

UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE
UNITE DE FORMATION et de RECHERCHE de PHARMACIE

ANNEE 2006

N° :

THESE

Présentée en vue de l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE REIMS
CHAMPAGNE-ARDENNE

MENTION : PHARMACIE

Spécialité : Biologie cellulaire et moléculaire

Soutenue publiquement le 23 octobre 2006

par

Victoria EL KHOURY

Née le 27 septembre 1977 à Jbeil (Liban)

**ETUDE DE MODIFICATIONS EPIGENETIQUES CORRELEES A
L'EXPRESSION DU GENE *MDR1* ET A LA TEXTURE NUCLEAIRE DANS
DES CELLULES DE CARCINOME PULMONAIRE H69 SENSIBLES ET
RESISTANTES A LA CHIMIOETHERAPIE**

Jury

Rapporteurs : Dr. BAGGETTO LG (Université Claude Bernard Lyon 1)
Pr. RONOT X (Université Joseph Fourier, Grenoble)

Examineurs : Pr. ROBERT J (Institut Bergonié, Bordeaux)
Dr. GARNOTEL R (Université de Reims Champagne-Ardenne)
Dr. MORJANI H (Université de Reims Champagne-Ardenne)

Directeur de thèse : Pr. DUFER J (Université de Reims Champagne-Ardenne)

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS.....	ix
LISTE DES ABREVIATIONS.....	xiii
INTRODUCTION GENERALE.....	1
ASPECT BIBLIOGRAPHIQUE.....	5
1. Mécanismes de résistance aux anticancéreux.....	6
1.1. Mécanismes non cellulaires de la résistance.....	6
1.2. Mécanismes cellulaires de la résistance.....	7
1.2.1. Augmentation de l'efflux du médicament.....	8
1.2.2. Diminution de l'influx du médicament.....	8
1.2.3. Inactivation de l'agent thérapeutique.....	8
1.2.4. Séquestration vésiculaire du médicament.....	8
1.2.5. Altérations de la cible du cytotoxique.....	9
1.2.6. Réparation des dommages de l'ADN.....	9
1.2.7. Incapacité des cellules traitées à entrer en apoptose.....	9
2. Famille des transporteurs ABC et résistance MDR.....	10
2.1. Sous-famille ABCB.....	11
2.2. Sous-famille ABCC.....	12
2.3. Sous-famille ABCG.....	13
3. Approches thérapeutiques pour contrecarrer la résistance P-gp dépendante.....	13
3.1. Inhibiteurs de la P-gp de première génération.....	14
3.2. Inhibiteurs de la P-gp de deuxième génération.....	14
3.3. Inhibiteurs de la P-gp de troisième génération.....	15
3.4. Peptides inhibiteurs de la P-gp.....	15
3.5. Anticorps dirigés contre la P-gp.....	15
3.6. Synthèse d'anticancéreux échappant à l'efflux médié par la P-gp.....	16
3.7. Diminution de l'expression du gène <i>MDR1</i>	16
4. Régulation transcriptionnelle du gène <i>MDR1</i>	17
5. Promoteur <i>MDR1</i> et facteurs de transcription.....	18
5.1. Élément initiateur (Inr).....	18

5.2.	Boîte GC-50 et élément CCAAT inversé.....	18
5.3.	Elément p53	20
5.4.	Elément invMED1	21
5.5.	Boîte GC-110	22
5.6.	Elément MEF1	22
5.7.	Elément CAAT.....	22
5.8.	Elément AP-1	23
5.9.	Elément C/EBP	24
5.10.	Eléments HSE	24
5.11.	Elément TCF	24
5.12.	Elément SXR.....	24
6.	Epigénétique et expression du gène <i>MDR1</i>	25
6.1.	Qu'est-ce que l'épigénétique ?.....	25
6.2.	Nucléosome : unité de base de la chromatine	26
6.3.	Histones du cœur nucléosomique.....	28
6.4.	Variants des histones du cœur nucléosomique.....	29
6.5.	Modifications post-traductionnelles des histones	33
6.5.1.	Acétylation des histones.....	34
6.5.2.	Méthylation des histones.....	42
6.5.3.	Phosphorylation des histones	47
6.5.4.	Ubiquitination et SUMOylation des histones.....	48
6.6.	Code des histones.....	49
6.7.	Méthylation de l'ADN	52
6.7.1.	Qu'est-ce que la méthylation de l'ADN ?.....	52
6.7.2.	Méthylation <i>de novo</i> de l'ADN.....	53
6.7.3.	Méthylation de maintien de l'ADN.....	54
6.7.4.	Méthylation de l'ADN et pathologies épigénétiques	55
6.7.5.	Méthylation de l'ADN et contrôle de l'expression génique	55
6.8.	Coopération entre la méthylation de l'ADN et les modifications des histones	57
6.8.1.	Désacétylation des histones, méthylation de H3K9 et méthylation de l'ADN	57
6.8.2.	Méthylation de H3K27 et méthylation de l'ADN.....	59
6.9.	Rôle de la chromatine dans l'expression du gène <i>MDR1</i>	60
6.9.1.	Acétylation des histones et expression du gène <i>MDR1</i>	60
6.9.2.	Méthylation de l'ADN et expression du gène <i>MDR1</i>	62

6.9.3. Connexion ADN méthylé / histones désacétylées au niveau du promoteur MDR1	63
7. Inhibiteurs des HDACs et thérapie anticancéreuse	65
7.1. Classification des inhibiteurs des HDACs	65
7.2. Effets cellulaires des inhibiteurs des HDACs	66
7.3. Inhibiteurs des HDACs en développement clinique	67
<i>MATERIEL ET METHODES</i>	69
1. Système biologique	70
1.1. Lignées cellulaires.....	70
1.1.1. Cellules sensibles H69WT	70
1.1.2. Cellules résistantes H69VP	70
1.2. Conditions de culture	70
2. Effecteurs pharmacologiques	71
2.1. Etoposide ou VP-16 (C ₂₉ H ₃₂ O ₁₃ ; MM : 588,6).....	71
2.2. Trichostatine A (TSA) (C ₁₇ H ₂₂ N ₂ O ₃ ; MM : 302,4).....	72
2.3. Butyrate de sodium (NaBut) (C ₃ H ₇ COONa ; MM : 110,09)	72
2.4. Cycloheximide (CHX) (C ₁₅ H ₂₃ NO ₄ ; MM : 281,4).....	73
2.5. Actinomycine D (ActD) (C ₆₂ H ₈₆ N ₁₂ O ₁₆ ; MM : 1255,42)	73
2.6. 5-Aza-2'-déoxycytidine (5azadC) (C ₈ H ₁₂ N ₄ O ₄ ; MM : 228,2)	74
3. Analyse de l'expression des gènes <i>MDR1</i> et <i>c-jun</i> par RT-PCR en temps réel (<i>Reverse-Transcription-Polymerase Chain Reaction</i>)	75
3.1. Principe	75
3.2. Conditions expérimentales	76
3.2.1. Modalités de traitement.....	76
3.2.2. Extraction des ARN	78
3.2.3. Contrôle de la qualité et quantification des ARN	79
3.2.4. Transcription inverse (RT).....	79
3.2.5. PCR en temps réel	80
4. Etude de la texture nucléaire par cytométrie en images.....	82
4.1. Principe de la cytométrie par analyse d'images.....	82
4.2. Application de la cytométrie en images à l'étude de la texture nucléaire.....	83
4.3. Conditions expérimentales	83
4.3.1. Préparation, fixation et coloration des cellules	83

4.3.2.	Lecture des lames et analyse des résultats	86
5.	Identification des protéines par western-blot	87
5.1.	Principe	87
5.2.	Conditions expérimentales de l'analyse des modifications post-traductionnelles des histones.....	88
5.2.1.	Modalités de traitement.....	88
5.2.2.	Extraction acide des histones	88
5.2.3.	Quantification des histones	89
5.2.4.	Electrophorèse par SDS-PAGE, transfert et immunodétection des histones...	89
5.3.	Conditions expérimentales de l'analyse de l'expression des protéines Bax et cycline D1	91
5.3.1.	Modalités de traitement.....	91
5.3.2.	Extraction des protéines totales.....	91
5.3.3.	Quantification des protéines.....	92
5.3.4.	Electrophorèse par SDS-PAGE, transfert et immunodétection des protéines .	92
6.	Evaluation de la viabilité cellulaire par un test au MTS	93
6.1.	Principe	93
6.2.	Conditions expérimentales	93
7.	Analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux	94
7.1.	Principe de la cytométrie en flux	94
7.2.	Application de la cytométrie en flux à l'étude du cycle cellulaire.....	95
7.3.	Conditions expérimentales	96
8.	Détection des cellules apoptotiques par marquage avec la coloration de Feulgen	96
9.	Détection des histones par migration sur gel AUT (Acetic acid-Urea-Triton).....	97
9.1.	Principe	97
9.2.	Conditions expérimentales.....	97
9.2.1.	Modalités de traitement.....	97
9.2.2.	Extraction acide et quantification des histones	97
9.2.3.	Electrophorèse par AUT-PAGE.....	98
10.	Etude des modifications post-traductionnelles des histones et de la fixation de PCAF au niveau du promoteur MDR1 par immunoprécipitation de la chromatine (ChIP)	99
10.1.	Principe	99
10.2.	Conditions expérimentales	99
10.2.1.	Modalités de traitement.....	100

10.2.2.	Préparation de l'extrait cellulaire	100
10.2.3.	Immunoprécipitation de la protéine d'intérêt.....	101
10.2.4.	Extraction de l'ADN associé à la protéine immunoprécipitée.....	103
10.2.5.	Analyse par PCR de l'ADN immunoprécipité.....	103
11.	Analyse de la méthylation de l'ADN par MSP (<i>methylation-specific PCR</i>)	105
11.1.	Principe	105
11.2.	Conditions expérimentales	105
11.2.1.	Modalités de traitement.....	105
11.2.2.	Extraction de l'ADN génomique.....	107
11.2.3.	Contrôle de la qualité et quantification de l'ADN	107
11.2.4.	Traitement de l'ADN génomique au bisulfite de sodium	108
12.	Analyse de la méthylation de l'ADN par COBRA (<i>COmbined Bisulfite Restriction Analysis</i>).....	112
12.1.	Principe	112
12.2.	Conditions expérimentales	112
12.2.1.	Modalités de traitement.....	112
12.2.2.	Extraction de l'ADN génomique.....	113
12.2.3.	Contrôle de la qualité et quantification de l'ADN	113
12.2.4.	Traitement de l'ADN génomique au bisulfite de sodium	113
12.2.5.	PCR au niveau de l'élément Inr du promoteur MDR1.....	113
12.2.6.	Purification des produits de PCR	114
12.2.7.	Digestion des amplicons par la <i>TaqI</i>	114
12.2.8.	Migration de l'ADN sur gel d'agarose et quantification de la méthylation...	115
 <i>RESULTATS</i>		116
1.	Rôle(s) de l'acétylation des histones dans la texture chromatinienne.....	117
1.1.	Caractérisation des cellules H69WT et H69VP	117
1.1.1.	Expression du gène <i>MDR1</i>	117
1.1.2.	Analyse de la texture nucléaire	117
1.1.3.	Modifications post-traductionnelles des histones	119
1.2.	Impact(s) de la TSA sur le phénotype cellulaire et nucléaire	121
1.2.1.	Effet de la TSA sur la prolifération cellulaire	121
1.2.2.	Influence de la TSA sur le cycle cellulaire	121
1.2.3.	Modifications post-traductionnelles des histones par la TSA	124

1.2.3.1.	Acétylation des histones.....	124
1.2.3.2.	Méthylation des histones.....	128
1.2.4.	Effet de la TSA sur la texture nucléaire.....	128
1.2.5.	Conclusions.....	133
2.	Régulation épigénétique du gène <i>MDR1</i> dans les cellules H69WT et H69VP.....	134
2.1.	Modulation de l'expression du gène <i>MDR1</i> par la TSA.....	134
2.2.	Modulation de l'expression du gène <i>MDR1</i> par le butyrate de sodium.....	136
2.3.	Rôles des mécanismes transcriptionnels et non transcriptionnels dans l'activité de la TSA sur l'expression du gène <i>MDR1</i>	136
2.3.1.	Rôle de la transcription.....	136
2.3.2.	Analyse de la stabilité de l'ARNm MDR1.....	138
2.3.2.1.	Recherche d'un effet indépendant de la transcription.....	138
2.3.2.2.	Recherche d'un effet dépendant de la transcription.....	140
2.3.3.	Rôle de la synthèse protéique <i>de novo</i> dans la modulation de l'expression du gène <i>MDR1</i>	140
2.3.4.	Modulation de l'expression du gène <i>c-jun</i> par la TSA.....	147
2.4.	Rôle(s) de la chromatine dans l'expression du gène <i>MDR1</i>	149
2.4.1.	Modifications post-traductionnelles des histones au niveau du promoteur MDR1 dans les cellules H69WT et H69VP.....	149
2.4.2.	Influence de la TSA sur les modifications des histones au niveau du promoteur MDR1.....	150
2.4.2.1.	Acétylation des histones H4.....	152
2.4.2.2.	Acétylation des histones H3.....	152
2.4.2.3.	Méthylation des histones H3.....	157
2.4.3.	Relation entre la méthylation de l'ADN et la modulation de l'expression du gène <i>MDR1</i> : effets de la TSA et/ou de la 5-aza-2'-désoxycytidine.....	157
2.4.3.1.	Analyse de la méthylation des boîtes GC-50 et GC-110 du promoteur MDR1.....	157
2.4.3.2.	Analyse de la méthylation de l'élément Inr du promoteur MDR1.....	162
2.4.3.3.	Modulation de l'expression du gène <i>MDR1</i> par la TSA et/ou la 5azadC.....	165
2.4.4.	Effet de la TSA sur la fixation du facteur PCAF au niveau de la boîte Y du promoteur MDR1.....	166
2.4.5.	Conclusions.....	168

<i>DISCUSSION</i>	172
<i>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</i>	193
<i>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</i>	197
<i>LISTE DES FIGURES</i>	xx
<i>LISTE DES TABLEAUX</i>	xxiii
<i>RESUME</i>	xxiv

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier tout d'abord mon directeur de thèse, Monsieur le Professeur Jean DUFER, pour l'aide et le support moral qu'il m'a apportés tout au long de ce travail et pour sa gentillesse remarquable. Je le remercie également de m'avoir fait confiance dans mon approche du sujet. Après avoir fait une thèse sous votre direction, j'ai acquis une grande autonomie qui me permet d'affronter la suite sans aucune crainte.

J'exprime également ma reconnaissance à Monsieur le Professeur Michel MANFAIT de m'avoir accueillie au sein de l'unité MéDIAN et d'avoir toujours été très agréable avec moi.

Je suis très reconnaissante à Monsieur le Docteur Loris G. BAGGETTO qui m'a fait l'honneur d'être dans ce jury en tant que rapporteur, et qui a su juger ce travail avec un regard critique, pertinent, constructif et très encourageant.

J'adresse mes remerciements à Monsieur le Professeur Xavier RONOT pour avoir accepté de juger ce travail en qualité de rapporteur. J'apprécie la rapidité avec laquelle vous avez lu ce manuscrit et l'intérêt que vous y avez porté.

Je tiens à remercier également Madame le Docteur Roselyne GARNOTEL de faire partie de mon jury de thèse. Je suis honorée de savoir que mon travail a été minutieusement examiné par une personne dont les qualités scientifiques et humaines ne sont pas à discuter.

Mes remerciements vont également à Monsieur le Professeur Jacques ROBERT qui a accepté d'examiner mon travail et de faire partie de ce jury.

J'adresse mes sincères remerciements à Monsieur le Docteur Hamid MORJANI, d'avoir non seulement accepté d'examiner ma thèse mais aussi pour ses conseils judicieux, son amabilité, son honnêteté et toute son amitié.

Je suis profondément reconnaissante à Monsieur le Docteur Dennis GOMEZ qui a su m'insuffler sa passion pour la recherche et qui a consacré beaucoup de temps à mon initiation à la biologie moléculaire.

Je ne peux oublier de remercier du fond du cœur Madame le Docteur Christine MILLOT. Je suis très ravie d'avoir connu à Reims une personne aussi humaine, aussi gentille et aussi correcte que vous. Merci de tout l'intérêt que vous m'avez porté, ainsi qu'à ma famille et à mon pays. Je n'aurais jamais pu espérer avoir une « voisine de bureau » aussi agréable que vous. Vous ferez toujours partie de ces personnes que je n'oublierai jamais.

Je remercie également Monsieur le Professeur Jean-Marc MILLOT, qui, outre ses compétences scientifiques qui n'échappent à personne au sein de l'unité MÉDIAN, s'est intéressé à mon travail et s'est toujours montré rassurant et généreux.

Je tiens à remercier sincèrement Monsieur le Professeur Jean-François RIOU qui a su m'apprécier et qui a toujours accepté de m'aider et de me soutenir. Merci d'être si brillant et passionné pour pouvoir transmettre cette maladie contagieuse qu'est la recherche !

Je pense également à Mme le Professeur Chantal TRENTESAUX qui s'est occupée de mes commandes de produits pendant mes deux premières années de thèse. Je vous remercie pour votre sens des relations humaines, votre ouverture d'esprit et votre respect des différences de culture.

Parmi les personnes qui m'ont accueillie les bras ouverts, je ne peux omettre Mme PISANI, une femme si dévouée et tellement gentille que je me sentais même sa propre fille. Les mots ne sauraient exprimer toute ma considération. Permettez-moi de vous dire tout simplement merci.

Mme COUSINAT, votre amabilité, votre disponibilité et votre sourire permanent m'ont beaucoup touchée. Acceptez mes sincères remerciements.

J'adresse mes remerciements à Lydie VENTEO qui, par sa douceur et sa serviabilité, m'a souvent remonté le moral. Merci de m'avoir écoutée et de m'avoir enrichie par tes conseils.

Je n'oublierai pas toute l'aide que Madame Karine BOUILLOT et Monsieur Yves GOURDAIN m'ont apportée. Je vous en remercie.

J'ai eu la chance de connaître des amis formidables à Reims pendant la préparation de cette thèse que je tiens à remercier particulièrement :

A Nadia,

« Sahbi » tu as été plus qu'une amie pour moi...

Merci pour les innombrables et interminables pauses café pendant lesquelles tu te montrais si « généreuse » en me laissant (et je t'en remercie) quelques secondes par-ci et par-là pour placer miraculeusement un ou deux mots.

Merci pour ton humour intelligent et pour ton accent français en lisant l'arabe.

Merci pour ta disponibilité et pour ton sincère soutien.

Merci pour ce que tu es...

A Céline,

Pour « tes origines libanaises cachées », pour ton je-m'en-foutisme exemplaire qui ne saurait masquer ta grande serviabilité, pour ton cœur d'enfant et pour ta passion pour les cigarettes.

A Nicolas, pour ton amitié et ton aide efficace en informatique.

A mes chers compatriotes, Ali et Roland, grâce à qui le Liban me paraissait plus proche et l'éloignement de la patrie moins dur.

Aux « anciens », Salima et Christophe qui ont mis de la bonne humeur au sein du laboratoire et avec qui j'ai lié une amitié sincère.

A Nasséra, pour tes coups de gueule légendaires, pour ta sincérité et ton amitié qui m'est très chère.

A Patrick, pour ta tendresse et tout le soutien que tu m'as apporté. Je te remercie pour tout.

Et pour terminer, je tiens à exprimer des remerciements plus personnels et intimes...

*A papa et maman,
Merci pour tous vos sacrifices et tout votre amour,
Merci d'avoir toujours été là pour moi,
Merci d'avoir cru en moi et d'avoir approuvé mes choix,
Même à des milliers de kilomètres de moi, vous étiez toujours dans mon cœur et plus proches que jamais.
Je vous remercie de m'encourager sans cesse et de m'avoir appris à me battre et à réussir.
Je vous dois tout ce que je suis aujourd'hui et je ne pourrais jamais vous remercier assez...*

*A ma sœur Tatiana,
Pour ta présence, ta sagesse, ton soutien sans pareil et tout ton amour.*

*A ma sœur Eliane,
Pour la magnifique frangine que tu es, pour m'avoir toujours incitée à persévérer et pour ton énorme soutien.*

*A mon frère Rayan,
Pour la personne honnête et engagée que tu es, pour ton sincère encouragement et pour être tout simplement le meilleur frangin au monde.*

*A Gilles,
Tu es pour moi plus qu'un amour, tu es une drogue que je réclame sans cesse, à laquelle je suis intimement dépendante et sans laquelle ma vie n'aurait pas ce même goût de douceur.
Je te remercie pour avoir transformé mon quotidien depuis près de deux ans.
Cette thèse est aussi la tienne, tellement tu y as participé par tes conseils fort judicieux, par toutes les finitions que tu as faites (et Dieu sait qu'elles sont nombreuses !), par ton généreux soutien et par tout le temps que tu m'as fait gagner.
Merci pour tous les moments inoubliables que tu m'as fait partager.
Merci pour avoir apprécié mon pays, pour avoir aimé ma culture, pour avoir adopté et approuvé mes principes, pour m'avoir tout simplement acceptée comme je suis.
Je t'aime...*

LISTE DES ABREVIATIONS

μL	Microlitre
μm	Micromètre
5azaC	5-Azacytidine
5azadC	5-Aza-2'-désoxycytidine
5-FU	5-Fluorouracile
ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
Ac	Anticorps
ac	Forme acétylée
ActD	Actinomycine D
ADNc	ADN complémentaire
ATP	Adénosine triphosphate
AUT-PAGE	<i>Acetic acid-urea-triton-polyacrylamide gel electrophoresis</i>
BCRP	<i>Breast cancer resistance protein</i>
C	Cytosine
C/EBP ^{β}	<i>CAAT enhancer-binding protein</i>
CAF-1	<i>chromatin assembly factor 1</i>
ChIP	<i>Chromatin immunoprecipitation</i>
CHX	Cycloheximide
COBRA	<i>Combined bisulfite restriction analysis</i>
Ct	<i>Threshold cycle</i>
D	acide aspartique
DLS	Distribution des longueurs de sections
DMR	<i>Differentially methylated region</i>
DMSO	Diméthyl sulfoxyde
DNG	Distribution des niveaux de gris
DNMT	<i>DNA methyltransferase</i>
dNTP	désoxynucléotide triphosphate
DO	Densité optique
DOI	Densité optique intégrée
DOM	Densité optique moyenne
DSDO	Déviations standard des densités optiques

DTT	Dithiotreitol
E	Energie ou acide glutamique (selon le contexte)
E(Z)	<i>Enhancer of zeste</i>
EGR1	<i>Early growth response element 1</i>
ENT	Entropie
ET	Ecart-type
ETM	Ecart-type de la moyenne
ex	Exemple
G	Guanine
GNAT	<i>Gcn5 (general control non-derepressible 5)-related acetyltransferase</i>
GSH	Glutathion
h	Heure
H	Histone
H3K9diM	Histone H3 di-méthylée sur la lysine 9
HAT	Histone acétyltransférase
HDAC	Histone désacétylase
HIF-1	<i>Hypoxia-inducible factor-1</i>
HMT	Histone méthyltransférase
HP1	<i>Heterochromatin protein 1</i>
HSE	<i>Heat shock element</i>
I	Inertie
IC ₅₀	Concentration inhibitrice 50
ICS	Importance des courtes sections
ID	Index de déviation
IGR	Région intergénique
ILS	Importance des longues sections
INP	Input
Inr	Initiateur
invMED1	<i>Inverted MED-1 element</i>
IP	Fraction immunoprécipitée
IR	Indice de résistance
IV	Intraveineuse
JNK	<i>c-Jun NH₂-terminal kinase</i>
K	Lysine

kDa	KiloDalton
LRP	<i>Lung resistance-related protein</i>
LSD1	<i>Lysine-specific demethylase 1</i>
MBD	<i>Methyl-binding domain</i>
MCAF1	<i>MBD1-containing chromatin-associated factor 1</i>
MDR	<i>Multidrug resistance</i>
MeCP2	<i>Methyl-CpG-binding protein 2</i>
MEF1	<i>MDR1 promoter-enhancing factor 1</i>
mg	Milligramme
min	Minute
mL	Millilitre
ML	Moyenne locale
MM	Masse molaire
mM	Millimolaire
MRP	<i>MDR-associated protein</i>
MSP	<i>Methylation-specific PCR</i>
MVP	<i>Major vault protein</i>
MXR	<i>Mitoxantrone-resistance protein</i>
NaBut	Butyrate de sodium
NBD	<i>Nucleotide (ATP)-binding domain</i>
NF-IL6	<i>Nuclear factor-interleukin-6</i>
nm	Nanomètre
nM	Nanomolaire
pb	Paire de bases
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PC	Polycomb
PCAF	<i>p300/CBP associated-factor</i>
PcG	<i>Polycomb group</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
P-gp	Glycoprotéine P
PLS	Pourcentage des longueurs de sections
PRC	<i>Polycomb repressive complex</i>
PRMT	<i>Protein arginine methyltransferase</i>
PVDF	<i>Polyvinylidene difluoride</i>

Q	Glutamine
R	Arginine
RH	<i>Random Hexadeoxynucleotide</i>
RHA	ARN hélicase A
RT-PCR	<i>Reverse-Transcription-Polymerase Chain Reaction</i>
s	Seconde
S	Sérine
SAGA	<i>Spt-Ada-Gcn5-acetyltransferase</i>
SAHA	<i>Suberoylanilide hydroxamic acid</i>
SAM	S-adénosylméthionine
SDS-PAGE	<i>SDS-polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SET	<i>Su(var)3-9, Enhancer of Zeste, Trithorax</i>
Sin3	<i>Switch insensitive 3</i>
SIRT	Sirtuines
Sp1	<i>Specificity protein 1</i>
SUMO	<i>Small ubiquitin-related modifier</i>
TAF	<i>TBP-associated factor</i>
TAFII250	<i>TATA-box binding protein associated-factor</i>
TBP	<i>TATA box binding protein</i>
TCF	<i>T-cell factor</i>
TMD	<i>Transmembrane domain</i>
TSA	Trichostatine A
u.a.	Unité arbitraire
UV	Ultraviolets
VP-16	Etoposide
vs	Versus
WT-1	<i>Wilm's tumor suppressor 1</i>
YB-1	<i>Y-box binding protein 1</i>

Les opinions exprimées dans cette thèse n'engagent que son auteur et en aucun cas la faculté de pharmacie de Reims.

Ce travail a été financé par l'Association Régionale pour l'Enseignement Supérieur et la Recherche Scientifique et technologique en Champagne-Ardenne (ARERS) et a fait l'objet des publications et des principales communications scientifiques suivantes :

Publications

EL KHOURY V, BREUZARD G, FOURRE N, DUFER J.

The histone deacetylase inhibitor, trichostatin A, down-regulates human *MDR1* gene expression by a transcription-dependent mechanism in a resistant small cell lung carcinoma cell line model.

Soumis à Mol Cancer Ther.

EL KHOURY V, GOMEZ D, LIAUTAUD-ROGER F, TRUSSARDI-REGNIER, DUFER J.

Effects of the histone deacetylase inhibitor trichostatin A on nuclear texture and c-jun gene expression in drug-sensitive and drug-resistant human H69 lung carcinoma cells.

Cytometry A. 2004; 62 (2): 109-117.

Principales communications

EL KHOURY V, GOMEZ D, LIAUTAUD-ROGER F, DUFER J.

Modulation de la texture nucléaire de cellules de carcinome pulmonaire résistantes à la chimiothérapie. Corrélations avec l'expression génique et l'acétylation des histones.

Présentation d'un poster à la première édition des « Journées de Recherche Respiratoire » (14-15 octobre 2005) à Reims.

EL KHOURY V, GOMEZ D, TRENTESAUX C, LIAUTAUD-ROGER F, DUFER J.

Histone acetylation at the *mdr1* gene promoter level in human drug-sensitive and -resistant lung carcinoma cells. Correlation with nuclear texture and gene expression.

Présentation orale au "26th meeting of the European Study Group for Cell Proliferation (E.S.G.C.P.)" (13-16 mai 2004) à Prague.

EL KHOURY V, GOMEZ D, TRENTESAUX C, LIAUTAUD-ROGER F, DUFER J.

Etudes des mécanismes épigénétiques liés à l'expression du gène *MDR1* dans des cellules de carcinome pulmonaire à petites cellules

Présentation orale au « Congrès International de Biochimie- Forum des Jeunes Chercheurs » (3-6 mai 2004) à Marrakech.

EL KHOURY V, GOMEZ D, TRUSSARDI-REGNIER A, LIAUTAUD-ROGER F, DUFER J.

Nuclear texture changes and c-jun expression induced by the histone deacetylase inhibitor trichostatin A in drug-sensitive and -resistant human H69 lung carcinoma cells.

Présentation d'un poster au congrès "Chromatin structure and gene expression mechanisms as therapeutic targets" (28-31 janvier 2004) à Kirchberg – Luxembourg.

EL KHOURY V, TRUSSARDI-REGNIER A, YATOUJI S, LIAUTAUD-ROGER F, TRENTESAUX C, DUFER J

Differential modulation of *MDR1* and *MRP1* genes expression by trichostatin A in human lung carcinoma cells.

Présentation d'un poster au "25th meeting of the European Study Group for Cell Proliferation (E.S.G.C.P.)" (24-27 octobre 2002) à Reims.

« La connaissance s'acquiert par l'expérience, tout le reste n'est que de l'information. »

Albert EINSTEIN (1879-1955)

***INTRODUCTION
GENERALE***

Depuis près de quarante ans, de nombreux efforts ont été faits pour réduire la mortalité due aux cancers de tous types. La thérapeutique anticancéreuse, qui s'est affinée au cours des années, associe la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie. Les progrès de la chimiothérapie ont permis d'améliorer significativement la survie des patients souffrant de cancer. Néanmoins, l'émergence de formes de résistance aux agents antimétaboliques limite souvent leur efficacité.

La résistance pléiotropique, appelée également *multidrug resistance* (MDR), concerne un nombre important de cellules tumorales qui acquièrent une résistance croisée vis-à-vis de nombreux médicaments anticancéreux de nature et de cibles multiples. Parmi les mécanismes à l'origine du phénotype MDR, la glycoprotéine P (P-gp), une protéine membranaire codée par le gène *MDR1* chez l'homme, y joue un rôle important (Juliano *et al.*, 1976). Son rôle dans le phénomène MDR comme pompe favorisant l'efflux des médicaments est l'un des mécanismes les mieux caractérisés de la résistance pléiotropique. En clinique, sa surexpression a été détectée lors du diagnostic de multiples cancers ainsi que lors de rechute (Krishna *et al.*, 2000 ; Litman *et al.*, 2001).

L'évolution des cancers permet de distinguer d'une part, une expression intrinsèque de la P-gp dans des tumeurs constituées de cellules d'emblée résistantes au traitement, et d'autre part, une expression acquise de cette protéine à la suite de la chimiothérapie. Trois principaux modèles de mécanismes ont été proposés pour expliquer la surexpression de la P-gp après traitement par des anticancéreux (Baker *et al.*, 2005) :

- La sélection thérapeutique et l'expansion d'une population cellulaire mutante P-gp⁺ parmi une population sensible P-gp⁻.
- L'activation directe du gène *MDR1* par les agents antimétaboliques.
- L'augmentation de la stabilité de l'ARNm MDR1.

Différentes études réalisées *in vitro* sur des lignées cellulaires et *in vivo* chez des patients traités démontrent que le gène *MDR1* est rapidement surexprimé après exposition aux agents anticancéreux (Abolhoda *et al.*, 1999 ; Hu *et al.*, 1999), résultat concordant avec le modèle d'activation évoqué ci-dessus. Toutefois, les mécanismes moléculaires responsables de l'activation du gène *MDR1* restent mal définis.

Cinquante ans après la découverte de l'ADN, la biologie est entrée dans une nouvelle ère post-génomique, dite aussi de l'épigénétique. Le terme épigénétique définit les modifications transmissibles et réversibles de l'expression des gènes, qui ne s'accompagnent pas de changements des séquences d'ADN. Ces modifications regroupent essentiellement les modifications post-traductionnelles des histones (acétylation, méthylation...) et la méthylation de l'ADN. Le processus épigénétique le plus répandu et le plus étudié actuellement correspond à des changements de configuration chromatinienne qui modulent l'accès à l'ADN des facteurs de transcription. Dans ce cadre, il a été récemment montré que l'accessibilité de la chromatine joue un rôle majeur dans l'expression constitutive du gène *MDR1* ainsi que dans sa transcription en réponse à différents agents (trichostatine A, butyrate de sodium, doxorubicine...) (Baker *et al.*, 2004).

Dans la mesure où les modifications épigénétiques remanient la structure chromatinienne, leur impact sur la texture nucléaire pourrait refléter des changements précoces du fonctionnement cellulaire, et peut-être de l'expression des gènes de résistance. La littérature ne recense pas d'étude traitant du rôle de mécanismes épigénétiques dans le phénotype nucléaire des cellules sensibles et résistantes à la chimiothérapie. Les mesures des différents paramètres de texture nucléaire sont des éléments importants de diagnostic qui, entre autres, ont permis de classer les cellules en catégories (normales ou cancéreuses par exemple) ou selon leur stade dans la progression tumorale. En outre, la texture de la chromatine a permis la détection rapide de changements cellulaires subtils et précoces dus à des agents toxiques (Bartels *et al.*, 1998). Souvent, de tels phénomènes ne peuvent être identifiés par microscopie optique classique. Si l'on réussit à établir une « signature nucléaire » en fonction de l'expression du gène *MDR1*, l'étude de la texture nucléaire pourrait permettre des avancées cliniques importantes en termes de dépistage précoce de la résistance pendant la chimiothérapie et de suivi de patients présentant des tumeurs multi-résistantes. Ceci permettrait une meilleure adaptation du protocole thérapeutique en fonction du profil nucléaire de chaque individu.

Ainsi, la première partie de ce travail consistera en l'analyse de la texture nucléaire de cellules de carcinome pulmonaire à petites cellules sensibles H69WT et résistantes à la chimiothérapie H69VP exprimant le gène *MDR1*, en vue d'une détection de modifications phénotypiques associées à la résistance. L'influence de l'acétylation des histones sur la texture nucléaire sera ensuite examinée en présence de trichostatine A, un inhibiteur des histones désacétylases.

Dans le but de mieux comprendre les régulations épigénétiques de ce gène de résistance, nous analyserons les effets de molécules inhibant les histones désacétylases ou les ADN méthyltransférases sur l'expression du gène *MDR1*. Cette étude mettra en avant les différences de réponses entre les cellules sensibles H69WT et résistantes H69VP. Nous déterminerons certains des mécanismes par lesquels des agents épimutagènes, c'est-à-dire des agents susceptibles de modifier le profil épigénétique, modulent l'expression de ce gène. Pour ce faire, nous rechercherons en premier lieu le niveau d'action de la trichostatine A et son effet sur la stabilité de l'ARNm *MDR1*. Ensuite nous analyserons les modifications post-traductionnelles des histones et les variations de méthylation de l'ADN survenant au niveau du promoteur *MDR1* en présence de trichostatine A et/ou de 5-aza-2'-désoxycytidine, un agent déméthylant de l'ADN.

***ASPECT
BIBLIOGRAPHIQUE***

1. Mécanismes de résistance aux anticancéreux

L'échec de la chimiothérapie dans le traitement du cancer résulte souvent de la résistance de celui-ci aux agents antinéoplasiques. Cette résistance peut être intrinsèque ou acquise pendant le traitement de certaines tumeurs initialement sensibles aux antimétabolites. Dans la majorité des cas, la résistance s'établit non seulement envers les médicaments responsables de son apparition mais se manifeste vis-à-vis de plusieurs classes d'anticancéreux de structures chimiques et de modes d'action différents (Gottesman, 2002 ; Longley *et al.*, 2005). Cette résistance pléiotropique est souvent désignée par le terme MDR (*multidrug resistance*). Quelle soit intrinsèque ou acquise, la résistance aux anticancéreux serait responsable de l'échec thérapeutique chez plus de 90% des patients présentant des cancers métastatiques (Longley *et al.*, 2005). Si la résistance aux anticancéreux est surmontée, l'impact sur la survie des patients sera significativement important.

Plusieurs facteurs peuvent affecter la sensibilité de la tumeur aux médicaments et ce, par des mécanismes spécifiques des cellules cancéreuses (mécanismes cellulaires) ou liés au micro-environnement de la tumeur (mécanismes non cellulaires).

1.1. Mécanismes non cellulaires de la résistance

Ce type de résistance survient pendant la croissance *in vivo* de la tumeur. C'est un phénomène typiquement associé aux tumeurs solides dont les propriétés physiologiques diffèrent des tumeurs circulantes telles que les cancers hématologiques. En particulier, la structure tridimensionnelle ainsi que l'environnement extracellulaire d'une tumeur solide (augmentation de la pression interstitielle) induisent sa faible vascularisation et protègent ainsi les cellules tumorales de l'effet cytotoxique des médicaments en diminuant leur accès au sein de la tumeur.

De plus, la déficience de certaines zones tumorales en nutriments et en oxygène peut conférer à la lésion maligne une résistance de mécanisme non cellulaire. En effet, le tissu normal possède une vascularisation relativement homogène qui permet une bonne oxygénation des cellules ; la vascularisation tumorale est tortueuse, présente des ruptures de la paroi vasculaire et une circulation sanguine irrégulière, créant ainsi des régions en hypoxie. Dans ces conditions, la quantité de cellules quiescentes augmente dans les régions faiblement vascularisées. Ces cellules sont souvent viables mais ne prolifèrent pas ; par conséquent elles sont résistantes aux agents cytotoxiques cycle-dépendants donc à la plupart des anticancéreux.

En outre, la formation d'acide lactique par les cellules cancéreuses en état d'hypoxie acidifie l'environnement tumoral et confère ainsi une résistance aux bases faibles (Krishna *et al.*, 2000 ; Leonessa *et al.*, 2003).

1.2. Mécanismes cellulaires de la résistance

Les mécanismes cellulaires sont appelés ainsi du fait qu'ils décrivent des altérations de la biochimie des cellules cancéreuses elles-mêmes. Cette résistance peut survenir à différents niveaux (figure 1):

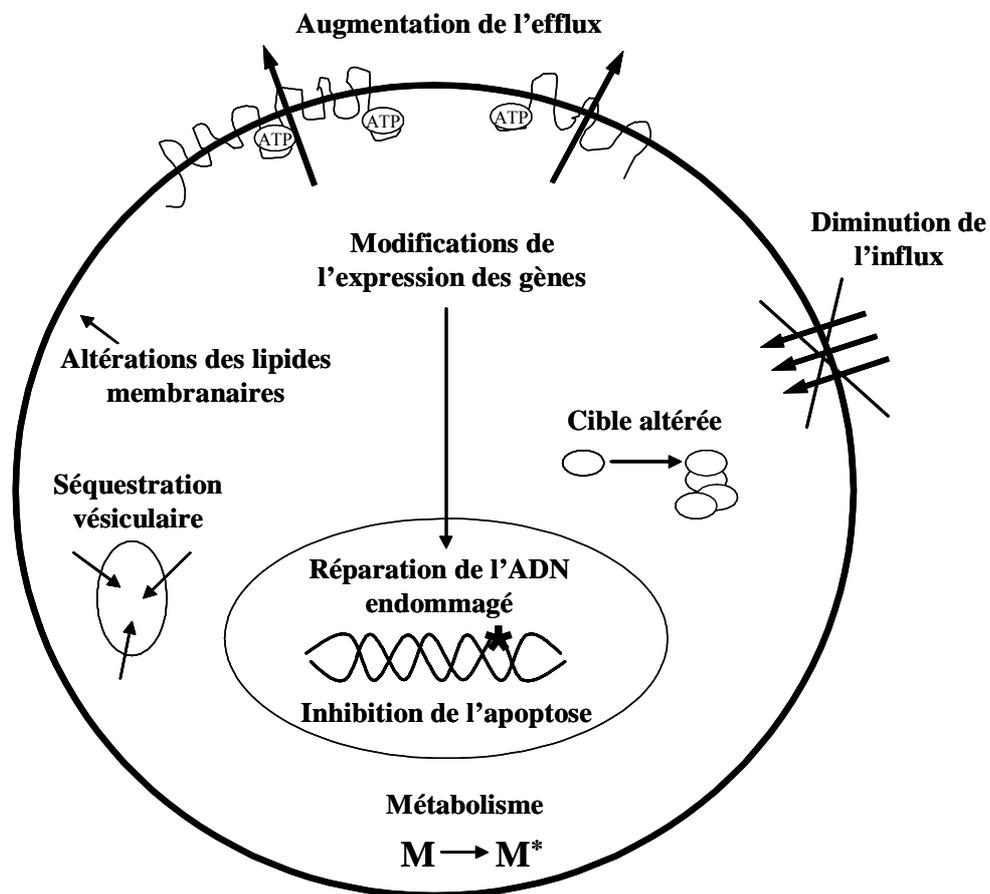


Figure 1. Représentation des principaux mécanismes cellulaires de la résistance.

1.2.1. Augmentation de l'efflux du médicament

Le médicament est transporté hors de la cellule par des protéines membres de la famille des transporteurs ABC (*ATP-binding cassette*), telles que la P-gp, la MRP1 et la BCRP (Litman *et al.*, 2001).

1.2.2. Diminution de l'influx du médicament

Les anti-folates (ex. méthotrexate) utilisent des transporteurs spécifiques (RFC, *reduced folate carrier*) pour pénétrer dans la cellule. La diminution de l'expression ou de l'activité de ces transporteurs peut entraîner une résistance aux anti-folates (Gottesman, 2002 ; Longley *et al.*, 2005).

1.2.3. Inactivation de l'agent thérapeutique

Les mécanismes qui inactivent les médicaments peuvent diminuer la quantité de molécules thérapeutiques libres pouvant se fixer sur leur cible intracellulaire. Ainsi, le 5-fluorouracile (5-FU) est transformé en un métabolite inactif par une dihydropyrimidine déshydrogénase (DPD) hépatique. La surexpression de cette enzyme peut conférer une résistance cellulaire au 5-FU (Takebe *et al.*, 2001).

1.2.4. Séquestration vésiculaire du médicament

L'expression de la principale protéine « vault » (MVP, *major vault protein*), appelée aussi LRP (*lung resistance-related protein*) a été impliquée dans la résistance MDR. La plupart des protéines vaults se retrouvent dans le cytoplasme mais une petite portion est localisée au niveau de la membrane nucléaire et des complexes des pores nucléaires. Les vaults pourraient médier le transport bidirectionnel de différents substrats entre le noyau et le cytoplasme. La MVP semble impliquée dans le transport nucléocytoplasmique des médicaments en les séquestrant au sein de vésicules. Ainsi la séquestration vésiculaire réduit la concentration du cytotoxique en contact avec sa cible sans affecter sa concentration cellulaire globale (Dalton *et al.*, 1999 ; Lehnert, 1996).

1.2.5. Altérations de la cible du cytotoxique

Des altérations quantitatives (taux d'expression) ou qualitatives (mutations) de la cible du médicament peuvent avoir un impact majeur sur la sensibilité de la cellule à l'agent anticancéreux. Ainsi, le fluorodésoxyuridine monophosphate (FdUMP), métabolite du 5-FU, est un puissant inhibiteur de la thymidylate synthétase, enzyme essentielle à la synthèse de l'ADN. Dans la mesure où l'inhibition de cette enzyme semble le mécanisme d'action principal du 5-FU, son expression est un déterminant majeur de la sensibilité cellulaire à cet antimétabolite (Longley *et al.*, 2003).

1.2.6. Réparation des dommages de l'ADN

La capacité de la cellule cancéreuse à réparer l'ADN peut déterminer sa résistance aux cytotoxiques qui induisent des dommages de l'ADN par voie directe (ex. dérivés du platine) ou indirecte (ex. inhibiteurs des topoisomérases I et II) (Longley *et al.*, 2005).

1.2.7. Incapacité des cellules traitées à entrer en apoptose

La surexpression de protéines anti-apoptotiques (ex. Bcl-2) et l'inactivation ou la mutation de gènes pro-apoptotiques (ex. *TP53*) diminuent l'entrée des cellules en apoptose et favorisent le développement de la tumeur (Longley *et al.*, 2005 ; Szakacs *et al.*, 2006).

De plus, les lipides membranaires altérés peuvent participer à l'établissement de la résistance MDR : le céramide est un second messenger impliqué dans la transmission des signaux apoptotiques. Plusieurs agents induisent une accumulation de céramide cellulaire, notamment les cytokines (TNF α et Fas), le stress environnemental (chaleur et hypoxie) et la plupart des anticancéreux. La production de céramide résulte d'une augmentation de sa synthèse *de novo* ou de l'hydrolyse de la sphingomyéline par les sphingomyélinases. La diminution des concentrations cellulaires en céramide, essentiellement par sa conversion en glycosylcéramide, permet à certaines lignées résistantes d'échapper à l'apoptose (Liu *et al.*, 2001 ; Modrak *et al.*, 2006 ; Prinetti *et al.*, 2006).

2. Famille des transporteurs ABC et résistance MDR

Parmi les mécanismes cellulaires cités ci-dessus, l'augmentation de l'efflux d'un grand nombre d'agents cytotoxiques reste le mécanisme de résistance le plus souvent rencontré lors d'études expérimentales. Cet efflux est médié par une famille de transporteurs ATP-dépendants connus sous le nom de transporteurs ABC (*ATP-binding cassette*). Ces protéines fixent l'ATP (adénosine triphosphate) et utilisent l'énergie libérée par son hydrolyse pour transporter non seulement des médicaments mais aussi des nutriments et autres molécules biologiquement importantes à travers toutes les membranes cellulaires (Dean *et al.*, 2001 ; Gottesman, 2002). L'unité fonctionnelle d'un transporteur ABC contient deux domaines transmembranaires (TMD, *transmembrane domain*) et deux domaines de fixation à l'ATP [NBD, *nucleotide (ATP)-binding domain*]. Les transporteurs tels que la BCRP (*breast cancer resistance protein*) appelée aussi MXR (*mitoxantrone-resistance protein*) ou ABCG2, qui ne contiennent qu'un seul domaine TMD lié à un unique domaine NBD, forment des dimères afin de générer un transporteur « entier » (Ozvegy *et al.*, 2001) (figure 2).

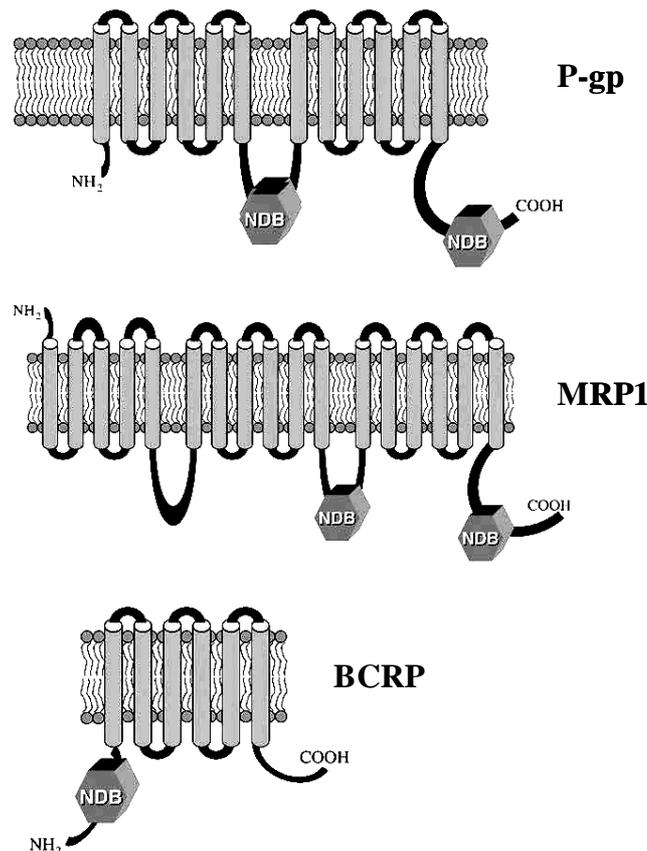


Figure 2. Structures des principaux transporteurs ABC (Scotto, 2003).

Chez l'homme, on dénombre 48 transporteurs ABC répartis en 7 sous-familles désignées par les lettres A à G. Leur distribution tissulaire rend compte de leur importance dans la détoxification de l'organisme. En effet, ils sont exprimés au niveau de certaines barrières pharmacologiques importantes notamment au niveau de la bordure en brosse des intestins, des canalicules biliaires, des tubes proximaux du rein et de la barrière hématoencéphalique. Les données actuelles indiquent qu'au moins 12 transporteurs ABC appartenant à trois sous-familles différentes jouent un rôle dans la résistance des cellules cancéreuses en culture (Szakacs *et al.*, 2006).

2.1. Sous-famille ABCB

La plupart des cellules résistantes surexpriment une protéine de 1280 acides aminés (~170 kDa) alors qu'elle n'est pas ou est faiblement exprimée dans leurs homologues sensibles. Cette protéine a été appelée glycoprotéine P (P-gp ou ABCB1), parce qu'elle semble affecter la perméabilité (P) de la membrane plasmique aux agents cytotoxiques (Loo *et al.*, 2005) (figure 2). C'est une pompe à efflux, produite par le gène *MDR1* chez l'homme (Ueda *et al.*, 1986) et appartenant à la sous-famille ABCB. Elle représente le mécanisme majeur de résistance MDR des cellules en culture et, de ce fait, est le transporteur ABC le mieux caractérisé (Gottesman, 2002).

