidemiology of the human glutathione S-transferase genotypes GSTM1 and GSTT1 in cancer susceptibility. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **6** (9), 1997, 733-43.

Rekhtman N, Choe KS, Matushansky I, Murray S, Stopka T, and Skoultchi AI. PU.1 and pRB interact and cooperate to repress GATA-1 and block erythroid differentiation. *Mol Cell Biol*, **23** (**21**), 2003, 7460-74.

Rekhtman N, Radparvar F, Evans T, and Skoultchi AI. Direct interaction of hematopoietic transcription factors PU.1 and GATA-1: functional antagonism in erythroid cells. *Genes Dev*, **13** (**11**), 1999, 1398-411.

Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, and Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, **414** (6859), 2001, 105-11.

Rhoads DM, Zarlengo RP, and Tu CP. The basic glutathione S-transferases from human livers are products of separate genes. *Biochem Biophys Res Commun*, **145** (1), 1987, 474-81.

Ribrag V, Koscielny S, Carpiuc I, Cebotaru C, Vande Walle H, Talbot M, Fenaux P, and Bosq J. Prognostic value of GST-pi expression in diffuse large B-cell lymphomas. *Leukemia*, **17** (**5**), 2003, 972-7.

Ricci G, Turella P, De Maria F, Antonini G, Nardocci L, Board PG, Parker MW, Carbonelli MG, Federici G, and Caccuri AM. Binding and kinetic mechanisms of the Zeta class glutathione transferase. *J Biol Chem*, **279** (**32**), 2004, 33336-42.

Rogiers V, Akrawi M, Vercruysse A, Phillips IR, and Shephard EA. Effects of the anticonvulsant, valproate, on the expression of components of the cytochrome-P-450-mediated monooxygenase system and glutathione S-transferases. *Eur J Biochem*, **231** (2), 1995, 337-43.

Rohlff C, Ahmad S, Borellini F, Lei J, and Glazer RI. Modulation of transcription factor Sp1 by cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem*, **272** (**34**), 1997, 21137-41.

Romeo PH, Prandini MH, Joulin V, Mignotte V, Prenant M, Vainchenker W, Marguerie G, and Uzan G. Megakaryocytic and erythrocytic lineages share specific transcription factors. *Nature*, **344** (**6265**), 1990, 447-9.

Rosson D, and O'Brien TG. Constitutive c-myb expression in K562 cells inhibits induced erythroid differentiation but not tetradecanoyl phorbol acetate-induced megakaryocytic differentiation. *Mol Cell Biol*, **15** (2), 1995a, 772-9.

Rosson D, and O'Brien TG. Expression and modulation of protein kinase C isoforms in differentiationcompetent and differentiation-resistant erythroleukemic cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **210** (1), 1995b, 90-7.

Rosson D, and O'Brien TG. AP-1 activity affects the levels of induced erythroid and megakaryocytic differentiation of K562 cells. *Arch Biochem Biophys*, **352** (2), 1998, 298-305.

Rowley PT, Farley BA, LaBella S, Giuliano R, and Leary JF. Single K562 human leukemia cells express and are inducible for both erythroid and megakaryocytic antigens. *Int J Cell Cloning*, **10** (**4**), 1992, 232-40.

Salinas AE, and Wong MG. Glutathione S-transferases--a review. Curr Med Chem, 6 (4), 1999, 279-309.

Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, Freeman TB, Saporta S, Janssen W, Patel N, Cooper DR, and Sanberg PR. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol*, **164** (2), 2000, 247-56.

Sassa S. Hematologic aspects of the porphyrias. Int J Hematol, 71 (1), 2000, 1-17.

Sato K. Glutathione transferases as markers of preneoplasia and neoplasia. Adv Cancer Res, 52 1989, 205-55.

Sauerbrey A, Zintl F, and Volm M. P-glycoprotein and glutathione S-transferase pi in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Cancer*, **70** (6), 1994, 1144-9.

Sawado T, Igarashi K, and Groudine M. Activation of beta-major globin gene transcription is associated with recruitment of NF-E2 to the beta-globin LCR and gene promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98** (**18**), 2001, 10226-31.

Sayed Y, Hornby JA, Lopez M, and Dirr H. Thermodynamics of the ligandin function of human class Alpha glutathione transferase A1-1: energetics of organic anion ligand binding. *Biochem J*, **363** (Pt 2), 2002, 341-6.

Schisselbauer JC, Silber R, Papadopoulos E, Abrams K, LaCreta FP, and Tew KD. Characterization of glutathione S-transferase expression in lymphocytes from chronic lymphocytic leukemia patients. *Cancer Res*, **50** (12), 1990, 3562-8.

Schmidt CA, and Przybylski GK. What can we learn from leukemia as for the process of lineage commitment in hematopoiesis? *Int Rev Immunol*, **20** (1), 2001, 107-15.