La P-gp comporte deux domaines transmembranaires, constitué chacun de 6 segments dont plusieurs sont impliqués dans la reconnaissance et la fixation des substrats qui sont ensuite transportés hors de la cellule (Ambudkar *et al.*, 2003 ; Loo *et al.*, 2005). Les substrats de la P-gp sont des substances médicamenteuses hydrophobes neutres ou chargées positivement, d'origine naturelle ; leur nature amphipathique leur permet de pénétrer dans la cellule par diffusion passive (Ambudkar *et al.*, 2003). Ces médicaments incluent plusieurs agents anticancéreux tels que les anthracyclines (ex. doxorubicine et daunorubicine), les taxanes (ex. paclitaxel), les alcaloïdes de la pervenche (ex. vinblastine et vincristine) et les inhibiteurs de la topoisomérase II (ex. étoposide), mais aussi d'autres agents pharmaceutiques comme certains antiarythmiques, des antihistaminiques, des statines hypocholestérolémiantes et des inhibiteurs de la protéase du VIH (virus de l'immunodéficience humaine) (Gottesman, 2002 ; Litman *et al.*, 2001 ; Longley *et al.*, 2005). La fixation de ces médicaments résulte en l'activation de l'un des deux domaines NBD ; l'hydrolyse de l'ATP modifie la configuration de la P-gp permettant l'expulsion du médicament dans le milieu extracellulaire. L'hydrolyse

de la seconde molécule d'ATP est nécessaire pour restaurer le transporteur dans son état originel afin qu'il retrouve sa fonctionnalité (Gottesman, 2002).

La P-gp est fortement exprimée dans plusieurs types de cancers humains, tels que les cancers du tractus gastro-intestinal (cancers de l'intestin grêle, du côlon, du foie et du pancréas), les cancers du système hématopoïétique (myélomes, lymphomes, leucémies), les cancers du système génito-urinaire (cancers du rein, de l'ovaire et du testicule) et autres types de cancers (neuroblastome, fibrosarcome, cancers du poumon...) (Goldstein *et al.*, 1989 ; Gottesman, 2002).

Deux autres protéines de la sous-famille ABCB, exprimées normalement au niveau du foie, semblent impliquées dans la résistance aux anticancéreux ; il s'agit d'un transporteur de sels biliaires, la protéine ABCB11 appelée aussi SPGP (*sister of P-gp*) et d'une flippase transloquant la phosphatidylcholine, la protéine ABCB4 appelée aussi MDR2 ou MDR3 (Szakacs *et al.*, 2006). Les études concernant ces deux transporteurs ne sont que préliminaires ; toutefois, il a été montré que les cellules transfectées avec ABCB11 acquièrent une résistance au paclitaxel (Childs *et al.*, 1998), alors que ABCB4 transporte certains substrats de la P-gp tels que la digoxine, le paclitaxel et la vinblastine (Smith *et al.*, 2000).

2.2. Sous-famille ABCC

Les protéines de cette famille (les MRPs, *MDR-associated proteins*) transportent préférentiellement des anions organiques et des composés provenant des réactions de phase II du métabolisme (réactions de conjugaison) (Dean *et al.*, 2001 ; Deeley *et al.*, 2006). En plus des deux domaines NBD et des deux domaines TMD, les MRPs sont composés de structures supplémentaires ; les protéines ABCC1, ABCC2, ABCC3, ABCC6 et ABCC10 contiennent une région amine terminale transmembranaire connectée à la structure cœur par un domaine de liaison cytoplasmique. Les quatre membres restants (ABCC4, ABCC5, ABCC11 et ABCC12) ne possèdent pas de domaine TMD N-terminal mais présentent le domaine de liaison cytoplasmique qui caractérise cette sous-famille.

La protéine ABCC1 (ou MRP1) a été identifiée dans des cellules H69AR résistantes à la doxorubicine provenant d'un carcinome pulmonaire à petites cellules (Cole *et al.*, 1992) (figure 2). L'expression de cette protéine est étendue à plusieurs tissus, tumeurs cliniques et lignées cellulaires cancéreuses (Szakacs *et al.*, 2006).

La MRP1 confère une résistance à plusieurs composés hydrophobes substrats de la P-gp mais transporte aussi des xénobiotiques (médicaments) conjugués au glutathion (GSH) et au glucuronide ainsi que certains métabolites naturels conjugués ou non aux GSH, glucuronide et sulfate (Deeley *et al.*, 2006). Certains homologues de la MRP1 semblent impliqués dans la résistance aux anticancéreux. Il s'agit des protéines ABCC2 (MRP2), ABCC3 (MRP3), ABCC6 (MRP6) et ABCC10 (MRP7) dont les études commencent à révéler leurs rôles dans le transport des anticancéreux (Gottesman, 2002 ; Szakacs *et al.*, 2006).

2.3. Sous-famille ABCG

La protéine ABCG2 (appelée aussi MXR, BCRP ou ABC-P) a été identifiée comme un transporteur de médicaments conférant une résistance aux anthracyclines et à la mitoxantrone (Allikmets *et al.*, 1998 ; Doyle *et al.*, 1998) (figure 2). Certains anticancéreux récemment développés, tels que le SN-38, métabolite actif de l'irinotécan et dérivé de la camptothécine (Kawabata *et al.*, 2001), ainsi que des inhibiteurs de la tyrosine kinase (Ozvegy-Laczka *et al.*, 2005) semblent eux aussi substrats de la BCRP. L'ABCG2 ne contenant qu'un domaine TMD et une seule cassette liant l'ATP, elle fonctionne comme un homodimère. Elle est surtout exprimée au niveau du placenta, de l'intestin, du sein, du foie et de certaines cellules souches hématopoïétiques (Gottesman, 2002).

3. Approches thérapeutiques pour contrecarrer la résistance P-gp dépendante

La P-gp joue un rôle significatif dans la résistance MDR rencontrée en clinique. En effet, ses taux d'expression dans plusieurs tumeurs différentes sont suffisants pour conférer aux cellules cancéreuses une résistance pléiotropique (Gottesman, 2002).

De nombreux efforts ont été déployés afin de pallier à la résistance MDR médiée par la surexpression de la P-gp chez des patients cancéreux. Différentes approches ont été envisagées et testées, comme l'utilisation d'inhibiteurs de la P-gp de première, deuxième et troisième générations, l'administration de peptides à haute affinité pour la P-gp et d'anticorps dirigés contre ce transporteur, le développement d'agents anticancéreux court-circuitant l'efflux par la P-gp et la diminution de l'expression du gène *MDR1*.

3.1. Inhibiteurs de la P-gp de première génération

Les premiers essais cliniques ont été menés avec des modulateurs de la P-gp déjà homologués pour d'autres indications thérapeutiques. Cette première génération d'inhibiteurs comporte, entre autres, des inhibiteurs calciques (ex. vérapamil, nifédipine et dextiguldipine), des antagonistes de la calmoduline (ex. trifluopérazine et chlorpromazine), des antipaludiques (ex. la quinine), des antiarythmiques (ex. la quinidine et l'amiodarone) et un immunosuppresseur, la cyclosporine A (Sharom, 1997). En général ces composés se sont révélés inefficaces ou toxiques aux doses requises pour atténuer l'activité de la P-gp (Krishna *et al.*, 2000 ; Szakacs *et al.*, 2006). Toutefois, un essai clinique de phase III a montré l'intérêt de combiner la cyclosporine A à la cytarabine et à la daunorubicine dans le traitement de certains patients atteints de leucémies myéloïdes aiguës (List *et al.*, 2001). De même, la quinine a permis l'augmentation du taux de rémission et de la survie de patients qui suivent une chimiothérapie intensive contre des syndromes myélodysplasiques où une expression de la P-gp a été mise en évidence (Wattel *et al.*, 1999).

3.2. Inhibiteurs de la P-gp de deuxième génération

Comparés aux inhibiteurs de première génération, les inhibiteurs de la P-gp de deuxième génération sont plus efficaces et moins toxiques. Dans cette catégorie nous retrouvons le dexvérapamil (énantiomère R du vérapamil) et le PSC-833 (Valspodar[®]), analogue de la cyclosporine D, qui antagonisent l'activité de la P-gp sans présenter, respectivement, des effets bloquant les canaux calciques ni des propriétés immunosuppressives (Szakacs *et al.*, 2006). Bien que les inhibiteurs de deuxième génération soient moins toxiques que ceux de la première génération, ils influencent néanmoins les paramètres pharmacocinétiques des antinéoplasiques lorsqu'ils sont administrés en même temps que les agents anticancéreux. Ils augmentent ainsi leur concentration plasmatique au delà du seuil de toxicité. La diminution des doses des anticancéreux est donc de rigueur mais reste néanmoins empirique. Les interactions pharmacocinétiques étant généralement imprévisibles, certains patients se retrouvent alors « sous-dosés » alors que d'autres sont en état de surdosage médicamenteux (Krishna *et al.*, 2000 ; Szakacs *et al.*, 2006).

3.3. Inhibiteurs de la P-gp de troisième génération

Les inhibiteurs de troisième génération ont été conçus pour avoir une très grande affinité pour la P-gp tout en générant de faibles interactions pharmacocinétiques (Szakacs *et al.*, 2006). En effet, l'inhibition du cytochrome P450 3A a été évitée avec les inhibiteurs de la troisième génération qui comprennent, entre autres, le laniquidar (R101933), le zosuquidar (LY335979), l'élacridar (GF-120918), le tariquidar (XR9576) et l'oc144-093 (ONT-093) (Gottesman, 2002 ; Krishna *et al.*, 2000 ; Szakacs *et al.*, 2006). Certains de ces modulateurs agissent sur plusieurs transporteurs ABC ; tel est le cas du biricodar (VX-710) et de l'élacridar (GF-120918) qui se fixent aussi bien sur la P-gp que sur la MRP1 et la BCRP, respectivement (Krishna *et al.*, 2000 ; Szakacs *et al.*, 2006). Les résultats des essais cliniques de phase III devraient déterminer si l'inhibition de la P-gp par ces modulateurs améliore le taux de survie des patients traités par les anticancéreux.

3.4. Peptides inhibiteurs de la P-gp

La résistance P-gp-dépendante peut être inhibée par des peptides hydrophobes dotés d'une très grande affinité pour la P-gp. Parmi ces peptides nous pouvons citer, à titre d'exemple, les « réversines » R121 et R205 (Sharom *et al.*, 1999). D'autres peptides correspondant à des segments transmembranaires de la P-gp agissent comme des inhibiteurs puissants et spécifiques de la P-gp, probablement en interférant avec l'assemblage ou la fonction de ce transporteur (Tarasova *et al.*, 2005).

3.5. Anticorps dirigés contre la P-gp

Un anticorps monoclonal de souris (UIC2) reconnaissant un épitope externe de la P-gp s'est avéré efficace dans l'inhibition de l'efflux des médicaments substrats de cette protéine (Mechetner *et al.*, 1992). De même, l'immunisation des souris avec des séquences externes de la P-gp génère des anticorps capables de renverser le phénotype MDR *in vitro* et *in vivo*, sans engendrer de réaction autoimmune (Pawlak-Roblin *et al.*, 2004).

Par ailleurs, les anticorps anti-P-gp ont été utilisés avec succès pour détruire les cellules exprimant ce transporteur ABC, par cytotoxicité dépendante des anticorps (ADCC, *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*) (Heike *et al.*, 1990), par la liaison de l'anticorps à la toxine de *Pseudomonas* (FitzGerald *et al.*, 1987) ou par sa conjugaison à un vecteur lentiviral (Morizono *et al.*, 2005).

3.6. Synthèse d'anticancéreux échappant à l'efflux médié par la P-gp

Plusieurs nouvelles molécules anticancéreuses, notamment l'irinotécan et son métabolite le SN-38, le depsipeptide, l'imatinib (Gleevec[®]) et le flavopiridol sont transportées dans le milieu extracellulaire par la P-gp. D'autres agents, tels les épothilones, sont de nouvelles drogues anticancéreuses dont le mécanisme d'action est semblable à celui des taxanes : elles se fixent sur les microtubules et les stabilisent. Toutefois, les épothilones ne sont pas substrats de la P-gp (Szakacs *et al.*, 2006).

Comme la plupart des antinéoplasiques sont actuellement irremplaçables, des approches seraient envisagées afin de réussir à modifier chimiquement leur susceptibilité d'être transportés tout en gardant leur activité antinéoplasique (Szakacs *et al.*, 2006).

Par ailleurs, certaines études ont réussi à contourner la résistance P-gp-dépendante en augmentant l'incorporation des médicaments à l'intérieur de la cellule, et ce, par amélioration de leur lipophilité (Lampidis *et al.*, 1997) ou par leur encapsulation dans des liposomes (Vail *et al.*, 2004).

3.7. Diminution de l'expression du gène MDR1

Bien que la résistance MDR des lignées cellulaires résulte le plus souvent d'une amplification du gène *MDR1*, la surexpression de la P-gp peut aussi avoir une origine transcriptionnelle. La régulation de l'expression de la P-gp est très complexe et impliquerait des mécanismes distincts dans les tissus sains et les cellules cancéreuses (Scotto, 2003).

A l'aide de bibliothèques combinatoires de peptides, des répresseurs transcriptionnels se fixant sélectivement sur le promoteur MDR1 ont été découverts, et leur expression dans des cellules cancéreuses résistantes a permis de réduire les taux de la P-gp et d'augmenter significativement leur chimiosensibilité (Bartsevich *et al.*, 2000).

Par ailleurs, des approches thérapeutiques fondées sur l'utilisation d'ARN inhibiteurs, notamment des oligonucléotides anti-sens, des ribozymes *hammerhead* et de petits ARN interférents (siRNA), a permis d'inactiver spécifiquement l'ARNm MDR1. Bien que les résultats expérimentaux soient, dans la majorité des cas, satisfaisants, l'obtention d'une inhibition optimale de l'expression de la P-gp s'est révélée difficile et l'innocuité de l'administration *in vivo* de ces constructions d'ARN reste à prouver (Fojo *et al.*, 2003 ; Pichler *et al.*, 2005 ; Xu *et al.*, 2004).

La répression transcriptionnelle demeure, néanmoins, une nouvelle stratégie très prometteuse qui, non seulement serait hautement spécifique, mais aussi permettrait de prévenir l'expression de la P-gp durant la progression du cancer.

4. Régulation transcriptionnelle du gène *MDR1*

La découverte de nombreuses séquences du promoteur *MDR1* et des facteurs de transcription qui y sont liés rend compte de la complexité de la régulation de ce gène de résistance et de leur implication dans la conversion des cellules P-gp négatives en cellules P-gp positives. Toutefois, l'accès de ces facteurs à leurs sites de liaison est essentiellement dépendant de la chromatine. Celle-ci est une structure dynamique qui peut modifier l'architecture nucléosomique, pour « ouvrir » ou « fermer » l'accès des facteurs en *cis* sur leurs régions en *trans*.

Il faut, néanmoins, signaler que la transcription du gène *MDR1* peut être aussi affectée par certaines altérations génomiques telles que des translocations ou des délétions. Bien que l'amplification du gène *MDR1* ait été souvent observée dans des lignées cellulaires hautement résistantes, elle n'aurait pas été mise en évidence dans des échantillons cliniques (Kantharidis *et al.*, 1997). Par contre, des anomalies du chromosome 7 (monosomie 7, délétion 7q, translocation 4q ; 7q), chromosome dont le bras long contient le gène *MDR1* (locus 7q21), semblent impliquées dans la transformation des cellules cancéreuses initialement sensibles à la chimiothérapie en cellules réfractaires aux traitements anticancéreux (Kantharidis *et al.*, 2000 ; Scotto, 2003). Quoique la mise en évidence de mutations du promoteur *MDR1* qui seraient responsables de son activation dans les cellules résistantes n'ait pas encore été clairement identifiée (Kantharidis *et al.*, 2000), des mutations ponctuelles ont été retrouvées dans différents exemples d'ostéosarcomes. Dans les cellules transfectées avec ces mutations puis traitées par des antinéoplasiques, l'activité du promoteur *MDR1* est amplifiée (Stein *et al.*, 1994). Toutefois, ces mutations se retrouvent aussi dans les tissus normaux provenant des mêmes patients et reflètent probablement un polymorphisme génétique. Quant à l'augmentation de l'expression du gène *MDR1* par les anticancéreux en présence de ces mutations, il reste à déterminer si ces agents peuvent induire une surexpression de la P-gp *in vivo* (Kantharidis *et al.*, 2000).

5. Promoteur MDR1 et facteurs de transcription

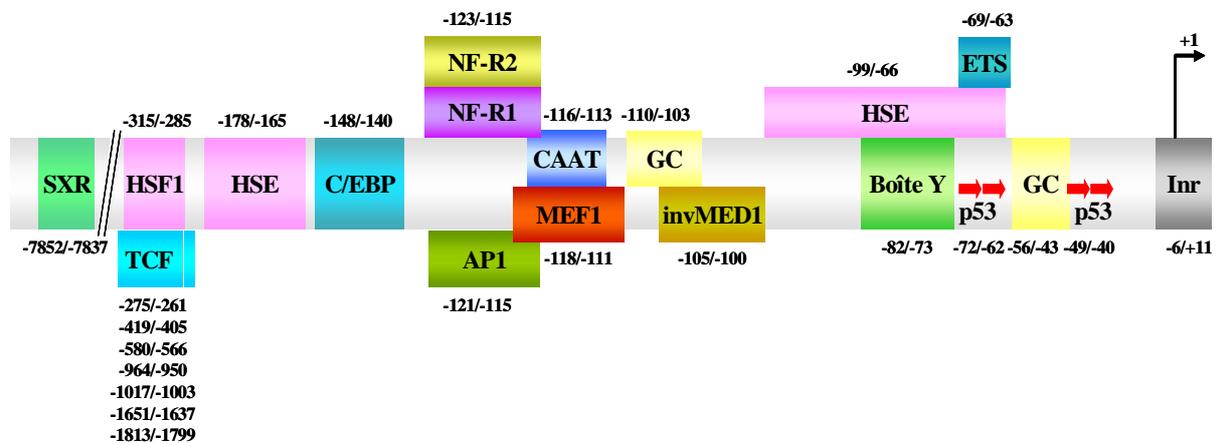


Figure 3. Eléments du promoteur MDR1 en amont du site majeur d'initiation de la transcription (+1) (adaptée de Labialle *et al.*, 2002).

5.1. Élément initiateur (Inr)

Près de la moitié des gènes transcrits par l'ARN polymérase II (Pol II) contiennent une boîte TATA (*TATA box*) nécessaire au recrutement de Pol II (Scotto, 2003). Le gène *MDR1* ne possède pas de boîte TATA mais un élément initiateur (Inr) défini par la séquence consensus Py-Py-A(+1)-N-T/A-Py-Py. Cet élément Inr formé de 17 pb (-6 à +11) est essentiel à l'initiation de la transcription à partir du site majeur d'initiation (+1) (Baker *et al.*, 2003 ; Labialle *et al.*, 2002) (figure 3).

5.2. Boîte GC-50 et élément CCAAT inversé

Comme la plupart des gènes démunis de boîte TATA, le promoteur MDR1 comporte un élément CCAAT inversé (ATTGG) (-82 à -73) ou boîte Y, qui interagit avec le facteur NF-Y trimérique, et une boîte GC-50 (-56 à -43) fixant les facteurs de transcription Sp1 (*specificity protein 1*) et Sp3 (*specificity protein 3*) (Labialle *et al.*, 2002 ; Scotto, 2003).

Au niveau de la boîte GC-50, le site de fixation du facteur Sp1 se chevauche avec celui de la protéine EGR1 (*early growth response element 1*), activatrice du gène *MDR1* et du

facteur oncosuppresseur WT-1 (*Wilm's tumor suppressor 1*), répresseur du gène *MDR1*. Ces deux protéines antagonistes se fixent d'une façon compétitive sur la même séquence d'ADN et leurs interactions pourraient jouer un rôle clé dans l'activation du promoteur (Kuwano *et al.*, 2004 ; Madden *et al.*, 1991).

De plus, la protéine NF-R1 reconnaît le motif GC-50 et régule négativement la transcription (Ogura *et al.*, 1992).

Les études de transfection avec des constructions du promoteur muté au niveau de l'une ou des deux boîtes Y et GC-50 démontrent leur importance dans l'expression constitutive du gène *MDR1* (Scotto *et al.*, 2001). Il est intéressant de signaler que le facteur YB-1 (*Y-box binding protein 1*), une protéine qui se lie préférentiellement à l'ARN et à l'ADN simple brin, se fixe sur la boîte Y et semble associée à la transcription du gène *MDR1* dans des situations de stress cellulaire (Ohga *et al.*, 1998). Bien que son importance dans la transcription constitutive soit controversée (Sundseth *et al.*, 1997), certaines données lui attribuent un rôle dans la transcription basale du gène *MDR1* dans les tumeurs mammaires (Bargou *et al.*, 1997). Toutefois, son rôle exact dans la résistance P-gp dépendante reste à élucider.

De plus, la protéine C/EBP^B (*CAAT enhancer-binding protein*), connue aussi sous le nom de facteur nucléaire NF-IL6 (*nuclear factor-interleukin-6*), interagit avec la boîte Y pour activer la transcription du gène *MDR1* (Chen *et al.*, 2004).

Par ailleurs, des études ont montré que, dans des conditions d'hypoxie cellulaire observée dans nombre de tumeurs volumineuses, la surexpression de la P-gp est médiée par le facteur HIF-1 (*hypoxia-inducible factor-1*), un facteur de transcription résidant normalement dans le cytoplasme et transloqué dans le noyau en cas de stress hypoxique. HIF-1 active le promoteur *MDR1* en se liant à la séquence consensus GCGTG localisé de -53 à -49 au niveau de la boîte GC-50. Des études préliminaires suggèrent que le facteur Sp1 pourrait contribuer, par sa fixation à la boîte GC-50, à l'induction du gène *MDR1* en réponse à une hypoxie (Comerford *et al.*, 2002).

➤ « *Enhancesome MDR1* »

L'expression du gène *MDR1* peut être activée par l'irradiation UV, certains agents différenciants (butyrate de sodium et acide rétinoïque), des inhibiteurs des HDACs (butyrate

de sodium et trichostatine A), des esters de phorbol et certains agents chimiothérapeutiques (Scotto *et al.*, 2001 ; Scotto, 2003). Les signaux provenant de ces différents facteurs convergent vers une région du promoteur MDR1 désignée par le terme « *enhancesome* ». Cette région inclue la boîte CCAAT inversée et la boîte GC-50. Les facteurs NF-Y, Sp1 et Sp3 fixés sur ces éléments coopèrent pour recruter l'histone acétyltransférase P/CAF (*p300/CBP associated-factor*) au niveau du promoteur MDR1, ce qui induit l'acétylation des histones de la région proximale du promoteur et aboutit, après remodelage de la chromatine, à l'activation transcriptionnelle du gène *MDR1* (Scotto, 2003) (Figure 4).

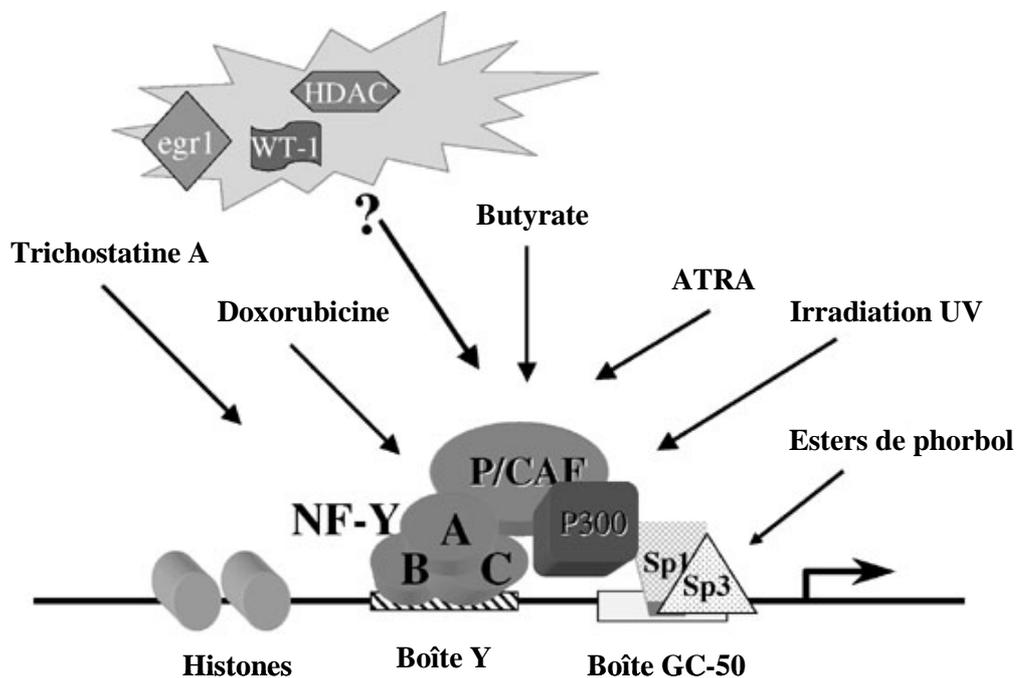


Figure 4. *Enhancesome* MDR1 (Scotto, 2003).

5.3. Élément p53

Plusieurs tumeurs non traitées par des antinéoplasiques expriment le phénotype MDR P-gp-dépendant. L'expression constitutive du gène *MDR1* pourrait donc être associée à l'activation de certains oncogènes ou à la perte de fonction de gènes suppresseurs de tumeurs.

Différentes études révèlent le rôle inhibiteur de l'anti-oncogène p53 sauvage sur l'activité du promoteur MDR1, alors que les versions mutées de cette protéine agissent comme des activatrices, probablement par perte de leur effet inhibiteur (Chin *et al.*, 1992 ; Johnson *et al.*, 2001 ; Thottassery *et al.*, 1997) ou par leur interaction avec le facteur proto-

oncogénique ETS-1 qui se lie sur son site de fixation (-69 à -63) au niveau du promoteur (Sampath *et al.*, 2001).

La répression du gène *MDR1* est médiée par la liaison de p53 sauvage à son élément localisé de -72 à -40 dans la région proximale du promoteur *MDR1*.

D'une manière générale, p53 active la transcription en se liant à son site de fixation consensus, formé de deux demi-sites comprenant chacun 2 copies d'une séquence PuPuPuCA/T disposées tête à tête (HH, *head-to-head*) et séparées de 0 à 13 nucléotides (Johnson *et al.*, 2001). Toutefois, il a été montré que l'élément p53 du promoteur *MDR1* est un site HT (*head-to-tail*), où les 2 copies de la séquence PuPuPuCA/T sont disposées tête à queue (figure 5), ce qui, après fixation de la protéine p53, lui permet d'agir en tant qu'inhibiteur (Johnson *et al.*, 2001 ; Labialle *et al.*, 2002 ; Scotto, 2003).

Certaines études mentionnent l'effet activateur de p53 sauvage sur le gène *MDR1*, une contradiction probablement due au large champ d'action de p53 et à des modifications majeures dans les conditions expérimentales des différentes études (Goldsmith *et al.*, 1995).

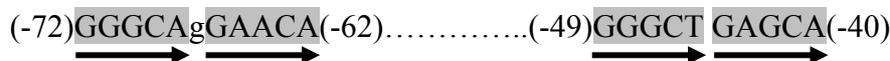


Figure 5. Représentation schématique du site de fixation HT de p53 au niveau du promoteur *MDR1* (Scotto, 2003).

5.4. Élément *invMED1*

Localisé de -105 à -100, l'élément *invMED1* (*inverted MED-1 element*) a été décrit dans les cellules leucémiques CEM comme un élément *cis*-activateur du gène *MDR1* (Labialle *et al.*, 2002 ; Marthinet *et al.*, 2000). Cet élément est constitué par la séquence GGGAGC, qui est l'inverse de la séquence MED-1 (GCTCCC/G) du promoteur *pgp1* chez le hamster, un élément qui, dans les cellules résistantes, permet la transcription du gène *MDR1* à partir de sites d'initiation supplémentaires en aval du site majeur (Ince *et al.*, 1996 ; Labialle *et al.*, 2004). Récemment, la protéine LRP130 a été identifiée comme le facteur nucléaire se fixant sur l'élément *invMED1* pour activer la transcription constitutive du gène *MDR1* (Labialle *et al.*, 2004).

5.5. Boîte GC-110

En amont de la boîte Y se trouve un deuxième élément GC, la boîte GC-110 (-110 à -103), qui ne fixe pas la protéine Sp1 mais un facteur nucléaire spécifique, non encore identifié, qui agit comme un répresseur du gène *MDR1* (Cornwell *et al.*, 1993).

5.6. Elément MEF1

Il a été montré qu'une protéine de 130 kDa, connue sous le nom de MEF1 (*MDR1 promoter-enhancing factor 1*), active la transcription du gène *MDR1* par sa fixation à la séquence GTCAATCC du promoteur située de -118 à -111. Cette protéine a été retrouvée dans la lignée résistante HL-60 et non dans son homologue sensible, ce qui suggère un rôle direct de ce facteur dans l'activation du gène *MDR1* suite à la sélection des cellules tumorales avec des anticancéreux (Ogretmen *et al.*, 2000). Par ailleurs, il a été récemment révélé que la protéine ARN hélicase A (RHA) est membre du complexe MEF1 fixé sur le promoteur *MDR1* et que cette protéine augmente l'expression endogène de la P-gp ainsi que celle d'un gène reporteur dans une construction avec le promoteur *MDR1* (Zhong *et al.*, 2004). Il est intéressant de préciser que cet élément contient la séquence CAAT (-116 à -113) qui fixe le complexe inhibiteur NFκB/p65 et c-fos dans les cellules sensibles MCF-7 (Ogretmen *et al.*, 1999).

5.7. Elément CAAT

L'élément CAAT (-116 à -113) du promoteur *MDR1* fixe un complexe protéique formé par les facteurs NFκB/p65 et c-fos. Cette liaison a été mise en évidence dans les cellules MCF-7 sensibles contrairement à leurs homologues résistants MCF-7/Adr et s'est avérée inhibitrice du gène *MDR1* (Ogretmen *et al.*, 1999). Néanmoins, une étude a montré que l'activation du gène *MDR1* par l'hépatocarcinogène 2-acétylaminofluorène (2-AAF) est médiée par une séquence d'ADN située à -6092 en amont du site majeur d'initiation de la transcription, séquence qui contient un site de fixation pour le facteur nucléaire NFκB (Kuo *et al.*, 2002). De plus, il a été proposé que le facteur NFκB reconnaisse un autre site de liaison au niveau de l'intron 1 du promoteur *MDR1*, par le biais duquel il active le promoteur *MDR1* dans les cellules HCT15 du cancer humain du côlon (Bentires-Alj *et al.*, 2003).

La protéine NF-R1 se fixe partiellement sur l'élément CAAT en se liant à la séquence ATTCAGTCA (-123 à -115) et régule négativement la transcription (Ogura *et al.*, 1992). Cette séquence est reconnue aussi par la protéine NF-R2 dont le rôle serait l'activation de la transcription du gène *MDR1* (Takatori *et al.*, 1993).

Enfin, la liaison de la protéine MEF1 (*MDR1 promoter-enhancing factor 1*) à la séquence GTCAATCC (-118 à -111) active le gène *MDR1* (Ogretmen *et al.*, 2000).

5.8. Elément AP-1

AP-1 est le terme général désignant les complexes de facteurs de transcription composés par les membres des familles d'oncogènes Fos et Jun.

Plusieurs études suggèrent que la voie des MAPKinases joue un rôle important dans la régulation de l'expression de la glycoprotéine P. En particulier, une association entre la surexpression de c-fos et celle du gène *MDR1* a été mise en évidence (Scanlon *et al.*, 1994). De plus, des taux élevés de c-fos et c-jun ont été détectés dans diverses cellules résistantes en comparaison avec leurs homologues sensibles (Bhushan *et al.*, 1992 ; Daschner *et al.*, 1999). Par ailleurs, les cellules transfectées avec *c-jun* surexpriment l'ARNm *MDR1* ainsi que la protéine P-gp (Daschner *et al.*, 1999). Toutes ces données apparaissent en faveur d'un rôle activateur des facteurs c-fos et c-jun sur l'expression du gène *MDR1* quand ils se fixent sur le site AP-1 (-121 à -115) du promoteur *MDR1*.

Toutefois, certaines études rapportent que les cellules surexprimant la P-gp possèdent une faible activité JNK (*c-Jun NH₂-terminal kinase*), une enzyme qui phosphoryle la protéine c-jun (Kang *et al.*, 2000). De plus, une relation directe entre la voie JNK et la diminution de l'expression de la P-gp a été récemment mise en évidence (Zhou *et al.*, 2006). Enfin, il a été démontré que le facteur c-jun joue un rôle déterminant dans la répression du gène *MDR1* par la salvicine (Miao *et al.*, 2003).

Ces données suggèrent cette fois que le facteur c-jun serait négativement corrélé à l'expression du gène *MDR1*. Elles confirment la nécessité d'études complémentaires afin de préciser le rôle qu'il joue dans le phénotype MDR.

5.9. Elément C/EBP

Il a été montré que la protéine C/EBP^β (ou NF-IL6) se fixe sur la séquence -148 à -140 du promoteur MDR1 et active la transcription (Combates *et al.*, 1994). Elle peut également interagir avec la boîte Y pour réguler positivement ce gène de résistance (Chen *et al.*, 2004).

5.10. Eléments HSE

Certaines études notent une augmentation de l'expression du gène *MDR1* à la suite d'un choc thermique ou après un traitement par l'arsenate, augmentation qui semble médiée par différents éléments HSE (*Heat shock element*) au niveau du promoteur MDR1. Ces éléments se retrouvent notamment au niveau des séquences -178 à -165 et -99 à -66. Néanmoins, aucune interaction directe entre un facteur de choc thermique et l'une de ces séquences HSE n'a pu être mise en évidence (Miyazaki *et al.*, 1992). Il a été montré plus tard que le facteur de choc thermique HSF1 active le promoteur MDR1 en s'associant à un nouvel élément HSE localisé dans la région -315 à -285 (Vilaboa *et al.*, 2000).

5.11. Elément TCF

Les facteurs de transcription, membres de la famille TCF (*T-cell factor*), sont connus pour leur rôle dans la tumorigenèse et dans la progression du cancer. Ces facteurs deviennent actifs après leur association à la β -caténine et stimulent ainsi leurs gènes cibles. L'augmentation des taux de β -caténine, observée dans 80% des cancers du côlon et dans certains cancers du foie et de la peau, résulte d'une mutation du gène suppresseur de tumeurs APC (*adenomatous polyposis coli*) ou d'une mutation du gène de la β -caténine induisant la stabilisation de cette protéine (Labialle *et al.*, 2002 ; Scotto, 2003). La fixation du complexe TCF4/ β -caténine à 7 éléments TCF localisés de -1813 à -261 au niveau du promoteur MDR1 induit la surexpression du gène *MDR1* durant la carcinogenèse colorectale et serait responsable de l'apparition d'une résistance intrinsèque (Yamada *et al.*, 2000).

5.12. Elément SXR

Un élément activateur attribué à la séquence -7852 à -7837 a été découvert au niveau du promoteur MDR1. Cet élément fixe le récepteur nucléaire SXR (*Steroid xenobiotic*

receptor)/RXR α , un hétérodimère formé par le récepteur des rétinoïdes RXR et le récepteur des stéroïdes SXR (P(pregnane)XR chez les rongeurs). Il active la transcription du gène *MDR1* en réponse à divers agents tels que la nifédipine, le RU486, la dexaméthasone et la rifampicine (Geick *et al.*, 2001 ; Scotto, 2003). La famille des récepteurs nucléaires SXR interviennent dans le catabolisme et l'efflux des médicaments, en régulant d'une part les gènes du cytochrome P450 (CYP3A4 et CYP2C8) et en activant d'autre part, l'expression de la P-gp (Synold *et al.*, 2001).

6. Epigénétique et expression du gène *MDR1*

Malgré les efforts déployés pour comprendre les mécanismes qui régulent l'expression du gène *MDR1*, son statut épigénétique est resté longtemps inexploré. Ce n'est que récemment que la recherche des divers facteurs transformant les cellules P-gp négatives en cellules P-gp positives s'est focalisée sur le rôle de la chromatine, un déterminant majeur de la régulation transcriptionnelle.

Afin de comprendre l'implication de la chromatine dans la transcription du gène *MDR1*, nous allons, en premier lieu, développer les concepts clés des modifications épigénétiques qui régissent le pouvoir transcriptionnel, pour ensuite aborder leurs rôles dans la régulation de l'expression du gène *MDR1*.

6.1. Qu'est-ce que l'épigénétique ?

Le terme « épigénétique » qualifie des informations contenues dans la chromatine, héréditaires au cours des divisions cellulaires, qui contribuent à la régulation d'états fonctionnels au sein d'une cellule sans altérer la séquence d'ADN (Santos-Rosa *et al.*, 2005). En particulier, les régulations épigénétiques de la transcription sont des phénomènes héréditaires et réversibles qui modulent l'expression des gènes sans en affecter la séquence nucléotidique.

Cette appréciation de l'importance de paramètres non codés génétiquement a pris un essor particulier avec les récents progrès réalisés dans la connaissance du génome au sein du noyau des cellules. En effet, le génome nucléaire s'organise en une structure nucléoprotéique, appelée chromatine, qui, outre sa composante génétique, est riche en informations épigénétiques. L'unité élémentaire de la chromatine est le nucléosome composé d'ADN et de

protéines basiques appelées histones. C'est donc la chromatine, et non l'ADN seul, qui est impliquée dans les événements moléculaires faisant intervenir le matériel génétique tels que la transcription.

L'information épigénétique au sein de la chromatine est principalement véhiculée par des modifications de l'ADN et des histones. De plus, la nature même des histones, qui existent sous leurs formes majoritaires ou sous d'autres formes appelées variants, est également une donnée épigénétique dont le rôle majeur a récemment été mis en avant (Henikoff *et al.*, 2004).

6.2. Nucléosome : unité de base de la chromatine

A l'intérieur du noyau des cellules eucaryotes, l'ADN est assemblé en une structure hautement organisée, la chromatine. Celle-ci est requise pour empaqueter l'ADN du génome humain d'environ 2 m de longueur à l'intérieur d'un noyau de quelques μm de diamètre. Toutefois, au-delà de son rôle dans la compaction physique de l'ADN, la chromatine régule les principales fonctions nucléaires, à savoir la transcription, la réplication et la réparation de l'ADN (Santos-Rosa *et al.*, 2005).

L'unité structurale de la chromatine est le nucléosome, lequel est constitué d'une particule cœur et d'une région internucléosomique (figure 6). La particule cœur consiste en 146 paires de bases (pb) d'ADN enroulées 1,65 fois autour d'un octamère de protéines basiques composé de 2 copies de chacune des histones H2A, H2B, H3 et H4 (Luger, 2006). L'assemblage commence par l'hétérodimérisation de H3 avec H4 suivie d'une dimérisation de H3 pour former le tétramère $(\text{H3-H4})_2$, auquel viennent s'adjoindre de part et d'autre deux dimères H2A-H2B (Ramaswamy *et al.*, 2005 ; Ridgway *et al.*, 2000 ; Wolffe *et al.*, 2000) (figure 7)

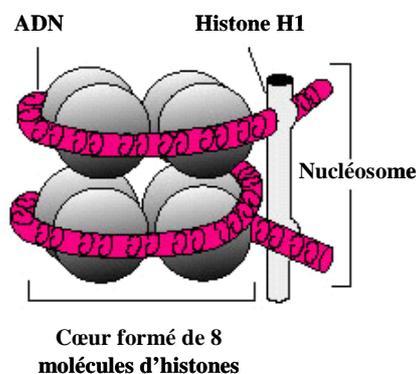


Figure 6. Structure du nucléosome (Monneret, 2005).

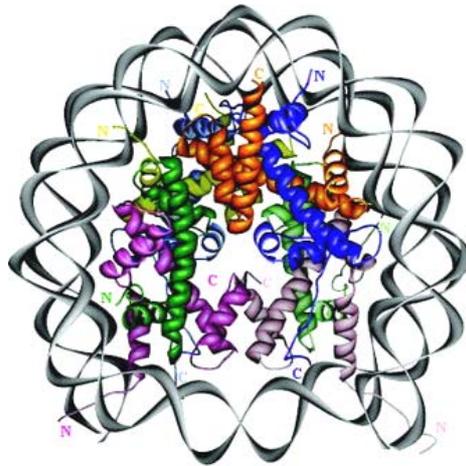


Figure 7. Architecture du coeur nucléosomique (Ramaswamy *et al.*, 2005).

Les histones H3 sont représentées en rose, les histones H4 en vert, les histones H2A en bleu, les histones H2B en orange et l'ADN en gris. Les couleurs claires et foncées distinguent les deux copies des monomères. Les terminaisons N et C sont indiquées.

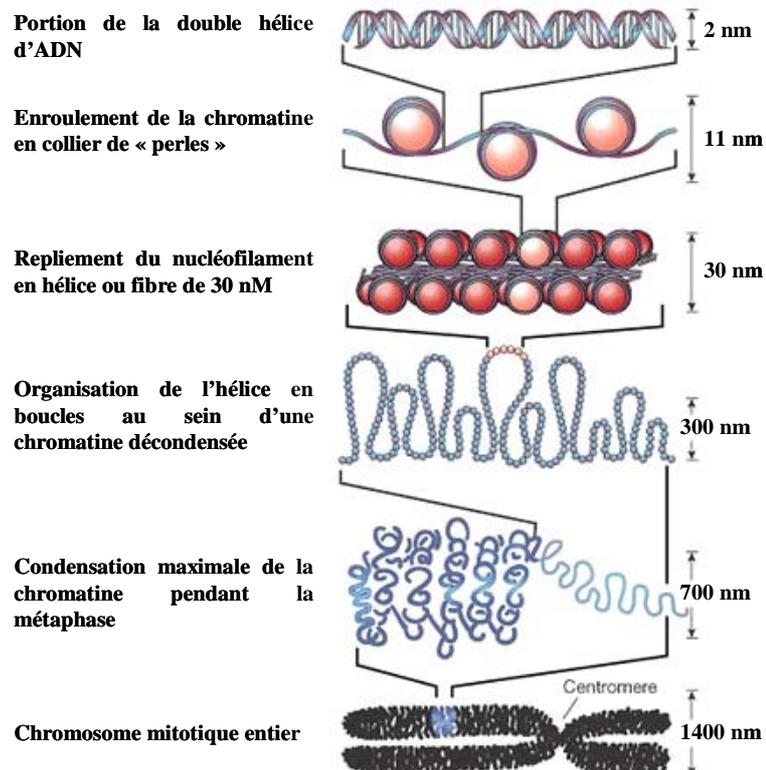


Figure 8. Différents niveaux de compaction de la chromatine (Alberts *et al.*, 1998).

La région internucléosomique relie les particules cœur adjacentes. Elle est formée d'un ADN de longueur variable selon l'espèce et le type cellulaire, sur lequel est associée une histone de liaison (H1) à proximité de la particule cœur. Ainsi, la longueur de l'ADN caractéristique d'un nucléosome varie de 160 à 200 paires de bases (Gilbert *et al.*, 2005 ; Khorasanizadeh, 2004). La présence de l'histone de liaison stabilise les nucléosomes, conduit à la formation de la fibre de chromatine de 30 nm et participe à la mise en place d'états chromatiniens de plus en plus condensés, allant jusqu'au chromosome métaphasique (figure 8).

6.3. Histones du cœur nucléosomique

Les quatre histones du cœur H2A, H2B, H3 et H4 sont chargées positivement du fait qu'elles contiennent des quantités relativement importantes de lysine (K) et d'arginine (R). Elles se fixent sur la fibre d'ADN grâce à des liaisons hydrogènes et à des interactions électrostatiques entre leurs résidus chargés positivement et les résidus phosphates de l'ADN. Les histones du cœur possèdent un motif commun, structuralement conservé, nommé « *histone fold* », constitué de trois hélices α reliées entre elles par deux courtes boucles L1 et L2, ainsi que deux extrémités ou queues flexibles dépourvues de structure secondaire (Gilbert *et al.*, 2005 ; Ramaswamy *et al.*, 2005 ; Zhang *et al.*, 2001). Le motif « *histone-fold* » permet la dimérisation des histones selon une configuration en poignée de mains (Ramaswamy *et al.*, 2005) (figure 9), tandis que leurs queues interviennent dans les interactions internucléosomiques au niveau de la fibre chromatinienne de 30 nm. L'extrémité N-terminale, quand elle est complètement tendue, peut se projeter par-delà la double hélice d'ADN dans le nucléosome. Les queues des histones sont le siège de modifications post-traductionnelles qui évoquent des états chromatiniens fonctionnels et/ou conformationnels spécifiques, pouvant jouer un rôle crucial dans de nombreux processus cellulaires (Wolffe *et al.*, 2000).

Le nucléosome représente une barrière pour le passage des complexes enzymatiques et des facteurs de transcription. Pour surmonter l'obstacle du nucléosome, la cellule utilise différentes stratégies pour réorganiser la chromatine dont la modification post-traductionnelle des histones, le remodelage de la chromatine par des complexes de remodelage ATP-dépendants et l'insertion de variants d'histones au sein du cœur nucléosomique. Les deux premiers mécanismes font l'objet de nombreuses études et agissent probablement en synergie. Le troisième est toujours mal connu.

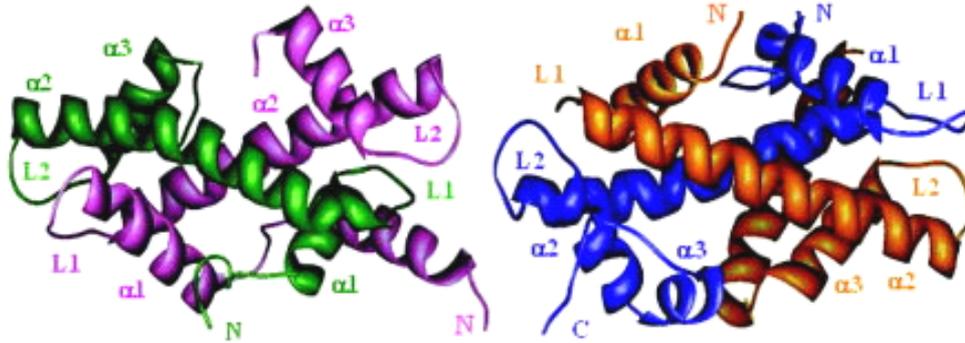


Figure 9. Configuration en poignée de mains des dimères H3-H4 et H2A-H2B (Ramaswamy *et al.*, 2005). L'histone H3 est représentée en rose, l'histone H4 en vert, l'histone H2A en bleu et l'histone H2B en orange. Les hélices α et les boucles de connexion L du motif *histone fold* sont indiquées.

6.4. Variants des histones du cœur nucléosomique

Chez la plupart des organismes, plusieurs copies des gènes d'histones codent pour les histones conventionnelles majoritaires dont l'expression et le positionnement sur l'ADN ont lieu selon un procédé strictement couplé à la réplication de l'ADN. Ces gènes possèdent des séquences très similaires, sont exprimés pendant la phase S du cycle cellulaire, ne contiennent pas d'introns et sont transcrits en ARNm non polyadénylés (Kamakaka *et al.*, 2005 ; Sarma *et al.*, 2005). Les histones font partie des protéines les mieux conservées au cours de l'évolution ; cependant, il en existe des variants non-alléliques dont les séquences primaires peuvent être identiques à un résidu près ou significativement différentes de celles des histones majoritaires. Ces variants, appelés aussi « histones de remplacement », sont produits par des gènes « réplication-indépendants » dont l'expression est faible et non limitée à la phase S, mais qui sont transcrits durant tout le cycle cellulaire. Ils sont localisés en dehors des « clusters » des gènes d'histones majoritaires, existent surtout en une seule copie, contiennent des introns et génèrent des ARNm le plus souvent polyadénylés (Alvelo-Ceron *et al.*, 2000 ; Kamakaka *et al.*, 2005 ; Pusarla *et al.*, 2005). Les variants d'histones sont déposés sur l'ADN pendant ou après l'accomplissement de la phase S. De plus, ils sont dotés de rôles spécifiques qui régulent la dynamique de la chromatine dans diverses fonctions nucléaires telles que la transcription, l'extinction des gènes, la ségrégation des chromosomes, la réplication, la réparation de l'ADN et la recombinaison (Pusarla *et al.*, 2005). Les histones H4 sont les seules histones du cœur nucléosomique dont aucun variant n'a été découvert.

➤ Variants H2A

Parmi les histones du cœur nucléosomique, les histones H2A possèdent le plus grand nombre de variants. Les histones H2A.1 et H2A.2 représentent les histones H2A majoritaires. Le génome humain contient 10 gènes codant pour H2A.1 et un gène codant pour H2A.2. Chez l'homme, cinq autres gènes H2A codent pour des protéines dont les séquences diffèrent considérablement des histones majoritaires ; il s'agit notamment des variants H2A.Z et H2A.X identifiés en 1980, macroH2A.1 et macroH2A.2 identifiés en 1990 et finalement H2A.Bbd (*H2A-Bar-body-deficient*) identifié en 2001 (Redon *et al.*, 2002).

H2A.Z représente 5 à 10% des histones H2A et contrôle probablement diverses fonctions majeures de la cellule (Pusarla *et al.*, 2005). Sa séquence est identique à 60% à celle de la forme principale de H2A. Chez la levure, l'expression de plusieurs gènes nécessite la présence de Htz1, l'homologue de H2A.Z, découverte qui soutient l'hypothèse que ce variant joue un rôle important dans la transcription. De plus, ce variant fonctionne comme une barrière contre la dissémination de l'hétérochromatine, en empêchant les histones désacétylases Sir2, Sir3 et Sir4 de se propager dans l'euchromatine. Toutefois, certaines études réalisées sur des eucaryotes supérieurs évoquent le rôle du variant H2A.Z dans la formation de l'hétérochromatine et dans le contrôle de l'intégrité génomique. Ainsi, ce variant localisé loin des télomères chez la levure et au niveau des foci hétérochromatiques dans les cellules de mammifères pourrait avoir diverses fonctions dans différents organismes (Jin *et al.*, 2005 ; Sarma *et al.*, 2005).

Le variant H2A.X se caractérise par une extension de sa queue C-terminale contenant la séquence conservée d'acides aminés SQ(E/D) ϕ (où ϕ dénote un résidu hydrophobe). La sérine 139 de cette région C-terminale est phosphorylée, principalement par la kinase ATM (*ataxia-telangiectasia mutated*), membre de la famille des PI3-kinases, en réponse à des cassures double-brin de l'ADN (DSB, *double-strand breaks*), un événement qui semble précoce dans la réponse à un dommage de l'ADN (quelques minutes plus tard).

H2A.X est incorporé massivement et d'une façon aléatoire dans les chromosomes, indépendamment du dommage de l'ADN. Toutefois, il semble qu'il fonctionne sous sa forme phosphorylée retrouvée autour des DSB (Jin *et al.*, 2005 ; Sarma *et al.*, 2005).

MacroH2A est un variant spécifique des vertébrés et possède deux domaines distincts : une partie N-terminale similaire à 64% à celle des histones H2A majoritaires et une large

région C-terminale contenant un « macrodomaine » non-histone qui représente les deux tiers de la masse moléculaire de la protéine. Ce variant se localise surtout au niveau du chromosome X inactif des cellules femelles de mammifères. MacroH2A joue un rôle général dans l'extinction des gènes ; en effet, son domaine C-terminal inhibe la fixation des facteurs de transcription et son domaine H2A N-terminal interfère avec l'activité des facteurs de remodelage de la chromatine SWI/SNF (Angelov *et al.*, 2003 ; Pusarla *et al.*, 2005).

H2A.Bbd est le variant H2A le plus récemment identifié et le moins étudié. Il semble exclu du chromosome X inactif, hautement condensé (le « Barr body ») des cellules de mammifères. Il s'accumule au niveau des sites de transcription où il colocalise avec l'histone H4 acétylée sur la lysine 12, ce qui lui confère une fonction dans l'établissement de l'euchromatine. Les études de la structure et de la stabilité des nucléosomes reconstitués à l'aide de ce variant amènent à conclure que les nucléosomes contenant H2A.Bbd sont plus « ouverts » et moins stables que ceux renfermant l'histone H2A conventionnelle. Par ailleurs il a été montré que la mobilité du variant H2A.Bbd dans le noyau était plus importante que celle des histones H2A majoritaires (Jin *et al.*, 2005 ; Sarma *et al.*, 2005).

➤ Variants H3

Les formes répliquatives de l'histone H3, autrement dit celles qui sont incorporées pendant la phase S du cycle cellulaire, sont les histones H3.1 (codées par 10 gènes) et H3.2 (codées par un seul gène) qui se distinguent l'une de l'autre par un seul acide aminé en position 96 (cystéine vs sérine, respectivement) (Benson *et al.*, 2006 ; Hake *et al.*, 2006 ; Pusarla *et al.*, 2005). Chez les mammifères, une forme particulière de l'histone H3.1 est uniquement exprimée dans les testicules ; il s'agit de H3.1t qui diffère de l'histone H3.1 au niveau de quatre acides aminés (Hake *et al.*, 2006 ; Karasawa *et al.*, 2004). La mise en place de l'histone H3.1 (sous forme dimérique H3.1-H4) au sein du nucléosome est assistée par un complexe d'assemblage de la chromatine contenant un chaperon d'histone, le facteur CAF-1 (*chromatin assembly factor 1*) (Sarma *et al.*, 2005).

Il a été récemment montré que l'histone H3.2 est enrichie en modifications post-traductionnelles liées à l'extinction des gènes (di- et tri-méthylation de la lysine 27), alors que l'histone H3.1 porte des signes d'activation (acétylation de la lysine 14) ou de répression génique (di-méthylation de la lysine 9), suggérant que ces isoformes puissent avoir fonctions biologiques distinctes (Hake *et al.*, 2006).

Il existe deux variants de l'histone H3 indépendants de la réplication : la protéine H3.3 dont la séquence se rapproche de celle des isoformes H3.1 et H3.2 (substitution de 4 acides aminés), et l'histone H3 centromérique significativement différente des autres isoformes (Sarma *et al.*, 2005).

Le variant H3.3 se retrouve au niveau des loci transcriptionnellement actifs et subit des modifications post-traductionnelles relatives à la compétence transcriptionnelle, telles que la di- et tri-méthylation de la lysine 4, l'acétylation des lysines 9, 18 et 23 et la méthylation de la lysine 79 (Hake *et al.*, 2006 ; Sarma *et al.*, 2005). Il est à noter que le variant H3.3 représente environ 25% des histones H3 totales chez la drosophile et que ce pourcentage atteint les 50% pendant la phase terminale de différenciation. Ce constat confirme l'incorporation du variant H3.3 dans l'ADN à tous les stades du cycle cellulaire, alors que les histones H3.1 et H3.2 ne se déposent que pendant la phase S. Toutefois, dans les cellules différenciées l'augmentation du taux de H3.3 n'est pas corrélée à l'activité transcriptionnelle (McKittrick *et al.*, 2004). L'incorporation du variant H3.3 dans la chromatine nécessite son assemblage à un complexe contenant le chaperon d'histone HIRA qui permet la formation de nucléosomes par l'intermédiaire d'une voie non couplée à la synthèse de l'ADN (Jin *et al.*, 2005).

Il est intéressant de noter que dans les deux complexes contenant CAF-1 ou HIRA, les histones H3 et H4 sont sous forme dimérique. Cette observation surprenante, à l'encontre des données sur la forme tétramérique des histones H3 et H4, amène à supposer qu'en présence de chaperons d'autres conformations stables seraient envisageables (Benson *et al.*, 2006).

Le variant centromérique de l'histone H3 CENP-A, incorporé dans la chromatine indépendamment de la réplication de l'ADN du centromère, peut s'associer avec les histones H4, H2A et H2B (Jin *et al.*, 2005). L'analyse de sa séquence révèle que son domaine C-terminal est similaire à plus de 60% à celui de l'histone H3 (Gilbert *et al.*, 2005), tandis que sa région N-terminale en diffère significativement. CENP-A est localisé exclusivement au niveau des centromères. Toutefois, quand il est surexprimé, il se dissémine dans le chromosome. Les connaissances actuelles ne permettent pas de savoir comment le variant CENP-A est ciblé sur les centromères. Ce variant aurait une fonction essentielle, étant donné que des souris « *knock-out* » homozygotes pour son gène ne sont pas viables (Sarma *et al.*, 2005).

➤ Variants H2B

Les isoformes H2B.1 et H2B.2 représentent les histones H2B majoritaires. Un seul variant de remplacement hTSH2B (*human testis/sperm-specific histone*), spécifique des tissus

testiculaires et des spermatozoïdes, a été identifié à ce jour chez l'homme. Il présente 85% de similarité avec l'histone H2B somatique, les différences majeures se localisant au niveau de la région N-terminale. Ce domaine étant impliqué dans les interactions de l'octamère d'histones avec l'ADN et dans la condensation des chromosomes mitotiques, il pourrait participer à la condensation des fibres chromatiniennes dans le sperme (Kamakaka *et al.*, 2005 ; Pusarla *et al.*, 2005 ; Zalensky *et al.*, 2002).

6.5. **Modifications post-traductionnelles des histones**

Les extrémités aminoterminales des histones, et dans une moindre mesure carboxyterminales, sont les cibles de nombreuses modifications post-traductionnelles, parmi lesquelles l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation et l'ubiquitination sont les plus étudiées (figure 10). Cependant, d'autres modifications ont également été décrites telles que l'ADP-ribosylation, la sumoylation, la glycosylation ou la biotinylation.

Les modifications des histones modulent la structure de la chromatine, permettant de contrôler les fonctions cellulaires liées à l'ADN, telles que la transcription, en réponse à des changements physiologiques dans la cellule. L'importance des modifications post-traductionnelles des histones est révélée par le fait que les mécanismes épigénétiques sont essentiels au développement harmonieux de l'organisme et que leur dérégulation peut entraîner différentes pathologies, notamment le cancer (Loizou *et al.*, 2006).

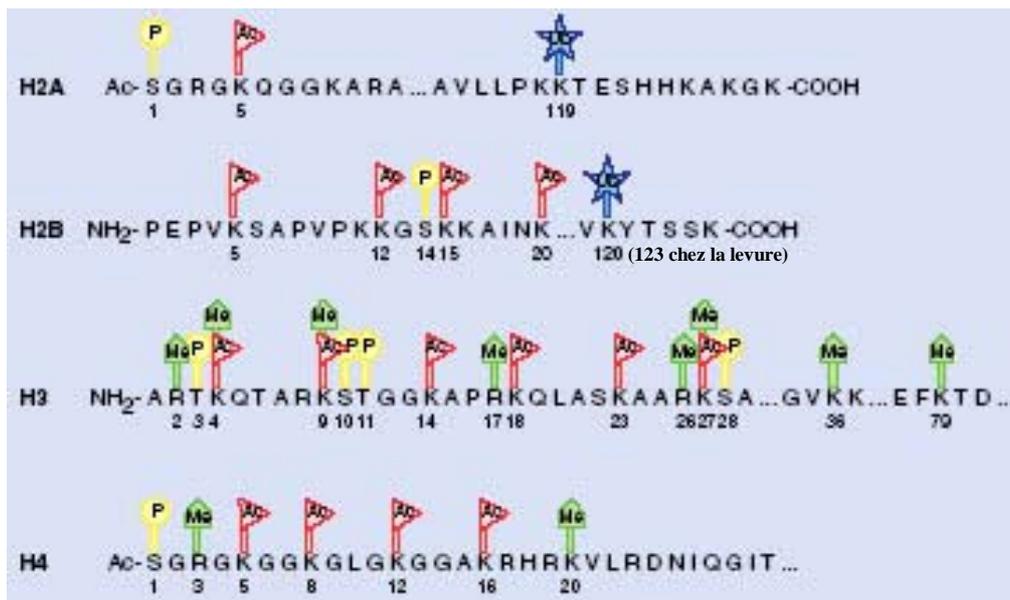


Figure 10. Modifications post-traductionnelles des histones du cœur nucléosomique (Peterson *et al.*, 2004).
Ac = acétylation ; Me = méthylation ; P = phosphorylation ; Ub = ubiquitination.

6.5.1. Acétylation des histones

La première association entre une modification post-traductionnelle d'une histone et un état fonctionnel particulier de la chromatine découle de l'observation que les régions de la chromatine transcriptionnellement actives sont enrichies en histones acétylées. Des études ultérieures ont mis en évidence le lien existant entre l'hypoacétylation des histones et l'inactivité de l'hétérochromatine constitutive ou facultative (Spotswood *et al.*, 2002).

L'acétylation des histones est prise en charge par des enzymes histones acétyltransférases (HATs) qui catalysent le transfert d'un groupe acétyle de l'acétyl-CoA vers un groupement amine (NH_3^+) ϵ d'une lysine située dans la queue N-terminale de l'histone. Les enzymes qui désacétylent les lysines des histones sont appelées les histones désacétylases (HDACs) (figure 11). L'état d'acétylation des histones résulte d'un équilibre entre ces deux types d'enzymes à activités opposées. Chez la plupart des espèces, les principaux sites d'acétylation sont les lysines 9, 14, 18 et 23 de l'histone H3 et les lysines 5, 8, 12 et 16 de l'histone H4 (Strahl *et al.*, 2000).

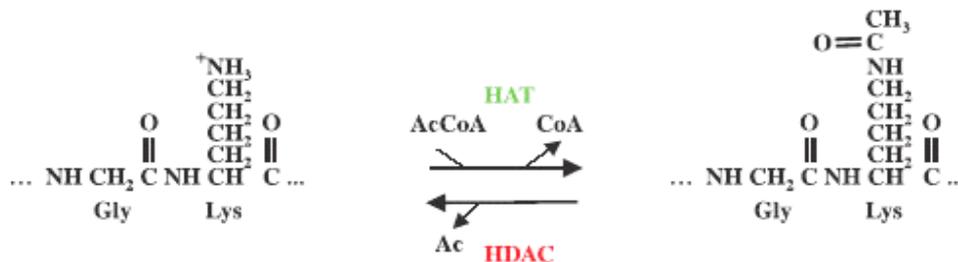


Figure 11. Réactions d'acétylation et de désacétylation des lysines de la queue N-terminale des histones (Verdone *et al.*, 2005).

Bien que l'activation et la répression de la transcription soient généralement corrélées à l'acétylation et la désacétylation des histones respectivement, plusieurs études ont montré que ce lien n'est pas exclusif (Deckert *et al.*, 2001 ; Mulholland *et al.*, 2003). En effet, chez la drosophile et la levure, l'hétérochromatine est acétylée sur la lysine 12 de l'histone H4, ce qui suggère un éventuel rôle de cette modification dans l'extinction génique (Grunstein, 1997). Toutefois, l'acétylation des histones est considérée comme un mécanisme clé dans l'interconversion entre les structures permissives et répressives de la chromatine (Eberharter *et al.*, 2002) (figure 12).

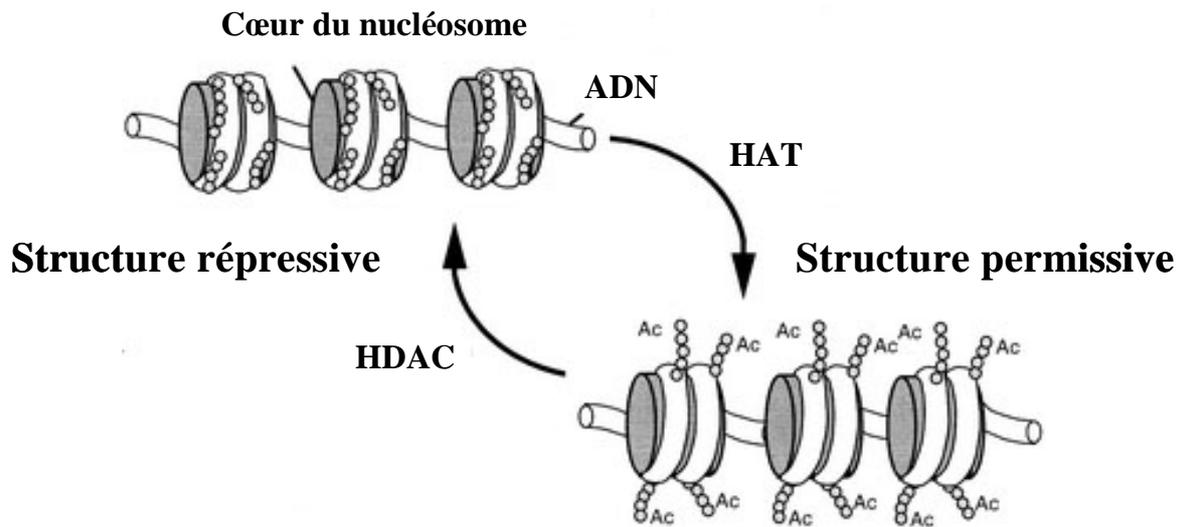


Figure 12. Modèle de régulation de la structure nucléosomique par acétylation réversible des histones (Yoshida *et al.*, 2001).

Un point majeur reste à éclaircir et concerne le rôle de l'acétylation des histones dans l'expression des gènes, notamment les mécanismes moléculaires qui sous-tendent les effets de cette modification en particulier. Deux hypothèses ont été proposées : d'une part, l'acétylation des histones modifie la structure des nucléosomes, et d'autre part, elle influence la fixation de certaines protéines sur l'ADN (Verdone *et al.*, 2005).

La première possibilité est expliquée par l'altération de l'interaction électrostatique entre les histones et l'ADN. En effet, l'addition d'un groupement acétyle sur le groupement amine ϵ d'une lysine de la queue N-terminale de l'histone neutralise la charge positive de cette terminaison. L'acétylation de ce résidu pourrait ainsi affaiblir le contact entre la queue N-terminale de l'histone et l'ADN chargé négativement. Par conséquent, la fluidité du nucléosome augmente et l'ADN est plus accessible à la machinerie transcriptionnelle (Kingston *et al.*, 1999). Plusieurs études évoquent l'importance du repositionnement des nucléosomes dans l'activation de la transcription (Di Mauro *et al.*, 2002 ; Lomvardas *et al.*, 2001) ou la nécessité d'une activité HAT pour l'initiation de la transcription (Agricola *et al.*, 2004). De plus, diverses données bibliographiques font référence à l'effet direct de l'acétylation des histones sur la modulation de la conformation nucléosomale *in vitro* (Garcia-Ramirez *et al.*, 1995 ; Wang *et al.*, 2001).

Le second mécanisme envisageable est fondé sur le fait que l'acétylation des résidus lysines des histones représente un site de fixation pour des protéines non-histones contenant un bromodomaine ; il s'agit d'un motif relié à la reconnaissance des lysines acétylées, retrouvé dans plusieurs facteurs de transcription et régulateurs de la chromatine (Yang, 2004).

L'une des principales fonctions des bromodomains dans la régulation génique est l'acétylation de la chromatine par les HATs. Ainsi, chez *Saccharomyces cerevisiae*, le bromodomaine de l'HAT Gcn5 est nécessaire pour permettre au complexe SAGA (*Spt-Ada-Gcn5-acetyltransferase*) de s'associer à la chromatine acétylée afin d'entretenir l'acétylation (Hassan *et al.*, 2002). Le bromodomaine de Gcn5 reconnaît, en particulier, la lysine 16 acétylée de l'histone H4 (Verdone *et al.*, 2005).

Par ailleurs, les bromodomains contribuent au remodelage nucléosomique dépendant de l'acétylation. Ainsi, chez la levure, le bromodomaine du complexe SWI/SNF permet son association avec les histones H3 et H4 acétylées par Gcn5 (Fry *et al.*, 2001). Chez l'homme, le complexe SWI/SNF s'associe, via son bromodomaine, à la lysine 8 acétylée de l'histone H4 et se combine à la protéine TBP (*TATA box binding protein*) et à ses facteurs associés TAFs (*TBP-associated factors*) ainsi qu'à l'ARN polymérase II pour former un complexe activateur (Adcock *et al.*, 2006).

En conclusion, il semble que les deux mécanismes proposés, neutralisation de la charge positive et recrutement de protéines non-histones, concourent à la régulation de la transcription à travers l'acétylation des histones (Nightingale *et al.*, 2006).

Outre son rôle dans la régulation de la transcription, l'acétylation des histones est associée à divers processus biologiques. Durant la réplication, par exemple, les histones H4 nouvellement synthétisées sont acétylées sur les résidus K5 et K12, une modification qui semble nécessaire à l'assemblage de la chromatine (Strahl *et al.*, 2000).

➤ **Histones acétyltransférases (HATs)**

Les histones acétyltransférases sont réparties en cinq familles (tableau I):

- Les GNATs [*Gcn5 (general control non-derepressible 5)-related acetyltransferases*] qui comprennent HAT1, GCN5 et PCAF.
- Les HATs de la famille MYST (MOZ, Ybf2/Sas3, Sas2 et Tip60).
- Les HATs membres de la famille p300/CBP.

- Les facteurs de transcription généraux à activité HAT tels que la protéine TAFII250 (*TATA-box binding protein associated-factor*) contenue dans le complexe transcriptionnel TFIID.

- Les HATs reliées aux récepteurs hormonaux nucléaires, notamment SRC1 (*steroid receptor coactivator 1*) et ACTR (*activator of retinoid receptor*).

En plus de ces principales familles d'HATs, plus d'une douzaine de protéines ont été identifiées comme possédant une activité HAT (Adcock *et al.*, 2006 ; Carrozza *et al.*, 2003 ; Johnstone, 2002).

Tableau I. Membres des familles d'HATs et leurs substrats correspondants (Adcock *et al.*, 2006).

Familles d'HATs	Substrats
GNATs	
Hat1	H4, H2A
Gcn5 et Gcn5L	H3K9/K14, H2B, c-Myc
Elp3	H3, H4
Hpa2	H3, H4
PCAF	H3, H4, c-Myc, GATA2
MYST	
Esa 1	H4, H2A
Tip60	H4, H2A, c-Myc, AR
MOF	H4K16, H3, H2A
MOZ	
Sas3	H3, H4
Sas2	H4K16
P300/CBP	
P300/CBP	H2A, H2B, H3, H4, p53, p65, AR, ER
Facteurs de transcription généraux HATs	
TAF250	H3, H4
TFIIIC	H2A, H3, H4
HATs reliés aux récepteurs hormonaux nucléaires	
SRC1	H3, H4
SRC3/ACTR	

Les HATs peuvent présenter une spécificité pour des substrats particuliers et la majorité existe dans des complexes formés de plusieurs sous-unités. Les différents composants du complexe représentent les déterminants majeurs de la spécificité de substrat de l'HAT. De plus, l'incorporation des HATs au sein de complexes modifie leur spécificité pour les lysines et augmente leur activité. Ainsi, quand elle isolée, l'enzyme Gcn5 acétyle essentiellement la lysine 14 de l'histone H3, alors que le complexe SAGA, où Gcn5 forme la sous-unité catalytique, acétyle les lysines 9, 14, 18 et 23 de cette histone (Adcock *et al.*, 2006 ; Johnstone, 2002).

Les sous-unités des complexes HATs déterminent les modifications des histones mais aussi la fonction transcriptionnelle, à travers leur fixation sur les facteurs de transcription au niveau des promoteurs. En effet, le facteur de transcription c-Myc, via son cofacteur TRRAP, recrute l'HAT GCN5 au niveau des gènes cibles, permettant à l'oncoprotéine c-Myc de réguler ses gènes cibles et d'induire ainsi la transformation maligne (Carrozza *et al.*, 2003).

En outre, les HATs peuvent acétyle des facteurs de transcription, ce qui augmente généralement l'activité de ces derniers (Johnstone, 2002).

➤ **Histones désacétylases (HDACs)**

Chez l'homme, il existe quatre familles d'HDACs (tableau II) :

- Les enzymes de classe I (HDAC 1, 2, 3 et 8), homologues de la protéine Rpd3 de la levure et exprimés de façon ubiquitaire, sont exclusivement localisés dans le noyau et agissent essentiellement comme corépresseurs transcriptionnels.

- Les enzymes de classe II (HDAC 4, 5, 6, 7, 9 et 10), homologues de la protéine Hda1 de la levure, se déplacent entre le noyau et le cytoplasme, laissant présager des fonctions extranucléaires en régulant l'acétylation de substrats non-histones. Par exemple, l'un des deux domaines désacétylases de HDAC6 s'est révélé capable de désacétyle l' α tubuline et la protéine Hsp90.

Leur distribution variant en fonction des tissus, ces enzymes seraient impliquées dans le développement et la différenciation cellulaire.

L'activité enzymatique des HDACs de classes I et II dépend de leur site actif contenant un ion Zn^{2+} (Adcock *et al.*, 2006 ; Lin *et al.*, 2006).

- Les enzymes de classe III appelées sirtuines (SIRT 1 à 7), homologues de la protéine Sir2 de la levure, requièrent le cofacteur NAD^+ pour exercer leur activité désacétylase, contrairement au HDACs de classes I et II qui utilisent un mécanisme catalysé par le zinc. Cette famille est moins étudiée que les classes I et II. Le rôle de ces enzymes dans les cellules

de mammifères semble essentiellement lié à la désacétylation de protéines non-histones telles que le facteur de transcription p53 (Lin *et al.*, 2006).

- L'enzyme HDAC11 fait partie de la classe IV. C'est la dernière enzyme isolée et caractérisée. Elle partage des homologies de séquence avec les enzymes de classes I et II au niveau de son site catalytique (Adcock *et al.*, 2006 ; Lin *et al.*, 2006).

Tableau II. Membres des familles d'HDACs et leurs substrats correspondants (Adcock *et al.*, 2006).

Familles d'HDACs	Substrats
Classe I (homologues de Rpd3)	
HDAC 1	H2A, H2B, H3, H4, AR, ER, SHP, YY1
HDAC 2	H2A, H2B, H3, H4, GR, YY1
HDAC 3	H2A, H2B, H3, H4, GR, SHP, GATA1, YY1
HDAC 8	H2A, H2B, H3, H4
Classe II (homologues de Hda1)	
HDAC 4	H2A, H2B, H3, H4, GATA1
HDAC 5	H2A, H2B, H3, H4, GATA1
HDAC 6	H2A, H2B, H3, H4, tubuline, SHP
HDAC 7	H2A, H2B, H3, H4
HDAC 9	H2A, H2B, H3, H4
HDAC 10	H2A, H2B, H3, H4
Classe III (homologues de Sir2)	
SIRT 1	
SIRT 2	
SIRT 3	
SIRT 4	
SIRT 5	Protéines non-histones ex. tubuline, p65, p53
SIRT 6	
SIRT 7	
Classe IV (homologue de Rpd3)	
HDAC 11	H2A, H2B, H3, H4

Les HDACs sont des régulateurs clés de plusieurs événements cellulaires fondamentaux, tels que le contrôle du cycle cellulaire, la différenciation et l'apoptose. La dérégulation de leur balance est impliquée dans la tumorigenèse ; citons à titre d'exemple la relation entre les HDACs et la leucémie aigüe promyélocytaire ; ce cancer résulte de translocations chromosomiques qui génèrent des protéines de fusion à partir du récepteur α de l'acide rétinoïque (RAR α , *retinoic acid receptor α*) et de l'une des deux protéines PML (*promyelocytic leukaemia*) (> 95% des cas) ou PLZF (*promyelocytic leukaemia zinc finger*) (~

5% des cas). Ces protéines de fusion provoquent une répression constitutive des gènes cibles de RAR α en y fixant des HDACs avec une grande affinité à tel point que l'acide rétinoïque ne puisse pas détacher les complexes HDACs et lever l'inhibition (Minucci *et al.*, 2006).

En outre, les HDACs semblent présenter des spécificités de substrats et réguler différentes régions du génome. Ainsi, chez la levure Hda1 et Rpd3 désacétylent des régions intergéniques (IGR, *intergenic region*) distinctes (les régions intergéniques correspondent le plus souvent aux promoteurs) (Ekwall, 2005). Rpd3 affecte l'acétylation des IGR de gènes impliqués dans la méiose et le métabolisme des carbohydrates et joue principalement le rôle de répresseur. Une activité particulière a été attribuée à l'enzyme Hda1 au niveau des régions subtélomériques nommées HAST, (*Hda1-affected subtelomeric domains*). Cette région contient plusieurs gènes induits par un stress nutritionnel et des gènes intervenant dans le métabolisme des carbohydrates. Hos1 (HDAC de classe I chez la levure) et Hos3 (HDAC de classe II chez la levure) désacétylent les IGR des gènes qui codent pour l'ARN ribosomal (ARNr) tandis que Hos2 (HDAC de classe I chez la levure) semble affecter les promoteurs des gènes codant pour les protéines ribosomales (Ekwall, 2005 ; Peterson, 2002) (figure 13).

Par ailleurs, les HDACs se caractérisent par une spécificité de substrat. Ainsi, Rpd3 désacétyle préférentiellement les lysines 5, 8 et 12 de l'histone H4, alors que Hos1 et Hos2 affectent principalement la lysine 12 acétylée de l'histone H4 et Hda1 les lysines 9 et 18 acétylées de l'histone H3 et la lysine 16 acétylée de l'histone H2B (Ekwall, 2005 ; Peterson, 2002).

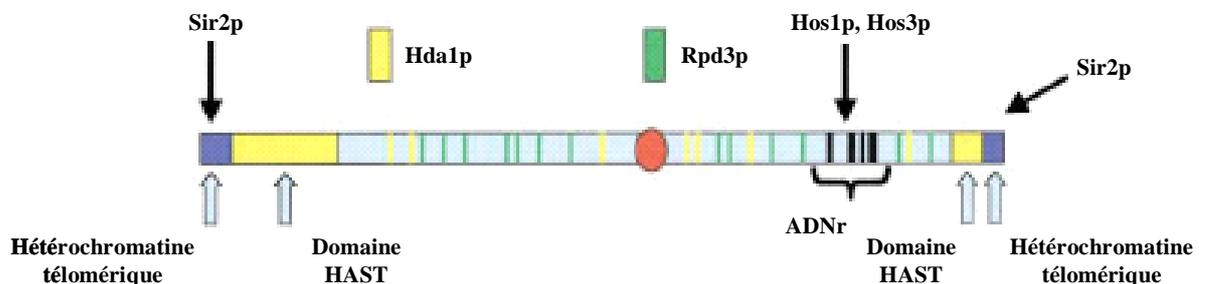


Figure 13. Représentation schématique d'un chromosome de levure montrant les régions régularisées par différentes HDACs (Peterson, 2002).

Les barres colorées représentent des régions intergéniques. Les promoteurs des gènes qui codent pour les protéines ribosomales et qui sont régularisés par Hos2p ne sont pas figurés. L'ovale rouge indique le centromère.

Diverses HDACs existent au sein de larges complexes de plusieurs sous-unités et la quasi-totalité des HDACs interagissent avec d'autres protéines cellulaires. Une protéine quelconque s'associant à une HDAC pourrait activer ou inhiber l'activité enzymatique de celle-ci. De même, les HDACs ne possédant pas généralement la faculté de se lier directement à l'ADN, leur recrutement sur la chromatine par d'autres protéines peut aussi altérer leur activité (Sengupta *et al.*, 2004).

Les enzymes HDAC1 et HDAC2 sont les HDACs les mieux caractérisées et se retrouvent ensemble dans au moins 3 complexes multi-protéiques distincts : le complexe Sin3 (*Switch insensitive 3*), le complexe NuRD (*nucleosome remodeling and deacetylase*) et le complexe CoREST [*Co-repressor of REST (RE1 silencing transcription factor)*] (figure 14) (Adcock *et al.*, 2006 ; Sengupta *et al.*, 2004). L'importance des associations protéiques dans l'activité des HDACs peut être illustrée par l'exemple du complexe NuRD dont l'activité HDAC est sévèrement compromise en l'absence de la protéine MTA2. Par ailleurs, des études récentes suggèrent que les co-répresseurs SMRT (*silencing mediator of retinoid and thyroid receptor*) et N-CoR (*nuclear receptor co-repressor*) fonctionnent comme une plateforme de recrutement des HDACs et que l'interaction entre HDAC3 et SMRT/N-CoR stimule l'activité enzymatique de HDAC3. En fait, il a été montré que l'activité enzymatique de HDAC3 est médiée par un domaine d'activation de la désacétylase (DAD, *deacetylase-activating domain*) présent dans les co-répresseurs SMRT et N-CoR (Sengupta *et al.*, 2004).

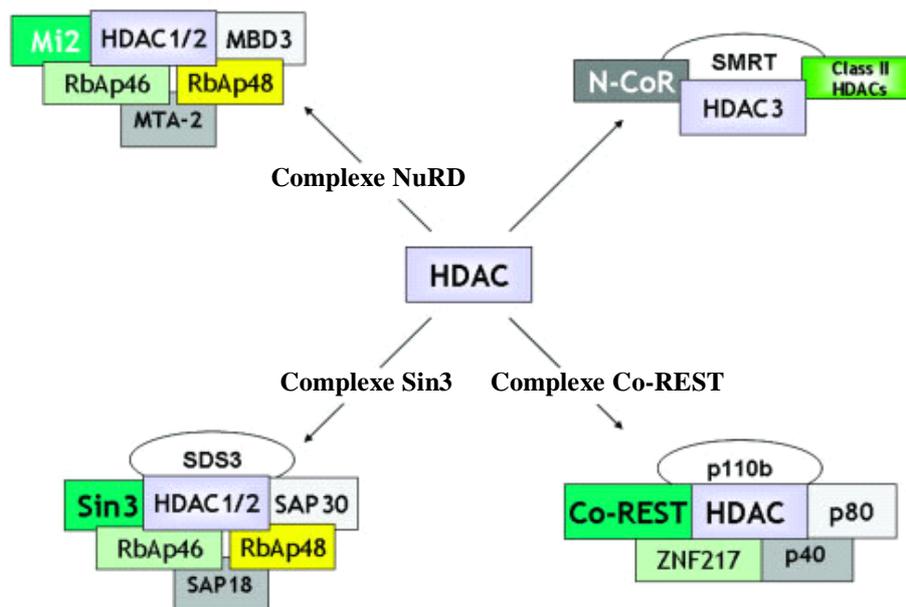


Figure 14. Composition des complexes répresseurs contenant des HDACs (Adcock *et al.*, 2006).

Enfin, plusieurs HDACs sont régulées par des modifications post-traductionnelles. Ainsi, la phosphorylation de HDAC1 peut augmenter son activité enzymatique, par une modulation de sa conformation qui la rend plus active ou en favorisant son interaction avec des protéines telles que MTA2 et SDS3 (Sengupta *et al.*, 2004).

En plus des histones, différentes HDACs peuvent désacétyler des protéines non-histones *in vitro* et *in vivo* (Adcock *et al.*, 2006 ; Sengupta *et al.*, 2004).

6.5.2. Méthylation des histones

Depuis 40 ans, les chercheurs soupçonnent l'implication de la méthylation des histones dans le contrôle de l'expression génique (Allfrey *et al.*, 1964). Cette méthylation est catalysée par des histones méthyltransférases (HMTs) capables de réaliser le transfert d'un groupement méthyle à partir d'une molécule donneuse, le S-adénosyl-méthionine, sur une lysine ou une arginine de la queue N-terminale d'une histone (Bannister *et al.*, 2005 ; Martin *et al.*, 2005). Les HMTs appartiennent à trois familles de protéines distinctes : la famille PRMT (*protein arginine methyltransferase*) qui méthyle les arginines, la famille des protéines à domaine SET (*Su(var)3-9, Enhancer of Zeste, Trithorax*) et les protéines DOT1/DOT1L, ne possédant pas de domaine SET, qui catalysent la méthylation des lysines (Martin *et al.*, 2005).

La méthylation peut altérer l'architecture de la chromatine, en condensant ou en relaxant sa structure. Cependant, le groupement méthyle est relativement petit et son addition à une lysine ou une arginine ne permet pas la neutralisation de leur charge positive. Ainsi, il semble improbable que la méthylation seule affecte significativement la structure de la chromatine. La littérature montre que l'effet de la méthylation résulte du fait qu'elle constitue un site de recrutement de protéines régulatrices contenant des domaines de fixation particuliers appelés chromodomains (Adcock *et al.*, 2006 ; Bannister *et al.*, 2005).

Les chaînes latérales des lysines peuvent être mono-, di- ou tri-méthylées alors que celles des arginines peuvent se présenter sous formes mono- ou diméthylées (symétrique ou asymétrique) (figure 15) (Bannister *et al.*, 2005). Actuellement, 24 sites de méthylation sont connus au niveau des histones (17 résidus lysines et 7 résidus arginines) ce qui laisse présager le grand nombre de combinaisons possibles et donc le vaste potentiel de fonctions que cette modification pourrait avoir (Adcock *et al.*, 2006).

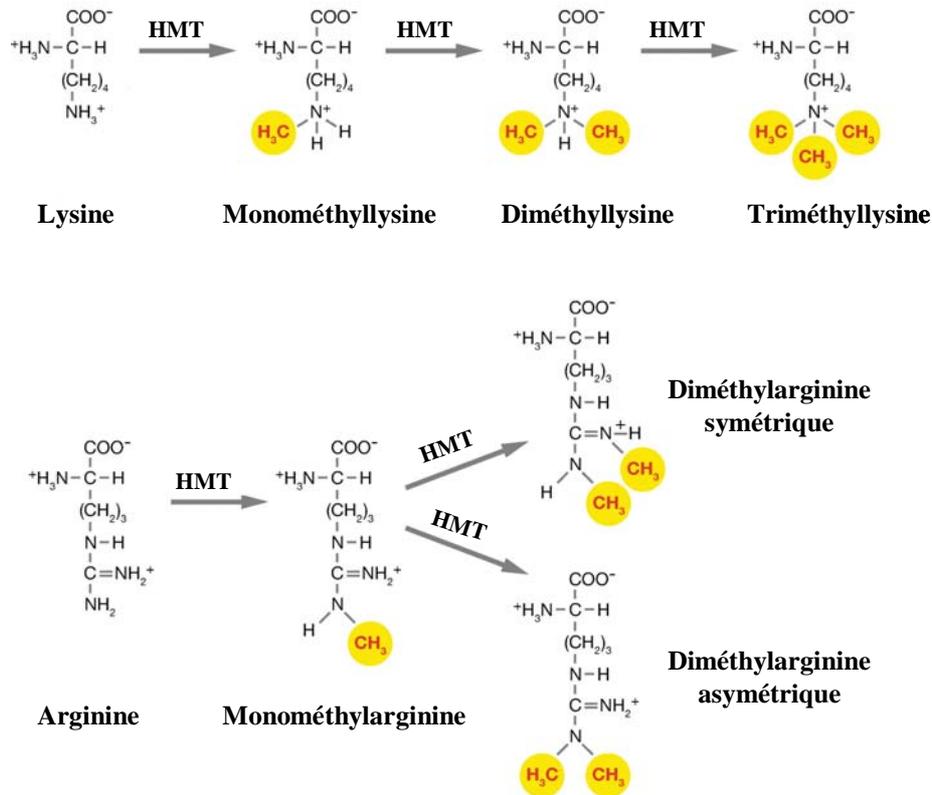


Figure 15. Formes méthylées des résidus lysines et arginines des histones (Shilatifard, 2006).

➤ Méthylation des résidus lysines

Les sites lysines les plus étudiés résident dans la terminaison amine des histones H3 et H4 et se distinguent par leur présence au sein d'un type particulier de chromatine, l'hétérochromatine ou l'euchromatine (Martin *et al.*, 2005). Ainsi, les formes méthylées de H3K9, H3K27, et H4K20 sont essentiellement associées à l'hétérochromatine, alors que les gènes actifs de l'euchromatine renferment des histones H3 méthylées sur les lysines K4, K36 et K79 (Martin *et al.*, 2005). De plus, ces formes méthylées délimitent des sous-domaines dans la chromatine : ainsi, H3K9 tri-méthylées et H4K20 tri-méthylées se concentrent au niveau de l'hétérochromatine péricentrique, tandis que H3K27 tri-méthylée est abondamment retrouvée au niveau du chromosome X inactif. De même, au sein de l'euchromatine, les gènes ont le potentiel d'être actifs et se retrouvent associés aux histones méthylées H3K4 et H3K36. Quand un gène est activé chez la levure, une hyperméthylation des résidus H3K4 et H3K36 est observée, essentiellement au niveau de la terminaison 5' du gène et sous la forme tri-méthylée (Adcock *et al.*, 2006 ; Bannister *et al.*, 2005).

La conséquence fonctionnelle de la méthylation des histones sur leurs lysines dépend des protéines qui reconnaissent une modification donnée. Les protéines qui induisent la répression génique, telles que HP1 (*heterochromatin protein 1*) ou la protéine Polycomb (PC) de la drosophile, contiennent un chromodomaine qui leur permet de reconnaître spécifiquement la marque de méthylation répressive appropriée (H3K9 et H3K27 respectivement), alors que la protéine activatrice Chd1 (*chromodomain helicase DNA-binding protein 1*) utilise son chromodomaine pour se fixer sur la forme activatrice H3K4 méthylée (Adcock *et al.*, 2006 ; Bannister *et al.*, 2005). Récemment, deux autres motifs capables de se lier aux résidus lysines méthylées des histones ont été mis en évidence. Il s'agit du domaine Tudor qui permet à la protéine p53BP1 (*p53-binding protein 1*) de reconnaître H3K79 méthylée et du domaine WD40-repeat de l'activateur transcriptionnel WDR5 qui se lie à H3K4 di- et tri-méthylées (Bannister *et al.*, 2005 ; Martin *et al.*, 2005).

Par ailleurs, le degré de modification d'un résidu lysine revêt également une certaine importance dans le langage des histones. En effet, chez les mammifères, l'hétérochromatine est spécifiquement enrichie en histones H3K9 tri-méthylées, alors que les formes mono- et di-méthylées se retrouvent essentiellement dans des régions euchromatiques (Martin *et al.*, 2005). D'ailleurs, la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3, catalysée par l'HMT Su(var)3-9 chez la drosophile et son homologue Suv39h1 chez l'homme, constitue un marqueur de l'hétérochromatine constitutive mais intervient également dans la répression transcriptionnelle des gènes euchromatiques. Tel est le cas de la protéine Rb (*retinoblastoma protein*) qui inhibe plusieurs gènes de la phase S du cycle cellulaire en recrutant les HMTs Suv39h1 sur leurs promoteurs (Nielsen *et al.*, 2001).

Une étude récente a cependant défié l'idée générale qui lie la méthylation de H3K9 à la répression génique, en démontrant que les régions codantes de plusieurs gènes activés sont enrichies en histones H3K9 tri-méthylées et en protéines HP1 γ (Vakoc *et al.*, 2005) ; il semblerait donc que la méthylation de H3K9 produise des effets différents selon qu'elle ait lieu au niveau des promoteurs ou des régions codantes des gènes (Martin *et al.*, 2005).

Comme il a été mentionné précédemment, la méthylation des histones sur leurs résidus lysines peut avoir un effet activateur. Le principal site de méthylation associé à l'activation génique est la lysine 4 de l'histone H3. L'analyse des différents états de méthylation de H3K4 et leur distribution dans différents organismes indiquent que les formes di- et tri-méthylées

sont abondantes au niveau des gènes actifs. Toutefois, la forme di-méthylée est généralement distribuée sur la partie médiane du gène, tandis que la forme tri-méthylée se localise spécifiquement sur sa partie terminale 5' (Martin *et al.*, 2005 ; Nightingale *et al.*, 2006).

Le mécanisme d'action par lequel cette modification active la transcription est encore mal connu. Néanmoins, la méthylation de H3K4 par Set9 semble, d'une part, inhiber l'association du complexe répresseur NuRD à activité HDAC avec la queue de l'histone H3 et, d'autre part, empêcher la méthylation de H3K9 par Suv39h1 (Nishioka *et al.*, 2002). L'identification des protéines Chd1 et WDR5 qui se lient à H3K4 méthylée confirme le rôle activateur que cette modification joue dans la transcription génique. Chd1 est membre du complexe SAGA dont l'activité HAT permettrait l'activation génique, tandis que WDR5 se lie essentiellement à la forme di-méthylée de H3K4 et semble nécessaire à sa conversion en H3K4 tri-méthylée [WDR5 est membre du complexe MLL (*mixed-lineage leukemia*) à activité H3K4 méthyltransférase] (Martin *et al.*, 2005).

➤ Déméthylation des résidus lysines

Pendant de nombreuses années, la méthylation des histones était considérée comme une marque épigénétique stable et irréversible qui rendait compte du caractère héritable des états ouverts (euchromatine) ou fermés (hétérochromatine) de la chromatine. Cette vision découlait de l'incapacité à mettre en évidence une activité histone déméthylase, d'autant plus que certaines études suggéraient que la demi-vie de la méthylation des histones est similaire à celle des histones elles-mêmes (Bannister *et al.*, 2005).

Cependant, le dogme de l'irréversibilité de la méthylation des histones est maintenant remis en question. La première percée dans ce domaine découle de l'identification d'une enzyme, la PADI4 (*peptidyl-arginine deiminase 4*) qui convertit la méthylarginine en citrulline (Cuthbert *et al.*, 2004). Peu de temps après cette découverte, il a été montré que la protéine LSD1 (*lysine-specific demethylase 1*) connue aussi sous le nom de BHC110, précédemment identifiée comme membre d'un complexe de plusieurs histones désacétylases, est capable de déméthyliser la lysine 4 de l'histone H3 (Martin *et al.*, 2005). Toutefois, la réaction chimique catalysée par LSD1 produit, par oxydation de l'amine, une imine intermédiaire dont la formation nécessite un azote protoné, ce qui rend les lysines mono- et di-méthylées substrats de LSD1, contrairement aux lysines tri-méthylées (Bannister *et al.*, 2005).

La spécificité de déméthylation de LSD1 semble dépendre des protéines qui lui sont associées. En effet, quand l'enzyme LSD1 est associée au cofacteur CoREST, elle déméthyle la lysine 4 de l'histone H3 (une marque de l'euchromatine) (Shi *et al.*, 2005), alors qu'associée au récepteur des androgènes, LSD1 déméthyle la lysine 9 de l'histone H3 (une marque de l'hétérochromatine) (Metzger *et al.*, 2005). Ainsi, l'enzyme LSD1 agit à la fois comme un co-activateur ou un co-répresseur transcriptionnel.

Plus récemment, il a été proposé que la déméthylation des lysines pourrait se faire par hydroxylation des groupes méthyles, réaction catalysée par le domaine JmjC de l'enzyme. La protéine JHDM1A (*JmjC domain-containing histone demethylase 1A*), connue aussi sous le nom de FBXL11, est la première histone déméthylase caractérisée de ce type. Celle-ci déméthyle spécifiquement la lysine 36 de l'histone H3 sous sa forme mono- ou di-méthylée, mais non sous sa forme tri-méthylée. La protéine FBXL10, apparentée à FBXL11 et baptisée JHDM1B, se révèle aussi une H3K36 déméthylase (Tsukada *et al.*, 2006). Aucune protéine capable de déméthyliser les tri-méthyllysines n'a encore été identifiée, bien que la réaction d'hydroxylation des groupes méthyles en soit théoriquement capable. Les histones déméthylases à domaine JmjC pourraient ainsi être des candidats potentiels à la déméthylation des lysines tri-méthylées (Martin *et al.*, 2005).

➤ Méthylation et déméthylation des résidus arginines

La méthylation des résidus arginines est catalysée par les méthyltransférases PRMT1 (*protein arginine methyltransferase 1*) pour l'histone H3 et CARM1 (*co-activator-associated arginine methyltransferase 1*) pour l'histone H4 (Cuthbert *et al.*, 2004). Cette modification est retrouvée au niveau des gènes actifs de la chromatine et est corrélée à l'activation de la transcription (Bannister *et al.*, 2005). En effet, PRMT1 et CARM1 s'associent avec des histones acétyltransférases pour former des complexes co-activateurs nécessaires à la régulation de certains gènes dépendants des facteurs NF- κ B et p53 (Santos-Rosa *et al.*, 2005).

Toutefois, l'enzyme PRMT5 a été identifiée au niveau de certains promoteurs où elle semble jouer le rôle de répresseur transcriptionnel en méthylant les histones (Wysocka *et al.*, 2006).

La méthylation des arginines est renversée par l'arginine désiminase PADI4 qui convertit les arginines mono-méthylées des histones H3 et H4 en citrulline. Elle peut

également transformer les arginines non-méthylées en citrulline (Bannister *et al.*, 2005 ; Nightingale *et al.*, 2006).

6.5.3. Phosphorylation des histones

L'histone H3 représente le principal substrat de phosphorylation. Quand elle est phosphorylée, la sérine 10 (S10) de la queue N-terminale de l'histone H3 peut évoquer des effets complètement opposés : cette modification se produit durant la condensation des chromosomes mais aussi lors de l'activation transcriptionnelle.

En effet, la phosphorylation de la S10 de l'histone H3 est associée à la condensation et à la ségrégation des chromosomes durant la mitose et la méiose. Cette phosphorylation est médiée par les membres de la famille Aurora kinase tels que Aurora B kinase chez les mammifères et la drosophile et Ipl1 kinase chez la levure et les nématodes (Clayton *et al.*, 2003). La phosphorylation de S10 commence à la fin de la phase G2 au niveau de l'hétérochromatine péricentrique, s'étend sur tout le chromosome durant la transition G2-M juste avant la prophase puis est rapidement perdue durant l'anaphase (Hendzel *et al.*, 1997). De même, la phosphorylation des résidus sérine 28 et thréonine 11 de l'histone H3 semble spécifique de la mitose (Santos-Rosa *et al.*, 2005).

En revanche, la sérine 10 phosphorylée sur l'histone H3 joue aussi un rôle important dans l'activation transcriptionnelle chez les eucaryotes. Contrairement à la phosphorylation mitotique de H3, quand la phosphorylation de S10 est induite par des stimuli, tels que des facteurs de croissance ou des inhibiteurs de la synthèse protéique, elle résulte en l'activation des cascades de MAP kinases. Différentes enzymes semblent engagées dans cette modification, notamment la protéine kinase A (PKA), la kinase RSK2 (*ribosomal S6-kinase 2*) activée par la voie ERK et la protéine MSK1 (*mitogen- and stress-activated protein kinase 1*) activée par les voies ERK et p38 MAP kinase (Clayton *et al.*, 2003). De plus, la phosphorylation de la sérine 10 de l'histone H3 agirait d'une façon coordonnée avec l'acétylation des lysines 9 et 14 situées sur la même queue N-terminale (Clayton *et al.*, 2003).

Par ailleurs, certaines études suggèrent que cette modification facilite l'acétylation des lysines en générant des sites d'interactions supplémentaires entre les HATs et la terminaison amine de l'histone (Gcn5 manifeste une affinité 10 fois plus importante pour la sérine 10 de l'histone H3 quand elle phosphorylée). Cette interprétation est corrélée avec l'observation

biologique concluant que la phosphorylation de S10 favorise l'acétylation de K14 et que ces deux modifications agissent en synergie pour activer la transcription (Khorasanizadeh, 2004).

La kinase ATM (*ataxia-telangiectasia mutated*) induit la phosphorylation de la sérine 139 du variant H2A.X, afin de permettre la réparation de l'ADN ayant subi des cassures doubles brins. Cette modification est requise pour l'accumulation et la rétention des protéines de réparation au niveau du site cassé (Loizou *et al.*, 2006).

6.5.4. Ubiquitination et SUMOylation des histones

Les histones H2A, H2B, H3 et H2A.Z peuvent être modifiées par ubiquitination, une réaction qui consiste en une combinaison à l'ubiquitine, une protéine de 76 acides aminés, et ce, grâce à une liaison covalente isopeptidique entre le résidu terminal glycine de l'ubiquitine et un groupe ϵ amine d'une lysine de l'histone (Kao *et al.*, 2003). L'ubiquitination est une réaction à trois étapes mettant en jeu successivement trois enzymes : l'activatrice E1, l'enzyme de conjugaison E2 et la ligase E3 (Khorasanizadeh, 2004). Des sites cibles lysines ont été identifiés au niveau des queues C-terminales des histones H2A (lysine 119) et H2B (lysine 120 chez les vertébrés et lysine 123 chez la levure), alors que les autres sites de liaison à l'ubiquitine restent inconnus. Comme l'acétylation, cette modification est très dynamique et réversible (Kao *et al.*, 2003).