Schneider U, Schwenk HU, 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*, **19** (**5**), 1977, 621-6.

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

Schroder CP, Godwin AK, O'Dwyer PJ, Tew KD, Hamilton TC, and Ozols RF. Glutathione and drug resistance. *Cancer Invest*, **14** (2), 1996, 158-68.

Schroder KR, Hallier E, Peter H, and Bolt HM. Dissociation of a new glutathione S-transferase activity in human erythrocytes. *Biochem Pharmacol*, **43** (8), 1992, 1671-4.

Schwartz DA, and Norris JS. Glucocorticoid, androgen, and retinoic acid regulation of glutathione S-transferase gene expression in hamster smooth muscle tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **184** (2), 1992, 1108-13.

Schwartzbauer G, Schlesinger K, and Evans T. Interaction of the erythroid transcription factor cGATA-1 with a critical auto-regulatory element. *Nucleic Acids Res*, **20** (17), 1992, 4429-36.

Sell S. Cellular origin of cancer: dedifferentiation or stem cell maturation arrest? *Environ Health Perspect*, **101 Suppl 5** 1993, 15-26.

Sell S. Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. Crit Rev Oncol Hematol, 51 (1), 2004, 1-28.

Sell S, and Dunsford HA. Evidence for the stem cell origin of hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma. *Am J Pathol*, **134** (6), 1989, 1347-63.

Sell S, and Pierce GB. Maturation arrest of stem cell differentiation is a common pathway for the cellular origin of teratocarcinomas and epithelial cancers. *Lab Invest*, **70** (1), 1994, 6-22.

Sheehan D, Meade G, Foley VM, and Dowd CA. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem J*, **360** (**Pt 1**), 2001, 1-16.

Sherr CJ, and Roberts JM. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev*, 9 (10), 1995, 1149-63.

Shields JM, Christy RJ, and Yang VW. Identification and characterization of a gene encoding a gut-enriched Kruppel-like factor expressed during growth arrest. *J Biol Chem*, **271** (**33**), 1996, 20009-17.

Shimizu R, Takahashi S, Ohneda K, Engel JD, and Yamamoto M. In vivo requirements for GATA-1 functional domains during primitive and definitive erythropoiesis. *Embo J*, **20** (**18**), 2001, 5250-60.

Shivdasani RA, Fujiwara Y, McDevitt MA, and Orkin SH. A lineage-selective knockout establishes the critical role of transcription factor GATA-1 in megakaryocyte growth and platelet development. *Embo J*, **16** (**13**), 1997, 3965-73.

Shivdasani RA, and Orkin SH. Erythropoiesis and globin gene expression in mice lacking the transcription factor NF-E2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92** (19), 1995, 8690-4.

Shivdasani RA, Rosenblatt MF, Zucker-Franklin D, Jackson CW, Hunt P, Saris CJ, and Orkin SH. Transcription factor NF-E2 is required for platelet formation independent of the actions of thrombopoietin/MGDF in megakaryocyte development. *Cell*, **81** (5), 1995, 695-704.

Simon MC, Pevny L, Wiles MV, Keller G, Costantini F, and Orkin SH. Rescue of erythroid development in gene targeted GATA-1- mouse embryonic stem cells. *Nat Genet*, **1** (2), 1992, 92-8.

Singal PK, Iliskovic N, Li T, and Kumar D. Adriamycin cardiomyopathy: pathophysiology and prevention. *Faseb J*, **11** (**12**), 1997, 931-6.

Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, and Dirks PB. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res*, **63** (**18**), 2003, 5821-8.

Singh SV, Varma V, Zimniak P, Srivastava SK, Marynowski SW, Desai D, Amin S, and Ji X. Structural basis for catalytic differences between alpha class human glutathione transferases hGSTA1-1 and hGSTA2-2 for glutathione conjugation of environmental carcinogen benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide. *Biochemistry*, **43** (**30**), 2004, 9708-15.

Skretting G, Gjernes E, and Prydz H. Sodium butyrate inhibits the expression of the human lecithin: cholesterol acyltransferase gene in HepG2 cells by a post-transcriptional mechanism. *FEBS Lett*, **404** (1), 1997, 105-10.

Snyder MJ, and Maddison DR. Molecular phylogeny of glutathione-S-transferases. DNA Cell Biol, 16 (11), 1997, 1373-84.

Solomon WB, Lin CH, Palma J, Gao XY, and Wu S. Suppression of a cellular differentiation program by phorbol esters coincides with inhibition of binding of a cell-specific transcription factor (NF-E2) to an enhancer element required for expression of an erythroid-specific gene. *J Biol Chem*, **268** (7), 1993, 5089-96.

Sordet O, Bettaieb A, Bruey JM, Eymin B, Droin N, Ivarsson M, Garrido C, and Solary E. Selective inhibition of apoptosis by TPA-induced differentiation of U937 leukemic cells. *Cell Death Differ*, **6** (4), 1999, 351-61.