Bien que l'ubiquitination des protéines soit largement associée à la dégradation par le protéasome de la protéine modifiée, l'ubiquitination des histones semble jouer un rôle très différent. En effet, cette modification sur les histones est particulière car elle implique une simple mono-ubiquitination non dégradative, contrairement à la poly-ubiquitination des protéines vouées à la dégradation (Kao *et al.*, 2003).

Il existe plusieurs protéines apparentées à l'ubiquitine, notamment la protéine SUMO (*small ubiquitin-related modifier*) qui lui est identique à 18%. Celle-ci peut être attachée à un résidu ϵ amine d'une lysine de l'histone par SUMOylation. C'est une réaction qui met en jeu une machinerie enzymatique, se rapprochant de celle de l'ubiquitination, dans laquelle se retrouvent une enzyme activatrice E1, une enzyme de conjugaison E2 et peut-être une ligase E3 *in vivo* (Gill, 2004). L'histone H4 est sujette à une modification par SUMOylation ; le site

cible n'a pas encore été identifié mais pourrait résider dans la queue N-terminale de cette histone *in vitro* (Gill, 2004).

Il n'a pas encore été clairement établi si l'ubiquitination et la SUMOylation affectent directement la conformation du nucléosome ou si elles favorisent ou diminuent la fixation de protéines non-histones. Toutefois, l'ubiquitination des histones est généralement associée à l'activation de la transcription alors que la modification des facteurs de transcription et des histones par SUMOylation est corrélée à la diminution de l'expression des gènes (Santos-Rosa *et al.*, 2005).

En effet, la mono-ubiquitination de l'histone H2B chez la levure est nécessaire à la méthylation des lysines K4 et K79 de l'histone H3, deux modifications activatrices. De plus, l'induction de certains gènes nécessite l'addition puis la suppression de l'ubiquitine sur l'histone H2B (Gill, 2004). En effet, la mutation de K123 de l'histone H2B chez la levure induit une diminution de l'expression des gènes Gal1 et Gal10. En revanche, l'enzyme désubiquitinatrice Ubp8, membre du complexe coactivateur SAGA est aussi requise pour une induction optimale de ces 2 gènes. Toutefois, chez la levure, l'ubiquitination de la lysine 123 de l'histone H3 semble réguler aussi l'extinction génique au niveau des télomères (Sun *et al.*, 2002).

La répression transcriptionnelle par l'histone H4 SUMOylée a été attribuée au recrutement des facteurs HDAC1 et HP1 (Shiio *et al.*, 2003). De plus, il a été récemment montré que la SUMOylation de MBD1, une protéine de liaison à l'ADN méthylé, facilite son association avec MCAF1 (*MBD1-containing chromatin-associated factor 1*). Ces deux facteurs sont retrouvés au niveau des régions hétérochromatiques riches en H3K9 triméthylées et HP1 (Uchimura *et al.*, 2006).

6.6. Code des histones

Strahl et Allis ont émis l'hypothèse que différentes modifications d'histones survenant sur une ou plusieurs régions terminales pouvaient agir d'une façon séquentielle ou combinatoire pour dicter une fonction chromatinienne particulière (Strahl *et al.*, 2000). Actuellement, de nombreuses études permettent de confirmer la validité de cette hypothèse et la complexité du code des histones. Bien que les modifications post-traductionnelles des histones influencent diverses fonctions de l'ADN, telles que la réparation, la recombinaison

ou la réplication, le code des histones a été surtout identifié en fonction de son rôle dans la transcription (Fuks, 2006).

La lecture de ce code nécessite la fixation de certaines protéines, dont la liaison à la chromatine est influencée par, ou dépend de modifications particulières des queues des histones. L'exemple le mieux connu est celui de la protéine HP1 (*heterochromatin protein 1*) qui se fixe spécifiquement sur la lysine 9 méthylée de la queue N-terminale de l'histone H3. Cette marque - ou signature - est souvent associée aux régions du génome transcriptionnellement inactives. Il est intéressant de signaler que la fixation de certaines protéines peut être empêchée ou même inversée par les modifications de résidus adjacents (Nightingale *et al.*, 2006).

La « communication » entre les modifications peut avoir lieu en *cis* c'est-à-dire à l'échelle d'une même queue d'histone mais aussi en *trans* donc entre différentes histones d'un même nucléosome ou de domaines nucléosomiques distincts, une notion qui apporte une dimension supplémentaire au code histone. La figure 16 décrit les interactions entre les différentes modifications des histones.

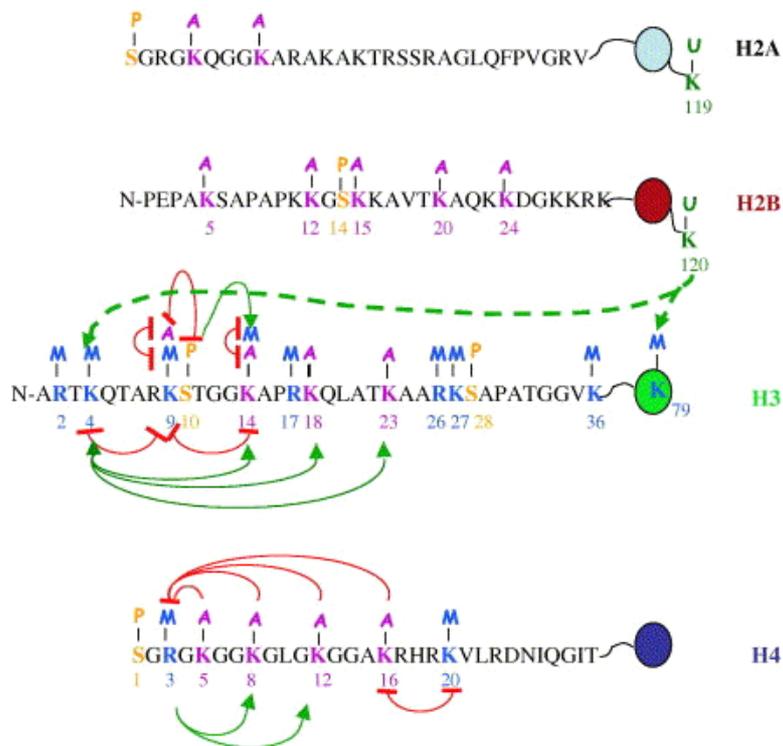


Figure 16. Interactions entre les différentes modifications des histones (adaptée de Santos-Rosa *et al.*, 2005).

Les flèches vertes représentent les modifications synergiques. Les traits rouges indiquent les modifications antagonistes.

Une modification sur un site peut influencer la capacité d'un autre site à être modifié, de manière synergique ou au contraire antagoniste. Ainsi, la phosphorylation de la sérine 10 de l'histone H3 inhibe la méthylation de la lysine 9 de la même histone et vice versa (Fuks, 2006 ; Margueron *et al.*, 2005 ; Santos-Rosa *et al.*, 2005), sauf au niveau des chromosomes mitotiques où ces deux modifications peuvent coexister (Hirota *et al.*, 2005). En effet, H3S10 phosphorylée facilite l'acétylation de H3K9 et/ou H3K14 inhibant par la suite la méthylation de H3K9 (Margueron *et al.*, 2005). Dans ce cas la phospho-acétylation de l'histone H3 est la marque d'une région transcriptionnellement active. Le schéma actuel du code histone s'appuie sur une combinaison de modifications, et non sur une modification isolée, qui conditionne un état particulier de la chromatine. Ce constat découle de plusieurs observations où une même modification est impliquée dans différentes fonctions, comme c'est le cas de la phosphorylation de H3S10 corrélée aussi à la condensation des chromosomes (Hirota *et al.*, 2005). Par ailleurs, cette modification permet à la protéine HP1 de se dissocier de la lysine 9 méthylée adjacente durant la mitose. L'acétylation de la lysine 14 de la même histone consolide l'éjection de HP1 (Nightingale *et al.*, 2006) (figure 17).

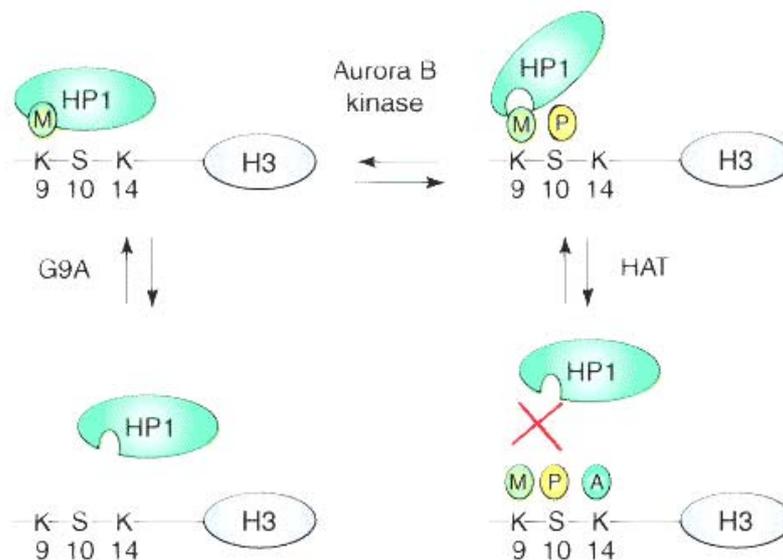


Figure 17. Influence des modifications des histones sur la fixation de HP1 (Nightingale *et al.*, 2006).

Parmi les modifications qui peuvent être permissives ou répressives pour d'autres, l'acétylation des lysines 5, 8, 12 et 16 de l'histone H4 entravent la méthylation par PRMT1 de l'arginine 3 de la même queue N-terminale.

Par contre, l'acétylation par p300 des résidus K8 et K12 de l'histone H4 est favorisée par la méthylation de l'arginine 3 (Fischle *et al.*, 2003).

L'illustration d'une activité *en trans* des modifications épigénétiques peut être réalisée à l'aide de l'exemple suivant où ces modifications agissent d'une façon séquentielle : chez la levure, l'ubiquitination de la lysine 123 de l'histone H2B (homologue de K120 chez l'homme) par Rad6 est requise pour la méthylation subséquente des résidus K4 et K79 de l'histone H3, deux modifications qui dénotent l'ouverture de la chromatine et l'activation de la transcription (Nightingale *et al.*, 2006).

Les modifications des histones peuvent influencer une plage de nucléosomes. Ainsi, il a été proposé que la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 se propageait sur de larges domaines grâce au recrutement du complexe HP1-Su(var)3-9 sur les sites H3K9 méthylés. Par ailleurs, comme il a été signalé précédemment, la méthylation de K4 et K79 sur l'histone H3 nécessite d'abord l'ubiquitination de la lysine 123 de l'histone H2B. Toutefois, chez la levure, 5% de H2B sont estimés ubiquitinés, alors que 35% des H3 totales sont méthylées sur K4 et 90% sur K79. Ainsi, une histone H2B ubiquitinée sur la lysine 123 contrôlerait plusieurs sites K4 et K79 sur différents nucléosomes (Fischle *et al.*, 2003).

6.7. Méthylation de l'ADN

6.7.1. Qu'est-ce que la méthylation de l'ADN ?

La méthylation de l'ADN est la marque épigénétique la mieux caractérisée, associée surtout à la répression transcriptionnelle. Elle résulte de réactions chimiques catalysées par les ADN méthyltransférases (DNMT, *DNA methyltransferase*), dans lesquelles un groupement méthyle, fourni par la S-adénosylméthionine (SAM), est ajouté à une cytosine pour donner une méthylcytosine (Herman *et al.*, 2003) (figure 18).

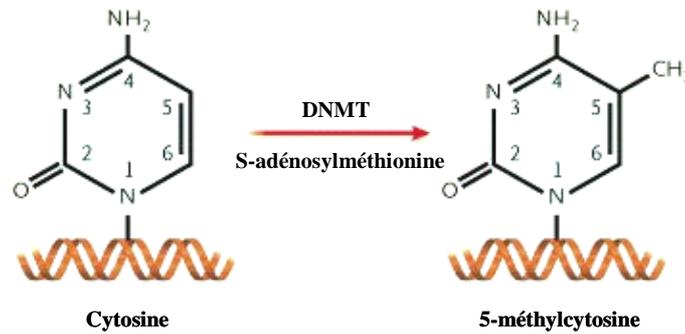


Figure 18. Mécanisme de méthylation de la cytosine au niveau de l'ADN (Herman *et al.*, 2003).

Chez les humains et autres mammifères, cette modification n'affecte que les cytosines suivies d'une guanine dans la séquence d'ADN (les sites ou dinucléotides CpG). La fréquence des dinucléotides CpG dans le génome humain est considérablement inférieure à la fréquence théorique. Ce phénomène résulterait de l'hyperméthylabilité des cytosines méthylées qui, par désamination, se transforment en thymines (Herman *et al.*, 2003 ; Issa, 1999). Ce phénomène de suppression CG est évident tout le long du génome humain à l'exception de quelques régions où la fréquence des sites CpG est identique ou significativement supérieure à la théorie. Ces régions, appelées îlots CpG, se retrouvent fréquemment au niveau des régions promotrices des gènes (environ 50% des gènes chez l'homme sont riches en dinucléotides CpG), sont typiquement non méthylées (alors que 70 à 80% de tous les sites CpG sont méthylés chez l'homme) et échappent ainsi à la mutation cytosine-thymine (Herman *et al.*, 2003 ; Issa, 1999 ; Jaenisch *et al.*, 2003).

Il faut noter que les îlots CpG des promoteurs demeurent non méthylés même quand le gène n'est pas en voie de transcription. Dans de rares cas, ces îlots deviennent méthylés et les gènes qui y sont associés connaissent alors une extinction permanente, transmise aux cellules filles pendant la mitose (Herman *et al.*, 2003).

6.7.2. Méthylation *de novo* de l'ADN

Lorsqu'on se réfère à l'établissement d'un profil de méthylation dans le génome, on parle d'une méthylation *de novo* de l'ADN. Celle-ci a lieu pendant la gastrulation de l'embryon et suit la vague de déméthylation du génome parental qui survient quelques heures après la fécondation. La méthylation *de novo* se manifeste rarement après la gastrulation au cours du développement normal. Toutefois, elle est fréquemment rencontrée durant

l'établissement des lignées cellulaires *in vitro* et dans les tumeurs malines *in vivo*. Les deux principales enzymes responsables de la méthylation *de novo* de l'ADN sont DNMT3A et DNMT3B (Jaenisch *et al.*, 2003).

6.7.3. Méthylation de maintien de l'ADN

La méthylation de maintien décrit les processus qui reproduisent les profils de méthylation dans les différentes générations cellulaires (Bird, 2002) ; pendant la réplication, le statut de méthylation est transmis aux brins d'ADN fils grâce à l'ADN méthyltransférase de maintien DNMT1, laquelle est présente au niveau de la fourche de réplication et reconnaît les sites CpG hémiméthylés (figure 19). Ainsi, le profil de méthylation est fidèlement copié dans l'ADN nouvellement synthétisé au cours des différentes réplifications des cellules somatiques (Miyamoto *et al.*, 2005).

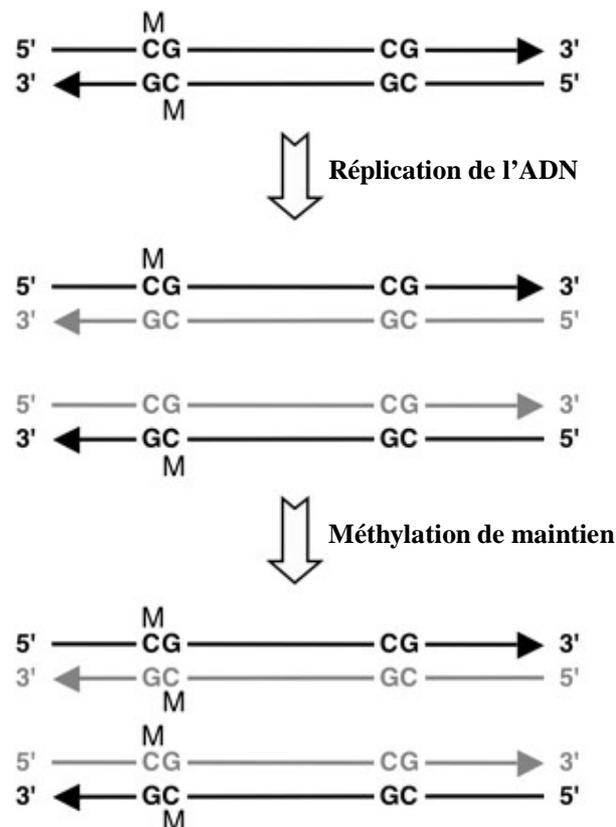


Figure 19. Transmission du profil de méthylation de l'ADN (Miyamoto *et al.*, 2005).

6.7.4. Méthylation de l'ADN et pathologies épigénétiques

La méthylation de l'ADN est liée à plusieurs pathologies épigénétiques dont l'étiologie peut impliquer une hypométhylation, comme le syndrome ICF (immunodéficience, instabilité centromérique, dysmorphie faciale) directement causé par des mutations du gène *DNMT3B*, ou une hyperméthylation de l'ADN notamment dans divers cancers en relation avec la méthylation de gènes suppresseurs de tumeurs tels que *p53*, *Rb* (*retinoblastoma gene*) et *p16* (Digel *et al.*, 2005 ; Egger *et al.*, 2004).

Trois altérations principales du système de méthylation de l'ADN ont été décrites dans les cellules cancéreuses : une hypométhylation globale, une augmentation des taux de DNMT1 et une hyperméthylation des îlots CpG au niveau de certains promoteurs. Ces altérations coexistent souvent dans la même cellule cancéreuse (Issa, 1999).

6.7.5. Méthylation de l'ADN et contrôle de l'expression génique

Comme il a été mentionné précédemment, les îlots CpG sont normalement déméthylés. Ceci est particulièrement important pour les promoteurs riches en dinucléotides CpG, du fait que leur état hypométhylé est essentiel à la transcription des gènes correspondants. La conséquence de la méthylation de l'ADN sur l'expression génique, notamment sur l'inhibition de la transcription, se manifeste à travers quelques exemples où la règle de l'hypométhylation des îlots CpG associés au promoteur n'est pas respectée. Ainsi, deux exceptions semblent importantes et méritent d'être signalées : les gènes du chromosome X inactif et les gènes soumis à l'empreinte parentale. Dans ces deux cas, les promoteurs sont méthylés sur plusieurs dinucléotides CpG résultant en une extinction génique (Digel *et al.*, 2005).

La méthylation de l'ADN emprunte plusieurs mécanismes pour inhiber la transcription. L'un de ces mécanismes est l'exclusion de protéines qui affectent la transcription à travers leur site de fixation à l'ADN. En effet, plusieurs facteurs reconnaissent des séquences contenant des dinucléotides CpG et certains ne peuvent s'y fixer quand les CpG sont méthylés. Un exemple de cette exclusion peut être illustré par la protéine insulatrice CTCF (*CCCTC-binding factor*) qui bloque les interactions entre un *enhancer* et son promoteur quand elle est placée entre ces deux éléments. La méthylation des sites CpG bloque la fixation de CTCF sur l'ADN, permettant ainsi à l'*enhancer* de stimuler l'activité du promoteur. Ce mécanisme est à la base de la régulation du gène *Igf2* soumis à empreinte

parentale : l'allèle maternel du gène *Igf2* est éteint à cause de la fixation du facteur CTCF entre son promoteur et un *enhancer* situé en 3' du locus (Bird, 2002 ; Jaenisch *et al.*, 2003).

Le deuxième modèle de répression est l'opposé du premier et implique des protéines qui sont recrutées et non repoussées par la méthylation de l'ADN.

La famille des protéines MBD (*methyl-binding domain*) est constituée de cinq protéines (MeCP2, MBD1, MBD2, MBD3 et MBD4) caractérisées par le motif MBD qui leur permet de se lier à l'ADN méthylé (Baker *et al.*, 2003). Les protéines MeCP2, MBD1, MBD2 et MBD3 sont impliquées dans la répression transcriptionnelle par leur interaction avec des complexes co-répresseurs contenant des HDACs (figure 20). De plus, il a été récemment montré qu'une autre protéine non apparentée aux précédentes, la protéine Kaiso, se fixe principalement sur l'ADN méthylé et induit une répression transcriptionnelle *in vitro* (Bird, 2002).

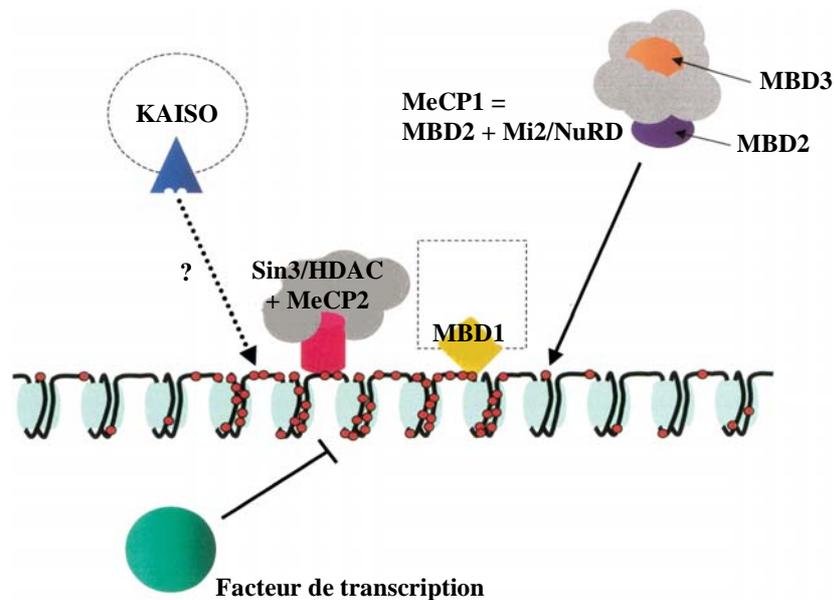


Figure 20. Mécanismes de répression transcriptionnelle par la méthylation de l'ADN (Bird, 2002).

6.8. Coopération entre la méthylation de l'ADN et les modifications des histones

6.8.1. Désacétylation des histones, méthylation de H3K9 et méthylation de l'ADN

L'existence d'une « conversation » épigénétique entre les histones et l'ADN est à présent une notion clairement identifiée. Cette « conversation » concerne la méthylation des cytosines, la désacétylation des histones et la méthylation de H3K9 et aboutit à la répression transcriptionnelle. La séquence exacte des événements en question reste cependant à éclaircir (Fuks, 2005).

D'une part, il est certain que la méthylation de l'ADN influence le profil des modifications post-traductionnelles des histones. Par exemple, les ADN méthyltransférases et certaines protéines MBD recrutent des complexes répresseurs contenant des HDACs. Certaines études proposent que la méthylation de l'ADN soit le facteur responsable de la pérennisation de la répression transcriptionnelle des gènes hyperméthylés dans les tumeurs malignes. De plus, elle agirait comme un système de mémoire cellulaire qui n'est pas directement impliqué dans l'initiation de l'extinction génique mais permet la propagation et le maintien de cet état silencieux (Fuks, 2005 ; Jaenisch *et al.*, 2003).

D'autre part, des données de la littérature suggèrent que la modification des histones soit une condition préalable à la méthylation de l'ADN. Des observations faites chez les champignons, les plantes et les mammifères présentent la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 comme un signal pour la méthylation de l'ADN. En effet, il a été montré que la méthylation de l'histone H3 sur la lysine 9 était nécessaire à la méthylation subséquente de l'ADN (Fuks, 2003 ; Jackson *et al.*, 2002 ; Tamaru *et al.*, 2001). Ces deux mécanismes seraient couplés par la protéine HP1 qui se fixe sur H3K9 méthylée et s'associe à une DNMT. La méthylation de l'ADN serait alors un événement complémentaire dans l'extinction génique et seuls les gènes déjà réprimés par d'autres mécanismes pourraient être méthylés sur les sites CpG (Fuks, 2005) (figure 21).

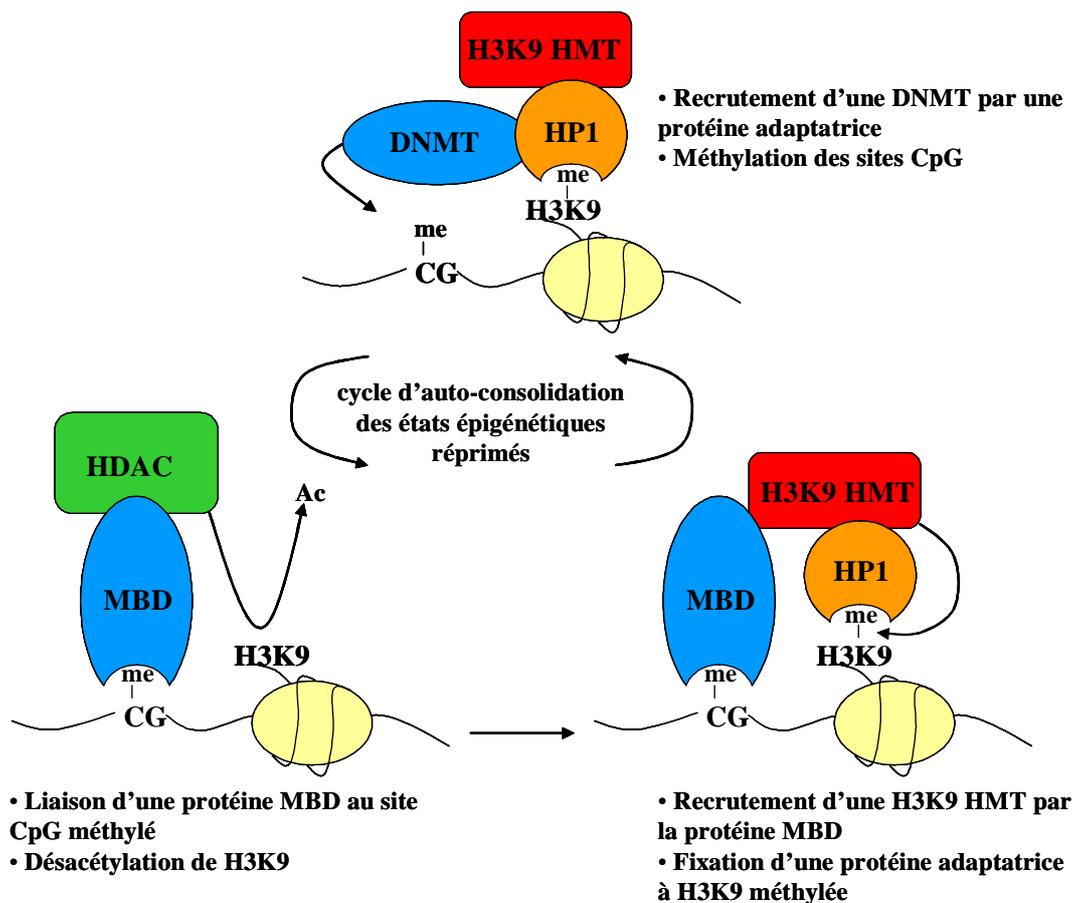


Figure 21. Modèle de cycle d'auto-consolidation des états réprimés de la chromatine (Fuks, 2005).

Par ailleurs il apparaît que l'information épigénétique est transmise des histones à l'ADN à travers la désacétylation des histones. En effet, des études suggèrent que la désacétylation des histones peut dans certaines situations conditionner la méthylation de l'ADN. Ce cas de figure est rencontré dans la leucémie aigüe promyélocytaire où la protéine de fusion PML-RAR induit une répression constitutive des gènes cibles de RAR α , par fixation des HDACs dans un premier temps, puis par recrutement d'enzymes DNMT et H3K9 méthyltransférases dans un deuxième temps, éteignant ainsi les gènes d'une façon permanente (Minucci *et al.*, 2006). Un schéma similaire a été proposé pour expliquer l'inhibition de certains gènes codant pour les ARN ribosomiaux, dont la méthylation de l'ADN dépend de la désacétylation préalable des histones (Santoro *et al.*, 2005). En outre, l'inhibition des HDACs par la TSA résulte en l'hypométhylation de l'ADN chez *Neurospora* (Selker, 1998).

Bien que la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 semble précéder la méthylation de l'ADN, cette dernière exercerait un rétrocontrôle positif sur la méthylation de H3K9, renforçant ainsi l'extinction épigénétique et permettant l'autopropagation de ce cycle pour une répression permanente (Fuks, 2003). En effet, il a été suggéré que la méthylation de l'ADN par les DNMTs permettrait la fixation sur l'ADN de protéines MBD, tels que MeCP2 (*methyl-CpG-binding protein 2*), qui, en retour, recrutent des H3K9 méthyltransférases et favorisent ainsi la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 (Fuks, 2003 ; Fuks, 2005).

En conclusion, ces données confirment l'existence d'un modèle de régulation dans lequel la méthylation de l'ADN fait partie d'un programme épigénétique qui conduit à la répression et implique les évènements suivants : la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 par une H3K9 méthyltransférase crée un site de fixation pour une protéine adaptatrice (probablement HP1), laquelle recrute ensuite une ADN méthyltransférase. Cette dernière catalyserait la méthylation des CpG, ce qui permettrait aux protéines MBD de se fixer à l'ADN. Ces protéines MBD recruteraient des complexes contenant des HDACs qui désacétylent la lysine 9 des histones H3 pour les préparer à une méthylation subséquente. En outre, selon ce modèle, les protéines MBD s'associeraient aussi à des H3K9 méthyltransférases. Des modifications de ce modèle peuvent être envisageables et s'illustrent, à titre d'exemple, par l'interaction directe décrite entre l'ADN méthyltransférase et l'HDAC (Fuks, 2003 ; Fuks, 2005).

6.8.2. Méthylation de H3K27 et méthylation de l'ADN

Outre la méthylation de H3K9, d'autres modifications d'histones pourraient coopérer avec l'ADN méthylé. La méthylation de l'histone H3 sur la lysine 27, une autre marque de répression transcriptionnelle est catalysée par les complexes répresseurs PRC2 et PRC3 (*Polycomb repressive complex*) à activités histones méthyltransférases dont la sous-unité catalytique est la protéine E(Z) (*enhancer of zeste*) à domaine SET (ou son homologue humain EZH2). Parmi les sous-unités qui composent ces complexes, deux autres protéines sont toujours présentes ; il s'agit de la protéine ESC (*extra sex combs*) [(ou son homologue humain EED (*embryonic ectoderm development*))] et de la protéine SUZ12 (*suppressor of zeste-12*) (Kuzmichev *et al.*, 2004 ; Martin *et al.*, 2005). Les protéines EZH2, EED et SUZ12 sont membres du groupe Polycomb (PcG, *Polycomb group*) dont le rôle a été mis en évidence dans l'extinction des gènes homéotiques (ou gènes Hox) durant le développement mais qui

sont aussi impliquées dans d'autres processus tels que l'inactivation du chromosome X et les phénomènes de métastase cancéreuse (Fuks, 2005 ; Martin *et al.*, 2005). H3K27 méthylée est reconnue par une protéine Polycomb à chromodomaine, membre du complexe répresseur PRC1 (*Polycomb repressive complex 1*) dont la fixation induit une répression transcriptionnelle par des mécanismes encore mal connus (Fuks, 2005 ; Martin *et al.*, 2005).

Bien que les données soient encore peu nombreuses, il semble que l'absence de la protéine EED active l'expression des allèles paternels réprimés de certains gènes soumis à empreinte chez la souris, un fait corrélé avec la déméthylation des sites CpG dans les régions DMR (*differentially methylated region*) de ces gènes (Mager *et al.*, 2003). Il serait encore hâtif de proposer un mécanisme par lequel EED influe sur la méthylation de l'ADN ; toutefois, il serait possible que EED, et peut-être d'autres sous-unités des complexes PRC2 et PRC3, contrôlent la méthylation des sites CpG à travers un contact physique avec les ADN méthyltransférases (Fuks, 2005).

6.9. Rôle de la chromatine dans l'expression du gène MDR1

6.9.1. Acétylation des histones et expression du gène MDR1

Certaines données de la littérature suggèrent que le butyrate de sodium (NaBut), un inhibiteur des histones désacétylases (HDAC), augmente l'expression de la glycoprotéine P dans des cellules de carcinome du côlon exprimant normalement cette protéine. Toutefois, cette surexpression de la P-gp n'est pas suivie d'une augmentation de l'efflux des médicaments dans les cellules SW620 mais semble associée à une augmentation de l'accumulation de la vinblastine, contrairement aux cellules HCT-15 où une nette diminution de l'accumulation de la vinblastine a été observée (Bates *et al.*, 1992 ; Mickley *et al.*, 1989). Des études ultérieures démontrent qu'un traitement par le NaBut augmente les taux d'ARNm MDR1 et de la P-gp mais aussi la résistance aux anticancéreux (Frommel *et al.*, 1993). L'origine de la discordance entre ces études n'est pas connue ; toutefois, il apparaît que l'effet du NaBut est spécifique de la lignée cellulaire et que la surexpression de la P-gp est liée à une régulation directe par le NaBut et ne semble pas une conséquence de la différenciation comme il avait été suggéré auparavant. De plus, le NaBut augmente les taux d'ARNm MDR1 et de P-gp, uniquement dans des cellules exprimant déjà un niveau basal de P-gp (Kantharidis *et al.*, 2000). Des études complémentaires ont démontré que l'effet du NaBut sur l'expression de l'ARNm MDR1 est d'origine transcriptionnelle et n'est pas dû à une modification de la demi-

vie de cet ARNm. Par ailleurs, cet effet est temps-dépendant, réversible et dépendant de la boîte CCAAT inversée dans un système de gène reporteur (Morrow *et al.*, 1994).

Les expériences réalisées avec la trichostatine A (TSA), un inhibiteur spécifique des HDACs, ont permis de confirmer que l'expression de la P-gp peut être accrue par l'inhibition des HDACs et que la chromatine joue un rôle clé dans la régulation de la transcription du gène *MDR1*. Jin et Scotto ont montré que la TSA active le promoteur MDR1 à travers la boîte Y et le facteur de transcription NF-Y qui s'y fixe. De plus, ils ont proposé que les facteurs NF-Y et PCAF activent le promoteur MDR1 endogène ou transfecté, à condition que la boîte Y ne soit pas mutée. Enfin, leurs résultats confirment que le facteur NF-Y est requis pour l'expression basale de ce gène de résistance (Jin *et al.*, 1998). D'ailleurs, les nouvelles molécules anticancéreuses ET-743 et HMN-176, en interagissant avec le facteur NF-Y, confirment son importance dans la régulation de la transcription du gène *MDR1* (Friedman *et al.*, 2002 ; Kanzaki *et al.*, 2002 ; Tanaka *et al.*, 2003). Le facteur NF-Y se révèle donc un médiateur central de l'activation du gène *MDR1* et, en recrutant la protéine PCAF dotée d'une activité histone acétyltransférase (HAT), agit, en partie, en relâchant la structure chromatinienne (Friedman *et al.*, 2002).

D'autres inhibiteurs des HDACs se sont révélés inducteurs du gène *MDR1*, notamment le SAHA (*suberoylanilide hydroxamic acid*) dans les cellules leucémiques K562 (Xiao *et al.*, 2005), et le depsipeptide dans différentes lignées cellulaires (Robey *et al.*, 2006 ; Xiao *et al.*, 2005). La surexpression du gène *MDR1*, après traitement par le depsipeptide, a été liée à une hyperacétylation des histones H3 et H4 au niveau du promoteur MDR1 (Xiao *et al.*, 2005). De plus, le depsipeptide augmente l'expression de la glycoprotéine P dans les cellules SW620 d'un carcinome du côlon, dans les cellules mononucléées du sang périphérique (Robey *et al.*, 2006) et dans les lignées cellulaires où une résistance au depsipeptide a été établie (Xiao *et al.*, 2005).

Toutes ces données tendent à démontrer que l'expression du gène *MDR1* est sensible à l'inhibition des HDACs et que sa régulation est étroitement liée à un mécanisme épigénétique dépendant de l'acétylation/désacétylation des histones au niveau de son promoteur.

6.9.2. Méthylation de l'ADN et expression du gène *MDR1*

Plusieurs études ont montré que l'activation du gène *MDR1* dans les cellules résistantes ne résultait pas de différences au niveau de la séquence du promoteur entre les cellules exprimant la P-gp et celles qui sont P-gp négatives (Kantharidis *et al.*, 2000). Dans l'une des premières études analysant la régulation génique à l'aide d'une construction de promoteur *MDR1*/gène reporteur, Ueda *et al* supposaient que les cellules sensibles avaient un promoteur *MDR1* non actif ou faiblement actif, alors que celui des cellules résistantes présentait une forte activité, reflétant les différences d'expression endogène des activateurs dans ces différents types cellulaires. Toutefois, les résultats obtenus ont montré une forte activité du promoteur *MDR1* dans les deux lignées sensible et résistante : l'activité du promoteur transfecté ne reflétait pas celle du promoteur endogène (Ueda *et al.*, 1987). Ces discordances seraient attribuées à des différences de méthylation des résidus CpG entre le promoteur *MDR1* endogène et le promoteur *MDR1* transfecté, une hypothèse qui expliquerait l'expression du gène *MDR1* dans les cellules résistantes contrairement à leurs homologues sensibles (Baker *et al.*, 2003). En effet, plusieurs équipes ont ensuite démontré que le promoteur *MDR1* est protégé grâce à la méthylation de son ADN, dans différentes lignées cellulaires sensibles.

D'une part, le promoteur *MDR1* est hyperméthylé dans la lignée CEM-CCRF P-gp négative alors qu'il est hypométhylé dans sa dérivée résistante CEM-A7 (El-Osta *et al.*, 2002). Une telle différence a aussi été mise en évidence chez des patients atteints de leucémie lymphocytaire chronique (Kantharidis *et al.*, 1997) et de leucémie myéloïde aigue (Nakayama *et al.*, 1998). Il en est de même pour les cellules MCF-7 sensibles en comparaison avec les cellules MCF-7/ADR résistantes (David *et al.*, 2004), ou encore pour les cellules KB/VJ300 résistantes établies à partir de leurs homologues sensibles KB3-1 (Kusaba *et al.*, 1999).

Ainsi, il a été proposé que la déméthylation de l'ADN conditionne l'activité génique dans le contexte du promoteur *MDR1* (Baker *et al.*, 2003).

Par ailleurs, une équipe japonaise a analysé l'influence de la méthylation de l'ADN sur l'expression de la P-gp dans des cellules murines, où le locus *MDR1* humain a été introduit, et qui ont été sélectionnées par la vincristine pour induire une résistance. Il a été noté que la surexpression sélective du gène *MDR1* humain est corrélée au statut de méthylation de son promoteur (Kusaba *et al.*, 1997).

De même, dans les cellules leucémiques humaines HL60 sensibles à la chimiothérapie, l'extinction du gène *MDR1* s'est révélée associée à la méthylation de plusieurs sites CpG dans deux régions distinctes : une aire du promoteur MDR1 et une aire de l'intron 1. La lignée résistante HL60/E8 ne montrant pas une telle méthylation de ces deux régions, une relation de causalité entre la méthylation de l'ADN et l'expression du gène *MDR1* a été suggérée (Desiderato *et al.*, 1997).

D'autre part, l'incubation des cellules sensibles en présence de 5azadC, un inhibiteur des DNMTs, induit la déméthylation des sites CpG du promoteur MDR1 initialement hyperméthylé et inactif, rapprochant ainsi leur profil de méthylation de celui des cellules résistantes. Par ailleurs, le traitement avec la 5azadC résulte en une augmentation des taux d'ARNm MDR1 et de la résistance MDR et en une diminution de l'accumulation de l'anticancéreux (Kantharidis *et al.*, 1997).

La réactivation du promoteur MDR1 est plus marquée quand la déméthylation est couplée à un remodelage chromatinien grâce à l'inhibition des HDACs par la TSA (El-Osta *et al.*, 2002). Cette donnée confirme l'importance des deux mécanismes de régulation épigénétique, la méthylation des sites CpG et l'acétylation des histones, dans la régulation transcriptionnelle du gène *MDR1*.

L'assemblage des nucléosomes dans le contexte d'une méthylation d'ADN interviendrait dans la capacité de l'ADN méthylé à inhiber la transcription plus efficacement que la chromatine non méthylée. Ces structures spécialisées sont probablement rassemblées par des protéines qui se fixent spécifiquement sur les sites CpG méthylés et par des histones désacétylases (Baker *et al.*, 2003).

6.9.3. Connexion ADN méthylé / histones désacétylées au niveau du promoteur MDR1

El-Osta *et al* ont démontré la prédominance de la méthylation de l'ADN sur la désacétylation des histones dans l'extinction du gène *MDR1* (El-Osta *et al.*, 2002). Cette déduction découle de résultats obtenus par la modification épigénétique du promoteur *MDR1* avec la 5-azacytidine (5azaC) et/ou la TSA, dans des cellules sensibles et résistantes à la chimiothérapie. En effet, le promoteur MDR1 des cellules CCRF-CEM sensibles fixe une

grande quantité de protéines MeCP2, lesquelles jouent un rôle primordial dans l'inhibition du gène *MDR1*. De plus la déméthylation de l'ADN par la 5azaC permet de dissocier le répresseur MeCP2 du promoteur et d'induire l'expression, quoique faible, du gène *MDR1*. Par contre, l'hyperacétylation des histones du promoteur *MDR1* après traitement par la TSA n'est pas suffisante pour activer la transcription. En combinant la TSA à la 5azaC, l'expression du gène *MDR1* est fortement induite dans les cellules CCRF-CEM. Ces résultats ont été interprétés de la façon suivante : la méthylation de l'ADN maintient le gène *MDR1* inactif, en rendant la chromatine inaccessible à la machinerie transcriptionnelle. Même en présence d'histones hyperacétylées, le gène *MDR1* est éteint par le complexe répresseur MeCP2-HDAC dépendant de la méthylation de l'ADN. Une déméthylation est donc requise pour détacher le complexe répresseur MeCP2-HDAC, ce qui est accompagné d'une faible acétylation des histones H3 et H4 et d'une réactivation du gène *MDR1* (figure 22). La transcription du gène *MDR1* est plus importante quand la déméthylation du promoteur par la 5azaC est associée à l'hyperacétylation des histones H3 et H4 obtenue grâce à un traitement avec la TSA (Baker *et al.*, 2003 ; El-Osta *et al.*, 2002).

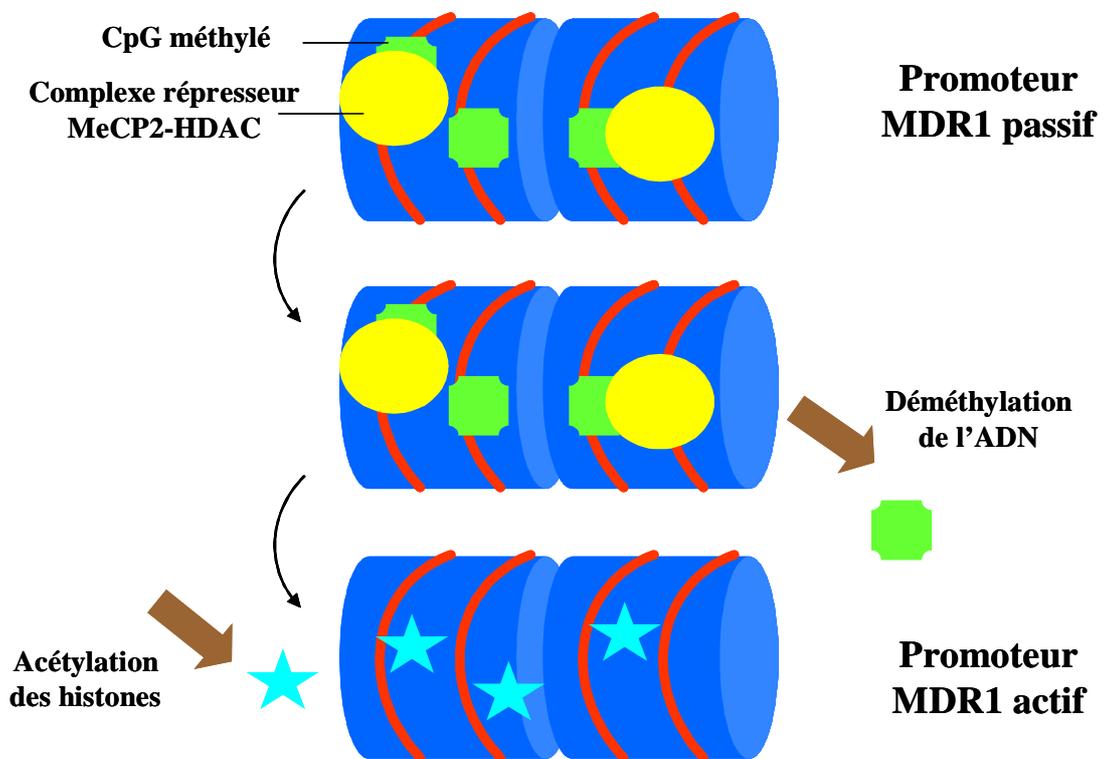


Figure 22. Modèle de mécanisme de contrôle de la transcription du gène *MDR1* en réponse à des modifications épigénétiques (adaptée de Baker *et al.*, 2003).

Somme toute, comme le traitement avec la TSA n'atténue pas la répression transcriptionnelle du gène méthylé, ceci suggère qu'en cas d'hyperméthylation du promoteur MDR1, la répression transcriptionnelle est indépendante de l'activité des HDACs (Kantharidis *et al.*, 2000). Les résultats de Cameron *et al* suggèrent eux aussi que, malgré la synergie d'action entre la méthylation de l'ADN et la désacétylation des histones, la méthylation des îlots CpG est prédominante dans le maintien de ces loci à l'état silencieux (Cameron *et al.*, 1999).

7. Inhibiteurs des HDACs et thérapie anticancéreuse

7.1. Classification des inhibiteurs des HDACs

Etant donné le grand nombre de pathologies, en particulier le cancer, dont l'étiologie est épigénétique [altération de l'expression des gènes qui régulent la différenciation, le cycle cellulaire et l'apoptose, mutations des gènes qui codent pour des HATs, des HDACs ou des protéines qui les recrutent (Mai *et al.*, 2005)], l'utilisation de molécules inhibitrices des HDACs comme nouvelle thérapie anticancéreuse est en plein essor (Adcock *et al.*, 2006). Les inhibiteurs des HDACs de classe III, essentiellement le sirtinol (*Sirt two inhibitor naphthol*), la splitomicine et le nicotinamide, ne faisant pas l'objet de notre étude, nous nous focaliserons sur les inhibiteurs des HDACs de classes I, II et IV, domaine dans lequel les avancées cliniques sont importantes (Mai *et al.*, 2005).

Les inhibiteurs des HDACs sont d'origine naturelle ou synthétique et, hormis quelques exceptions, peuvent être divisés en quatre principales classes chimiques (Dokmanovic *et al.*, 2005 ; Johnstone, 2002 ; Lin *et al.*, 2006) :

- Les acides gras à courte chaîne : butyrate de sodium, phénylbutyrate de sodium, valproate de sodium et AN-9.
- Les dérivés de l'acide hydroxamique : trichostatine A, SAHA (*suberoylanilide hydroxamic acid*), CBHA (*m-carboxycinnamic acid bishydroxamic acid*) et ses dérivés (LAQ-824 et PXD-101) et oxamflatine.
- Les benzamides : MS-275 et CI-994.
- Les peptides cycliques : depsipeptide (FR901228 ou FK-228), apicidine A, trapoxine A et CHAP (*cyclic hydroxamic acid-containing peptide*).

Certains inhibiteurs des HDACs ne correspondent pas à la classification structurale précédente ; tel est, par exemple, le cas d'un époxyde, la dépodécine.

De plus, quelques nouvelles molécules semblent inhiber préférentiellement les HDACs de classe I et d'autres présentent une spécificité pour une HDAC en particulier ; la tubacine, par exemple, est spécifique de l'HDAC6 (Minucci *et al.*, 2006).

Parmi les inhibiteurs des HDACs d'origine naturelle, nous pouvons citer la trichostatine A, le butyrate de sodium, l'apicidine, la trapoxine A, le depsipeptide et la dépodécine. Les inhibiteurs des HDACs synthétiques comprennent le SAHA, l'oxamflatine, le CBHA, le LAQ824, le PXD-101, le MS-275, le CHAP, le CI-994, le phénylbutyrate de sodium et le valproate de sodium (Mai *et al.*, 2005 ; Minucci *et al.*, 2006).

7.2. Effets cellulaires des inhibiteurs des HDACs

La plupart des inhibiteurs des HDACs induisent l'arrêt du cycle cellulaire (essentiellement par induction de p21), la différenciation et/ou l'apoptose (caspase-dépendante et indépendante) *in vitro* et *in vivo*, et plusieurs d'entre eux ont de puissantes activités antitumorales *in vivo*.

L'inhibition des HDACs affecte la transcription d'un pourcentage restreint de gènes (jusqu'à 20% maximum) qui sont alors surexprimés ou sous-exprimés (Minucci *et al.*, 2006).

Outre la transcription, les inhibiteurs des HDACs influencent d'autres phénomènes nucléaires. En effet, dans quelques lignées cellulaires, ils peuvent inhiber la réparation de l'ADN endommagé, augmentant la sensibilité des cellules tumorales à la chimiothérapie et à la radiothérapie (Camphausen *et al.*, 2004 ; Munshi *et al.*, 2005).

Par ailleurs l'action de ces inhibiteurs dépend, en partie, de l'échec des cellules tumorales à activer deux mécanismes de surveillance présents dans les cellules normales : le premier est le point de contrôle en phase G₂ (*G2-phase checkpoint*), qui intervient dans la transition G2-M et se déclenche après la réplication de l'ADN pour empêcher la cellule d'entrer en mitose aberrante. Le second mécanisme est le point de contrôle du fuseau mitotique (*mitotic-spindle checkpoint*), qui, normalement détecte l'alignement incorrect des chromosomes sur le fuseau mitotique et stoppe le cycle cellulaire en métaphase jusqu'à attachement adéquat des chromosomes. La perturbation de ces deux mécanismes résulte en

l'accomplissement d'une mitose abortive et en l'apoptose subséquente des cellules tumorales (Minucci *et al.*, 2006 ; Vermeulen *et al.*, 2003). L'un des modes d'action des inhibiteurs des HDACs serait donc l'accumulation d'ADN endommagé qui, non réparé, entraînera la mort catastrophique de la cellule cancéreuse.