Sordet O, Rebe C, Dubrez-Daloz L, Boudard D, and Solary E. Intracellular redistribution of procaspases during TPA-induced differentiation of U937 human leukemic cells. *Leukemia*, **16** (**8**), 2002, 1569-70.

Sorensen BS, Jensen PB, Sehested M, Jensen PS, Kjeldsen E, Nielsen OF, and Alsner J. Antagonistic effect of aclarubicin on camptothecin induced cytotoxicity: role of topoisomerase I. *Biochem Pharmacol*, **47** (**11**), 1994, 2105-10.

Spira AI, and Carducci MA. Differentiation therapy. Curr Opin Pharmacol, 3 (4), 2003, 338-43.

Sposi NM, Zon LI, Care A, Valtieri M, Testa U, Gabbianelli M, Mariani G, Bottero L, Mather C, Orkin SH, and et al. Cell cycle-dependent initiation and lineage-dependent abrogation of GATA-1 expression in pure differentiating hematopoietic progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89** (14), 1992, 6353-7.

Stanulla M, Schrappe M, Brechlin AM, Zimmermann M, and Welte K. Polymorphisms within glutathione S-transferase genes (GSTM1, GSTT1, GSTP1) and risk of relapse in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: a case-control study. *Blood*, **95** (4), 2000, 1222-8.

Stein J, Schroder O, Bonk M, Oremek G, Lorenz M, and Caspary WF. Induction of glutathione-S-transferase-pi by short-chain fatty acids in the intestinal cell line Caco-2. *Eur J Clin Invest*, **26** (1), 1996, 84-7.

Stoehlmacher J, Park DJ, Zhang W, Groshen S, Tsao-Wei DD, Yu MC, and Lenz HJ. Association between glutathione S-transferase P1, T1, and M1 genetic polymorphism and survival of patients with metastatic colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst*, **94** (**12**), 2002, 936-42.

Strange RC, Spiteri MA, Ramachandran S, and Fryer AA. Glutathione-S-transferase family of enzymes. *Mutat Res*, **482** (1-2), 2001, 21-6.

Strubelt O, Deters M, Pentz R, Siegers CP, and Younes M. The toxic and metabolic effects of 23 aliphatic alcohols in the isolated perfused rat liver. *Toxicol Sci*, **49** (**1**), 1999, 133-42.

Su F, Hu X, Jia W, Gong C, Song E, and Hamar P. Glutathion S transferase pi indicates chemotherapy resistance in breast cancer. *J Surg Res*, **113** (1), 2003, 102-8.

Suliman HB, Carraway MS, Velsor LW, Day BJ, Ghio AJ, and Piantadosi CA. Rapid mtDNA deletion by oxidants in rat liver mitochondria after hemin exposure. *Free Radic Biol Med*, **32** (**3**), 2002, 246-56.

Sundstrom C, and Nilsson K. Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int J Cancer*, **17** (**5**), 1976, 565-77.

Sutherland JA, Turner AR, Mannoni P, McGann LE, and Turc JM. Differentiation of K562 leukemia cells along erythroid, macrophage, and megakaryocyte lineages. *J Biol Response Mod*, **5** (3), 1986, 250-62.

Tamura S, Wang XH, Maeda M, and Futai M. Gastric DNA-binding proteins recognize upstream sequence motifs of parietal cell-specific genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90** (**22**), 1993, 10876-80.

Tang XB, Liu DP, and Liang CC. Regulation of the transcription factor GATA-1 at the gene and protein level. *Cell Mol Life Sci*, **58** (**14**), 2001, 2008-17.

Tashiro K, Asakura T, Fujiwara C, Ohkawa K, and Ishibashi Y. Glutathione-S-transferase-pi expression regulates sensitivity to glutathione-doxorubicin conjugate. *Anticancer Drugs*, **12** (**8**), 2001, 707-12.

Tenen DG. Disruption of differentiation in human cancer: AML shows the way. *Nat Rev Cancer*, **3** (**2**), 2003, 89-101.

Tenhunen R, and Mustajoki P. Acute porphyria: treatment with heme. Semin Liver Dis, 18 (1), 1998, 53-5.

Terrier P, Townsend AJ, Coindre JM, Triche TJ, and Cowan KH. An immunohistochemical study of pi class glutathione S-transferase expression in normal human tissue. *Am J Pathol*, **137** (4), 1990, 845-53.

Testa U. Apoptotic mechanisms in the control of erythropoiesis. Leukemia, 18 (7), 2004, 1176-99.

Tew KD. Glutathione-associated enzymes in anticancer drug resistance. Cancer Res, 54 (16), 1994, 4313-20.

Theodorakis NG, Zand DJ, Kotzbauer PT, Williams GT, and Morimoto RI. Hemin-induced transcriptional activation of the HSP70 gene during erythroid maturation in K562 cells is due to a heat shock factor-mediated stress response. *Mol Cell Biol*, **9** (8), 1989, 3166-73.

Tidefelt U, Elmhorn-Rosenborg A, Paul C, Hao XY, Mannervik B, and Eriksson LC. Expression of glutathione transferase pi as a predictor for treatment results at different stages of acute nonlymphoblastic leukemia. *Cancer Res*, **52** (**12**), 1992, 3281-5.

Toffoli G, Frustaci S, Tumiotto L, Talamini R, Gherlinzoni F, Picci P, and Boiocchi M. Expression of MDR1 and GST-pi in human soft tissue sarcomas: relation to drug resistance and biological aggressiveness. *Ann Oncol*, **3** (1), 1992, 63-9.

Tokes ZA, Rogers KE, and Rembaum A. Synthesis of adriamycin-coupled polyglutaraldehyde microspheres and evaluation of their cytostatic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **79** (6), 1982, 2026-30.

Toki T, Itoh J, Kitazawa J, Arai K, Hatakeyama K, Akasaka J, Igarashi K, Nomura N, Yokoyama M, Yamamoto M, and Ito E. Human small Maf proteins form heterodimers with CNC family transcription factors and recognize the NF-E2 motif. *Oncogene*, **14** (**16**), 1997, 1901-10.

Trachte AL, Suthers SE, Lerner MR, Hanas JS, Jupe ER, Sienko AE, Adesina AM, Lightfoot SA, Brackett DJ, and Postier RG. Increased expression of alpha-1-antitrypsin, glutathione S-transferase pi and vascular endothelial growth factor in human pancreatic adenocarcinoma. *Am J Surg*, **184** (6), 2002, 642-7; discussion 647-8.

Trayner ID, Bustorff T, Etches AE, Mufti GJ, Foss Y, and Farzaneh F. Changes in antigen expression on differentiating HL60 cells treated with dimethylsulphoxide, all-trans retinoic acid, alpha1,25-dihydroxyvitamin D3 or 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate. *Leuk Res*, **22** (6), 1998, 537-47.

Trentesaux C, Nyoung MN, Aries A, Morceau F, Ronchi A, Ottolenghi S, Jardillier JC, and Jeannesson P. Increased expression of GATA-1 and NFE-2 erythroid-specific transcription factors during aclacinomycinmediated differentiation of human erythroleukemic cells. *Leukemia*, **7** (**3**), 1993, 452-7.

Tsai SF, Martin DI, Zon LI, D'Andrea AD, Wong GG, and Orkin SH. Cloning of cDNA for the major DNAbinding protein of the erythroid lineage through expression in mammalian cells. *Nature*, **339** (**6224**), 1989, 446-51.

Tsai SF, Strauss E, and Orkin SH. Functional analysis and in vivo footprinting implicate the erythroid transcription factor GATA-1 as a positive regulator of its own promoter. *Genes Dev*, **5** (**6**), 1991, 919-31.

Tsang AP, Visvader JE, Turner CA, Fujiwara Y, Yu C, Weiss MJ, Crossley M, and Orkin SH. FOG, a multitype zinc finger protein, acts as a cofactor for transcription factor GATA-1 in erythroid and megakaryocytic differentiation. *Cell*, **90** (1), 1997, 109-19.

Tsiftsoglou AS, Pappas IS, and Vizirianakis IS. Mechanisms involved in the induced differentiation of leukemia cells. *Pharmacol Ther*, **100** (**3**), 2003, 257-90.

Tsukamoto N, Chen J, and Yoshida A. Enhanced expressions of glucose-6-phosphate dehydrogenase and cytosolic aldehyde dehydrogenase and elevation of reduced glutathione level in cyclophosphamide-resistant human leukemia cells. *Blood Cells Mol Dis*, **24** (2), 1998, 231-8.

Turner J, and Crossley M. Basic Kruppel-like factor functions within a network of interacting haematopoietic transcription factors. *Int J Biochem Cell Biol*, **31** (10), 1999a, 1169-74.

Turner J, and Crossley M. Mammalian Kruppel-like transcription factors: more than just a pretty finger. *Trends Biochem Sci*, **24** (6), 1999b, 236-40.

Uchida N, Buck DW, He D, Reitsma MJ, Masek M, Phan TV, Tsukamoto AS, Gage FH, and Weissman IL. Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97** (**26**), 2000, 14720-5.

Utesch D, Traiser M, Gath I, Dorresteijn AW, Maier P, and Oesch F. Effects of sodium butyrate on DNA content, glutathione S-transferase activities, cell morphology and growth characteristics of rat liver nonparenchymal epithelial cells in vitro. *Carcinogenesis*, **14** (**3**), 1993, 457-62.