Les inhibiteurs des HDACs n'induisent pas uniquement l'acétylation des histones mais manifestent aussi des effets pléiotropiques sur des substrats non-histones. Quand ces substrats sont eux-mêmes des facteurs de transcription ils pourront éventuellement influencer à leur tour la transcription (Minucci *et al.*, 2006).

Il est intéressant de noter que les cellules normales sont souvent considérablement plus résistantes (10 fois voire plus) que les cellules tumorales à la mort cellulaire induite par ces inhibiteurs (Dokmanovic *et al.*, 2005 ; Minucci *et al.*, 2006). L'origine de cette résistance est encore mal connue, mais semble liée à la libération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS, *reactive oxygen species*). En effet, contrairement aux cellules cancéreuses, après traitement par les inhibiteurs des HDACs seules les cellules normales accumulent la thiorédoxine (TXN ou TRX), un capteur de radicaux libres. Ainsi, les ROS produites à la suite de ce traitement sont neutralisées dans les cellules normales par la TRX, alors que les cellules cancéreuses meurent du fait que leur TRX soit inactivée par sa fixation à la protéine TBP-2 surexprimée en présence d'inhibiteurs d'HDACs (Dokmanovic *et al.*, 2005).

7.3. Inhibiteurs des HDACs en développement clinique

La classe des acides gras à courte chaîne contient des inhibiteurs d'HDACs relativement faibles, actifs à des concentrations de l'ordre du μM . Ces inhibiteurs ont été testés en clinique (AN-9 en essai de phase II ; phénylbutyrate de sodium en essai de phase I ; acide valproïque en essai de phase I/II) mais présentent l'inconvénient d'une courte demi-vie et des doses élevées nécessaires pour induire un effet thérapeutique (Dokmanovic *et al.*, 2005 ; Lin *et al.*, 2006).

Les dérivés de l'acide hydroxamique agissent à des concentrations de l'ordre du nM et ont une demi-vie plus longue que les précédents. La trichostatine A (TSA) est le premier hydroxamate naturel identifié comme inhibiteur des HDACs mais elle n'est pas développée en clinique à cause de sa toxicité (Lin *et al.*, 2006). Certains dérivés synthétiques appartenant à cette classe sont en études cliniques de phases I/II. Le SAHA, par exemple, est un des

inhibiteurs des HDACs les plus avancées en recherche clinique. Deux formes pharmaceutiques différentes ont été testées, orale et intraveineuse. Il s'avère que la forme orale du SAHA a un profil pharmacocinétique plus favorable (demi-vie = 120 min vs 40 min pour la forme IV), donne de meilleurs résultats mais paraît aussi plus toxique. De plus, le SAHA, qui est actuellement en étude clinique de phase II, possède un champ d'action large, du fait qu'il soit efficace dans différentes tumeurs hématologiques et solides à des doses bien tolérées (Dokmanovic *et al.*, 2005 ; Minucci *et al.*, 2006).

Parmi les dérivés benzamides, le MS-275 semble le plus actif, donne des résultats très encourageants *in vitro* et est engagé actuellement dans des essais cliniques de phase I. Les schémas d'administration quotidienne se sont révélés inappropriés à cause de la longue demi-vie du MS-275 (80 heures) et de l'importante toxicité qui en résulte (Dokmanovic *et al.*, 2005 ; Minucci *et al.*, 2006).

Le depsipeptide a déjà été évalué lors d'essais de phase I. Des études cliniques de phase II, en monothérapie ou en combinaison avec d'autres agents anticancéreux sont entreprises et permettront de déterminer son efficacité sur différents types de tumeurs hématologiques et solides (Dokmanovic *et al.*, 2005).

Aucun des inhibiteurs des HDACs testés n'est totalement sans effet clinique, confirmant que les HDACs représentent une cible thérapeutique prometteuse et méritent un développement supplémentaire. Cependant, bien que cliniquement rare, une résistance aux inhibiteurs des HDACs a été rapportée (le depsipeptide est substrat de la P-gp et de la MRP1). En outre, l'effet d'un grand nombre d'antimitotiques est potentialisé par les inhibiteurs des HDACs. Malheureusement, cette synergie dans l'efficacité peut être accompagnée d'effets indésirables rarement ou jamais enregistrés avec ces inhibiteurs quand ils sont administrés seuls. Néanmoins, leur combinaison à d'autres molécules agissant par des mécanismes épigénétiques paraît très intéressante. Citons notamment leur association à des agents déméthylants de l'ADN qui donne de très bons résultats *in vitro* et qui est actuellement en développement clinique (Minucci *et al.*, 2006).

MATERIEL ET METHODES

1. Système biologique

1.1. Lignées cellulaires

1.1.1. Cellules sensibles H69WT

Les cellules H69WT proviennent de l'ATCC (American Type Culture Collection). Cette lignée a été établie à partir du liquide pleural d'un homme Caucasien âgé de 55 ans atteint d'un carcinome pulmonaire à petites cellules non traité (Carney *et al.*, 1985). Ces cellules prolifèrent en suspension sous forme de grappes et leur temps de doublement est de 60 ± 2 heures.

1.1.2. Cellules résistantes H69VP

Les cellules H69VP ont été gracieusement fournies par M. Le Professeur Maxwell SEHESTED (Département de Pathologie, Sundby Hospital, Copenhague, Danemark). Elles ont été sélectionnées en présence d'étoposide à des concentrations croissantes de $0,5 \mu\text{M}$ à $3 \mu\text{M}$ et ont été caractérisées au passage 125 comme surexprimant les gènes MDR1 et MRP1. Leur indice de résistance à l'étoposide est de 17. Ces cellules manifestent une résistance croisée à la vincristine (IR = 8) et à la doxorubicine (IR = 6) (Brock *et al.*, 1995).

L'indice de résistance (IR) est défini par : $\text{IR} = \text{IC}_{50} \text{ cellules résistantes} / \text{IC}_{50} \text{ cellules sensibles}$. L' IC_{50} est la concentration de l'agent pharmacologique induisant une inhibition de croissance de 50%.

Ces cellules croissent en amas et ont un temps de doublement de 38 ± 4 heures.

1.2. Conditions de culture

Les cellules sont cultivées en milieu liquide RPMI 1640/glutamax (Invitrogen, France) supplémenté à 1% (v/v) en antibiotiques à partir d'une solution constituée de 10000 UI/mL de pénicilline G et de 10000 $\mu\text{g/mL}$ de streptomycine (Invitrogen, France), et à 10% en sérum de veau fœtal (SVF) (Invitrogen, France) préalablement décomplémenté (30 min à 56°C). La résistance des cellules H69VP est entretenue en présence de $3 \mu\text{M}$ d'étoposide. Au bout de 3 jours, elles sont observées au microscope inversé et comptées à l'aide de l'hématimètre de Malassez. Leur viabilité est évaluée par la méthode d'exclusion au bleu trypan 0,4%

(Invitrogen, France) : celui-ci est exclu des cellules viables qui demeurent ainsi incolores, contrairement aux cellules mortes qui se chargent de bleu (Boyse *et al.*, 1964).

Les cellules sont cultivées à une concentration initiale de $15 \cdot 10^4$ cellules/mL dans des boîtes de culture de 25 cm^2 (Nunclon, Polylabo, France) contenant du milieu complet. Elles sont remises en culture pendant la phase exponentielle de leur croissance (3-4 jours) et sont maintenues à 37°C dans une étuve saturée en humidité contenant 5% de CO_2 . Avant analyse, les cellules H69VP sont cultivées en absence d'étoposide pendant au moins 48 h. Toutes les manipulations sont faites stérilement sous une hotte à flux laminaire vertical (ESI-FLUFRANCE, Wissous, France).

2. Effecteurs pharmacologiques

2.1. Etoposide ou VP-16 ($\text{C}_{29}\text{H}_{32}\text{O}_{13}$; MM : 588,6)

L'étoposide est une épipodophyllotoxine semi-synthétique, substance extraite d'une plante de la famille des Berbéridacées (rhizomes de *Podophyllum peltatum*) (figure 23). Il s'agit d'un antimitotique qui inhibe la topoisomérase II (Topo II). L'étoposide se fixe sur les complexes ADN-topo II (durant l'étape de clivage de l'ADN par l'enzyme), empêchant ainsi la religation de l'ADN, rendant définitives les cassures double-brin (Baldwin *et al.*, 2005). La solution mère d'étoposide (Sigma-Aldrich, France) est préparée à 30 mM dans le DMSO (DiMéthyl SulfOxyde), aliquotée et conservée à -20°C à l'abri de la lumière.

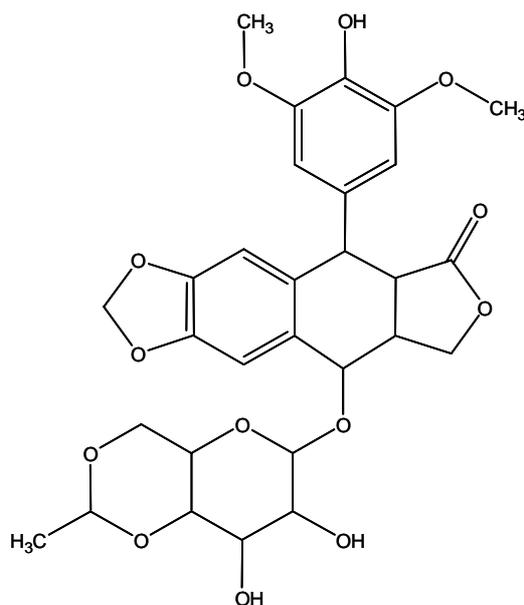


Figure 23. Structure développée de l'étoposide.

2.2. Trichostatine A (TSA) ($C_{17}H_{22}N_2O_3$; MM : 302,4)

Isolée à partir de *Streptomyces hygroscopicus*, la trichostatine A a été d'abord caractérisée comme antifongique dirigé contre *Trichophyton spp.* Environ dix ans plus tard, ses activités différentiantes et antiprolifératives ont été démontrées (Yoshida *et al.*, 2001).

La TSA est un puissant inhibiteur réversible des HDACs de classes I et II. C'est le premier hydroxamate identifié avec un fort pouvoir acétylant (à des concentrations de l'ordre du nM). Elle est formée de 3 motifs distincts : le groupement fonctionnel (acide hydroxamique) chélateur de Zn^{2+} , une chaîne de liaison aliphatique et une coiffe diméthylaminophényle nécessaires au bon positionnement du groupe fonctionnel de la molécule au sein de l'HDAC (figure 24) (Lin *et al.*, 2006 ; Vanhaecke *et al.*, 2004).

La solution mère de TSA (Sigma-Aldrich, France) est préparée à 1 mg/mL dans le DMSO, aliquotée et conservée à $-20^{\circ}C$.

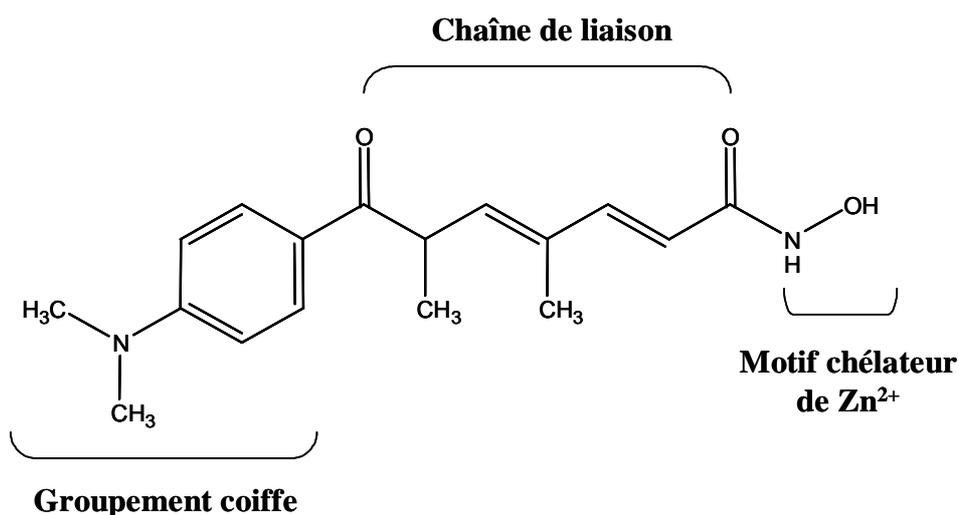


Figure 24. Structure développée de la trichostatine A.

2.3. Butyrate de sodium (NaBut) (C_3H_7COONa ; MM : 110,09)

Le butyrate de sodium est un inhibiteur non spécifique des HDAC de classes I et II d'origine naturelle. Il appartient à la famille des acides gras à courte chaîne qui regroupe des molécules dont l'activité inhibitrice est relativement faible et efficaces à des concentrations de l'ordre du mM (Dokmanovic *et al.*, 2005 ; Gottlicher *et al.*, 2001 ; Lin *et al.*, 2006).

La solution mère de NaBut (Sigma-Aldrich, France) est préparée à 100 mg/mL dans l'eau, aliquotée et conservée à $-20^{\circ}C$.

2.4. Cycloheximide (CHX) ($C_{15}H_{23}NO_4$; MM : 281,4)

Le cycloheximide est produit par *Streptomyces griseus* (figure 25). Sa principale activité est l'inhibition de l'élongation au cours de la traduction chez les eukaryotes ce qui inhibe la synthèse protéique (Cesari *et al.*, 1998 ; Lee *et al.*, 2005).

La solution mère de cycloheximide (Sigma-Aldrich, France) est préparée à 25 mg/mL dans l'éthanol, aliquotée et conservée à $-20^{\circ}C$ pour une durée maximale de trois mois.

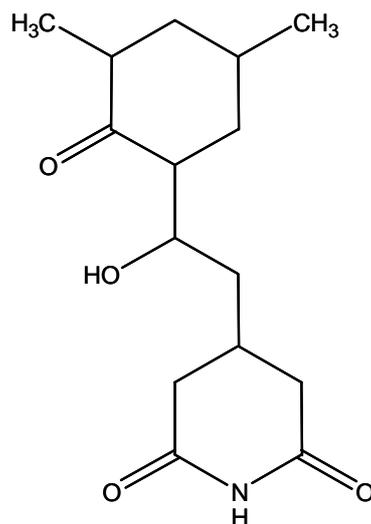


Figure 25. Structure développée du cycloheximide.

2.5. Actinomycine D (ActD) ($C_{62}H_{86}N_{12}O_{16}$; MM : 1255,42)

L'actinomycine D ou dactinomycine est un antibiotique antinéoplasique, agent intercalant de l'ADN qui inhibe la transcription (Wadkins *et al.*, 1996) (figure 26).

La solution mère d'actinomycine D (Sigma-Aldrich, France) est préparée à 1 mg/mL dans le DMSO, aliquotée et conservée à $-20^{\circ}C$ à l'abri de la lumière pour une durée maximale d'un mois.

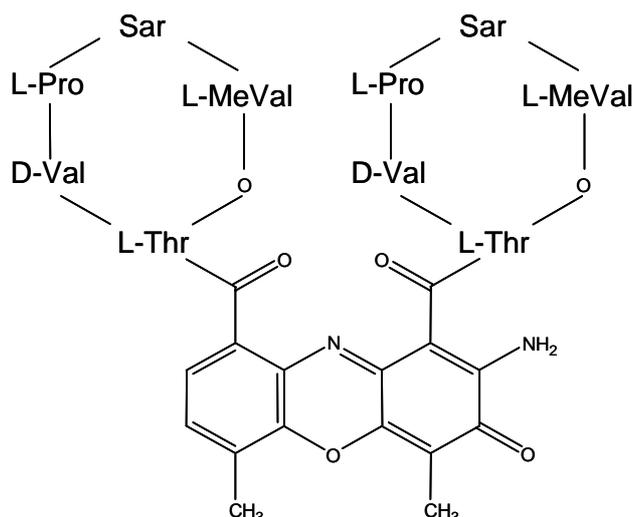


Figure 26. Structure développée de l'actinomycine D.

2.6. 5-Aza-2'-désoxycytidine (5azadC) ($C_8H_{12}N_4O_4$; MM : 228,2)

La 5-aza-2'-désoxycytidine est un agent déméthylant de l'ADN (figure 27). Son incorporation dans l'ADN à la place d'une 2'-désoxycytidine inhibe l'activité de l'ADN méthyltransférase par sa liaison irréversible à l'enzyme (Christman, 2002 ; Juttermann *et al.*, 1994).

La solution mère de 5azadC (Sigma-Aldrich, France) est préparée à 100 mM dans une solution d'acide acétique (Sigma-Aldrich, France) à 5%, aliquotée et conservée à -20°C pour une durée maximale de trois mois.

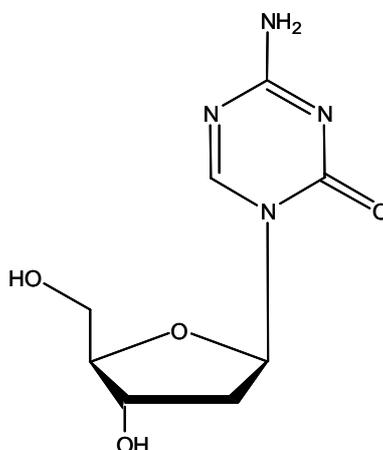


Figure 27. Structure développée de la 5-aza-2'-désoxycytidine.

3. Analyse de l'expression des gènes *MDR1* et *c-jun* par RT-PCR en temps réel (*Reverse-Transcription-Polymerase Chain Reaction*)

3.1. Principe

Après extraction des ARN totaux cellulaires, ces derniers sont transformés en ADN complémentaires (ADNc) par transcription inverse (reverse transcription, RT) lesquels sont ensuite amplifiés par PCR en temps réel. La PCR, est par définition, une réaction en chaîne au cours de laquelle des brins d'ADN néosynthétisés au cours d'un cycle d'amplification servent de matrice pour le cycle suivant. Un cycle de PCR est composé de 3 étapes (dénaturation-hybridation-élongation) et est répété de nombreuses fois au cours de la réaction. Ainsi, la réaction en chaîne aboutit à une accumulation exponentielle théorique de 2^n fois par molécule d'ADN. Autrement dit, la quantité de produits de PCR double à chaque cycle d'amplification suivant la relation mathématique suivante :

$$N = N_0 \times 2^n$$

(où N est le nombre de molécules amplifiées au final, N_0 le nombre initial de molécules et n le nombre de cycles d'amplification).

Le principe de la PCR en temps réel est fondé sur la détection et la quantification d'un signal fluorescent émis par un fluorophore dont l'intensité d'émission est proportionnelle à la quantité de produits amplifiés pendant la PCR. Dans notre étude, le système de détection repose sur l'inclusion d'un agent intercalant, le SYBR[®] Green, dans l'ADN double brin. Au cours de l'hybridation des amorces puis de l'extension réalisée par l'ADN polymérase, cet agent s'intercale entre les deux brins d'ADN nouvellement synthétisés et émet une fluorescence. Cette accumulation progressive de la fluorescence est observée en temps réel à chaque cycle de PCR. Plus la quantité de cibles est importante, plus le nombre de cycles nécessaire pour atteindre une valeur de fluorescence seuil supérieure à la fluorescence du bruit de fond est faible. En effet, au cours des premiers cycles d'amplification, l'intensité de la fluorescence émise est très faible et va permettre de définir le signal de base. Après un certain nombre de cycles, l'accumulation des produits de PCR entraîne une variation mesurable de l'intensité de la fluorescence émise. Le point de départ de la phase exponentielle, phase au cours de laquelle l'efficacité d'amplification est supposée rester constante, est appelée le cycle seuil (*threshold cycle*, Ct). Plus précisément, le cycle seuil est le nombre de cycles pour lequel l'intensité de la fluorescence émise a dépassé une valeur seuil significativement différente du

bruit de fond (figure 28). Le Ct est inversement proportionnel au logarithme décimal du nombre de molécules d'ADN cible initialement présentes avant amplification par PCR (Ameziane *et al.*, 2006 ; Tse *et al.*, 2003). Sa valeur sera utilisée pour la quantification relative de l'ARN des gènes d'intérêt.

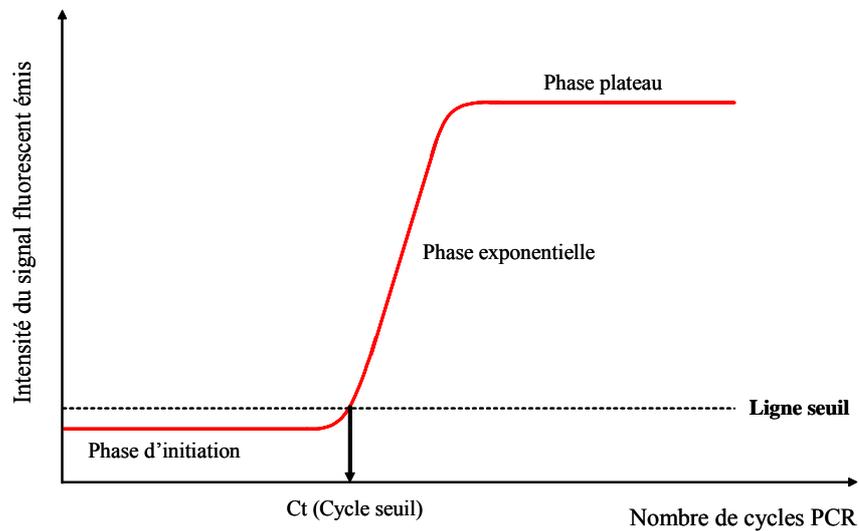


Figure 28. Suivi en temps réel d'une réaction PCR.

3.2. Conditions expérimentales

3.2.1. Modalités de traitement

➤ L'effet de la TSA sur l'expression des gènes *MDR1* et *c-jun* a été étudié sur des cellules incubées en présence de 100 ng/mL TSA pendant 0 h (cellules contrôles), 8 h, 12 h et 24 h.

➤ Le traitement par le NaBut a été effectué avec une concentration de 5 mM pendant 0 h (cellules contrôles), 8 h, 12 h et 24 h.

➤ L'étude de l'effet de la TSA après inhibition de la traduction a nécessité l'incubation des cellules avec :

- Ethanol (solvant du CHX) dilué 2500 fois pendant 1 h puis éthanol dilué 2500 fois + DMSO (solvant de la TSA) dilué 10000 fois pendant 24 h (pour les cellules contrôles).
- Ethanol dilué 2500 fois pendant 1 h puis éthanol dilué 2500 fois + 100 ng/mL TSA pendant 24 h.

- 10 µg/mL CHX pendant 1 h puis 10 µg/mL CHX + DMSO dilué 10000 fois pendant 24 h.
 - 10 µg/mL CHX pendant 1 h puis 10 µg/mL CHX + 100 ng/mL TSA pendant 24 h.
- L'effet de l'actinomycine D sur l'activité de la TSA a été analysé après incubation des cellules avec :
- 5 µg/mL ActD pendant 30 min puis 1 µg/mL ActD (dilution du milieu au 1/5^e) + DMSO (solvant de la TSA) dilué 10000 fois pendant 24 h (pour les cellules contrôles).
 - 5 µg/mL ActD pendant 30 min puis 1 µg/mL ActD (dilution du milieu au 1/5^e) + 100 ng/mL TSA pendant 24 h.
- L'action directe de la TSA sur la stabilité de l'ARNm MDR1 a été étudiée sur des cellules incubées en présence de :
- 5 µg/mL ActD pendant 30 min puis 1 µg/mL ActD (dilution du milieu au 1/5^e) + DMSO (solvant de la TSA) dilué 10000 fois pendant 0 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h et 24 h (pour les cellules contrôles).
 - 5 µg/mL ActD pendant 30 min puis 1 µg/mL ActD (dilution du milieu au 1/5^e) + 100 ng/mL TSA pendant 0 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h et 24 h.
- L'action indirecte de la TSA sur la stabilité de l'ARNm MDR1 a été étudiée sur des cellules incubées en présence de :
- DMSO (solvant de la TSA) dilué 10000 fois pendant 6 h puis 5 µg/mL ActD + DMSO dilué 10000 fois pendant 30 min (administration de l'ActD) puis 1 µg/mL ActD + DMSO dilué 50000 fois (dilution du milieu au 1/5^e) pendant 12 h (pour les cellules contrôles).
 - 100 ng/mL TSA pendant 6 h puis 5 µg/mL ActD + 100 ng/mL TSA pendant 30 min (administration de l'ActD) puis 1 µg/mL ActD + 20 ng/mL TSA (dilution du milieu au 1/5^e) pendant 12 h.
- Le traitement des cellules avec la 5azadC et l'association 5azadC + TSA a été réalisé selon le protocole suivant :
- 5% acide acétique (solvant de la 5azadC) dilué 50000 fois pendant 24 h puis rajout de 5% acide acétique dilué 50000 fois pendant 24 h puis changement du milieu et rajout de 5% acide acétique dilué 50000 fois pendant 24 h puis incubation dans du milieu

neuf pendant 9 h puis incubation pendant 24 h en présence de DMSO (solvant de la TSA) dilué 10000 fois durant les 8 dernières heures ou durant les 24 h (pour les cellules contrôles).

- 5% acide acétique (solvant de la 5azadC) dilué 50000 fois pendant 24 h puis rajout de 5% acide acétique dilué 50000 fois pendant 24 h puis changement du milieu et rajout de 5% acide acétique dilué 50000 fois pendant 24 h puis incubation dans du milieu neuf pendant 9 h puis incubation pendant 24 h en présence de TSA 100 ng/mL durant les 8 dernières heures ou durant les 24 h.
- 5azadC 2 μ M pendant 24 h puis rajout de 5azadC 2 μ M pendant 24 h puis changement du milieu et rajout de 5azadC 2 μ M pendant 24 h puis incubation dans du milieu neuf pendant 9 h puis incubation pendant 24 h en présence de DMSO dilué 10000 fois durant les 8 dernières heures ou durant les 24 h.
- 5azadC 2 μ M pendant 24 h puis rajout de 5azadC 2 μ M pendant 24 h puis changement du milieu et rajout de 5azadC 2 μ M pendant 24 h puis incubation dans du milieu neuf pendant 9 h puis incubation pendant 24 h en présence de TSA 100 ng/mL durant les 8 dernières heures ou durant les 24 h.

3.2.2. Extraction des ARN

Les ARN totaux sont extraits selon la méthode de Chomczynski (Chomczynski *et al.*, 1987) à l'aide du réactif Tri ReagentTM (Sigma-Aldrich, France). Les cellules préalablement lavées au PBS, sont lysées par 1 mL de réactif Tri ReagentTM (Sigma-Aldrich, France) puis incubées 10 min dans la glace. Après addition de 0,2 mL de chloroforme froid, le mélange est agité au vortex pendant 15 s, incubé 15 min dans la glace, puis centrifugé 20 min à 4⁰C à 12000 g. La phase aqueuse supérieure contenant les ARN, est ensuite transférée dans 0,7 mL d'isopropanol froid. Après agitation, les ARN sont précipités une nuit à -20⁰C. Le précipité d'ARN est récupéré après centrifugation 10 min à 4⁰C à 12000 g, puis lavé avec 1 mL d'éthanol à 75%. Après centrifugation pendant 5 min à 4⁰C à 7500 g, le précipité est séché à l'air puis repris dans 50 μ L d'eau exempte de DNase et de RNase. Le culot, délicatement agité, est placé 5 min à 65⁰C puis aussitôt dans la glace.

3.2.3. Contrôle de la qualité et quantification des ARN

Avant chaque RT-PCR, les ARN extraits sont contrôlés puis quantifiés. L'intégrité des ARN est contrôlée par électrophorèse en gel d'agarose à 2% dans du TBE 1X (solution tampon Tris Borate EDTA) en présence de 0,05 µg/mL de bromure d'éthidium, après addition du tampon de charge aux échantillons pendant 1 h à 80 V. La présence de 2 bandes nettes et distinctes après révélation sous ultraviolets (UV) reflète la qualité des ARN ribosomiaux majoritaires (18S et 28S) et donc, par extrapolation, la qualité des ARN totaux.

Les ARN ne répondant pas à ces conditions sont exclus de toute analyse par RT-PCR.

Les ARN sont dosés par spectrophotométrie à 260 nm. La contamination protéique est estimée par une lecture à 280 nm. Le rapport DO_{260}/DO_{280} doit être compris entre 1,9 et 2. Un rapport inférieur à 1,9 signifie la présence de contaminants protéiques. S'il est supérieur à 2, il existe une contamination par l'isothiocyanate de guanidine (composé présent dans le réactif Tri ReagentTM).

3.2.4. Transcription inverse (RT)

Toutes les manipulations sont effectuées dans la glace. Le volume réactionnel final est de 20 µL. 1 µg d'ARN est mélangé avec 1 µL d'oligodésoxynucléotides (dNTP) à 10 mM chacun (Invitrogen, France) et 0,25 µg de Random Hexadésoxynucléotide primers (RH) à 500 ng/µL (Boehringer, France). Le volume est ajusté à 12µL avec de l'eau distillée ultra-pure, le tout est mis à chauffer à 65°C pendant 5 min, puis les tubes sont tout de suite déposés dans la glace. Un mélange contenant 4 µL du tampon 5X (Invitrogen, France), 2 µL de DTT (dithiotreitol) à 0,1 M (Invitrogen, France) et 1 µL d'inhibiteur de ribonucléases RNaseOUTTM (Invitrogen, France) est ajouté à chaque tube avant une incubation à 37°C pendant 2 min. 1 µL (200 unités) de la transcriptase inverse M-MLV (Invitrogen, France) est alors additionné puis les échantillons sont incubés dans le thermocycleur pendant 10 min à 25°C (hybridation des amorces sur l'ARN), 50 min à 37°C (élongation du brin d'ADNc) et 15 min à 70°C (dénaturation de l'enzyme), successivement. Les ADNc synthétisés sont stockés à -20°C jusqu'à leur utilisation.

Dans chaque série de RT, un témoin sans ARN (blanc de RT) est réalisé pour vérifier l'absence de contamination par un ARNm étranger ou par d'autres produits post-PCR.

3.2.5. PCR en temps réel

Toutes les réactions de PCR en temps réel ont été réalisées dans des tubes capillaires (Roche, France) à l'aide du kit QuantiTect™ SYBR® Green PCR (Qiagen, France). Ce kit est composé d'eau ultra-pure et de la solution QuantiTect™ SYBR® Green PCR Master Mix 2x qui contient, entre autres, la Taq ADN polymérase *hot start*, le tampon correspondant où l'ion Mg²⁺ est déjà présent à une concentration suffisante pour avoir 2,5 mM de Mg²⁺ dans les tubes réactionnels, le SYBER green I et un mélange de dNTPs. L'appareil de PCR en temps réel utilisé est le LightCycler® (Roche Diagnostics, France). Les taux d'expression de l'ARNm MDR1 ou c-jun ont été normalisés par rapport à ceux de 18S. Cette expression relative est donnée par le rapport suivant :

$$2^{\Delta Ct \text{ gène d'intérêt}} / 2^{\Delta Ct \text{ 18S}} \quad (\Delta Ct = Ct \text{ échantillon contrôle} - Ct \text{ échantillon traité})$$

Le rapport est égal à 1 pour l'échantillon contrôle.

Dans chaque série de PCR, un témoin sans ADNc (blanc de PCR) est réalisé pour vérifier l'absence de contamination par d'autres produits post-PCR. De plus, une courbe standard est établie à partir de 4 dilutions en série d'une solution d'ADNc contenant le gène d'intérêt afin d'obtenir, à partir de sa pente, l'efficacité de la PCR. Celle-ci est définie comme étant la proportion moyenne des molécules d'ADN cible se dupliquant à chaque cycle. Elle est déterminée par l'équation suivante :

$$\text{Efficacité} = [10^{(-1/\text{pente})}] - 1$$

Une efficacité de 100% correspond à une pente de -3,32.

La spécificité de l'amplification et l'absence de dimères d'amorces ont été confirmées par l'analyse de la courbe de fusion (*melting curve*) obtenue après dénaturation des produits post-PCR à 95°C pendant 15 s suivie d'un refroidissement à 65°C pendant 30 s puis d'un chauffage lent (0,05°C/s) jusqu'à 95°. Cette courbe permettra de déterminer la température de fusion du produit amplifié.

➤ Conditions de la PCR des ADNc MDR1

Le mélange réactionnel contient 10 µL de QuantiTect™ SYBR® Green PCR Master Mix (Qiagen, France), 500 nM d'amorces (Proligo, France), 2 µL d'ADNc dilué 4 fois et suffisamment d'eau pour avoir un volume final de 20 µL. Les séquences des amorces utilisées sont les suivantes :

MDR1 :

Amorce sens : 5'-CCCATCATTGCAATAGCAGG-3'

Amorces antisens : 5'-GTTCAAACCTTCTGCTCCTGA-3'

L'amplicon a une taille de 157 pb.

La PCR est réalisée selon le protocole suivant : une incubation à 95°C pendant 15 min pour activer la Taq ADN polymérase HotStart et 35 à 45 cycles d'amplification : 95°C pendant 30 s (dénaturation), 59°C pendant 30 s (hybridation) et 72°C pendant 30 s (élongation).

➤ **Conditions de la PCR des ADNc c-jun**

Le mélange réactionnel contient 10 µL de QuantiTect™ SYBR® Green PCR Master Mix (Qiagen, France), 250 nM d'amorces (Proligo, France), 2 µL d'ADNc dilué 10 fois et suffisamment d'eau pour avoir un volume final de 20 µL. Les séquences des amorces utilisées sont les suivantes :

c-jun :

Amorce sens : 5'-AACGACCTTCTATGACGATGCCCTC-3'

Amorces antisens : 5'-GCGAACCCCTCCTGCTCATCTGTC-3'

L'amplicon a une taille de 299 pb.

La PCR est réalisée selon le protocole suivant : une incubation à 95°C pendant 15 min pour activer la Taq ADN polymérase HotStart et 35 à 45 cycles d'amplification : 95°C pendant 30 s (dénaturation), 60°C pendant 30 s (hybridation) et 72°C pendant 30 s (élongation).

➤ **Conditions de la PCR des ADNc 18S**

Le mélange réactionnel contient 10 µL de QuantiTect™ SYBR® Green PCR Master Mix (Qiagen, France), 500 nM d'amorces (Proligo, France), 2 µL d'ADNc dilué 10000 fois et suffisamment d'eau pour avoir un volume final de 20 µL. Les séquences des amorces utilisées sont les suivantes :

18S :

Amorce sens : 5'-AGTGACGAAAATAACAATACAGGACTCT-3'

Amorces antisens : 5'-CCCTCCAATGGATCCTCGTT-3'

L'amplicon a une taille de 91 pb.

La PCR est réalisée selon le protocole suivant : une incubation à 95°C pendant 15 min pour activer la Taq ADN polymérase HotStart et 32 cycles d'amplification : 95°C pendant 20 s (dénaturation), 60°C pendant 20 s (hybridation) et 72°C pendant 20 s (élongation).

4. Etude de la texture nucléaire par cytométrie en images

4.1. Principe de la cytométrie par analyse d'images

De la préparation cytologique aux résultats chiffrés, l'information (l'image) subit des transformations dont la séquence correspond à un ordre logique. Les principales étapes sont :

- L'acquisition de l'image
- La numérisation de l'image
- La segmentation de l'image
- La paramétrisation
- L'analyse statistique et la présentation des résultats

L'acquisition est l'étape au cours de laquelle les variations d'intensité lumineuse dans la scène observée (champ du microscope) vont être transformées par le capteur (une caméra vidéo CCD) en un signal électrique.

La numérisation va consister à transformer ce dernier en une suite de valeurs numériques, traduisant les différentes intensités du signal au sein de la scène observée.

La segmentation permet de définir dans l'image les objets (cellules) qui devront être reconnus et analysés. C'est l'étape la plus délicate de l'analyse d'images car de sa qualité dépendront tous les résultats.

Une fois les zones d'intérêt convenablement définies, il devient possible de faire des mesures à partir du contenu de l'image. Cette étape correspond à la paramétrisation. Ces mesures peuvent être classées dans diverses catégories :

- Morphométrie : mesure de la forme et des dimensions des structures
- Densitométrie : mesure de la quantité de substance
- Spectrométrie : mesures colorimétriques
- Texture : mesure de la distribution spatiale en matériel

L'analyse statistique est l'étape finale de l'analyse. C'est elle qui va permettre de tirer tous les bénéfices des traitements précédents. Elle fournit une information objective et quantitative de l'image.

4.2. Application de la cytométrie en images à l'étude de la texture nucléaire

La texture du noyau décrit les faciès de la chromatine avec trois attributs différents : sa condensation, sa distribution et son organisation dans le noyau (figure 29).

La condensation de la chromatine concerne le degré de compaction des segments de chromatine.

La distribution de la chromatine concerne la proportion relative des différents degrés de compaction de la chromatine.

L'organisation de la chromatine concerne l'arrangement topographique des divers degrés de condensation de la chromatine.

La densité optique intégrée (DOI) est la somme de tous les pixels de l'image du noyau et est directement liée au contenu total en ADN nucléaire. Elle permet donc de construire un histogramme de répartition des cellules en fonction de leur contenu en ADN. Ceci permet de mesurer la distribution des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire. Les valeurs des paramètres de texture étant liées à la phase du cycle de la cellule étudiée, des comparaisons ne peuvent donc être effectuées qu'entre noyaux de cellules appartenant à la même phase du cycle. Le tableau III décrit les différents paramètres de texture analysés dans cette étude.

4.3. Conditions expérimentales

4.3.1. Préparation, fixation et coloration des cellules

Les cellules sont incubées en présence de 100 ng/mL TSA pendant 0 h (pour les cellules contrôles), 8 h, 12 h et 24 h. Elles sont cytocentrifugées à 40 g pendant 5 min sur des lames préalablement dégraissées à raison de 50000 cellules/lame. Les lames sont ensuite plongées dans le mélange de fixation (alcool à 95% (v/v) – formol (Sigma-Aldrich, France) à 3% dans du NaCl 0,9% (3/1)) pendant 10 min, rincées dans 3 bains successifs d'alcool à 95% (v/v) pendant 5 min chacun puis séchées à l'air.

La coloration cytochimique dite de « Feulgen » permet de détecter l'ADN de façon spécifique et stœchiométrique. Elle est précédée d'une hydrolyse acide dans une solution HCl 5 N pendant 30 min à température ambiante. Cette hydrolyse entraîne la dépurination de l'ADN, rendant accessibles les désoxyriboses et faisant apparaître des groupements aldéhydes

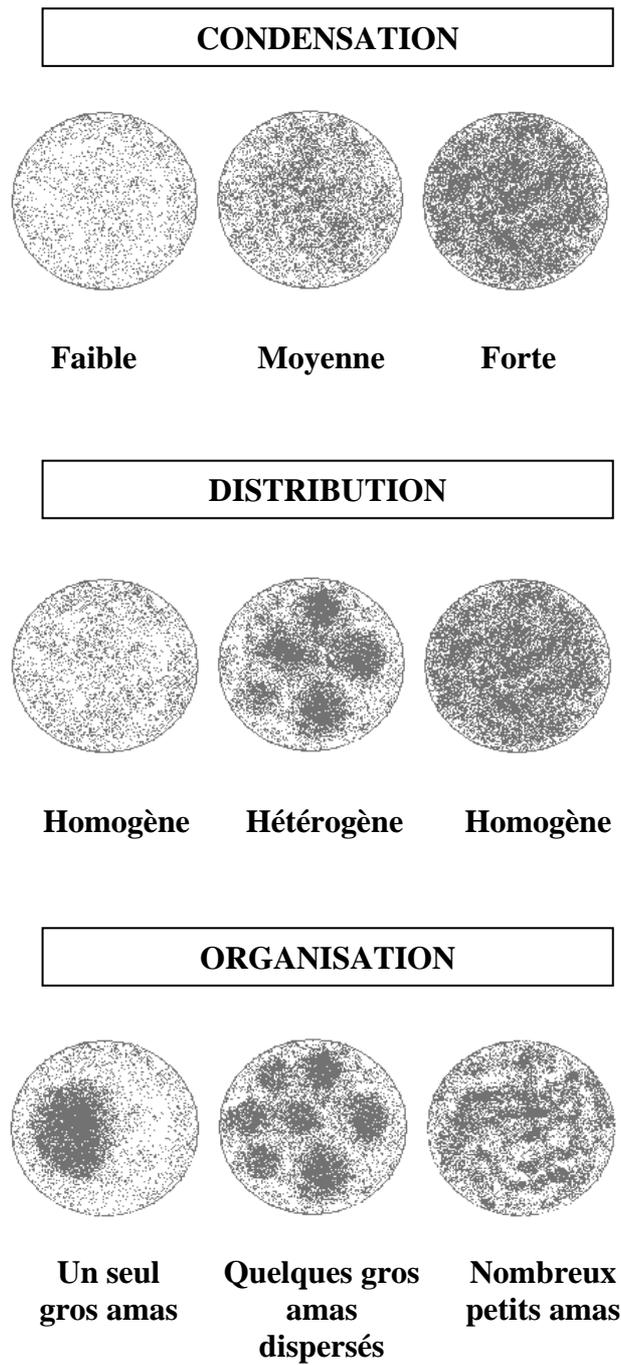


Figure 29. Description du faciès chromatinien : quelques exemples (Giroud, 1987).

Tableau III. Description des paramètres de texture (Giroud, 1987).

Histogramme des densités optiques

Densité optique moyenne	DOM	Elle mesure la concentration en ADN par unité de surface nucléaire. Elle augmente avec la condensation de la chromatine.
Déviati on standard des densités optiques	DSDO	Elle mesure l'hétérogénéité de la distribution des différents degrés de condensation de la chromatine quels que soient les degrés de condensation de la chromatine et leur organisation. Elle augmente avec une distribution plus hétérogène de la chromatine.

Matrice de co-occurrence

Moyenne locale	ML	Elle donne une estimation globale de la condensation de la chromatine. Elle augmente avec la condensation.
Energie	E	Elle exprime la distribution de la chromatine plutôt que la condensation. Elle diminue avec une distribution plus compacte et augmente avec une distribution plus homogène
Entropie	ENT	Ces deux paramètres mesurent le contraste dans une image. Ils augmentent avec le contraste.
Inertie	I	

Matrice des longueurs de sections

Importance des courtes sections	ICS	Ces paramètres mesurent la distribution des longueurs de sections qui dépendent de l'organisation de la chromatine. ILS augmente et ICS diminue quand la texture de la chromatine est finement granulaire et homogène. Les variations sont inversées quand la texture est hétérogène avec de gros amas.
Importance des longues sections	ILS	
Distribution des niveaux de gris	DNG	Elle mesure l'uniformité de la distribution des niveaux de gris parmi les longueurs de sections.
Distribution des longueurs de sections	DLS	Ce paramètre augmente avec l'homogénéité des longueurs de sections.
Pourcentage des longueurs de sections	PLS	Ce paramètre conduit à des interprétations similaires qu'avec ICS.

qui vont réagir avec le réactif de Schiff pour donner une coloration rose-rougeâtre (Auer *et al.*, 1989). Celui-ci est préparé à partir de 1 g de chlorure de pararosaniline (Sigma-Aldrich, France) dilué dans 180 mL d'eau distillée, 2 g de métabisulfite de sodium (Sigma-Aldrich, France) et 1 mL de HCl 37%. Après agitation et filtration, le volume final est ajusté à 200 mL avec de l'eau distillée et 2 g de charbon actif (Prolabo, France) sont ajoutés. Après une nouvelle agitation, la solution est conservée à 4°C à l'abri de la lumière et utilisée 48 h plus tard après l'avoir filtrée deux fois au moment de l'utilisation. Les frottis fixés et hydrolysés sont placés pendant 2 h à l'obscurité dans le réactif de Schiff, puis sont rincés dans 3 bains successifs d'eau bisulfiteuse préparée extemporanément (20 mL de bisulfite de sodium à 10% ; 20 mL de HCl 1 N ; 260 mL eau distillée), chaque bain durant 3 min. Les lames sont enfin déshydratées dans des bacs successifs d'alcool à 70%, 90%, 100%, alcool 100%/xylène (v/v), puis dans 2 bacs de xylène avant d'être montées à l'acryptol (Labonord, France).

Des empreintes de foie de souris, colorées en même temps que les cytocentrifugations, servent de référence pour la quantification de l'ADN des cellules étudiées. En effet, le foie est constitué de cellules ayant un degré croissant de ploïdie et un contenu en ADN en croissance géométrique (2C, 4C, 8C,...) avec une activité proliférative négligeable. De plus, les cellules diploïdes de la souris contiennent une quantité d'ADN identique à celle des cellules diploïdes humaines.

4.3.2. Lecture des lames et analyse des résultats

L'analyse est réalisée à l'aide du système SAMBA 2005 (System for Analytical Microscopy in Biomedical Applications) couplé à un microscope (Axioskop, Zeiss, Allemagne) et à une caméra vidéo couleur CCD (Sony, Japon) pour acquérir et analyser les images. 200 cellules au minimum sont analysées sur chaque échantillon à un grossissement de 400 fois. Un minimum de 100 hépatocytes de souris servent de référence pour la quantification de l'ADN des cellules étudiées et sont analysées dans les mêmes conditions.

Treize paramètres sont mesurés pour chaque noyau examiné : un paramètre morphométrique (aire nucléaire), un paramètre densitométrique [densité optique intégrée (DOI)] et 11 paramètres de texture (tableau III). Ces derniers sont évalués uniquement sur les noyaux en phase G₀/G₁, sélectionnés sur la base de la valeur de leur DOI (pic modal G₁ ± 15%).

Les 11 paramètres de texture sont calculés sur l'image nucléaire après réduction à 16 niveaux de gris. Pour chaque population cellulaire, la moyenne et l'écart-type des paramètres

nucléaires ont été calculées. La signification des différences entre les valeurs des paramètres dans les cellules contrôles et celles dans les cellules traitées a été estimée par un test *t* de Student après la correction de Bonferroni pour variables multiples. Afin d'avoir des résultats plus informatifs, la variation standardisée par rapport au contrôle (ou index de déviation, ID), adaptée de Bartels *et al.* (Bartels *et al.*, 1998), a été déterminée en calculant, pour chaque paramètre mesuré dans un noyau donné, la différence avec la valeur moyenne du même paramètre observée dans les noyaux contrôles. Ces différences ont ensuite été standardisées en les divisant par les écarts-types correspondants dans les cellules contrôles, selon l'équation suivante :

$$ID = \frac{\text{valeur cellule traitée} - \text{valeur moyenne cellules contrôles}}{\text{écart-type valeurs cellules contrôles}}$$

L'anormalité nucléaire est déterminée, pour chaque population cellulaire, par la moyenne des valeurs absolues des index de déviation de tous les paramètres combinés (Bartels *et al.*, 1998), selon l'équation suivante :

$$\text{Anormalité nucléaire} = \frac{\sum_{i=1}^n |ID|}{n}$$

n = nombre des ID calculés à partir de tous les paramètres.

5. Identification des protéines par western-blot

5.1. Principe

Le western blot est une méthode de protéomique utilisée pour détecter, par immunomarquage, une protéine spécifique dans un échantillon à l'aide d'un anticorps spécifique de cette protéine.

Après extraction, les protéines de l'échantillon sont séparées selon leurs masses moléculaires par électrophorèse au travers d'un gel de polyacrylamide en présence de Sodium Dodécyl Sulfate (SDS) le plus souvent. Il s'agit alors de la technique SDS-PAGE (*SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*). Les protéines sont alors transférées sur une membrane de nitrocellulose ou de PVDF (*PolyVinylidene DiFluoride*) sous l'influence d'un champ électrique. Des accrochages non spécifiques entre les anticorps et certains constituants de la membrane existent par le fait d'interactions hydrophobes. Ces interactions vont produire un

bruit de fond. En pratique, pour diminuer ce marquage aspécifique, un mélange contenant des protéines et des macromolécules (comme le lait) est appliqué sur la membrane avant l'incubation de l'anticorps (saturation des sites d'interactions non spécifiques). Afin de caractériser la protéine d'intérêt, la membrane est ensuite incubée avec l'anticorps spécifique de cette protéine (anticorps primaire). Après une série de lavages, le complexe antigène-anticorps formé, est reconnu par un deuxième anticorps dirigé spécifiquement contre l'anticorps primaire (anticorps secondaire). Cet anticorps secondaire est habituellement lié à la peroxydase qui, par ajout de luminol, permet l'identification de la protéine d'intérêt par chimiluminescence.

5.2. Conditions expérimentales de l'analyse des modifications post-traductionnelles des histones

5.2.1. Modalités de traitement

Les cellules ont été incubées en présence de 100 ng/mL TSA pendant 0 h (pour les cellules contrôles), 8 h, 12 h et 24 h.

5.2.2. Extraction acide des histones

5 à 10 x 10⁶ cellules sont mises en suspension dans 500 µL de PBS. 2 mL de tampon de lyse cytoplasmique (320 mM saccharose ; 5 mM MgCl₂ ; 10 mM Tris-HCL pH 7,5 ; 1% Triton X-100 ; 10 mM acide butyrique ; 1 mM benzamidine ; 1 mM PMSF) y sont alors rajoutés. Le mélange est délicatement homogénéisé en retournant le tube plusieurs fois et laissé incubé 10 min dans la glace. Les cellules lysées sont ensuite centrifugées à 4°C, pendant 15 min à 1300 g et le surnageant éliminé. Le culot est alors lavé avec 1 mL de tampon de lyse cytoplasmique afin de le débarrasser des débris cellulaires résiduels. Il est ensuite récupéré par centrifugation à 4°C, pendant 15 min à 1300 g et remis en suspension dans 500 µL de tampon de lyse nucléaire (10 mM Tris-HCL pH 7,4 ; 4 mM MgCl₂ ; 10 mM acide butyrique ; 0,1 mM PMSF ; 0,1 mM benzamidine). Afin d'extraire les histones, 500 µL d'une solution froide de HCl 0,8 M y sont alors rajoutés et le mélange est gardé pendant 2 h dans la glace en vortexant le tube de temps en temps. Après 10 min de centrifugation à 4°C et à 12000 g, le surnageant est alors récupéré et les histones précipitées dans 8 volumes d'acétone (soit 8 mL) pendant une nuit à -20°C. Le lendemain, les histones sont collectées par

centrifugation à 4°C, pendant 10 min à 2000 g. L'excès de sels est éliminé en lavant le culot 2 fois avec 10 volumes (soit 1 mL) d'un mélange acétone/HCl 100 mM (10/1) préparé extemporanément puis 2 fois avec 10 volumes (soit 1 mL) d'acétone, à température ambiante. Après chaque lavage, le culot d'histones est récupéré par centrifugation pendant 10 min à 2000 g. Le culot propre est séché à l'air pendant 5 à 10 min puis remis en solution dans 100 µL d'eau, laquelle est conservée à -20°C.