Vahrmeijer AL, Snel CA, Steenvoorden DP, Beijnen JH, Pang KS, Schutrups J, Tirona R, Keizer HJ, van Dierendonck JH, van de Velde CJ, and Mulder GJ. Lack of glutathione conjugation of melphalan in the isolated in situ liver perfusion in humans. *Cancer Res*, **56** (**20**), 1996, 4709-14.

Vainchenker W, Testa U, Guichard J, Titeux M, and Breton-Gorius J. Heterogeneity in the cellular commitment of a human leukemic cell line: K 562. *Blood Cells*, **7** (2), 1981, 357-75.

Volm M, Mattern J, and Samsel B. Relationship of inherent resistance to doxorubicin, proliferative activity and expression of P-glycoprotein 170, and glutathione S-transferase-pi in human lung tumors. *Cancer*, **70** (4), 1992, 764-9.

Wada H, Hasegawa K, Morimoto T, Kakita T, Yanazume T, Abe M, and Sasayama S. Calcineurin-GATA-6 pathway is involved in smooth muscle-specific transcription. *J Cell Biol*, **156** (6), 2002, 983-91.

Wall L, deBoer E, and Grosveld F. The human beta-globin gene 3' enhancer contains multiple binding sites for an erythroid-specific protein. *Genes Dev*, **2**(**9**), 1988, 1089-100.

Walsh JC, DeKoter RP, Lee HJ, Smith ED, Lancki DW, Gurish MF, Friend DS, Stevens RL, Anastasi J, and Singh H. Cooperative and antagonistic interplay between PU.1 and GATA-2 in the specification of myeloid cell fates. *Immunity*, **17** (**5**), 2002, 665-76.

Wang B, and Williamson G. Detection of a nuclear protein which binds specifically to the antioxidant responsive element (ARE) of the human NAD(P) H:quinone oxidoreductase gene. *Biochim Biophys Acta*, **1219** (**3**), 1994, 645-52.

Wang K, Ramji S, Bhathena A, Lee C, and Riddick DS. Glutathione S-transferases in wild-type and doxorubicin-resistant MCF-7 human breast cancer cell lines. *Xenobiotica*, **29** (**2**), 1999, 155-70.

Wasserman WW, and Fahl WE. Functional antioxidant responsive elements. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94** (10), 1997, 5361-6.

Waxman S. Differentiation therapy in acute myelogenous leukemia (non-APL). Leukemia, 14 (3), 2000, 491-6.

Weiss MJ, Keller G, and Orkin SH. Novel insights into erythroid development revealed through in vitro differentiation of GATA-1 embryonic stem cells. *Genes Dev*, **8** (10), 1994, 1184-97.

Weiss MJ, and Orkin SH. Transcription factor GATA-1 permits survival and maturation of erythroid precursors by preventing apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92** (**21**), 1995, 9623-7.

Whalen AM, Galasinski SC, Shapiro PS, Nahreini TS, and Ahn NG. Megakaryocytic differentiation induced by constitutive activation of mitogen-activated protein kinase kinase. *Mol Cell Biol*, **17** (**4**), 1997, 1947-58.

Whitmarsh AJ, and Davis RJ. Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J Mol Med*, **74** (**10**), 1996, 589-607.

Witt O, Sand K, and Pekrun A. Butyrate-induced erythroid differentiation of human K562 leukemia cells involves inhibition of ERK and activation of p38 MAP kinase pathways. *Blood*, **95** (7), 2000, 2391-6.

Witt O, Schulze S, Kanbach K, Roth C, and Pekrun A. Tumor cell differentiation by butyrate and environmental stress. *Cancer Lett*, **171** (**2**), 2001, 173-82.

Woessmann W, and Mivechi NF. Role of ERK activation in growth and erythroid differentiation of K562 cells. *Exp Cell Res*, **264** (2), 2001, 193-200.

Xia C, Hu J, Ketterer B, and Taylor JB. The organization of the human GSTP1-1 gene promoter and its response to retinoic acid and cellular redox status. *Biochem J*, **313** (**Pt 1**) 1996, 155-61.

Xie P, Chan FS, Ip NY, and Leung M. Nerve growth factor potentiated the sodium butyrate- and PMA-induced megakaryocytic differentiation of K562 leukemia cells. *Leuk Res*, **24** (**9**), 2000, 751-9.

Xie P, Chan FS, Ip NY, and Leung MF. Induction of gp130 and LIF by differentiation inducers in human myeloid leukemia K562 cells. *Leuk Res*, 23 (12), 1999, 1113-9.

Xie T, Belinsky M, Xu Y, and Jaiswal AK. ARE- and TRE-mediated regulation of gene expression. Response to xenobiotics and antioxidants. *J Biol Chem*, **270** (**12**), 1995, 6894-900.

Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, and Beach D. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature*, **366** (**6456**), 1993, 701-4.

Xu S, Wang Y, Roe B, and Pearson WR. Characterization of the human class Mu glutathione S-transferase gene cluster and the GSTM1 deletion. *J Biol Chem*, **273** (6), 1998, 3517-27.