5.2.3. Quantification des histones

Les histones sont des protéines nucléaires pauvres en résidus aromatiques (tyrosine, tryptophane et phénylalanine). Ainsi, leur dosage par spectrophotométrie est réalisé par mesure de l'absorbance à 230 nm (absorbance des liaisons peptidiques) et non à 280 nm comme pour la majorité des protéines (Manchester, 1996), sachant qu'une solution d'histones à 1 mg/mL a une densité optique de 3,3 à 230 nm.

5.2.4. Electrophorèse par SDS-PAGE, transfert et immunodétection des histones

En présence de SDS, les histones sont chargées négativement et migrent vers l'anode en fonction de leurs masses moléculaires, après application d'un champ électrique.

15 µg d'histones sont mises en solution dans 6 µL de tampon LaemmLi 4X (9 mL de tampon LaemmLi 4X contiennent : 0,4 g SDS ; 2,5 mL Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 ; 5 mL glycérol ; 2 mg bleu de bromophénol) contenant 0,6 µL de 2-mercapthoéthanol ajouté extemporanément pour réduire les ponts disulfures des protéines. Le volume est alors ajusté à 24 µL avec de l'eau. Les échantillons ainsi que 10 µL du marqueur de masse moléculaire (référence C3312, Sigma-Aldrich, France), sont chauffés 1 min à 100°C avant d'être déposés dans le gel de concentration à 4% (10 mL du gel de concentration contiennent : 1,3 mL acrylamide/M-bisacrylamide 30% ; 2,5 mL Tris-HCl 0.5M pH 6,8 ; 0,1 mL SDS 10% m/v ; 6,1 mL H₂O ; 50 µL persulfate d'ammonium 10% (m/v) ; 10 µL TEMED), coulé sur le gel de séparation à 18% (10 mL du gel de séparation contiennent : 6 mL acrylamide/M-bisacrylamide 30% ; 2,5 mL Tris-HCl 3M pH 8,8 ; 0,1 mL SDS 10% m/v ; 1,4 mL H₂O ; 50 µL persulfate d'ammonium 10% (m/v) ; 10 µL TEMED).

La migration est réalisée sous une tension de 150 Volts pendant 2 heures et demi, dans le tampon de migration (25 mM Tris Base ; 192 mM glycine ; 0,1% SDS).

Les histones sont ensuite transférées sur une membrane de PVDF (Invitrogen, France) préalablement activée pendant 1 min dans le méthanol, puis trempée dans de l'eau jusqu'à totale réhydratation. L'électrotransfert est réalisé pendant une nuit sous une tension de 20 volts, en présence de tampon de transfert (25 mM Tris Base ; 192 mM glycine ; 0,03% SDS m/v).

La membrane est ensuite trempée 20 s dans le méthanol puis séchée 15 min à l'air et remise une nouvelle fois dans le méthanol pendant 20 s puis réhydratée dans l'eau. Elle est alors colorée au Rouge Ponceau S [0,1% Ponceau S (m/v) ; 5% acide acétique v/v] afin de visualiser les protéines pour vérifier l'efficacité du transfert et pour pouvoir découper une bande de la membrane contenant la protéine d'intérêt.

La membrane est d'abord saturée dans du tampon TBS-T (10 mM Tris pH 8 ; 150 mM NaCl ; 0,1% Tween-20) contenant 5% de lait écrémé (m/v) pendant 3 heures à température ambiante, puis incubée en présence de l'anticorps primaire dissous dans le TBS-T à 5% de lait écrémé et utilisé à la dilution suivante :

Anti-acétyl-Histone H4 (origine : lapin) (référence 06-866, Upstate, France) : 1/2000.

Anti-acétyl-Histone H3 (origine : lapin) (référence 06-599, Upstate, France) : 1/20000.

Anti-diméthyl-Histone H3 Lys 9 (origine : lapin) (référence 07-441, Upstate, France) : 1/2000.

Anti-Histone-H3 (origine : lapin) (référence ab1791, Abcam, Angleterre) : 1/2000.

Après 3 lavages successifs de 15 min chacun avec une quantité suffisante de TBS-T, la membrane est incubée pendant 1 heure, à température ambiante en présence d'un anticorps secondaire (origine : chèvre) couplé à la peroxydase de raifort, spécifique des immunoglobulines G (IgG) de lapin (référence 12-348, Upstate, France) et dilué au 1/2000^e dans le tampon TBS-T contenant 5% de lait écrémé. La membrane est à nouveau rincée 3 fois dans du TBS-T avant d'être révélée à l'aide du kit de révélation par chimiluminescence (Pierce, Perbio Science France SAS, France), composé d'une solution de luminol et d'une solution de peroxyde d'hydrogène. En milieu alcalin, l'oxydation du luminol par le peroxyde d'hydrogène produit une émission lumineuse. Cette réaction de chimiluminescence est catalysée par la peroxydase de raifort et la quantité de lumière émise est proportionnelle à la quantité de catalyseur. Ainsi, l'anticorps secondaire est détecté grâce à cette réaction de

chimiluminescence. Pour ce faire, la membrane est immergée dans le mélange chimiluminescent (constitué de volumes égaux des 2 solutions du kit à raison de 0,125 mL de volume final/cm² de membrane) pendant 1 min, égouttée, couverte d'un film plastique, puis exposée en cassette à un film photographique (HyperfilmTM ECL, Amersham Biosciences, France) (autoradiographie) pendant 1 à 10 min. La position du complexe immun sur la membrane est alors visualisée après révélation du film et la quantité des histones d'intérêt est normalisée par rapport à celle des histones H3.

Comme les anticorps anti-acétyl-Histone H3 et anti-Histone-H3 se fixent sur la même protéine, une déshybridation de la membrane marquée par l'un des anticorps a été nécessaire avant sa réhybridation par l'autre. Ainsi, la membrane est incubée dans le tampon de déshybridation (100 mM 2-mercaptoéthanol ; 2% SDS m/v ; 62,5 mM Tris-HCl pH 6,7) à 55°C pendant 30 min sous agitation. Elle est ensuite lavée 3 fois avec un grand volume de TBS-T à température ambiante, chaque lavage durant 10 à 15 min. Elle est alors saturée et hybridée de nouveau, comme décrit précédemment.

5.3. Conditions expérimentales de l'analyse de l'expression des protéines Bax et cycline D1

5.3.1. Modalités de traitement

Les cellules ont été incubées en présence de :

- Ethanol (solvant du CHX) dilué 2500 fois pendant 1 h puis éthanol dilué 2500 fois + DMSO (solvant de la TSA) dilué 10000 fois pendant 24 h (pour les cellules contrôles).
- Ethanol dilué 2500 fois pendant 1 h puis éthanol dilué 2500 fois + 100 ng/mL TSA pendant 24 h.
- 10 µg/mL CHX pendant 1 h puis 10 µg/mL CHX + DMSO dilué 10000 fois pendant 24 h.
- 10 µg/mL CHX pendant 1 h puis 10 µg/mL CHX + 100 ng/mL TSA pendant 24 h.

5.3.2. Extractions des protéines totales

10 x 10⁶ cellules sont lysées, dans la glace pendant 30 min, dans 100 µL de tampon RIPA (0,05 M Tris-HCl pH 7,4 ; 0,15 M NaCl ; 0,25% acide désoxycholique ; 1% NP-40 ; 1

mM EDTA) contenant des inhibiteurs de protéases (10 mM acide butyrique ; 1 µg/mL aprotinine ; 1 µg/mL pepstatine ; 1 mM PMSF) et de phosphatases (1 mM Na₃VO₄ ; 1 mM NaF). Le lysat est ensuite centrifugé 15 min à 13000 tours/min (centrifugeuse 5804R Eppendorf, France) à 4°C. Le surnageant contenant les protéines est alors récupéré.

5.3.3. Quantification des protéines

La concentration en protéines du surnageant est déterminée par la méthode de Bradford basée sur l'adsorption du colorant Bleu de Coomassie G-250. En milieu acide, ce colorant se lie aux protéines ce qui provoque le transfert de son pic d'absorption de 465 nm (rouge) à 595 nm (bleu).

Les protéines sont diluées 1000 fois dans 1 mL de solution contenant 200 µL de réactif de Bradford (Biorad Protein Assay, BIO-RAD, France). L'absorbance de la solution est mesurée à 595 nm. La concentration en protéines de l'échantillon est alors déterminée à l'aide d'une courbe d'étalonnage réalisée dans les mêmes conditions avec des concentrations croissantes d'albumine sérique bovine (Sigma Aldrich, France) allant de 1 à 10 µg/mL.

5.3.4. Electrophorèse par SDS-PAGE, transfert et immunodétection des protéines

Les principales étapes de l'électrophorèse en SDS-PAGE, du transfert et de l'immunodétection des protéines Bax et Cycline D1 sont identiques à celles des histones décrites précédemment. Quelques modifications sont toutefois à signaler :

- 25 µg de protéines ont été déposés dans chaque puits.
- Le gel de séparation utilisé est un gel à 13% (10 mL du gel de séparation contiennent : 4,3 mL acrylamide/bisacrylamide 30% ; 2,5 mL Tris-HCl 1,5M pH 8,8 ; 0,1 mL SDS 10% m/v ; 3,1 mL H₂O ; 50 µL persulfate d'ammonium 10% (m/v) ; 5 µL TEMED).
- La migration est réalisée sous une tension de 200 Volts pendant 1 heure.
- Le tampon de transfert (25 mM Tris Base ; 192 mM glycine) ne contient pas de SDS.
- Les anticorps utilisés ainsi que leurs dilutions sont les suivants :
Anti-Bax clone 2D2 (origine : souris) (référence B8554, Sigma Aldrich, France) : 1/1000.
Anti-cycline D1 (C-20) (origine : lapin) (référence sc-717, Santa Cruz Biotechnology, Tebu-Bio SA, France) : 1/200.

Anti- β -actine clone AC-15 (origine : souris) (référence A5441, Sigma Aldrich, France) : 1/15000.

- La détection des protéines Bax et β -actine a nécessité l'utilisation d'un anticorps secondaire (origine : chèvre) couplé à la peroxydase de raifort, spécifique des immunoglobulines G (IgG) de souris (référence 12-349, Upstate, France). Il a été dilué au 1/2000^e dans le tampon TBS-T contenant 5% de lait écrémé.

- La quantité de protéines d'intérêt est normalisée par rapport à celle de la β -actine.

6. Evaluation de la viabilité cellulaire par un test au MTS

6.1. Principe

La survie cellulaire est évaluée par une méthode colorimétrique basée sur la détection de la conversion d'un dérivé du tétrazolium (MTS) par les cellules métaboliquement actives. Les cellules vivantes possèdent des déshydrogénases mitochondriales qui réduisent le MTS (3 - (4,5 - dimethylthiazol - 2 - yl) - 5- (3 - carboxymethoxyphenyl)- 2 - (4 - sulfophenyl) - 2H -tetrazolium, inner salt) jaune en formazan pourpre, soluble dans le milieu de culture. Après une incubation de 1 à 4 heures, l'intensité de la couleur pourpre est directement proportionnelle au nombre de cellules vivantes et évaluée en mesurant l'absorbance du formazan à 490 nm.

6.2. Conditions expérimentales

Le kit utilisé est CellTiter 96TM AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega, France). Ce kit est composé d'une solution de MTS et de PMS (Phénazine MéthoSulfate) qui facilite la réduction du MTS.

Les cellules sontensemencées dans des microplaques de 96 puits à raison de 20000 cellules/puits dans un volume de 100 μ L RPMI à 10% de SVF. Les cellules, à l'exception des contrôles, sont incubées avec 25 ng/mL, 50 ng/mL, 75 ng/mL et 100 ng/mL de TSA.

Après 8h, 12h et 24h d'incubation, 20 μ L d'un mélange contenant 2 mL de MTS et 100 μ L de PMS sont additionnés à chaque puits. Les plaques sont ensuite incubées à 37°C pendant 3 heures ; la lecture de l'absorbance est effectuée sur un lecteur de microplaque « Series 750 microplates reader » (Cambridge Technology, USA) à 490 nm.

7. Analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux

7.1. Principe de la cytométrie en flux

La cytométrie en flux est une technique permettant l'analyse individuelle et multiparamétrée de cellules ou d'éléments subcellulaires, à une vitesse variant entre 500 et 5000 objets par seconde. Elle donne des indications sur la taille, la structure interne (granulométrie, rapport nucléo-cytoplasmique...) et la fluorescence d'un système cellulaire. Les résultats obtenus se présentent sous la forme d'histogrammes mono ou biparamétrés, donnant la répartition des cellules en fonction du ou des paramètres étudiés. De plus, la cytométrie en flux permet de trier et de séparer physiquement les sous-populations mises en évidence par l'analyse. Cette analyse devant se faire pour chaque objet individuellement, il est nécessaire que l'échantillon se présente sous la forme d'une suspension. Une fois mises en suspension, les cellules ou les particules subcellulaires peuvent être analysées après ou en l'absence de fixation. La mesure de composants particuliers de la cellule nécessite leur marquage préalable, soit à l'aide de fluorochromes spécifiques (intercalants...), soit par immunomarquage fluorescent (anticorps marqués). Les cellules sont ensuite injectées au centre d'une gaine liquide réalisée par l'intermédiaire d'une buse de 50 à 100 μm de diamètre. Le jet résultant va permettre aux cellules de défiler l'une derrière l'autre, avec suffisamment d'espace entre elles pour être analysées séparément. A la sortie de la buse, les cellules passent dans un faisceau lumineux focalisé sur le centre du jet et généralement fourni par un laser. L'interaction entre le faisceau et les particules est à l'origine de signaux lumineux, lesquels sont séparés et sélectionnés par un jeu de miroirs et de filtres puis collectés par des photodétecteurs (photodiodes et photomultiplicateurs) qui vont les transformer de façon proportionnelle en signaux électriques. Enfin, l'analyseur multicanaux va permettre le traitement des signaux électriques afin d'obtenir un histogramme de la répartition de la population analysée, en fonction du ou des paramètres étudiés (figure 30).

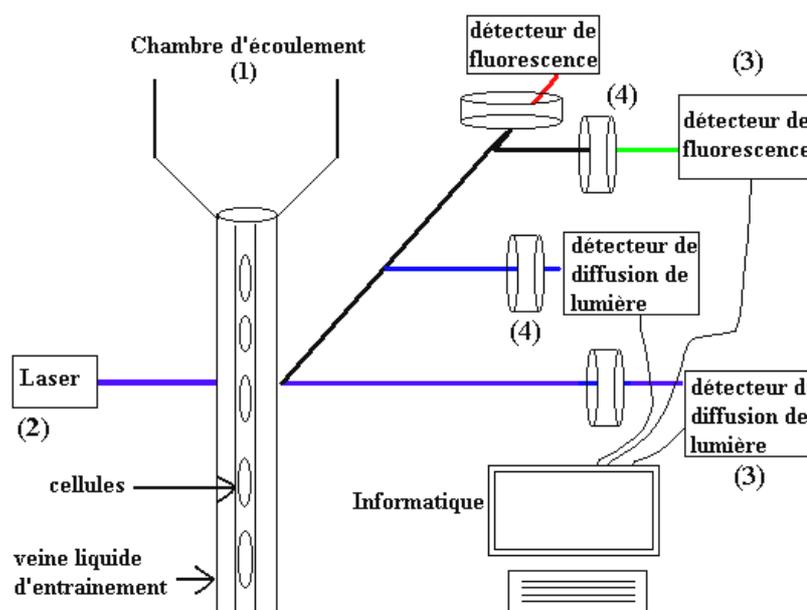


Figure 30. Représentation schématique d'un cytomètre en flux.

7.2. Application de la cytométrie en flux à l'étude du cycle cellulaire

La mesure du cycle cellulaire par cytométrie en flux divise le cycle en trois phases : G_0/G_1 , phase d'activation des cellules, S, phase de synthèse de l'ADN et G_2/M , phase de mitose. Ces trois phases sont différentes par leur quantité d'ADN. Les cellules en G_0/G_1 contiennent $2n$ chromosomes, les cellules en G_2/M contiennent $4n$ chromosomes et les cellules en phase de synthèse possèdent une quantité d'ADN intermédiaire. La distinction entre G_0 (phase quiescente) et G_1 (phase de préparation à la synthèse d'ADN) ainsi que G_2 (phase de préparation de la mitose) et M (mitose) est impossible avec une méthode utilisant un intercalant comme l'iodure de propidium. La cytométrie en flux permet de suivre la distribution des cellules dans les différentes phases du cycle en fonction du traitement appliqué. Elle nécessite l'emploi de fluorochromes spécifiques de l'ADN possédant deux qualités essentielles : combinaison stoechiométrique avec l'ADN et bonne émission de fluorescence après liaison à l'ADN. Les fluorochromes utilisés sont regroupés en deux catégories principales :

- Les agents intercalants : iodure de propidium, bromure d'éthidium.
- Les colorants spécifiques de paires de bases : Hoechst 33342/33258 (A-T) et mithramycine (G-C).

Les intercalants, bien que leur fixation soit liée à l'accessibilité de l'ADN, sont plus utilisés pour mesurer les contenus en ADN car la teneur en A-T et G-C n'intervient pas dans leur fixation.

7.3. Conditions expérimentales

Les cellules ont été incubées en présence de 100 ng/mL TSA pendant 0 h (pour les cellules contrôles), 8 h, 12 h et 24 h. Après 7 min de centrifugation à 1000 tours/min (centrifugeuse Eppendorf 5804R), 10^6 cellules ont été mises en suspension dans 1 mL de PBS (Phosphate Buffered Saline) dépourvu de Ca^{++} et de Mg^{++} . Après une nouvelle centrifugation pendant 3 min à 2000 tours/min, le culot est resuspendu dans 1 mL de PBS froid additionné de 2,3 mL d'alcool absolu froid. Le culot est ensuite récupéré par une centrifugation de 3 min à 2000 tours/min et vortexé pendant qu'on y rajoute goutte à goutte 1 mL d'éthanol à 70% froid. Le mélange est alors gardé 30 min dans la glace. 1 mL de PBS est additionné à 1 mL de la suspension cellulaire fixée. Après une centrifugation de 3 min à 2000 tours/min, le culot est vortexé et 4 mL de PBS lui sont rajoutés par fractions de 1 mL. Incubée pendant 15 min à température ambiante, la suspension cellulaire est ensuite centrifugée 3 min à 2000 tours/min, le culot vortexé puis additionné d'1 mL de tampon de coloration [composé de 940 μL de PBS contenant 0,1 mM EDTA et 0,1% (m/v) triton X-100, de 50 μL d'iodure de propidium (Sigma-Aldrich, France) à 1 mg/mL et de 10 μL de ribonucléase A (Sigma-Aldrich, France) à 2,5 mg/mL] et analysé aussitôt au cytomètre en flux Coulter EPICS XL (Beckman-Coulter, France). Les résultats ont été analysés à l'aide du logiciel « Multicycle ». La signification des différences de pourcentage des cellules dans les différentes phases du cycle a été estimée par une analyse de variance (ANOVA).

8. Détection des cellules apoptotiques par marquage avec la coloration de Feulgen

Les cellules ont été incubées en présence de 100 ng/mL TSA pendant 0 h (pour les cellules contrôles), 8 h, 12 h et 24 h. Le nombre de cellules apoptotiques a été évalué après l'analyse d'au moins 500 cellules marquées par la coloration de Feulgen (lames utilisées pour l'analyse de la texture nucléaire). Les cellules définies comme apoptotiques présentent des caractéristiques spécifiques de l'apoptose, à savoir : rétrécissement cellulaire, condensation de

la chromatine et formation de corps apoptotiques. La signification des différences de pourcentage des cellules apoptotiques a été estimée par une analyse de variance (ANOVA).

9. Détection des histones par migration sur gel AUT (Acetic acid-Urea-Triton)

9.1. Principe

Par SDS-PAGE les histones sont séparées en fonction de leur masse moléculaire. Toutefois, ce système est moins efficace pour séparer les variants d'histones ou leurs formes portant des modifications post-traductionnelles telles que l'acétylation, la méthylation ou la phosphorylation, leurs masses moléculaires étant similaires. Pour cette raison, le système AUT-PAGE est souvent utilisé pour l'analyse des histones, car celles-ci y sont séparées en fonction de leur masse moléculaire, de leur charge et de leur affinité au triton X-100.

Au pH du système (~3), les protéines sont chargées positivement et migrent donc vers la cathode en présence d'un champ électrique. L'urée, en dénaturant les protéines, augmente leur solubilité mais aussi leur coefficient de friction ce qui diminue leur mobilité. Ainsi, grâce à l'acide acétique et à l'urée, deux protéines de masses similaires mais de charges différentes peuvent être séparées l'une de l'autre. Le triton X-100 améliore la résolution du gel du fait que certains variants ont une affinité plus importante que d'autres au triton X-100, ce qui ralentit leur migration (Bonner *et al.*, 1980 ; Boulikas, 1985).

9.2. Conditions expérimentales

9.2.1. Modalités de traitement

Les cellules ont été incubées en présence de 100 ng/mL TSA pendant 0 h (pour les cellules contrôles), 8 h, 12 h et 24 h.

9.2.2. Extraction acide et quantification des histones

L'extraction acide des histones ainsi que leur quantification ont été réalisées de la même manière que pour l'analyse des histones par western-blot (voir sections 5.2.2. et 5.2.3.).

9.2.3. Electrophorèse par AUT-PAGE

Le système est composé d'un gel de concentration à 4% [4% acrylamide ; 0,163% bisacrylamide ; 8 M urée ; 1 M acide acétique ; 45 mM NH₄OH ; 0,75% TEMED (%v) ; riboflavine 0,00027% (m/v)] de 3 cm de hauteur, coulé sur un gel de séparation à 15% [15% acrylamide ; 0,1% M-bisacrylamide ; 8 M urée ; 1 M acide acétique ; 8 mM triton X-100 ; 45 mM NH₄OH ; 0,5% TEMED (%v) ; riboflavine 0,00027% (m/v)] de 13 cm de hauteur.

La préparation des gels et des échantillons nécessite un chauffage permanent des solutions au bain-marie afin d'éviter la cristallisation de l'urée.

La riboflavine est utilisée comme initiateur de la polymérisation. Toutefois, elle doit être photoactivée pour permettre la formation de radicaux libres indispensables à la polymérisation de l'acrylamide. C'est pourquoi cette dernière est réalisée à la lumière du jour.

Afin de nettoyer le gel de toute particule pouvant oxyder les protéines et altérer ainsi la résolution des bandes, le système a été soumis à une pré-électrophorèse à polarité inversée, avant de déposer les échantillons dans les puits. Celle-ci a été réalisée à 4°C sous une tension de 100 V pendant une nuit, en présence du tampon de migration préparé extemporanément (1 M acide acétique ; 0,2 M glycine).

25 à 35 µg d'histones ont été mélangées à 6 µL de tampon d'échantillon 3X (12 M urée ; 3 M NH₄OH ; 15 mM DTT ajouté extemporanément) dans un volume final de 18 µL, puis incubées pendant 5 min à température ambiante. 2,25 µL (1/8^e de volume) d'une solution de pyronine G à 1% dans de l'acide acétique y sont alors rajoutés pour visualiser le front de migration. L'urée diffuse facilement dans les puits et peut entraver le dépôt des échantillons ainsi que leur tassement ; les puits sont donc nettoyés à l'aide d'une micropipette avant d'y déposer les échantillons. La migration est réalisée à 4°C, à polarité inversée, sous une tension de 200 V pendant environ 20 heures, en présence du tampon de migration fraîchement préparé (1 M acide acétique ; 0,2 M glycine). Le gel est ensuite coloré au bleu de Coomassie R-250 puis décoloré dans une solution de méthanol à 10% et d'acide acétique à 10%, pour visualiser les différentes protéines.

10. Etude des modifications post-traductionnelles des histones et de la fixation de PCAF au niveau du promoteur MDR1 par immunoprécipitation de la chromatine (ChIP)

10.1. Principe

L'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) est une technique qui permet de mettre en évidence la fixation d'une protéine donnée sur une séquence spécifique de l'ADN *in vivo*. En bref, les cellules vivantes sont fixées par le formaldéhyde afin de lier les protéines à l'ADN (cross-linking). La chromatine est ensuite clivée et solubilisée par sonication [il s'agit alors du xChIP par opposition au nChIP (native ChIP) où l'on utilise la digestion enzymatique pour fragmenter l'ADN]. Cette étape est suivie par une immunoprécipitation sélective des complexes protéine-ADN à l'aide d'anticorps dirigés contre la protéine d'intérêt. Les « crosslinks » sont ensuite défaites et l'ADN immunoprécipité est analysé par PCR à l'aide d'amorces spécifiques de la région à analyser (figure 31) (Yan *et al.*, 2004).

10.2. Conditions expérimentales

Toutes les expériences de ChIP ont été faites avec le kit Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay (Upstate, France).

Les anticorps utilisés sont les suivants :

Anti-acétyl-Histone H4 (origine : lapin) (référence 06-866, Upstate, France).

Anti-acétyl-Histone H3 (origine : lapin) (référence 06-599, Upstate, France).

Anti-diméthyl-Histone H3 Lys 9 (origine : lapin) (référence 07-441, Upstate, France).

Anti-PCAF (H-369) (origine : lapin) (référence sc-8999X, Santa Cruz Biotechnology, tebu-bio, France).

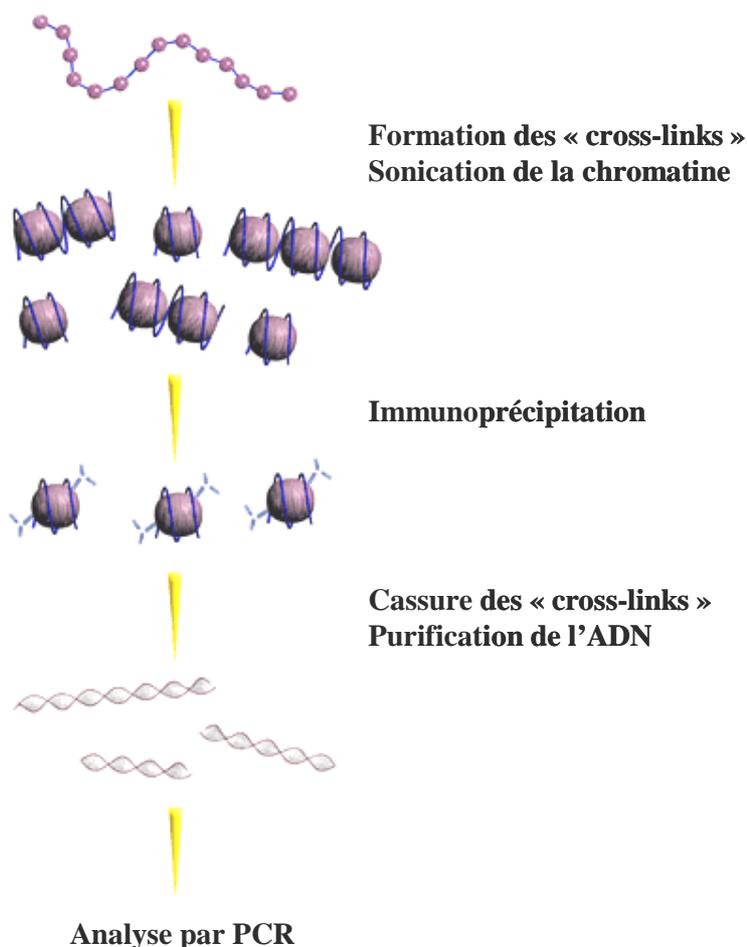


Figure 31. Représentation schématique de la technique de ChIP.

10.2.1. Modalités de traitement

Les cellules ont été incubées en présence de 100 ng/mL TSA pendant 0 h (pour les cellules contrôles), 8 h, 12 h et 24 h.

10.2.2. Préparation de l'extrait cellulaire

La fixation des protéines (histones et autres protéines nucléosomiques) à l'ADN (formation de cross-links) a été réalisée par incubation de $2,5 \times 10^6$ cellules vivantes dans leur milieu de culture en présence de formaldéhyde à 1% et ce, pendant 10 min (quand la protéine d'intérêt est une histone) ou 20 min (lorsque la protéine d'intérêt est PCAF) à 37°C. La réaction est ensuite stoppée par ajout de glycine à une concentration finale de 125 mM, pendant 5 min à température ambiante. Les cellules sont récupérées après 4 min de

centrifugation à 2000 tours/min (centrifugeuse 5804R Eppendorf, France) à 4°C, puis lavées 2 fois avec 5 mL de PBS froid supplémenté en inhibiteurs de protéases (1 µg/mL aprotinine; 1 µg/mL pepstatine A ; 1 mM PMSF). Le culot cellulaire est remis en suspension dans 470 µL de tampon de lyse (1% SDS ; 10 mM EDTA ; 50 mM Tris-HCl pH 8,1) additionné d'inhibiteurs de protéases (1 µg/mL aprotinine; 1 µg/mL pepstatine A ; 1 mM PMSF) et gardé 10 min dans la glace. La chromatine est alors clivée par sonication (Vibracell 72412, BioBlock scientifique, France) dans la glace à une amplitude de 40% , pendant 30 à 45 s par impulsions de 5 s alternées avec 30 s de pause pour éviter la surchauffe de l'ADN qui risquerait de le dégrader. Les échantillons sont ensuite centrifugés à 4°C pendant 10 min à 13000 tours/min pour éliminer les débris cellulaires insolubles, et le surnageant transvasé dans un tube propre. Les conditions de sonication sont optimales quand les fragments d'ADN ont des tailles de 200 à 1000 pb. La validation de cette première étape est donc primordiale avant de poursuivre l'expérience. Ainsi, 20 µL du lysat cellulaire soniqué sont additionnés de 80 µL d'eau et 4 µL d'une solution de NaCl 5M puis chauffés à 65°C pendant 6 heures pour détacher les « cross-links ». Les protéines sont ensuite digérées en présence d'1 µL de protéinase K à 20 mg/mL (Euromedex, France) à 55°C pendant 1 à 2 heures. L'ADN est récupéré par une extraction au phénol-chloroforme selon le protocole suivant : La solution d'ADN est mélangée à un même volume de phénol saturé de tampon Tris (Euromedex, France), puis centrifugée pendant 5 min à 15500 g à température ambiante. La phase aqueuse est récupérée et additionnée d'un volume identique d'une solution de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25:24:1) (Euromedex, France). Après agitation du tube et centrifugation pendant 5 min à 15500 g à température ambiante, la phase aqueuse est de nouveau recueillie et l'ADN précipité avec 2 volumes d'éthanol pur et 1/10^e de volume d'acétate de sodium 3 M pH 5,2, pendant une nuit à -20°C. Le précipité est lavé avec 1 mL d'éthanol à 70% puis repris dans 25 µL de tampon TE (10 mM Tris pH 8 ; 1 mM EDTA). L'ADN est ensuite migré, en même temps qu'un marqueur de taille (1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen, France), sur un gel d'agarose à 1% supplémenté en bromure d'éthidium à 0,05 µg/mL, sous une tension de 80 V pendant 45 min pour détecter la taille des fragments d'ADN clivé.

10.2.3. Immunoprécipitation de la protéine d'intérêt

Après avoir optimisé les conditions de sonication, 410 µL du lysat cellulaire clivé sont dilués 10 fois avec le tampon de dilution (0,01% SDS ; 1,1% Triton X-100 ; 1,2 mM EDTA ;

16,7 mM Tris-HCl pH 8,1 ; 167 mM NaCl) additionné d'inhibiteurs de protéases (1 µg/mL aprotinine; 1 µg/mL pepstatine A ; 1 mM PMSF). 20 µL de cette solution diluée sont ensuite recueillis et représenteront l'« input » qui estimera la quantité d'ADN présente dans chaque échantillon. L'« input » est gardé à -80°C jusqu'à ce que tous les échantillons soient récoltés. Afin de réduire le bruit de fond résultant d'une fixation aspécifique, le reste de la solution (~4080 µL) est mis à agiter sur un rouleur à disque rotatif pendant une heure à 4°C, en présence de 164 µL d'une suspension de billes de protéine A/agarose/ADN de sperme de saumon. Les billes sont ensuite séparées du mélange par une brève centrifugation à 10000 g pendant 5 s et le surnageant récupéré. Ce dernier est divisé en deux fractions égales (200 µL) dans deux tubes différents. L'anticorps dirigé contre la protéine d'intérêt est ajouté (8 µg) dans le tube où aura lieu l'immunoprécipitation, alors que le deuxième tube servira de contrôle négatif et subira les mêmes traitements sans être supplémenté en anticorps. Les échantillons sont alors mis à agiter sur un rouleur à disque rotatif pendant une nuit à 4°C. 60 µL de la suspension de protéine A/agarose/ADN de sperme de saumon sont rajoutés aux échantillons pour recueillir les complexes immuns, après 1 heure de rotation à 4°C. Les billes sont alors collectées après une centrifugation d'une minute à 850 tours/min à 4°C. L'ADN et les protéines associés d'une façon non spécifique aux billes sont éliminés par 5 lavages, de 5 min chacun, avec successivement :

- 1 mL du tampon « low salt » (0,1% SDS ; 1% Triton X-100 ; 2 mM EDTA ; 20 mM Tris-HCl pH 8,1 ; 150 mM NaCl).
- 1 mL du tampon « high salt » (0,1% SDS ; 1% Triton X-100 ; 2 mM EDTA ; 20 mM Tris-HCl pH 8,1 ; 500 mM NaCl).
- 1 mL du tampon « LiCl » (0,25 M LiCl ; 1% NP40 ; 1% désoxycholate ; 1 mM EDTA ; 10 mM Tris-HCl pH 8,1).
- 1 mL de tampon TE (10 mM Tris pH 8 ; 1 mM EDTA).
- 1 mL de tampon TE (10 mM Tris pH 8 ; 1 mM EDTA).

Après le lavage, les billes sont recueillies par une centrifugation d'une minute à 850 tours/min à 4°C. A ce stade, les échantillons sont des complexes de protéine A-anticorps-protéine-ADN. Les complexes protéine-ADN sont élués après avoir incubé les billes avec 250 µL de tampon d'éluion (1% SDS ; 0,1 M NaHCO₃), préparé extemporanément, pendant 15 min à température ambiante. Le surnageant est récupéré après 2 min de centrifugation à 10000 g à température ambiante et l'opération répétée encore une fois. Les 2 éluats sont ensuite combinés (~ 500 µL) dans le même tube.

10.2.4. Extraction de l'ADN associé à la protéine immunoprécipitée

La fraction éluée est additionnée de 20 μ L NaCl 5 M et chauffée à 65°C pendant 6 heures afin de détacher les cross-links formés par le formaldéhyde. A cette étape, le volume de la fraction « input » est ajustée à 100 μ L puis la solution est chauffée de la même manière en présence de 4 μ L NaCl 5 M. Afin de purifier l'ADN des protéines, les échantillons immunoprécipités et les contrôles négatifs sont complétés avec 10 μ L d'EDTA 0,5 M, 20 μ L de Tris-HCl 1M pH 6,5 et 1,5 μ L de protéinase K à 20 mg/mL. Les « Input » sont supplémentés en quantités proportionnelles des mêmes produits. Les tubes sont ainsi gardés à 55°C pendant 2 heures. L'ADN est recueilli par une extraction au phénol-chloroforme suivie d'une précipitation à -20°C pendant une nuit avec 3 volumes d'éthanol pur en présence de 20 μ g de glycogène (Euromedex, France) comme entraîneur. L'ADN est ensuite lavé avec 1 mL d'éthanol 70% et repris dans 30 μ L de tampon TE (10 mM Tris pH 8 ; 1 mM EDTA).

10.2.5. Analyse par PCR de l'ADN immunoprécipité

L'ADN est analysé par PCR « classique » semi-quantitative. Toutes les réactions de PCR ont été réalisées dans un volume final de 25 μ L contenant : 0,2 mM de chacun des désoxyribonucléotides (dNTP) (Invitrogen, France), 2 mM MgCl₂ (Invitrogen, France), 0,5 unité de Taq ADN polymérase recombinante (Invitrogen, France), le tampon de la Taq concentré une fois (Invitrogen, France), 5 μ L de la solution d'ADN (diluée 8 fois pour les Input) et 1 μ M de chacune des amorces sens et antisens (Proligo, France).

Dans chaque série de PCR, un témoin sans ADN est réalisé parallèlement aux échantillons pour vérifier l'absence de contamination. Les ADN amplifiés sont migrés sur un gel d'agarose à 2% contenant 0,05 μ g/mL de bromure d'éthidium. Le gel est alors scanné en utilisant le Typhoon 9210 scanner (Amersham Biosciences, France). Les bandes ont été quantifiées par densitométrie et analysées avec le logiciel « Image Quant » (Amersham Biosciences, France). L'enrichissement en ADN immunoprécipité (IP) est déterminé en divisant la densité des produits de PCR IP par celle des input (INP), pour les échantillons contrôles et traités puis en comparant le rapport entre les valeurs obtenues.

Les régions étudiées du promoteur MDR1 ainsi que leurs positions par rapport au site majeur d'initiation de la transcription sont les suivantes :

- Une région proximale (+292 à +591 au niveau de l'intron 1).
- Une région distale (-981 à -817 au niveau de l'intron -1).

- Une région dans les exons 1a et 1b (-222 à +37) contenant la boîte CCAAT inversée (ou boîte Y), site de fixation du co-activateur PCAF.

➤ Conditions de la PCR au niveau de la région proximale (+292 à +591) du promoteur MDR1

Les séquences des amorces utilisées sont les suivantes :

Amorce sens : 5'-TCAGGAGCTCCTGGAGCAGC-3'

Amorces antisens : 5'-GAGCGCCCGCCGTTGATGCC-3'

L'amplicon a une taille de 300 pb.

La PCR est réalisée selon le protocole suivant : une incubation à 94°C pendant 3 min, 30 cycles d'amplification : 94°C pendant 1 min (dénaturation), 58,5°C pendant 1 min (hybridation) et 72°C pendant 1 min (élongation) puis une incubation à 72°C pendant 10 min.

➤ Conditions de la PCR au niveau de la région distale (-981 à -817) du promoteur MDR1

Les séquences des amorces utilisées sont les suivantes :

Amorce sens : 5'-CATCCTCAGACTATGCAGTA-3'

Amorces antisens : 5'-GCTAACTCACATCAGAGCTT-3'

L'amplicon a une taille de 165 pb.

La PCR est réalisée selon le protocole suivant : une incubation à 94°C pendant 3 min, 30 cycles d'amplification : 94°C pendant 50 s (dénaturation), 58°C pendant 50 s (hybridation) et 72°C pendant 50 s (élongation) puis une incubation à 72°C pendant 10 min.

➤ Conditions de la PCR au niveau de la région (-222 à +37) contenant la boîte CCAAT inversée, site de fixation de PCAF

Les séquences des amorces utilisées sont les suivantes :

Amorce sens : 5'-TGCGCGTTTCTCTACTTG-3'

Amorces antisens : 5'-TCTGCTTCTTTGAGCTTGG-3'

L'amplicon a une taille de 259 pb.

La PCR est réalisée selon le protocole suivant : une incubation à 94°C pendant 3 min, 30

cycles d'amplification pour les Input et 35 cycles d'amplification pour les IP et contrôles négatifs: 94°C pendant 40 s (dénaturation), 59,5°C pendant 40 s (hybridation) et 72°C pendant 40 s (élongation) puis une incubation à 72°C pendant 10 min.

11. Analyse de la méthylation de l'ADN par MSP (methylation-specific PCR)

11.1. Principe

La PCR spécifique de la méthylation (MSP) est une technique rapide et très sensible pour analyser la méthylation des cytosines d'une façon qualitative. Elle est basée sur l'utilisation de deux paires distinctes d'amorces au niveau la région d'intérêt, désignées à amplifier les brins méthylés (amorces M) ou non méthylés (amorces U) après transformation de l'ADN par le bisulfite de sodium (figure 32). En effet, ce dernier convertit les cytosines non méthylées en uraciles (figure 33), lesquelles sont reconnues comme des thymines au cours de l'amplification de l'ADN par PCR, alors que les cytosines méthylées ne sont pas modifiées par le bisulfite de sodium et sont détectées comme des cytosines (Derks *et al.*, 2004).

11.2. Conditions expérimentales

11.2.1. Modalités de traitement

Le traitement des cellules avec la 5azadC et l'association 5azadC + TSA a été réalisé selon le protocole suivant :

- 5% acide acétique (solvant de la 5azadC) dilué 50000 fois pendant 24 h puis rajout de 5% acide acétique dilué 50000 fois pendant 24 h puis changement du milieu et rajout de 5% acide acétique dilué 50000 fois pendant 24 h puis incubation dans du milieu neuf pendant 9 h puis incubation pendant 24 h en présence de DMSO (solvant de la TSA) dilué 10000 fois durant les 8 dernières heures (pour les cellules contrôles).
- 5% acide acétique (solvant de la 5azadC) dilué 50000 fois pendant 24 h puis rajout de 5% acide acétique dilué 50000 fois pendant 24 h puis changement du milieu et rajout de 5% acide acétique dilué 50000 fois pendant 24 h puis incubation dans du milieu neuf pendant 9 h puis incubation pendant 24 h en présence de TSA 100 ng/mL durant les 8 dernières heures.

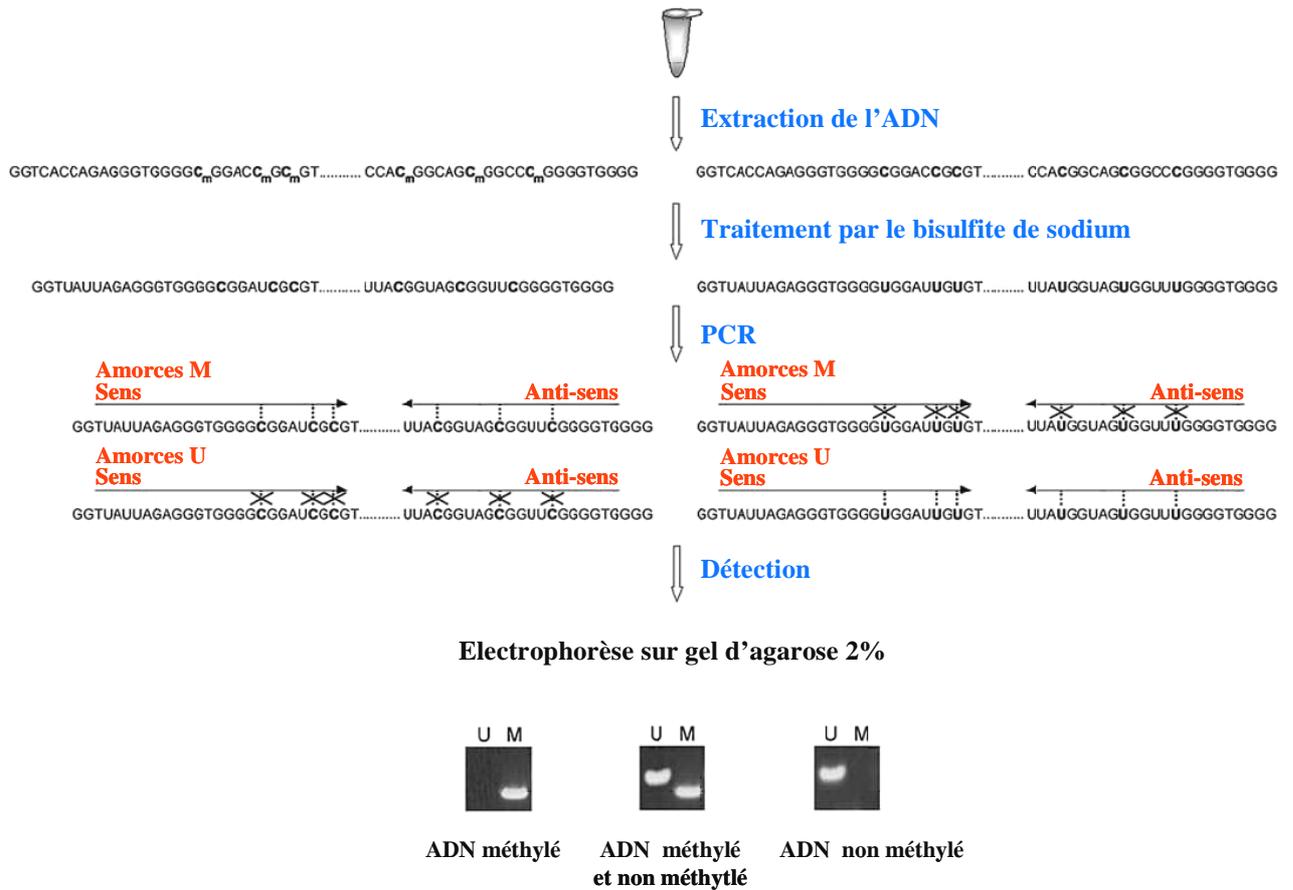


Figure 32. Schéma représentatif des différentes étapes de la MSP (Derks *et al.*, 2004).

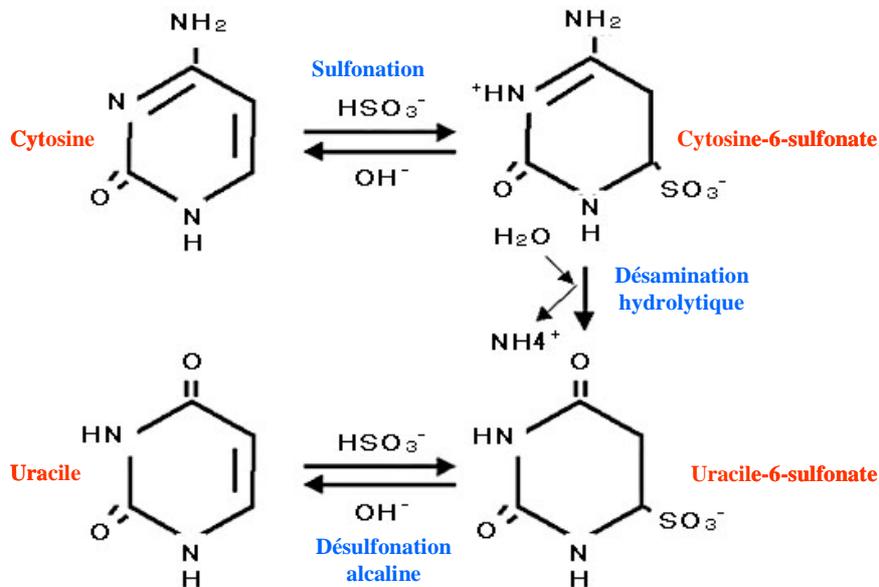


Figure 33. Etapes de la réaction de conversion par le bisulfite.

- 5azadC 2 μ M pendant 24 h puis rajout de 5azadC 2 μ M pendant 24 h puis changement du milieu et rajout de 5azadC 2 μ M pendant 24 h puis incubation dans du milieu neuf pendant 9 h puis incubation pendant 24 h en présence de DMSO dilué 10000 fois durant les 8 dernières heures.
- 5azadC 2 μ M pendant 24 h puis rajout de 5azadC 2 μ M pendant 24 h puis changement du milieu et rajout de 5azadC 2 μ M pendant 24 h puis incubation dans du milieu neuf pendant 9 h puis incubation pendant 24 h en présence de TSA 100 ng/mL durant les 8 dernières heures.

11.2.2. Extraction de l'ADN génomique

L'extraction de l'ADN génomique a été effectuée à l'aide du kit NucleoSpin[®] Tissue (Macherey-Nagel, France), selon les recommandations du fabricant. Brièvement, 10×10^6 cellules sont lysées par une solution contenant du SDS et de la protéinase K. L'ADN est ensuite adsorbé sur une membrane de silice à l'intérieur de petites colonnes adaptées à des tubes de 1,5 à 2 mL, en présence d'agents chaotropiques (hydrochlorure de guanidine) et d'éthanol. Après lavage de la membrane par deux tampons différents, l'ADN génomique est élué par 100 μ L de tampon TE (10 mM Tris pH 8 ; 1 mM EDTA).

11.2.3. Contrôle de la qualité et quantification de l'ADN

L'intégrité de l'ADN génomique est contrôlée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1%, sous une tension de 80 V pendant 1 heure. L'extraction sur colonnes permet d'obtenir de l'ADN dont la taille est de l'ordre de 20-30 kb pouvant aller jusqu'à 50 kb. Ainsi, la présence d'une bande nette de très grande taille signifie que l'ADN est de bonne qualité. Les échantillons dont l'ADN forme un « smear » sur le gel ont été exclus de l'analyse.

Les ADN sont dosés par spectrophotométrie à 260 nm. La contamination protéique est estimée par une lecture à 280 nm. Le rapport DO_{260}/DO_{280} doit être compris entre 1,7 et 2. S'il est inférieur à 1,7, il existe une contamination qui impose de pratiquer une seconde extraction. Un rapport supérieur à 2 témoigne de la présence d'une quantité importante d'ARN.