Yamamoto M, Ko LJ, Leonard MW, Beug H, Orkin SH, and Engel JD. Activity and tissue-specific expression of the transcription factor NF-E1 multigene family. *Genes Dev*, **4** (10), 1990, 1650-62.

Yamamoto Y, and Gaynor RB. IkappaB kinases: key regulators of the NF-kappaB pathway. *Trends Biochem Sci*, **29** (2), 2004, 72-9.

Yang D, Suzuki S, Hao LJ, Fujii Y, Yamauchi A, Yamamoto M, Nakamura M, and Kumatori A. Eosinophil-specific regulation of gp91(phox) gene expression by transcription factors GATA-1 and GATA-2. *J Biol Chem*, **275** (13), 2000, 9425-32.

Yang J, Kawai Y, Hanson RW, and Arinze IJ. Sodium butyrate induces transcription from the G alpha(i2) gene promoter through multiple Sp1 sites in the promoter and by activating the MEK-ERK signal transduction pathway. *J Biol Chem*, **276** (**28**), 2001, 25742-52.

Yi Z, Wang Z, Li H, and Liu M. Inhibitory effect of tellimagrandin I on chemically induced differentiation of human leukemia K562 cells. *Toxicol Lett*, **147** (**2**), 2004, 109-19.

Yin L, Laevsky G, and Giardina C. Butyrate suppression of colonocyte NF-kappa B activation and cellular proteasome activity. *J Biol Chem*, **276** (**48**), 2001, 44641-6.

Yin Z, Ivanov VN, Habelhah H, Tew K, and Ronai Z. Glutathione S-transferase p elicits protection against H2O2-induced cell death via coordinated regulation of stress kinases. *Cancer Res*, **60** (**15**), 2000, 4053-7.

Yomogida K, Ohtani H, Harigae H, Ito E, Nishimune Y, Engel JD, and Yamamoto M. Developmental stage- and spermatogenic cycle-specific expression of transcription factor GATA-1 in mouse Sertoli cells. *Development*, **120** (7), 1994, 1759-66.

Younes M, and Strubelt O. Protection by exogenous glutathione against hypoxic and cyanide-induced damage to isolated perfused rat livers. *Toxicol Lett*, **50** (2-3), 1990, 229-36.

Yu C, Cantor AB, Yang H, Browne C, Wells RA, Fujiwara Y, and Orkin SH. Targeted deletion of a highaffinity GATA-binding site in the GATA-1 promoter leads to selective loss of the eosinophil lineage in vivo. *J Exp Med*, **195** (**11**), 2002, 1387-95.

Yu J, and Russell JE. Structural and functional analysis of an mRNP complex that mediates the high stability of human beta-globin mRNA. *Mol Cell Biol*, **21** (17), 2001, 5879-88.

Yu R, Chen C, Mo YY, Hebbar V, Owuor ED, Tan TH, and Kong AN. Activation of mitogen-activated protein kinase pathways induces antioxidant response element-mediated gene expression via a Nrf2-dependent mechanism. *J Biol Chem*, **275** (**51**), 2000, 39907-13.

Zhang J, and Lou YJ. Relationship between activation of microsomal glutathione S-transferase and metabolism behavior of chlorambucil. *Pharmacol Res*, **48** (6), 2003, 623-30.

Zhang K, Mack P, and Wong KP. Glutathione-related mechanisms in cellular resistance to anticancer drugs. *Int J Oncol*, **12** (**4**), 1998, 871-82.

Zhang K, Yang EB, Wong KP, and Mack P. GSH, GSH-related enzymes and GS-X pump in relation to sensitivity of human tumor cell lines to chlorambucil and adriamycin. *Int J Oncol*, **14** (**5**), 1999, 861-7.

Zhang P, Zhang X, Iwama A, Yu C, Smith KA, Mueller BU, Narravula S, Torbett BE, Orkin SH, and Tenen DG. PU.1 inhibits GATA-1 function and erythroid differentiation by blocking GATA-1 DNA binding. *Blood*, **96** (**8**), 2000, 2641-8.

Zhang Y, Gonzalez V, and Xu MJ. Expression and regulation of glutathione S-transferase P1-1 in cultured human epidermal cells. *J Dermatol Sci*, **30** (**3**), 2002, 205-14.

Zhou S, Heller LJ, and Wallace KB. Interference with calcium-dependent mitochondrial bioenergetics in cardiac myocytes isolated from doxorubicin-treated rats. *Toxicol Appl Pharmacol*, **175** (1), 2001a, 60-7.

Zhou S, Palmeira CM, and Wallace KB. Doxorubicin-induced persistent oxidative stress to cardiac myocytes. *Toxicol Lett*, **121** (**3**), 2001b, 151-7.