11.2.4. Traitement de l'ADN génomique au bisulfite de sodium

2 µg d'ADN génomique sont dilués avec de l'eau dans un volume final de 50 µL. L'ADN est dénaturé en présence de 0,3 M NaOH (la solution de NaOH doit être préparée extemporanément) à 37°C pendant 15 min, puis aussitôt mis dans la glace. Le mélange est ensuite additionné de 30 µL d'une solution d'hydroquinone 10 mM (concentration finale = 0,5 mM) et 520 µL d'une solution de métabisulfite de sodium (Na₂S₂O₅) 2M pH 5 (concentration finale de HSO₃⁻ = 3,1 M), préparées extemporanément et à l'abri de la lumière. Les échantillons sont homogénéisés délicatement puis incubés pendant 16 heures à 50°C. A ce stade, les résidus cytosines de départ sont transformés, par sulfonation, en cytosine-6-sulfonate puis, par désamination, en uracile-6-sulfonate (figure 33).

Les sels de bisulfite sont éliminés par purification de l'ADN sur des résines de silice à l'aide du kit Wizard[®] DNA Clean-Up System (Promega, France) selon les recommandations du fabricant. L'ADN purifié est repris dans 50 µL d'eau.

La désulfonation de l'uracile-6-sulfonate en uracile est favorisée à pH élevé. Ainsi, 5,5 µL d'une solution de NaOH 3 M préparée extemporanément sont ajoutés à l'ADN et la réaction d'élimination est conduite à 37°C pendant 15 min. L'ADN est ensuite précipité avec 3 volumes d'éthanol pur et 33 µL d'acétate d'ammonium 10 M pH 7 en présence de 20 µg de glycogène comme entraîneur, pendant une nuit à -20°C. L'ADN est récupéré par une centrifugation à 15500 g pendant 15 min à 10°C puis lavé avec 1 mL d'éthanol 70%. L'ADN est finalement dissous dans 20 µL d'eau et gardé à -20°C pendant 2 mois maximum.

➤ Conditions de la PCR GC T (avec les amorces T)

Cette PCR est destinée à évaluer la quantité d'ADN présente dans chaque échantillon et à adapter les volumes d'ADN, après quantification des bandes par densitométrie, de façon à avoir des quantités équivalentes d'ADN dans tous les puits. Les mêmes volumes d'ADN sont ensuite utilisés pour les PCR avec les amorces U et M.

Les amorces T amplifient une région du promoteur MDR1 transformée par le bisulfite de sodium et contenant les boîtes GC-50 et GC-110 quel que soit leur état de méthylation.

Les séquences des amorces T sont les suivantes :

Amorce sens : 5'-GGTGATATAGAATTGGAGAGG-3'

Amorces antisens : 5'-CCTCAAAAACCCTTCTCC-3'

L'amplicon a une taille de 620 pb.

Les réactions de PCR GC T ont été réalisées dans un volume final de 25 µL contenant : 0,2 mM de chacun des désoxyribonucléotides (dNTP) (Invitrogen, France), 2 mM MgCl₂ (Invitrogen, France), 0,5 unité de Taq ADN polymérase recombinante (Invitrogen, France), le tampon de la Taq concentré une fois (Invitrogen, France), 1 µM de chacune des amorces sens et antisens (Proligo, France) et un volume empirique d'ADN (variant de 0,2 à 1,5 µL environ).

Dans chaque série de PCR, un témoin sans ADN est réalisé parallèlement aux échantillons pour vérifier l'absence de contamination.

La PCR est réalisée selon le protocole suivant : une incubation à 94°C pendant 5 min, 33 cycles d'amplification : 94°C pendant 50 s (dénaturation), 61°C pendant 50 s (hybridation) et 72°C pendant 50 s (élongation) puis une incubation à 72°C pendant 10 min.

➤ **Conditions de la PCR GC-50U (avec les amorces GC-50U)**

Les amorces GC-50U amplifient la boîte GC-50 du promoteur MDR1 transformée par le bisulfite de sodium, si celle-ci n'est pas méthylée avant de subir la réaction de conversion.

Les séquences des amorces GC-50U sont les suivantes :

Amorce sens : 5'-TAGGAATAGTGTTGGGGTG-3'

Amorces antisens : 5'-CCTCAAAAACCCTTCTCC-3'

L'amplicon a une taille de 306 pb.

Les réactions de PCR GC-50U ont été réalisées dans un volume final de 25 µL contenant : 0,2 mM de chacun des désoxyribonucléotides (dNTP) (Invitrogen, France), 2 mM MgCl₂ (Invitrogen, France), 0,5 unité de Taq ADN polymérase recombinante (Invitrogen, France), le tampon de la Taq concentré une fois (Invitrogen, France), 1 µM de chacune des amorces sens et antisens (Proligo, France) et les mêmes volumes d'ADN utilisés pour la PCR GC T.

Dans chaque série de PCR, un témoin sans ADN est réalisé parallèlement aux échantillons pour vérifier l'absence de contamination.

La PCR est réalisée selon le protocole suivant : une incubation à 94°C pendant 5 min, 30 cycles d'amplification : 94°C pendant 50 s (dénaturation), 61°C pendant 50 s (hybridation) et 72°C pendant 50 s (élongation) puis une incubation à 72°C pendant 10 min.

➤ **Conditions de la PCR GC-50M (avec les amorces GC-50M)**

Les amorces GC-50M amplifient la boîte GC-50 du promoteur MDR1 transformée par le bisulfite de sodium, si celle-ci est méthylée avant de subir la réaction de conversion.

Les séquences des amorces GC-50M sont les suivantes :

Amorce sens : 5'-GTTGGGTAGGAATAGCGTC-3'

Amorces antisens : 5'-CCTCAAAAACCCTTCTCC-3'

L'amplicon a une taille de 306 pb.

Les réactions de PCR GC-50M ont été réalisées dans un volume final de 25 µL contenant : 0,2 mM de chacun des désoxyribonucléotides (dNTP) (Invitrogen, France), 2 mM MgCl₂ (Invitrogen, France), 0,5 unité de Taq ADN polymérase recombinante (Invitrogen, France), le tampon de la Taq concentré une fois (Invitrogen, France), 1 µM de chacune des amorces sens et antisens (Proligo, France) et les mêmes volumes d'ADN utilisés pour la PCR GC T.

Dans chaque série de PCR, un témoin sans ADN est réalisé parallèlement aux échantillons pour vérifier l'absence de contamination.

La PCR est réalisée selon le protocole suivant : une incubation à 94°C pendant 5 min, 30 cycles d'amplification : 94°C pendant 50 s (dénaturation), 57,5°C pendant 50 s (hybridation) et 72°C pendant 50 s (élongation) puis une incubation à 72°C pendant 10 min.

➤ **Conditions de la PCR GC-110U (avec les amorces GC-110U)**

Les amorces GC-110U amplifient la boîte GC-110 du promoteur MDR1 transformée par le bisulfite de sodium, si celle-ci n'est pas méthylée avant de subir la réaction de conversion.

Les séquences des amorces GC-110U sont les suivantes :

Amorce sens : 5'-TTTAGTTAATTTGGGTTGGG-3'

Amorces antisens : 5'-CCTCAAAAACCCTTCTCC-3'

L'amplicon a une taille de 354 pb.

Les réactions de PCR GC-110U ont été réalisées dans un volume final de 25 µL contenant : 0,2 mM de chacun des désoxyribonucléotides (dNTP) (Invitrogen, France), 1,7 mM MgCl₂ (Invitrogen, France), 0,5 unité de Taq ADN polymérase recombinante (Invitrogen, France), le tampon de la Taq concentré une fois (Invitrogen, France), 1 µM de

chacune des amorces sens et antisens (Proligo, France) et les mêmes volumes d'ADN utilisés pour la PCR GC T.

Dans chaque série de PCR, un témoin sans ADN est réalisé parallèlement aux échantillons pour vérifier l'absence de contamination.

L'amplification est réalisée par une PCR « touch down » : elle consiste à démarrer la PCR à une température d'hybridation supérieure à celle des amorces, puis de la diminuer séquentiellement après un certain nombre de cycles : l'hybridation des amorces est d'abord réalisée sur la séquence cible de l'ADN, évitant ainsi des hybridations non spécifiques. Même si la température d'hybridation définitivement atteinte permet des hybridations non spécifiques, les amorces s'hybrident préférentiellement sur le produit cible.

La PCR « touch down » est réalisée selon le protocole suivant : une incubation à 94°C pendant 5 min, 3 cycles d'amplification : 94°C pendant 50 s (dénaturation), 61°C pendant 50 s (hybridation) et 72°C pendant 50 s (élongation), 30 cycles d'amplification : 94°C pendant 50 s (dénaturation), 61°C (-0,2°C/cycle) pendant 50 s (hybridation) et 72°C pendant 50 s (élongation), puis une incubation à 72°C pendant 10 min.

➤ **Conditions de la PCR GC-110M (avec les amorces GC-110M)**

Les amorces GC-110M amplifient la boîte GC-110 du promoteur MDR1 transformée par le bisulfite de sodium, si celle-ci est méthylée avant de subir la réaction de conversion.

Les séquences des amorces GC-110M sont les suivantes :

Amorce sens : 5'-TATTTAGTTAATTCGGGTCG-3'

Amorces antisens : 5'-CCTCAAAAACCCTTCTCC-3'

L'amplicon a une taille de 356 pb.

Les réactions de PCR GC-110M ont été réalisées dans un volume final de 25 µL contenant : 0,2 mM de chacun des désoxyribonucléotides (dNTP) (Invitrogen, France), 1,7 mM MgCl₂ (Invitrogen, France), 0,5 unité de Taq ADN polymérase recombinante (Invitrogen, France), le tampon de la Taq concentré une fois (Invitrogen, France), 1 µM de chacune des amorces sens et antisens (Proligo, France) et les mêmes volumes d'ADN utilisés pour la PCR GC T.

Dans chaque série de PCR, un témoin sans ADN est réalisé parallèlement aux échantillons pour vérifier l'absence de contamination.

L'amplification est réalisée par une PCR « touch down » identique à celle de la PCR GC-110U : une incubation à 94°C pendant 5 min, 3 cycles d'amplification : 94°C pendant 50 s (dénaturation), 61°C pendant 50 s (hybridation) et 72°C pendant 50 s (élongation), 30 cycles d'amplification : 94°C pendant 50 s (dénaturation), 61°C (-0,2°C/cycle) pendant 50 s (hybridation) et 72°C pendant 50 s (élongation), puis une incubation à 72°C pendant 10 min.

Les ADN amplifiés sont migrés sur un gel d'agarose à 2% contenant 0,05 µg/mL de bromure d'éthidium. Le gel est scanné en utilisant le Typhoon 9210 scanner (Amersham Biosciences, France).

12. Analyse de la méthylation de l'ADN par COBRA (COmbined Bisulfite Restriction Analysis)

12.1. Principe

Cette technique est utilisée pour déterminer, d'une façon quantitative, le taux de méthylation de l'ADN sur un (ou plusieurs) doublet(s) CpG bien précis. Elle combine l'amplification par PCR de l'ADN traité au bisulfite de sodium et la digestion des produits post-PCR par une enzyme de restriction.

La conversion des cytosines non méthylées en uraciles et des cytosines méthylées en cytosines par le traitement au bisulfite de sodium suivi d'une PCR permet la création de nouveaux sites de restriction enzymatique ou la préservation de sites pré-existants. Le rapport entre la fraction digérée et la fraction totale reflète le pourcentage de méthylation de l'ADN du site étudié dans l'ADN génomique d'origine (Xiong *et al.*, 1997).

12.2. Conditions expérimentales

12.2.1. Modalités de traitement

Le traitement des cellules avec la 5azadC et l'association 5azadC + TSA a été réalisé selon le protocole suivant :

- 5% acide acétique (solvant de la 5azadC) dilué 50000 fois pendant 24 h puis rajout de 5% acide acétique dilué 50000 fois pendant 24 h puis changement du milieu et rajout de 5% acide acétique dilué 50000 fois pendant 24 h puis incubation dans du milieu

neuf pendant 9 h puis incubation pendant 24 h en présence de DMSO (solvant de la TSA) dilué 10000 fois durant les 8 dernières heures (pour les cellules contrôles).

- 5% acide acétique (solvant de la 5azadC) dilué 50000 fois pendant 24 h puis rajout de 5% acide acétique dilué 50000 fois pendant 24 h puis changement du milieu et rajout de 5% acide acétique dilué 50000 fois pendant 24 h puis incubation dans du milieu neuf pendant 9 h puis incubation pendant 24 h en présence de TSA 100 ng/mL durant les 8 dernières heures.
- 5azadC 2 μ M pendant 24 h puis rajout de 5azadC 2 μ M pendant 24 h puis changement du milieu et rajout de 5azadC 2 μ M pendant 24 h puis incubation dans du milieu neuf pendant 9 h puis incubation pendant 24 h en présence de DMSO dilué 10000 fois durant les 8 dernières heures.
- 5azadC 2 μ M pendant 24 h puis rajout de 5azadC 2 μ M pendant 24 h puis changement du milieu et rajout de 5azadC 2 μ M pendant 24 h puis incubation dans du milieu neuf pendant 9 h puis incubation pendant 24 h en présence de TSA 100 ng/mL durant les 8 dernières heures.

12.2.2. Extraction de l'ADN génomique

L'extraction de l'ADN génomique a été décrite à la section 11.2.2.

12.2.3. Contrôle de la qualité et quantification de l'ADN

Cette partie est identique à celle décrite à la section 11.2.3.

12.2.4. Traitement de l'ADN génomique au bisulfite de sodium

Le traitement de l'ADN génomique au bisulfite de sodium est identique à celui réalisé pour l'étude de la méthylation par MSP (voir section 11.2.4.)

12.2.5. PCR au niveau de l'élément Inr du promoteur MDR1

La séquence du promoteur MDR1 amplifiée par PCR s'étend de -20 à +172 par rapport au site majeur de transcription. Les amorces utilisées sont complémentaires de

séquences d'ADN transformées par le bisulfite de sodium et ne contenant pas de doublets CpG avant la conversion. Ainsi l'amplification est indépendante de la méthylation de l'ADN.

Les séquences des amorces sont les suivantes :

Amorce sens : 5'-GTTATAGGAAGTTTGAGTTT-3'

Amorces antisens : 5'-AAAAACTATCCCATAATAAC-3'

L'amplicon a une taille de 192 pb.

Les réactions de PCR ont été réalisées dans un volume final de 25 μ L contenant : 0,2 mM de chacun des désoxyribonucléotides (dNTP) (Invitrogen, France), 1,7 mM $MgCl_2$ (Invitrogen, France), 0,5 unité de Taq ADN polymérase recombinante (Invitrogen, France), le tampon de la Taq concentré une fois (Invitrogen, France), 0,5 μ M de chacune des amorces sens et antisens (Proligo, France) et 5 μ L de la solution d'ADN transformé par le bisulfite.

Dans chaque série de PCR, un témoin sans ADN est réalisé parallèlement aux échantillons pour vérifier l'absence de contamination.

L'amplification est réalisée par une PCR « touch down » : une incubation à 94°C pendant 3 min, 40 cycles d'amplification : 94°C pendant 30 s (dénaturation), 58°C (-0,4°C/cycle) pendant 30 s (hybridation) et 72°C pendant 30 s (élongation), puis une incubation à 72°C pendant 10 min.

La présence de l'amplicon (192 pb) a été vérifiée par migration de 4 μ L des produits de PCR sur un gel d'agarose à 2%. La suite de l'expérience a été faite avec les 21 μ L restants.

12.2.6. Purification des produits de PCR

Les produits de PCR ont été purifiés sur des membranes de silice en présence de sels chaotropiques (thiocyanate de guanidine) en utilisant le Kit NucleoSpin[®] Extract II (Macherey-Nagel, France), selon les recommandations du fabricant. L'ADN est élué avec 25 μ L de tampon NE (5 mM Tris-HCl pH 8,5).

12.2.7. Digestion des amplicons par la TaqI

Les produits de PCR purifiés sont digérés par la TaqI. Cette enzyme de restriction coupe la séquence palindromique TCGA, entre le T et le C:



Ce site de restriction est retrouvé au niveau de l'élément Inr du promoteur MDR1. Il est localisé de +3 à +6 relativement au site majeur d'initiation de la transcription. Après traitement par le bisulfite de sodium, cette séquence est conservée si au préalable la cytosine est méthylée. La coupure enzymatique donnera alors deux fragments de 168 pb et 24 pb respectivement. Toutefois si la cytosine n'est pas méthylée, elle est transformée en uracile, laquelle est remplacée par la thymine dans les amplicons de PCR. Ainsi, le site de restriction de la *TaqI* est perdu et le fragment de 192 pb amplifié par PCR n'est pas coupé.

La digestion enzymatique a été réalisée dans les conditions suivantes : les 25 µL d'ADN purifié et repris dans le tampon NE (5 mM Tris-HCl pH 8,5) sont additionnés de 10 unités de *TaqI* (1µL) (Invitrogen, France) et de 2,89 µL de son tampon 10X (Invitrogen, France). Les mélanges réactionnels sont ensuite incubés à 65°C pendant une nuit.

12.2.8. Migration de l'ADN sur gel d'agarose et quantification de la méthylation

Après la digestion enzymatique, le résultat est visualisé par migration de l'ADN sur un gel d'agarose à 2,5% contenant 0,05 µg/mL de bromure d'éthidium. Le gel est alors scanné en utilisant le Typhoon 9210 scanner (Amersham Biosciences, France). Les bandes sont quantifiées par densitométrie et analysées avec le logiciel « Image Quant » (Amersham Biosciences, France).

Le pourcentage de méthylation correspond au rapport, multiplié par 100, entre la densité des produits de PCR digérés (bande à 168 pb) et la somme des densités des produits de PCR totaux [digérés (bande à 168 pb) et non digérés (bande à 192 pb)].

RESULTATS

1. Rôle(s) de l'acétylation des histones dans la texture chromatinienne

1.1. Caractérisation des cellules H69WT et H69VP

1.1.1. Expression du gène *MDR1*

Les lignées cellulaires H69WT et H69VP ont été décrites respectivement comme sensibles et résistantes à la chimiothérapie (Brock *et al.*, 1995 ; Minato *et al.*, 1990). Afin de vérifier l'intégrité de ce profil dans les cellules H69WT et H69VP utilisées tout le long de ce travail, le taux d'ARNm *MDR1*, normalisé par rapport à celui de l'ARNr 18S, a été évalué par RT-PCR en temps réel. Les cellules résistantes H69VP se caractérisent par une expression de l'ARNm *MDR1* 8000 fois plus importante que leurs homologues sensibles H69WT (Taux d'expression *MDR1*/18S est considéré comme égal à 1 pour les cellules H69WT) (figure 34).

1.1.2. Analyse de la texture nucléaire

Des études effectuées par les membres de notre équipe ont montré que la cytométrie en images est un outil efficace dans la détection des variations texturales nucléaires entre cellules sensibles et cellules résistantes à la chimiothérapie (Dufer *et al.*, 1995 ; Yatouji *et al.*, 2003).

L'étude des paramètres morphologiques et texturaux a été réalisée sur des noyaux sélectionnés en phase G_0/G_1 du cycle sur la base de leur contenu en ADN évalué par la densité optique intégrée (DOI), après coloration au Feulgen.

L'aire nucléaire des cellules H69WT (45 ± 9 u.a.) est similaire à celle des cellules H69VP (47 ± 5 u.a.). Certains paramètres de texture nucléaire montrent des différences significatives entre les cellules sensibles et les cellules résistantes (tableau IV). L'augmentation de l'énergie (E) dans les cellules H69VP rend compte d'une distribution plus homogène de la chromatine. Ce résultat est en accord avec la diminution de l'entropie (ENT) signifiant une diminution du contraste dans les noyaux des cellules H69VP. De plus, l'augmentation de la distribution des niveaux de gris (DNG) ainsi que la diminution de la déviation standard des densités optiques (DSDO) décrivent, elles aussi, une distribution plus uniforme de la chromatine dans les cellules résistantes. Dans la mesure où la moyenne locale (ML) et la densité optique moyenne (DOM) sont peu modifiées, il semble donc qu'il s'agit plus d'une modification de la distribution que de la condensation globale de la chromatine.

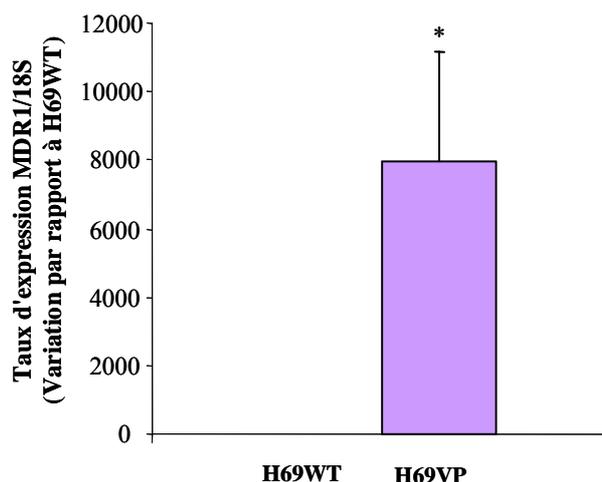


Figure 34. Expression de l'ARNm MDR1 dans les cellules H69WT et H69VP.

Quantifications par RT-PCR en temps réel du taux d'ARNm MDR1 par rapport à l'ARNr 18S. Les valeurs correspondent à la moyenne \pm ET de 4 expériences indépendantes.

* : $p < 0,05$ en comparaison avec la valeur obtenue dans les cellules H69WT – Test t de Student

Tableau IV. Valeurs des paramètres de texture dans les cellules H69WT et H69VP en phase G₀/G₁.

Paramètres	Valeurs des paramètres (u.a.)	
	H69WT (n=196)	H69VP (n=204)
DOM	2.45 \pm 0.05	2.34 \pm 0.04
DSDO	1.51 \pm 0.07	1.24 \pm 0.04 ^a
ML	1.93 \pm 0.05	1.80 \pm 0.03
E	1.75 \pm 0.06	2.03 \pm 0.06 ^a
ENT	2.13 \pm 0.04	1.95 \pm 0.03 ^a
I	1.35 \pm 0.03	1.27 \pm 0.01
ICS	2.26 \pm 0.01	2.29 \pm 0.01
ILS	2.11 \pm 0.06	2.33 \pm 0.05
DNG	2.45 \pm 0.07	2.72 \pm 0.06 ^a
DLS	2.12 \pm 0.02	2.14 \pm 0.01
PLS	2.08 \pm 0.03	1.99 \pm 0.02

Les valeurs correspondent à la moyenne \pm ETM et sont exprimées en unités arbitraires.

n = effectif de l'échantillon cellulaire en phase G₀/G₁ à partir de 3 expériences indépendantes

^a : valeur significativement différente de celle obtenue dans les cellules H69WT – Test t de Student après la correction de Bonferroni pour variables multiples.

Cette conclusion correspond aux variations, bien que non significatives, des autres paramètres, notamment l'inertie et l'importance des longues sections.

1.1.3. Modifications post-traductionnelles des histones

Les modifications épigénétiques jouent un rôle important dans l'établissement de la structure chromatinienne et dans l'expression génique. Toutefois leur implication dans la détermination du profil textural chromatinien reste peu connu (Montironi *et al.*, 2003). Les cellules H69WT et H69VP présentant des différences de texture nucléaire, nous avons recherché des variations possibles au niveau des modifications post-traductionnelles des histones dans ces 2 lignées cellulaires.

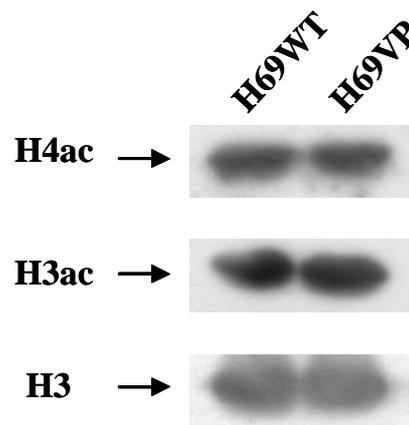
L'acétylation des histones H3 et H4, substrats majeurs de l'acétylation (Nan *et al.*, 2004), est souvent associée à l'« ouverture » de la chromatine et à l'activation des gènes (Grunstein *et al.*, 1997).

Après extraction acide des histones et SDS-PAGE, le niveau d'acétylation des histones H3 et H4 a été analysé par western blot, à l'aide d'anticorps reconnaissant la forme tétra-acétylée (K5, K8, K12 et K16) de l'histone H4 et di-acétylée (K9 et K14) de l'histone H3. Cette étude ne montre pas de différences significatives entre les cellules H69WT et H69VP et suggère que les profils texturaux distincts des deux lignées ne trouvent pas leur origine au niveau de l'acétylation des histones évaluée au niveau global (figure 35).

La di-méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 est reconnue par des protéines, telles que HP1, susceptibles de « fermer » la structure de la chromatine et d'inhiber l'expression génique (Martin *et al.*, 2005). Cette modification épigénétique, analysée par western blot, ne reflète pas les modifications de texture nucléaire entre les cellules H69WT et H69VP, aucune différence n'ayant été mise en évidence (figure 39).

Si les différences texturales entre les cellules H69WT et H69VP ne sont pas dues à des différences du niveau d'acétylation des histones H3 et H4, cela ne signifie pas que des variations du taux d'acétylation des histones n'ont aucune influence sur la texture nucléaire. Ainsi, nous avons analysé la texture nucléaire en présence de trichostatine A (TSA), un inhibiteur des histones désacétylases (HDACs). Ceci nous permettrait de rechercher une éventuelle corrélation entre les variations texturales et l'expression du gène *MDR1* régulée de manière épigénétique (El-Osta *et al.*, 2002).

A



B

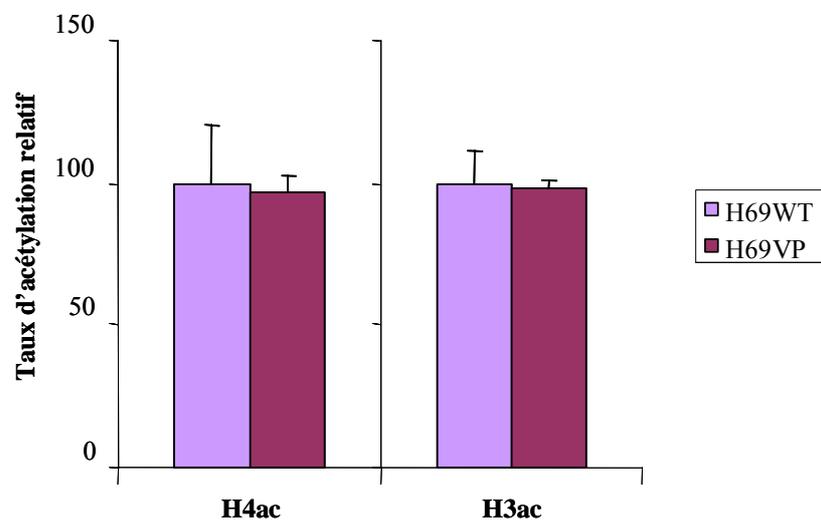


Figure 35. Acétylation des histones H4 et H3 dans les cellules H69WT et H69VP.

A : analyse par western blot du niveau des histones H4 tétra-acétylées, H3 di-acétylées et H3 totales dans des cellules H69WT et H69VP.

B : quantifications de l'acétylation par rapport au taux de H3 totales. Les valeurs correspondent à la moyenne \pm ET de 3 expériences indépendantes.

1.2. Impact(s) de la TSA sur le phénotype cellulaire et nucléaire

1.2.1. Effet de la TSA sur la prolifération cellulaire

Les données de la littérature indiquent que la TSA possède un effet anti-prolifératif et apoptotique sur nombre de cellules cancéreuses (Vanhaecke *et al.*, 2004).

Les cellules H69WT et H69VP ont été incubées avec des concentrations croissantes de TSA, pendant 8 h, 12 h et 24 h. La TSA inhibe leur croissance d'une façon dose et temps-dépendante (figure 36). Dans les cellules sensibles, son effet anti-prolifératif augmente avec le temps d'incubation et la concentration en TSA jusqu'à 50 ng/mL. A partir de cette concentration et jusqu'à 100 ng/mL de TSA, le pourcentage de cellules vivantes se stabilise pour les temps d'incubation courts (8 h et 12 h) et tend à diminuer lentement quand l'incubation avec la TSA dure 24 h. Les cellules H69VP semblent plus sensibles à l'effet de la TSA sur la croissance cellulaire. Malgré une inhibition de croissance négligeable aux temps courts (8 h et 12 h), avec des doses croissantes de TSA, celle-ci entraîne une diminution marquée et rapide du pourcentage de cellules vivantes après 24 h d'incubation avec des concentrations allant jusqu'à 50 ng/mL. Ce pourcentage de cellules vivantes ne change plus avec l'augmentation des concentrations de TSA jusqu'à 100 ng/mL.

1.2.2. Influence de la TSA sur le cycle cellulaire

L'inhibition de la prolifération induite par la TSA à 100 ng/mL est en partie liée à une augmentation du nombre de cellules apoptotiques en fonction du temps (tableau V). Il est connu que l'inhibition de la croissance cellulaire par la TSA peut aussi résulter de l'arrêt du cycle dans plusieurs types de cellules (Duan *et al.*, 2005 ; Vanhaecke *et al.*, 2004). Un effet cytostatique de la TSA a donc été recherché dans les cellules H69WT et H69VP.

L'effet de la TSA sur le cycle cellulaire a été étudié par cytométrie en flux (tableau V). Après 24 h d'incubation avec la TSA à 100 ng/mL, le pourcentage des cellules H69WT et H69VP en phase S diminue d'une façon significative. Cette diminution est associée à une augmentation des cellules en phase G₂/M. De même, un arrêt de croissance en phase G₀/G₁ est observé dans les 2 lignées cellulaires, statistiquement significatif dans les cellules H69VP.

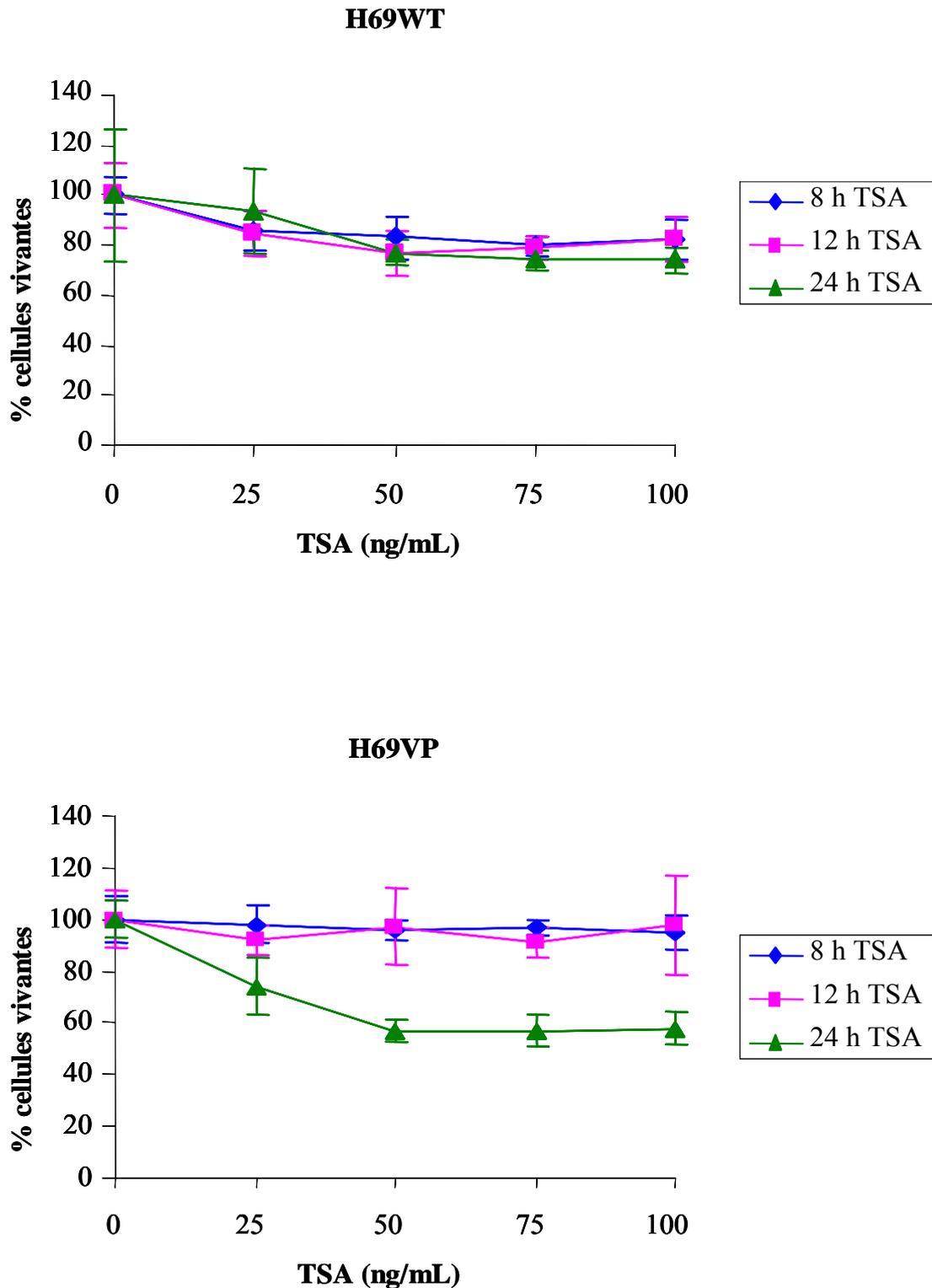


Figure 36. Effet de la TSA sur la viabilité des cellules H69WT et H69VP.

Les cellules ont été incubées ou non en présence de doses croissantes de TSA, pendant 8 h, 12 h et 24 h. La survie cellulaire a été évaluée à l'aide du test MTS. Les valeurs correspondent à la moyenne \pm ET de 3 expériences indépendantes.

Tableau V. Effet de la TSA (100 ng/mL) sur le cycle cellulaire.

Lignées cellulaires	Temps d'incubation avec TSA (h)	G ₀ /G ₁ (%)	S (%)	G ₂ /M (%)	Cellules apoptotiques (%)
H69WT	0	50.4 ± 1.9	27.0 ± 2.6	22.5 ± 0.7	4.5 ± 0.7
	8	46.9 ± 2.0	27.7 ± 2.7	25.3 ± 0.6	5.5 ± 2.1
	12	45.8 ± 0.5	26.4 ± 0.2	27.7 ± 0.5	7.0 ± 1.4
	24	54.1 ± 0.4	11.4 ± 0.3 ^a	34.4 ± 0.3 ^a	15.5 ± 0.7 ^a
H69VP	0	44.8 ± 2.0	26.1 ± 2.3	28.9 ± 0.2	3.6 ± 0.6
	8	39.3 ± 0.3	30.5 ± 0.4	30.1 ± 0.2	4.3 ± 1.5
	12	38.9 ± 2.5	27.1 ± 1.1	33.8 ± 1.5 ^a	8.6 ± 4.5
	24	55.0 ± 1.3 ^a	3.3 ± 1.5 ^a	41.7 ± 2.8 ^a	13.5 ± 4.9 ^a

Le contenu en ADN a été estimé par cytométrie en flux après marquage à l'iodure de propidium. Les cellules apoptotiques ont été comptées parmi au moins 500 cellules colorées par la méthode de Feulgen. Les valeurs correspondent à la moyenne ± ET de 3 expériences indépendantes.

^a: p<0,05 en comparaison avec les valeurs obtenues dans les cellules cultivées en absence de TSA – Analyse de variance (ANOVA).

Après 8 h et 12 h d'incubation, la TSA ne semble pas induire des modifications notables au niveau du cycle cellulaire, hormis une augmentation du pourcentage des cellules résistantes en phase G₂/M après 12 h d'incubation.

1.2.3. Modifications post-traductionnelles des histones par la TSA

1.2.3.1. Acétylation des histones

La TSA module la structure chromatinienne grâce à son activité inhibitrice des HDACs. L'étude de l'acétylation des histones H3 et H4 a été réalisée par western blot en utilisant des anticorps anti-H4 tétra-acétylée (K5, K8, K12 et K16) et anti-H3 di-acétylée (K9 et K14). Les résultats obtenus sont normalisés par rapport à la quantité de H3 totales. Les cellules H69WT et H69VP montrent un taux basal d'acétylation négligeable en comparaison avec l'hyperacétylation des histones H3 et H4 induite par la TSA (100 ng/mL) après 8 h d'incubation (figure 37). Cette acétylation est conservée jusqu'à 24 h et son taux est au moins équivalent à celui retrouvé après 8 h.

Ces résultats ont été complétés par une étude de l'acétylation des histones après AUT-PAGE, afin de séparer les histones majoritaires, les variants d'histones et leurs formes acétylées (figure 38). Les histones migrant plus lentement sous formes acétylées, nous pouvons ainsi déterminer les différents niveaux d'acétylation en fonction de leur position sur le gel.

Ainsi, dans les cellules H69WT et H69VP, les histones H4 se trouvent majoritairement sous formes non acétylée et mono-acétylées. Cette dernière accompagne généralement la forme non acétylée de l'histone H4 dans plusieurs systèmes cellulaires et tissulaires (Sternier *et al.*, 1989). Après incubation avec la TSA, les formes di- et tri-acétylées apparaissent, parallèlement à une diminution des formes mono- et non acétylées. La forme tétra-acétylée étudiée par western blot est difficilement discernable sur le gel AUT, probablement par manque de résolution suffisante.

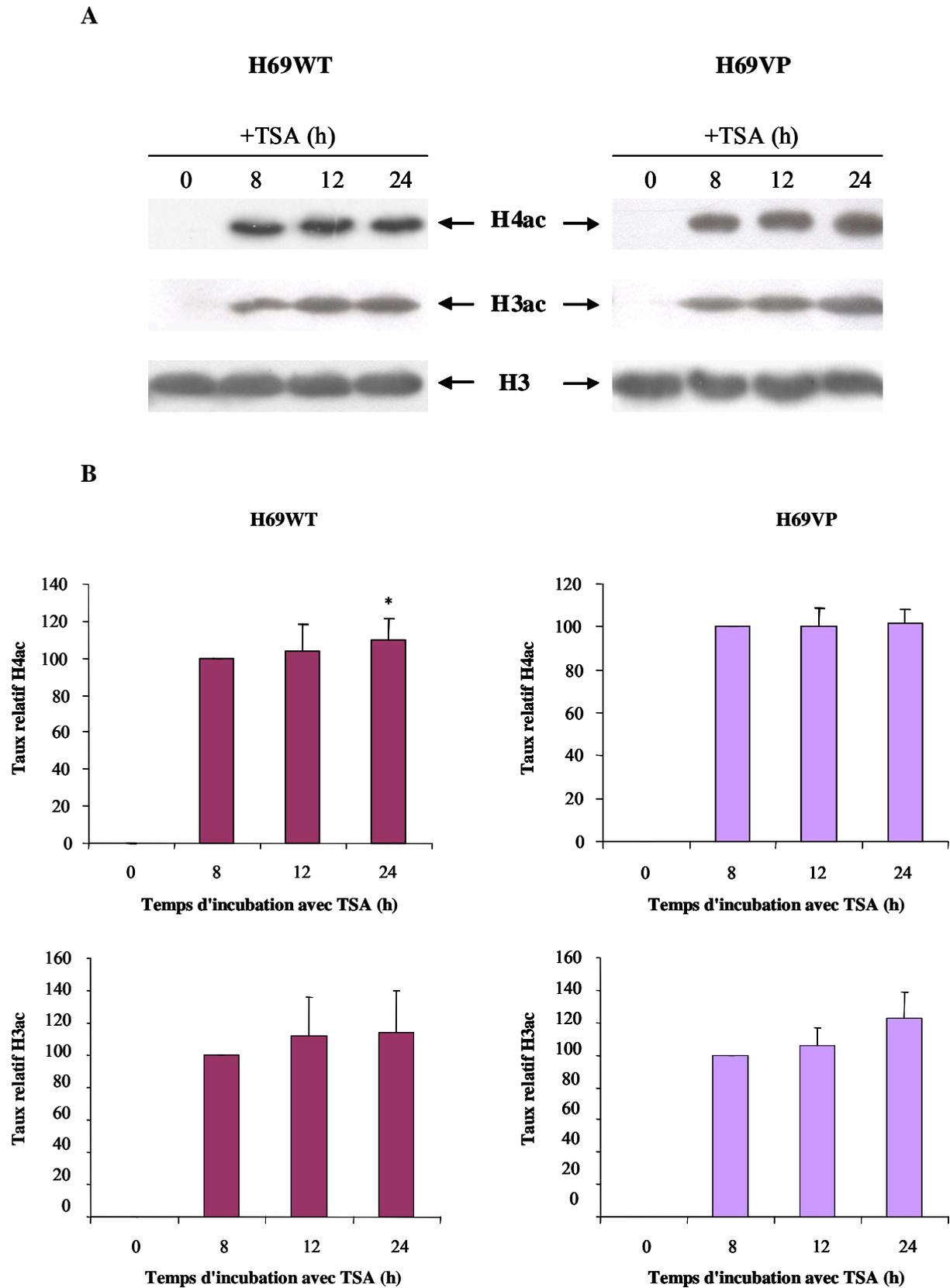


Figure 37. Acétylation des histones H4 et H3 par la TSA.

A : analyse par western blot du niveau des histones H4 acétylées, H3 acétylées et H3 totales dans des cellules H69WT et H69VP incubées ou non avec la TSA (100 ng/mL) pendant 8 h, 12 h et 24 h.

B : quantifications de l'acétylation par rapport au taux de H3 totales. Les valeurs correspondent à la moyenne \pm ET de 3 expériences indépendantes et représentent les variations par rapport au temps 8 h.

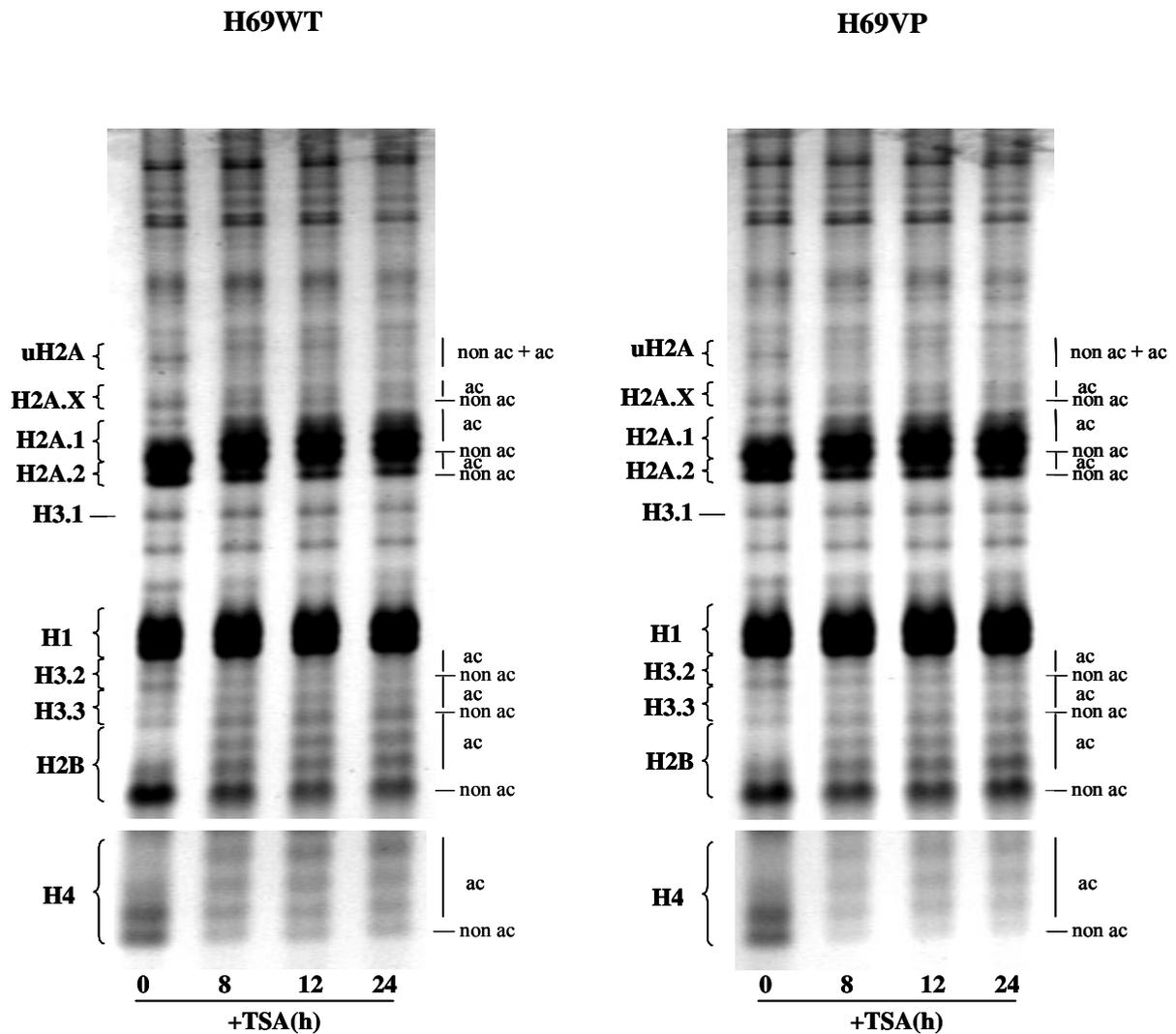


Figure 38. Analyse par AUT-PAGE des formes acétylées des histones et de leurs variants.

Histones extraites à partir de cellules H69WT et H69VP incubées ou non avec la TSA (100 ng/mL) pendant 8 h, 12 h et 24 h, puis migrées sur gel AUT. ac = formes acétylées ; non ac = formes non acétylées.

Ce résultat est représentatif de 3 expériences indépendantes.

Les différents variants de l'histone H3 ont été séparés ainsi que leur formes acétylées. Celles-ci se retrouvent principalement au niveau du variant H3.3, histone associée souvent aux régions transcriptionnellement actives de la chromatine (Jin *et al.*, 2005 ; McKittrick *et al.*, 2004), ainsi qu'au niveau de H3.2. Ces formes acétylées sont détectées par le « smear » qu'elles forment sur le gel au dessus de la forme non acétylée.

L'histone H2B est surtout mono- et non acétylées dans les 2 lignées cellulaires. Incubées en présence de TSA, les formes di- et tri-acétylées de H2B apparaissent aux dépens de la forme non acétylée. La bande correspondant à la forme tri-acétylée de H2B tend à se confondre avec celle de H3.3 non acétylée.

Les histones H2A.2 ont une mobilité électrophorétique différente de celle des H2A.1 sur le gel AUT, en raison de la substitution de la leucine en position 51 par un résidu méthionine (Redon *et al.*, 2002). Les formes acétylées migrant moins vite que les non acétylées, nous pouvons distinguer les formes non acétylées des histones H2A.1 et H2A.2, ainsi que les formes mono- et di-acétylées des histones H2A.1. La forte intensité des bandes correspondant à ces deux histones rend difficile la discernation des formes acétylées des histones H2A.2.

L'histone H1 ne peut pas être acétylée d'une façon post-traductionnelle *in vivo* (Alvelo-Ceron *et al.*, 2000 ; Herrera *et al.*, 1997), c'est pourquoi nous n'observons pas de bandes correspondant à une acétylation de H1 par la TSA. D'autres histones ont pu être séparées sur le gel AUT, notamment les histones uH2A et le variant H2A.X.

L'augmentation du temps d'incubation avec la TSA jusqu'à 24 h n'a qu'une influence minime sur le profil de l'acétylation retrouvé après 8 h d'incubation.

1.2.3.2. Méthylation des histones

La di-méthylation de l'histone H3 sur la lysine 9 (H3K9diM) est une modification post-traductionnelle caractéristique d'une chromatine fermée, transcriptionnellement inactive. La TSA ayant dans certains cas particuliers un effet déméthylant de l'ADN (Selker, 1998), son effet sur la méthylation de H3K9 a été recherché par western blot (figure 39). La TSA n'entraîne pas de modifications significatives au niveau de la di-méthylation de H3K9 au cours du temps et ceci jusqu'à 24 h d'incubation, dans les cellules H69WT et H69VP. Signalons que le taux basal de H3K9diM, rapporté à la quantité totale des histones H3, est équivalent dans les 2 lignées.

1.2.4. Effet de la TSA sur la texture nucléaire

Bien que la TSA induise un profil d'acétylation des histones similaire dans les 2 lignées cellulaires, les modifications texturales nucléaires induites diffèrent entre les cellules sensibles et résistantes. La figure 40 décrit les variations des paramètres de texture par rapport aux valeurs retrouvées dans les cellules non traitées. Ce type de représentation est plus informatif que les valeurs brutes des paramètres, car basé sur une comparaison relative, moins sensible aux différences provenant des expériences elles-mêmes (Bartels *et al.*, 1998 ; Weyn *et al.*, 2000).

Dans les cellules H69WT, la chromatine se décondense progressivement jusqu'à 12 h d'incubation en présence de 100 ng/mL de TSA. Ceci est perçu par une diminution de la DOM et de la ML. Après 24 h d'incubation, des changements significatifs de l'organisation spatiale de la chromatine sont observés : malgré une chromatine qui continue à se décondenser globalement (diminution de la DOM et de la ML), des mottes chromatiniennes apparaissent dans le noyau. En effet, l'augmentation de l'ICS et du PLS, et la diminution de l'ILS rendent compte d'une texture granuleuse de la chromatine. L'augmentation de l'inertie (I) signifie que le contraste est plus important ; les mottes chromatiniennes deviennent donc plus denses et mieux distinctes. Celles-ci restent cependant homogènes entre elles compte tenu de l'uniformité de la distribution des niveaux de gris (augmentation de la DNG) et de l'homogénéité des longueurs de section (augmentation de la DLS).