Zhu J, Koken MH, Quignon F, Chelbi-Alix MK, Degos L, Wang ZY, Chen Z, and de The H. Arsenic-induced PML targeting onto nuclear bodies: implications for the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94** (8), 1997, 3978-83.

Zon LI, Yamaguchi Y, Yee K, Albee EA, Kimura A, Bennett JC, Orkin SH, and Ackerman SJ. Expression of mRNA for the GATA-binding proteins in human eosinophils and basophils: potential role in gene transcription. *Blood*, **81** (**12**), 1993, 3234-41.

Zon LI, Youssoufian H, Mather C, Lodish HF, and Orkin SH. Activation of the erythropoietin receptor promoter by transcription factor GATA-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88** (**23**), 1991, 10638-41.

PUBLICATIONS ISSUES DE CE TRAVAIL

Les travaux présentés dans cette thèse ont fait l'objet des présentations et publications suivantes :

PUBLICATIONS :

Publications à comité de lecture :

- Michael Schnekenburger, Franck Morceau, Annelyse Duvoix, Sylvie Delhalle, Chantal Trentesaux, Mario Dicato and Marc Diederich. Expression of Glutathione S-transferase P1-1 in differentiating K562: role of GATA-1. Biochem Biophys Res Commun, 311(4): 815-21, 2003.
- Michael Schnekenburger, Franck Morceau, Annelyse Duvoix, Sylvie Delhalle, Chantal Trentesaux, Mario Dicato and Marc Diederich. Increased glutathione S-transferase P1-1 expression by mRNA stabilization in hemin-induced differentiation of K562 cells. Biochem Pharmacol, 68 (6) : 1269-1277, 2004.
- Michael Schnekenburger, Franck Morceau, Estelle Henry, Romain Blasius, Mario Dicato, Chantal Trentesaux and Marc Diederich. Transcriptional and post-transcriptional regulation of glutathione S-transferase P1-1 expression during butyric acid-induced differentiation of K562 cells. (Soumis)

<u>Revue</u> :

 Franck Morceau, Michaël Schnekenburger, Mario Dicato and Marc Diederich. GATA-1: Friends, Brothers and Coworkers. Ann N Y Acad Sci, 1030, 2004 (Sous presse).

<u>AUTRES PUBLICATIONS</u> :

- A. Duvoix, M. Schmitz, M. Schnekenburger, M. Dicato, F. Morceau, M.-M. Galteau, M. Diederich. Transcriptional regulation of Glutathione S-transferase P1-1 in human leukemia. Biofactors, 17(1-4): 131-8, 2003. (Revue)
- Annelyse Duvoix, Franck Morceau, Sylvie Delhalle, Martine Schmitz, Michaël Schnekenburger, Marie-Madeleine Galteau, Mario Dicato and Marc Diederich. Induction of apoptosis by curcumin: mediation by glutathione S-transferase P1-1 inhibition. Biochem Pharmacol, 66(8): 1475-83, 2003.

- A.Duvoix, F.Morceau, M. Schnekenburger, S. Delhalle, M.M. Galteau, M. Dicato and M. Diederich. Curcumin-induced cell death in two leukemia cell lines: K562 and Jurkat. Ann N Y Acad Sci, 1010 : 389-92, 2003.
- S. Delhalle, A.Duvoix, M. Schnekenburger, F.Morceau, M. Dicato and M. Diederich.
 An introduction to the molecular mechanisms of apoptosis. Ann N Y Acad Sci, 1010 : 1-8, 2003.
- Franck Morceau, Annelyse Duvoix, Sylvie Delhalle, Michaël Schnekenburger, Mario Dicato, and Marc Diederich. Regulation of glutathione S-transferase P1-1 gene expression by NF-kappaB in tumor necrosis factor alpha-treated K562 leukemia cells. Biochem Pharmacol, 67(7) : 1227-38, 2004.
- Duvoix A, Delhalle S, Blasius R, Schnekenburger M, Morceau F, Fougère M, Henry E, Galteau MM, Dicato M, Diederich M. Effect of chemopreventive agents on glutathione S-transferase P1-1 gene expression mechanisms *via* activating protein 1 and nuclear factor kappaB inhibition. Biochem Pharmacol, 68(6) : 1101-11, 2004.
- Annelyse Duvoix, Michaël Schnekenburger, Sylvie Delhalle, Romain Blasius, Patricia Borde-Chiché, Franck Morceau, Mario Dicato and Marc Diederich Expression of glutathione S-transferase P1-1 in leukemic cells is regulated by inducible AP-1 binding. Cancer Letters, 216 : 207-219, 2004.
- Romain Blasius, Annelyse Duvoix, Franck Morceau, Michaël Schnekenburger, Sylvie Delhalle, Estelle Henry, Mario Dicato and Marc Diederich. Curcumin stability and its effect on GSTP1-1 mRNA expression in K562 cells. Ann N Y Acad Sci., 1030, 2004 (sous presse).
- Annelyse Duvoix, Romain Blasius, Sylvie Delhalle, Michaël Schnekenburger, Franck Morceau, Estelle Henry, Mario Dicato and Marc Diederich. Chemopreventive and therapeutic effects of curcumin. Cancer Letters, 2005 (sous presse).

<u>COMMUNICATIONS</u> :

> PAR AFFICHE :

- 29^{ème} Forum des Jeunes Chercheurs, Dijon, France, 1^{er} au 5 juillet 2002 : Régulation de l'expression de la glutathion S-transférase P1-1 : Etude des sites GATA.
- Journée des boursiers, Luxembourg, Luxembourg, 8 novembre 2003 : Régulation de l'expression du gène de la glutathion S-transférase P1-1 par le facteur GATA-1 au cours de la différenciation de cellules leucémiques.
- > ORALES :
 - Journée scientifique des jeunes chercheurs de l'IFR 53, Reims, France, 12 mai 2003 : Expression de la glutathion S-transférase P1-1 au cours de la différenciation érythroïde ou mégacaryocytaire dans les cellules leucémiques humaines K562.
 - Journée de la Société de Biologie de Reims, Reims, France, 21 mai 2003 : Expression de la glutathion S-transférase P1-1 au cours de la différenciation des cellules leucémiques humaines K562.
 - 5th International Meeting : CHROMATIN 2004, Luxembourg, du 28 au 31 janvier 2004: Expression of Glutathione S-transferase P1-1 during induction of differentiation of human leukaemic K562 cells : implication of transcription factor GATA-1.

SCHNEKENBURGER Michael Régulation de l'expression de la glutathion S-transférase P1-1 au cours de la différenciation de la

lignée leucémique humaine K562

RESUME

Parmi les enzymes du métabolisme du glutathion, la GST (glutathion S-transférase) (E.C. 2.5.1.18) P1-1 est une enzyme dont le profil d'expression est étroitement associé à la carcinogenèse et aux phénomènes de résistance aux médicaments anticancéreux. Notre hypothèse de travail repose sur le fait que la différenciation cellulaire peut-être utilisée comme une approche thérapeutique dans le traitement des leucémies. Notre objectif principal est de savoir si l'expression du gène codant pour la GSTP1-1 est modulée au cours de la différenciation vers les voies érythroïde et mégacaryocytaire. Nos résultats montrent dans une première partie que l'expression de la GSTP1-1 est augmentée par des inducteurs de la différenciation érythroïde (anthracyclines, hémine) de la leucémie myéloïde chronique humaine K562, alors qu'elle est diminuée par l'ester de phorbol TPA qui induit la voie mégacaryocytaire dans ces mêmes cellules. L'induction de différenciation par le butyrate vers l'une ou l'autre des deux voies myéloïdes s'accompagne d'une diminution de l'expression de l'ARNm de GSTP1-1. Une étude assistée par ordinateur de la séquence promotrice du gène de la GSTP1-1 nous a permis de découvrir deux séquences GATA en -905 et -1208. La caractérisation des sites par des expériences de retard de migration sur gel, de compétition et de supershift, met en évidence un complexe résultant de l'interaction entre le site situé à -1208 et le facteur de transcription GATA-1, impliqué dans les processus de différenciation hématopoïétique. Avec les anthracyclines (aclarubicine et doxorubicine), le TPA et le butyrate de sodium, la formation et l'intensité de ce complexe sont corrélées à l'expression de l'ARNm de GSTP1-1 et à la voie de différenciation induite. Dans le cas de l'hémine, ce sont des mécanismes post-transcriptionnels entraînant une stabilisation de l'ARNm de GSTP1-1 qui sont à l'origine de l'accumulation d'ARNm observée. En conclusion, nous montrons que la GSTP1-1 est régulée au cours de la différenciation érythroïde et mégacaryocytaire de cellules leucémiques avec la participation probable du facteur de transcription GATA-1.

MOTS-CLES : leucémie myéloïde chronique, glutathion *S*-transférase, différenciation cellulaire, érythroblaste, mégacaryocyte, facteurs de transcription, anthracyclines, ester de phorbol, hémine, butyrate.

RUBRIQUE DE CLASSEMENT : BIOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE

JURY :

Monsieur le Professeur Mario DICATO (Luxembourg) : Président de Jury Monsieur le Professeur Laurent DEGOS (Paris) : Rapporteur Monsieur le Professeur Athanase VISVIKIS (Nancy) : Rapporteur Monsieur le Docteur Marc DIEDERICH (Luxembourg) : Examinateur Madame le Professeur Chantal TRENTESAUX (Reims) : Directeur de thèse Monsieur le Docteur Franck MORCEAU (Luxembourg) : Co-Directeur

ADRESSE DE L'AUTEUR : SCHNEKENBURGER Michael 29, rue Saint-Aubin 52100 MOESLAINS