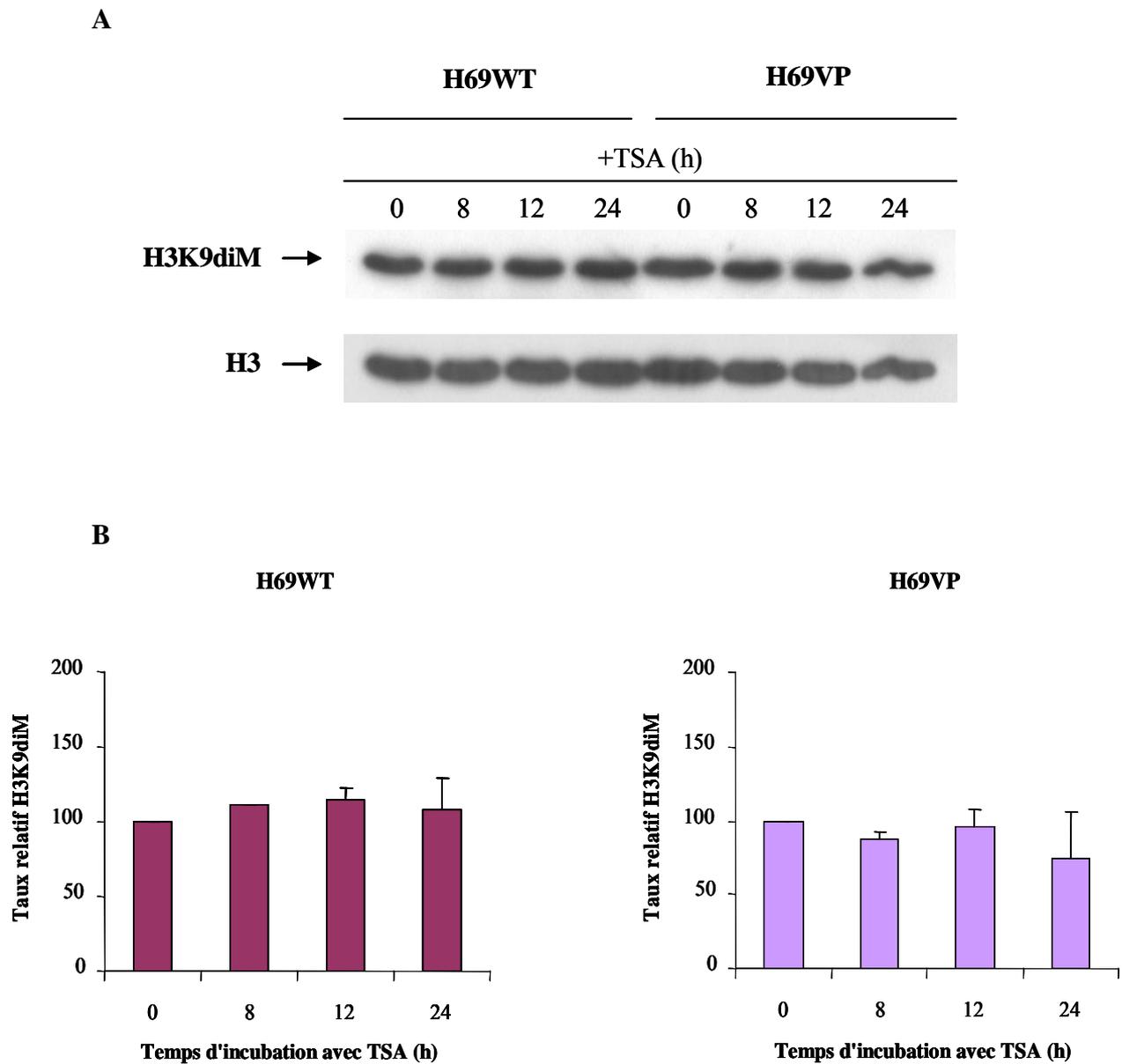


Figure 39. Effet de la TSA sur la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3.

A : analyse par western blot du niveau de H3K9 di-méthylées et de H3 totales dans des cellules H69WT et H69VP incubées ou non avec la TSA (100 ng/mL) pendant 8 h, 12 h et 24 h.

B : quantifications de la méthylation par rapport au taux de H3 totales. Les valeurs correspondent à la moyenne \pm ET de 3 expériences indépendantes et représentent les variations par rapport au contrôle non traité.

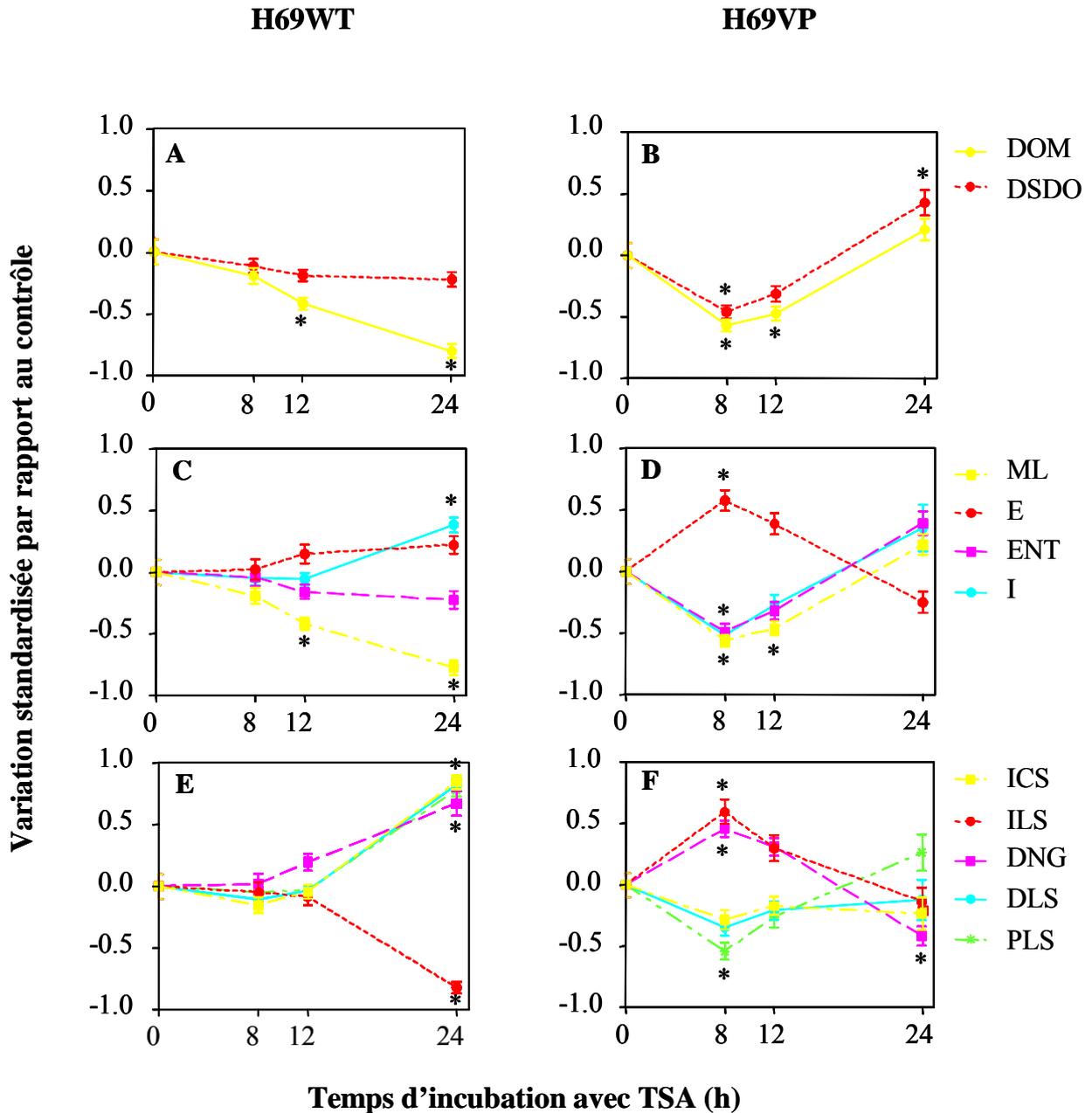


Figure 40. Effet de la TSA sur la texture nucléaire.

Paramètres de texture analysés dans les cellules H69WT (A, C, E) et H69VP (B, D, F) avant et après incubation avec 100 ng/mL TSA pendant 8 h, 12 h et 24 h.

A et B : paramètres de l'histogramme des densités optiques. C et D : paramètres de la matrice de co-occurrence. E et F : paramètres de la matrice des longueurs de section. Les valeurs correspondent à la moyenne \pm ETM de la variation par rapport au contrôle, calculées sur 200 cellules en phase G_0/G_1 à partir de 3 expériences indépendantes.

* : valeur significativement différente de celle obtenue dans le contrôle non traité – Test *t* de Student après la correction de Bonferroni pour variables multiples.

Dans les cellules H69VP, les changements de texture nucléaire sont rapides mais transitoires. Après 8 h d'incubation en présence de 100 ng/mL de TSA, on observe une décondensation globale de la chromatine (diminution de la DOM et de la ML). Cette chromatine est distribuée d'une façon plus homogène (diminution de la DSDO, de l'ENT et de l'I et augmentation de l'E) et devient finement granuleuse (augmentation de l'ILS et de la DNG et diminution de l'ICS et du PLS). Après 12 h et jusqu'à 24 h d'incubation avec la TSA, la plupart de ces paramètres reprennent des valeurs qui se rapprochent progressivement de celles observées dans les cellules non traitées. Ces paramètres suggèrent une « recondensation » de la chromatine (augmentation de la DOM et de la ML), dont la distribution est de plus en plus hétérogène (augmentation de la DSDO, de l'ENT, de l'I et diminution de l'E et de la DNG) et grossièrement granuleuse (diminution de l'ILS et augmentation du PLS).

Une façon plus simple de représenter les résultats de la texture est de réduire les données en calculant « l'anormalité nucléaire » qui correspond à la moyenne des valeurs absolues des variations par rapport au contrôle de tous les paramètres combinés. Elle permet d'estimer l'éloignement ou le rapprochement du profil nucléaire d'une population traitée par la TSA de celui d'une population « normale » représentée dans notre étude par les cellules non traitées.

Ainsi, la figure 41 montre que les cellules H69WT ont un profil chromatinien qui s'éloigne des cellules « normales » avec l'augmentation du temps d'incubation en présence de TSA. Ce résultat est en accord avec l'analyse individuelle des paramètres dans la mesure où cette dernière décrit une décondensation progressive de la chromatine.

De même l'étude de l'anormalité nucléaire des cellules H69VP incubées avec la TSA décrit un profil chromatinien qui s'éloigne de la normale après 8 h d'incubation puis se rapproche de nouveau de celle-ci. En effet, les paramètres de texture étudiés individuellement décrivent des changements transitoires de la texture chromatinienne.

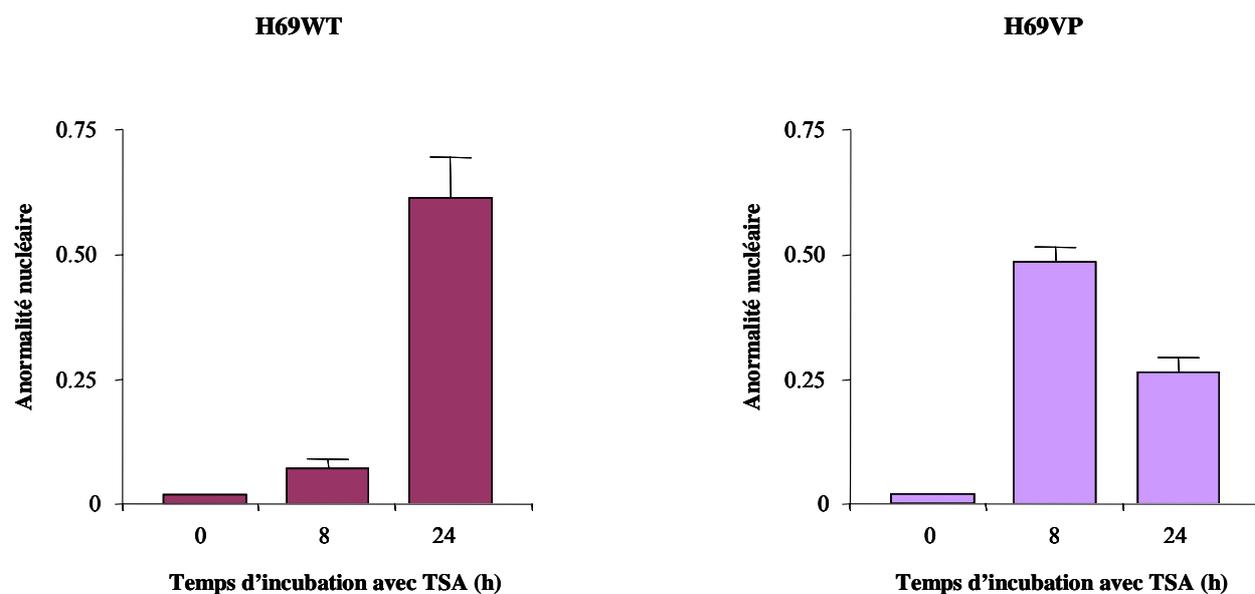


Figure 41. Anormalité nucléaire induite par la TSA.

Anormalité nucléaire analysée dans les cellules H69WT et H69VP avant et après incubation avec 100 ng/mL TSA pendant 8 h, et 24 h.

Les valeurs correspondent à la moyenne \pm ET des valeurs absolues des index de déviation des paramètres de texture par rapport au contrôle non traité, calculées sur 200 cellules en phase G₀/G₁ à partir de 3 expériences indépendantes.

1.2.5. Conclusions

Les cellules résistantes H69VP présentent un taux d'ARNm MDR1 plus élevé, parallèlement à une distribution plus uniforme de la chromatine, en comparaison avec leurs homologues sensibles H69WT. Cette différence de texture nucléaire entre les deux lignées cellulaires n'est pas due à des variations de l'acétylation globale des histones ni à la diméthylation de la lysine 9 de l'histone H3.

La trichostatine A induit l'arrêt du cycle cellulaire en phase G₀/G₁ et G₂/M et manifeste une activité apoptotique dans les cellules H69WT et H69VP incubées pendant 24 h en présence de 100 ng/mL de TSA. De plus, elle entraîne une hyperacétylation générale des histones du cœur nucléosomique qui modifie le phénotype nucléaire des cellules ; une décondensation globale et progressive de la chromatine est alors observée dans les cellules sensibles H69WT, alors qu'elle est transitoire dans les cellules résistantes H69VP où une « recondensation » chromatiniennne a été mise en évidence après 12 heures de traitement.

2. Régulation épigénétique du gène *MDR1* dans les cellules H69WT et H69VP

2.1. Modulation de l'expression du gène *MDR1* par la TSA

La deuxième partie de ce travail vise à mieux comprendre les régulations épigénétiques du gène *MDR1* et à rechercher une éventuelle corrélation entre celles-ci et le phénotype nucléaire chromatinien observé. Ainsi, nous avons tout d'abord analysé l'effet de la TSA sur l'expression de l'ARNm *MDR1* dans les cellules H69WT et H69VP.

Après incubation des cellules H69WT et H69VP avec 100 ng/mL de TSA durant 8 h, 12 h et 24 h, l'ARN a été soumis à une RT-PCR en temps réel afin de détecter l'expression de l'ARNm *MDR1* normalisée par rapport à l'ARNr 18S.

Le taux d'expression *MDR1*/18S est considéré comme égal à 1 pour les cellules non traitées H69WT et H69VP. Ce taux d'expression ne signifie pas que l'expression de l'ARNm *MDR1* est équivalente dans ces deux lignées [rappelons que cette expression est 8000 fois plus importante dans les cellules H69VP (figure 34)]. Les comparaisons sont donc faites entre cellules traitées et non traitées d'une même lignée. Nous avons opté pour ce mode de représentation des figures dans toutes les expériences qui ont nécessité une RT-PCR.

Les résultats montrent que la TSA modifie l'expression du gène *MDR1* dans les 2 lignées cellulaires, ce qui est conforme aux données de la littérature confirmant que cette expression est sous contrôle épigénétique (Jin *et al.*, 1998) (figure 42). Cependant, la modulation de son expression apparaît différente dans les cellules sensibles et résistantes. Une augmentation progressive du taux d'ARNm est observée en fonction du temps d'incubation avec la TSA dans les cellules H69WT, alors que c'est l'inverse qui a lieu dans la lignée résistante où l'on observe une diminution de cette expression.

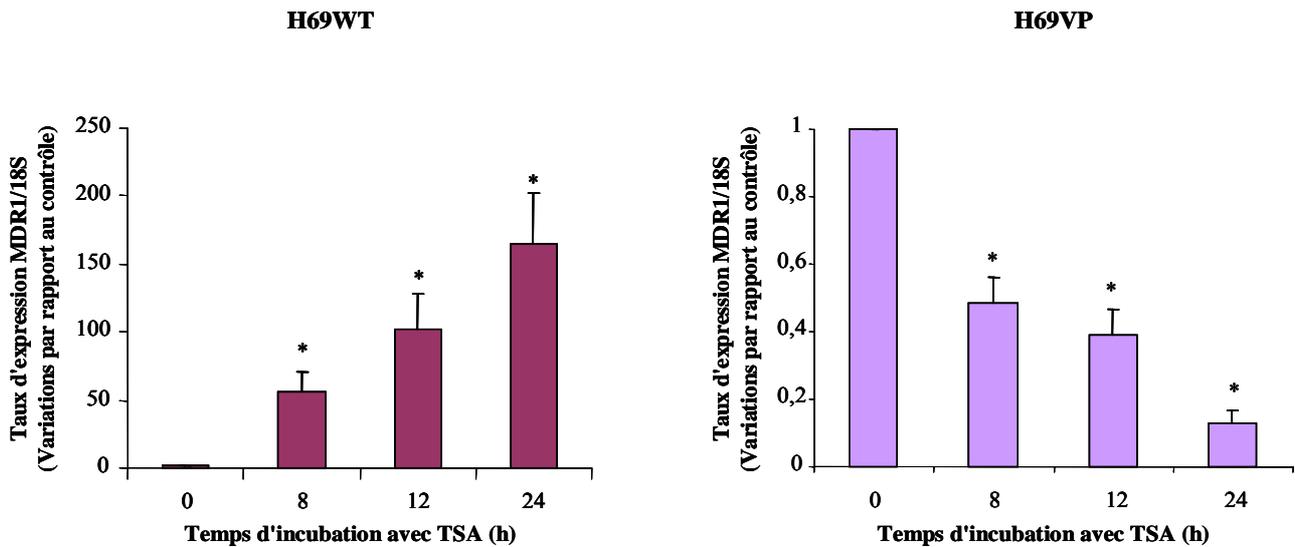


Figure 42. Effet de la TSA sur l'expression du gène *MDR1*.

Quantifications par RT-PCR en temps réel du taux d'ARNm *MDR1* par rapport à l'ARNr 18S dans des cellules H69WT et H69VP incubées ou non avec 100 ng/mL TSA pendant 8 h, 12 h et 24 h. Les valeurs correspondent à la moyenne \pm ET de 4 expériences indépendantes.

* : $p < 0,05$ en comparaison avec la valeur obtenue dans le contrôle non traité – Test *t* de Student

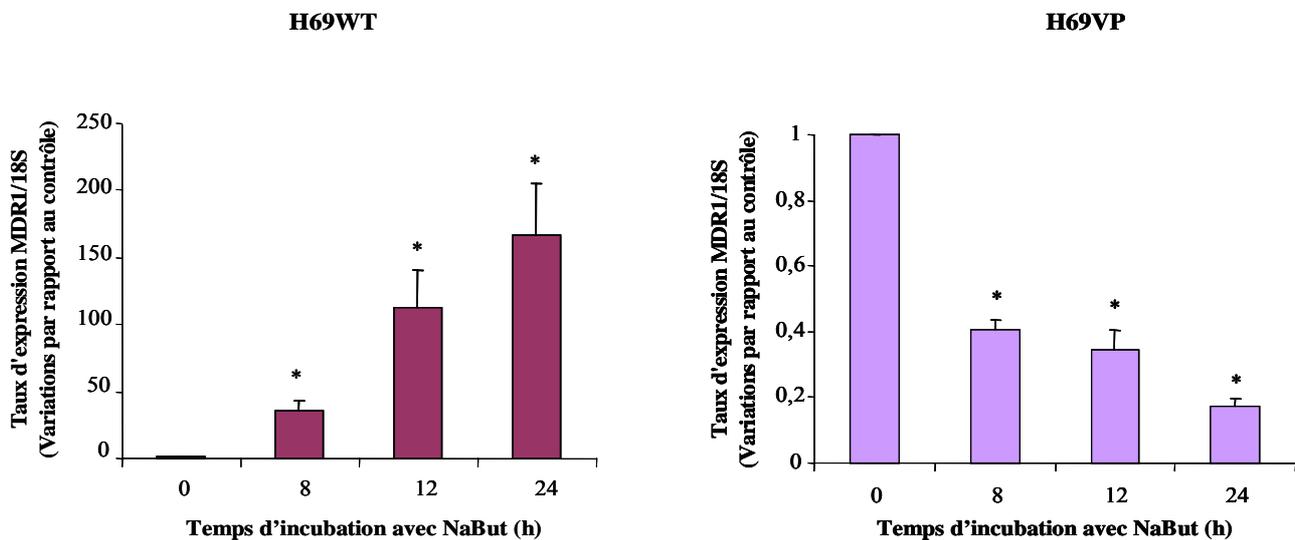


Figure 43. Effet du NaBut sur l'expression du gène *MDR1*.

Quantifications par RT-PCR en temps réel du taux d'ARNm *MDR1* par rapport à l'ARNr 18S dans des cellules H69WT et H69VP incubées ou non avec 5mM NaBut pendant 8 h, 12 h et 24 h. Les valeurs correspondent à la moyenne \pm ET de 3 expériences indépendantes.

* : $p < 0,05$ en comparaison avec la valeur obtenue dans le contrôle non traité – Test *t* de Student

2.2. Modulation de l'expression du gène MDR1 par le butyrate de sodium

Afin de vérifier que c'est l'activité inhibitrice des HDACs de la TSA, et non une propriété inhérente à la molécule même, qui est responsable de ces modifications d'expression du gène *MDR1*, les 2 lignées cellulaires ont été incubées durant 8 h, 12 h et 24 h en présence de 5 mM de butyrate de sodium (NaBut), un autre inhibiteur des HDACs. La figure 43 illustre les variations d'expression de l'ARNm MDR1 après action du NaBut. Celles-ci sont similaires à celles observées en présence de TSA, ce qui semble confirmer l'implication de l'activité inhibitrice des HDACs de la TSA dans la régulation de l'expression du gène *MDR1*.

2.3. Rôles des mécanismes transcriptionnels et non transcriptionnels dans l'activité de la TSA sur l'expression du gène MDR1

2.3.1. Rôle de la transcription

L'abondance en ARNm peut être régulée à 2 niveaux : la transcription du gène et la dégradation de l'ARN. Afin d'analyser lequel de ces 2 mécanismes pourrait être impliqué lors de variations de l'ARNm MDR1 induites par la TSA, les cellules H69WT et H69VP ont été pré-incubées pendant 30 min avec l'actinomycine D à 5 µg/mL, un inhibiteur de la transcription, puis cultivées en présence ou en absence de 100 ng/mL de TSA associée à une concentration de 1 µg/mL d'actinomycine D.

L'actinomycine D inhibe l'ARN polymérase I (Pol I) à faibles concentrations (0,04 µg/mL) et les trois ARN polymérases (Pol I, Pol II et Pol III) à fortes concentrations (Perry, 1963). A la concentration de 5 µg/mL, toutes les ARN polymérases sont inhibées par l'actinomycine D ; aucun ARN ne peut donc être transcrit. Ceci va induire une diminution de la quantité de tous les ARN déjà existant dans la cellule par dégradation progressive.

Les résultats montrent qu'en présence d'actinomycine D, aucune augmentation de la quantité d'ARNm MDR1 n'est observée après incubation des cellules H69WT en présence de TSA. De même, dans les cellules H69VP, malgré une nette diminution du taux d'ARNm MDR1 induite par la TSA, aucune différence n'est retrouvée quand celles-ci ont été pré-incubées avec l'actinomycine D (figure 44).

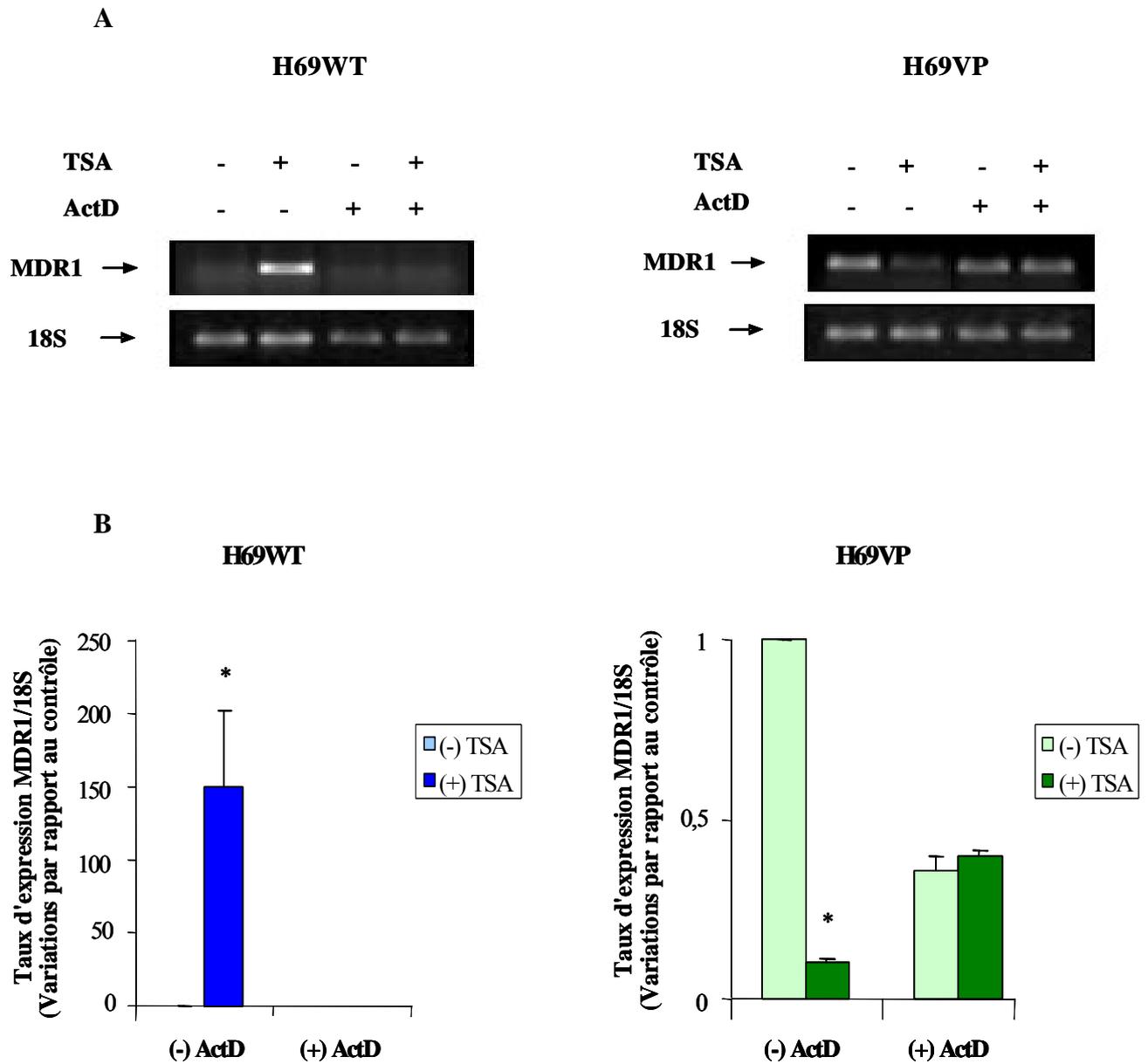


Figure 44. Rôle de la transcription dans la modulation de l'expression du gène *MDR1* par la TSA.

Etude de l'expression de l'ARNm *MDR1* dans des cellules H69WT et H69VP incubées ou non avec 100 ng/mL TSA pendant 24 h, en présence ou en absence d'actinomycine D. A : Gel d'agarose à 2,5% des produits post-PCR (32 cycles et 25 cycles pour PCR *MDR1* dans les H69WT et H69VP respectivement ; 20 cycles pour PCR 18S) B : Quantifications par RT-PCR en temps réel du taux d'ARNm *MDR1* par rapport à l'ARNr 18S. Les valeurs correspondent à la moyenne \pm ET de 3 expériences indépendantes.

* : $p < 0,05$ en comparaison avec la valeur obtenue dans le contrôle correspondant (non traité avec la TSA) – Test *t* de Student

Le potentiel transcriptionnel est donc un facteur essentiel pour que la TSA puisse moduler l'expression du gène *MDR1* dans les 2 lignées cellulaires étudiées. Ces résultats laissent présager une régulation par la TSA du taux de transcription du gène *MDR1*.

Cependant, hormis une régulation transcriptionnelle de l'expression du gène *MDR1*, la TSA pourrait aussi influencer la dégradation de son ARNm, qui serait en partie responsable des différences retrouvées au niveau de l'expression de l'ARNm de ce gène de résistance étudiée par RT-PCR.

2.3.2. Analyse de la stabilité de l'ARNm MDR1

Deux approches ont été appliquées pour étudier l'effet de la TSA sur la stabilité de l'ARNm MDR1, afin de répondre aux questions suivantes : la TSA a-t-elle une activité sur la stabilité de l'ARNm ? Si oui, celle-ci résulte-t-elle d'un effet sur la transcription ? Ainsi cette analyse a été réalisée en incubant les cellules en présence de trichostatine A, après ou avant inhibition de la transcription par l'actinomycine D.

2.3.2.1. Recherche d'un effet indépendant de la transcription

Afin d'analyser si le niveau de dégradation de l'ARNm MDR1 peut être modifié par la présence de la TSA dans le milieu de culture indépendamment de son action sur la transcription, les cellules H69WT et H69VP ont été pré-incubées avec l'actinomycine D à 5 µg/mL durant 30 min ; la TSA a ensuite été rajoutée ou non à 100 ng/mL dans le milieu de culture contenant au final 1 µg/mL d'actinomycine D. Le taux d'ARNm a été déterminé par RT-PCR en temps réel, à différents temps d'incubation avec la TSA (0 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h et 24 h). Les résultats sont illustrés par la figure 45 et représentent les variations du rapport ARNm MDR1/ARNr 18S, par rapport au contrôle défini par le moment d'administration de la TSA (autrement dit à t=0h après les 30 minutes d'incubation en présence d'actD).

Dans les cellules H69WT et H69VP, les courbes de variations présentent une allure descendante ; la dégradation de l'ARNm MDR1 est donc plus rapide que celle de l'ARNr 18S. De plus, les courbes reflétant la dégradation de l'ARNm MDR1 en l'absence de TSA tendent à se confondre avec celles enregistrées en présence de TSA, les différences n'étant pas significatives aux différents temps étudiés et jusqu'à 24 h d'incubation.

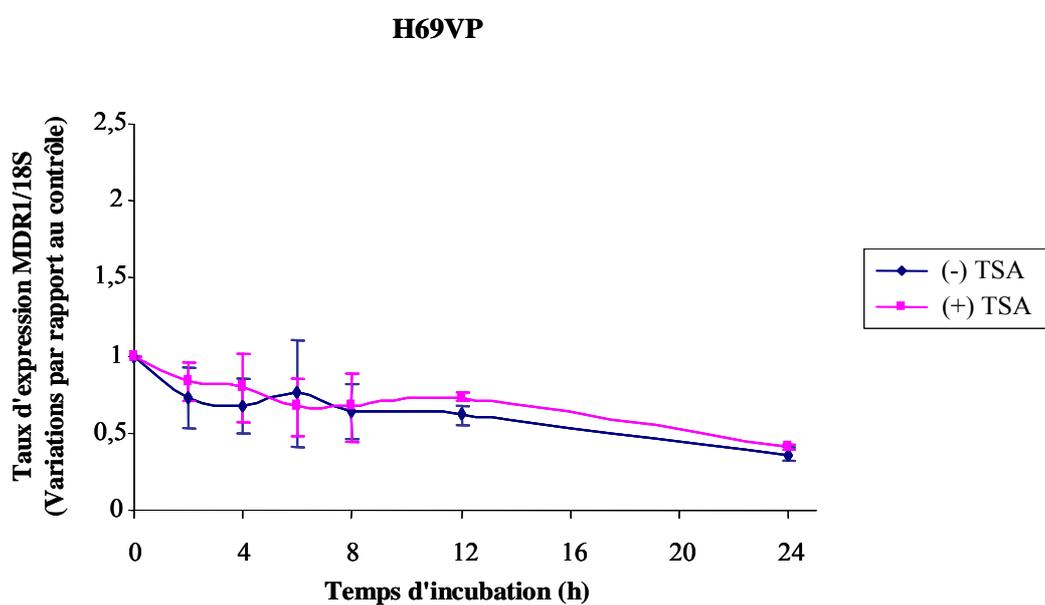
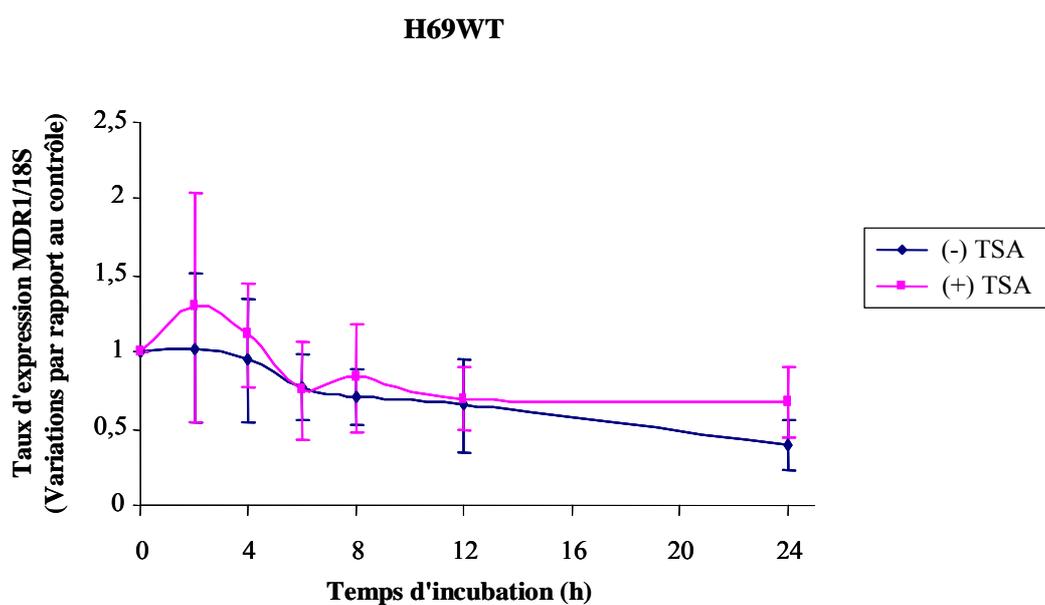


Figure 45. Effet de la TSA sur la stabilité de l'ARNm MDR1 selon un mécanisme indépendant de la transcription.

Quantifications par RT-PCR en temps réel du taux de dégradation de l'ARNm MDR1 dans des cellules H69WT et H69VP incubées ou non avec 100 ng/mL TSA après inhibition de la transcription par l'actinomycine D. L'expression de MDR1 est normalisée par rapport à celle de 18S. Les valeurs correspondent à la moyenne \pm ET de 3 expériences indépendantes.

Ainsi, la TSA n'influe pas sur la dégradation de l'ARNm MDR1 par un mécanisme indépendant de la transcription. Néanmoins, la stabilité de l'ARNm MDR1 pourrait être modifiée par l'action de la TSA sur l'expression de gènes intervenant dans la dégradation ou la stabilisation de l'ARN, et donc par un mécanisme dépendant de la transcription.

2.3.2.2. Recherche d'un effet dépendant de la transcription

La TSA pourrait moduler l'expression de gènes intervenant dans la stabilité de l'ARNm MDR1. Afin d'analyser cette hypothèse, les cellules H69WT et H69VP ont été incubées pendant 6 h avec ou sans TSA à 100 ng/mL, avant d'administrer l'actinomycine D dans le milieu de culture à une concentration finale de 5 µg/mL pendant 30 min. Le milieu a été ensuite dilué 5 fois afin de garder l'actinomycine D à 1 µg/mL. La moitié des cellules a été récupérée aussitôt et l'autre moitié 12 h plus tard. Les résultats obtenus par RT-PCR en temps réel ont été représentés par la variation du taux ARNm MDR1/ARNr 18S par rapport au contrôle désigné au temps $t=0h$ après l'incubation de 30 min avec l'actD (figure 46).

Le taux relatif d'ARNm diminue d'environ 40% à $t=12h$ dans les cellules H69WT non incubées avec la TSA. Cette diminution est identique dans les cellules ayant subi l'effet de la TSA. De même dans les cellules H69VP, le rapport ARNm MDR1/ARNr 18S diminue de la même manière avec ou sans pré-incubation avec la TSA.

Ces résultats montrent que, dans notre modèle cellulaire, la TSA n'influence pas la stabilité de l'ARNm MDR1 via un mécanisme dépendant de son activité sur la transcription d'autres gènes.

En conclusion, la TSA modifie le niveau transcriptionnel du gène *MDR1* et n'affecte pas la stabilité de son ARNm dans les cellules H69WT et H69VP.

2.3.3. Rôle de la synthèse protéique *de novo* dans la modulation de l'expression du gène *MDR1*

La régulation de l'expression du gène *MDR1* par la TSA a lieu au niveau transcriptionnel et pourrait dépendre de la modification d'expression de facteurs impliqués dans l'expression du gène *MDR1*. Ainsi, nous avons examiné l'importance de la synthèse protéique *de novo* sur la régulation par la TSA de la transcription du gène *MDR1*.

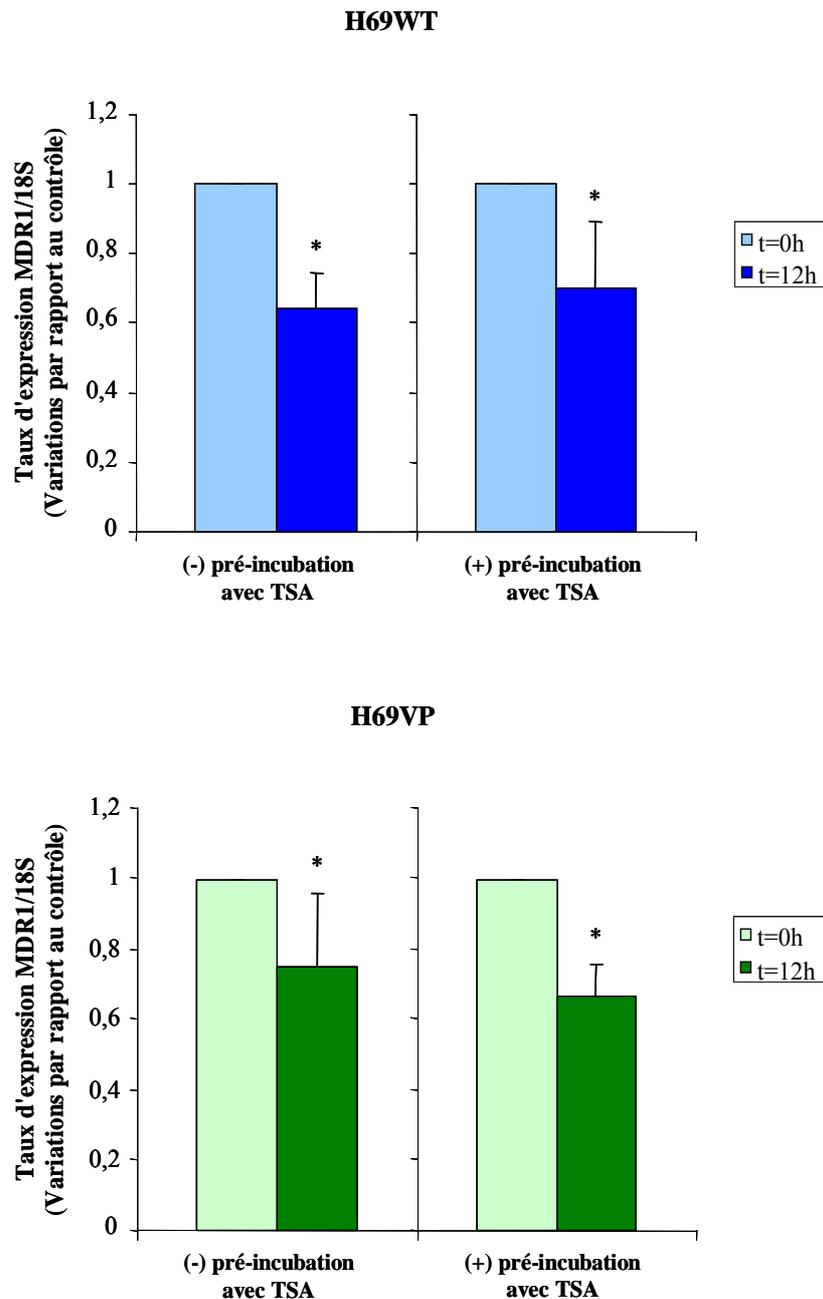


Figure 46. Effet de la TSA sur la stabilité de l'ARNm MDR1 selon un mécanisme dépendant de la transcription.

Quantifications par RT-PCR en temps réel du taux de dégradation de l'ARNm MDR1 12 h après inhibition de la transcription par l'actinomycine D, dans des cellules H69WT et H69VP pré-incubées ou non avec 100 ng/mL TSA pendant 6 h. L'expression de MDR1 est normalisée par rapport à celle de 18S. Les valeurs correspondent à la moyenne \pm ET de 3 expériences indépendantes.

* : $p < 0,05$ en comparaison avec la valeur obtenue dans le contrôle correspondant (à $t=0h$ après inhibition de la transcription) – Test t de Student

Les cellules H69WT et H69VP ont été incubées pendant 1 h avec 10 µg/ml de cycloheximide (CHX), un inhibiteur de la traduction, puis traitées ou non pendant 24 h avec 100 ng/mL de TSA en présence ou en absence de CHX ; L'effet du CHX sur la modulation de l'expression du gène *MDR1* par la TSA a été ensuite analysé par RT-PCR en temps réel.

➤ **Vérification de l'effet inhibiteur du CHX sur la traduction**

Afin de vérifier que le protocole de traitement avec le CHX a permis une inhibition totale de la traduction, l'expression des protéines Bax et cycline D1 a été analysée par western blot, en présence de TSA, avant et après action du CHX.

Plusieurs études démontrent que l'apoptose induite par la TSA est accompagnée d'une surexpression de la protéine Bax (Herold *et al.*, 2002 ; Suzuki *et al.*, 2000 ; Vanhaecke *et al.*, 2004). Ceci est le cas dans les cellules H69WT et H69VP où l'on observe une augmentation d'expression de la protéine Bax après 24 h d'incubation en présence de TSA (figure 47). Ce résultat est conforme avec les résultats décrits précédemment sur l'effet apoptotique de la TSA dans ces 2 lignées cellulaires.

Dans les cellules incubées avec le CHX, la TSA n'induit plus la surexpression de Bax, ce qui prouve que la synthèse protéique a été effectivement inhibée par le CHX.

La TSA, induisant après 24 h d'incubation un arrêt du cycle cellulaire en phase G₀/G₁ dans les cellules H69WT et H69VP, l'expression de la cycline D1, un régulateur clé de l'entrée et de la progression en phase G₁ ainsi que de la transition G₁-S (Joyce *et al.*, 2001), pourrait être influencée. En effet, après 24 h d'incubation, la TSA diminue l'expression de la cycline D1 (figure 48), conformément à ce qui a été décrit dans la littérature (Vanhaecke *et al.*, 2004). La quantité de cycline D1 dépend de son taux de synthèse et de sa dégradation. Après inhibition de la traduction par le CHX, elle ne dépend plus que de sa dégradation ; c'est pourquoi aucune différence par western blot n'est observée entre cellules traitées et non traitées par la TSA, quand celles-ci ont été pré-incubées avec le CHX. Ceci est un contrôle supplémentaire de l'inhibition de la traduction par le CHX utilisé à 10 µg/ml dans les cellules H69WT et H69VP et administré 1 h avant la TSA.

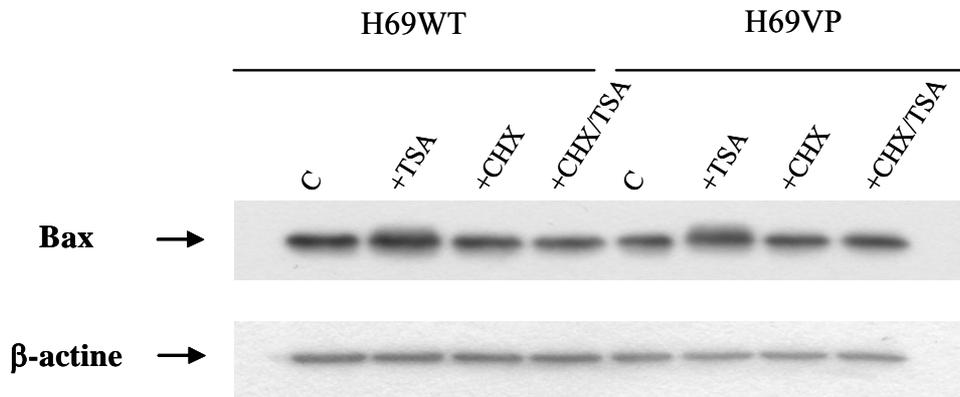


Figure 47. Effet du cycloheximide sur la modulation de l'expression de Bax par la TSA.

Analyse par western blot du niveau d'expression de Bax dans des cellules H69WT et H69VP incubées ou non avec la TSA (100 ng/mL) pendant 24 h, en présence ou en absence de cycloheximide à 10 µg/mL administré 1h avant la TSA. La quantité de Bax est estimée par rapport à celle de la β-actine. Ce résultat est représentatif de 2 expériences indépendantes.

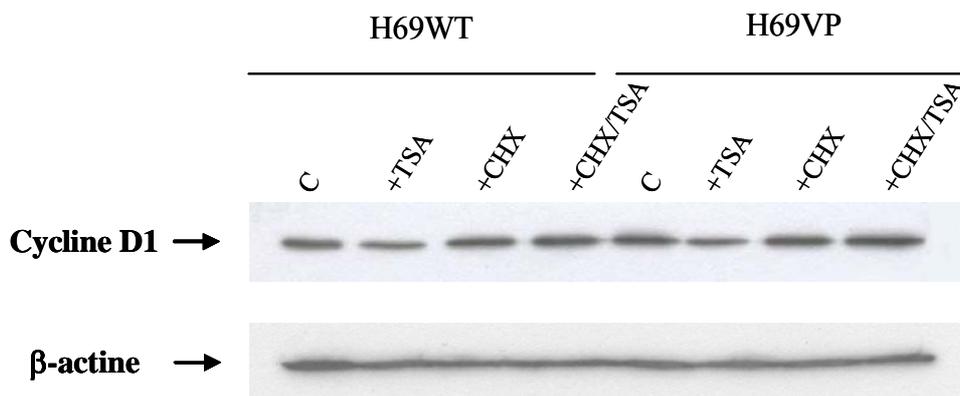


Figure 48. Effet du cycloheximide sur la modulation de l'expression de la cycline D1 par la TSA.

Analyse par western blot du niveau d'expression de la cycline D1 dans des cellules H69WT et H69VP incubées ou non avec la TSA (100 ng/mL) pendant 24 h, en présence ou en absence de cycloheximide à 10 µg/mL administré 1h avant la TSA. La quantité de cycline D1 est estimée par rapport à celle de la β-actine. Ce résultat est représentatif de 2 expériences indépendantes.

Après vérification de l'inhibition de la traduction par le CHX selon le protocole d'étude utilisé, nous avons examiné, par RT-PCR en temps réel, le rôle de la synthèse protéique *de novo* dans la modulation de l'expression du gène *MDR1* par la TSA.

Dans les cellules H69WT, le cycloheximide augmente d'un facteur 7 l'expression du gène *MDR1*, alors que cette augmentation n'est que 1,5 fois plus importante dans les cellules H69VP (figure 49). Ce résultat suggère que l'expression de l'ARNm *MDR1* serait contrôlée par un facteur répresseur, surtout actif dans les cellules sensibles. L'inhibition de la traduction de ce répresseur lèverait donc son action inhibitrice sur l'expression du gène *MDR1*. Un effet semblable du CHX sur l'expression génique a déjà été rapporté dans d'autres modèles cellulaires (Keller *et al.*, 2005 ; Ogretmen *et al.*, 1999), notamment au niveau du gène *MDR1* dans les cellules sensibles MCF-7 et résistantes MCF-7/Adr (Ogretmen *et al.*, 1999). Toutefois, l'augmentation de la quantité d'ARNm *MDR1* en présence de CHX pourrait aussi résulter d'une augmentation de la stabilité de cet ARNm par le CHX.

Après RT-PCR en temps réel interrompue en phase exponentielle, les produits post-PCR ont été visualisés sur gel d'agarose à 2,5%.

Dans les cellules H69WT, une nette augmentation du taux d'ARNm *MDR1* est observée après action de la TSA. Cette augmentation a lieu même après inhibition de la traduction par le CHX (figure 50). De plus, il existe une différence significative entre la quantité d'ARNm *MDR1* observée suite au traitement combinant la TSA au CHX et celle observée après traitement avec la TSA seule, différence imputable à l'action du CHX sur le taux d'ARNm *MDR1*. Toutefois, en présence de CHX, le rapport entre l'ARNm *MDR1* des cellules incubées et non incubées avec la TSA diminue (32 vs 150) (figure 50).

Dans les cellules résistantes, la TSA diminue fortement l'expression du gène *MDR1*. L'inhibition de la traduction par le CHX atténue l'effet de la TSA sans pour autant le supprimer, la quantité d'ARNm *MDR1* passant d'un rapport 1/10 à un rapport 1/3 en présence de CHX (figure 50). Le cycloheximide augmente légèrement la quantité d'ARNm *MDR1*, ce qui peut expliquer la différence significative qui existe entre la quantité d'ARNm *MDR1* après TSA+CHX et celle après TSA seule.

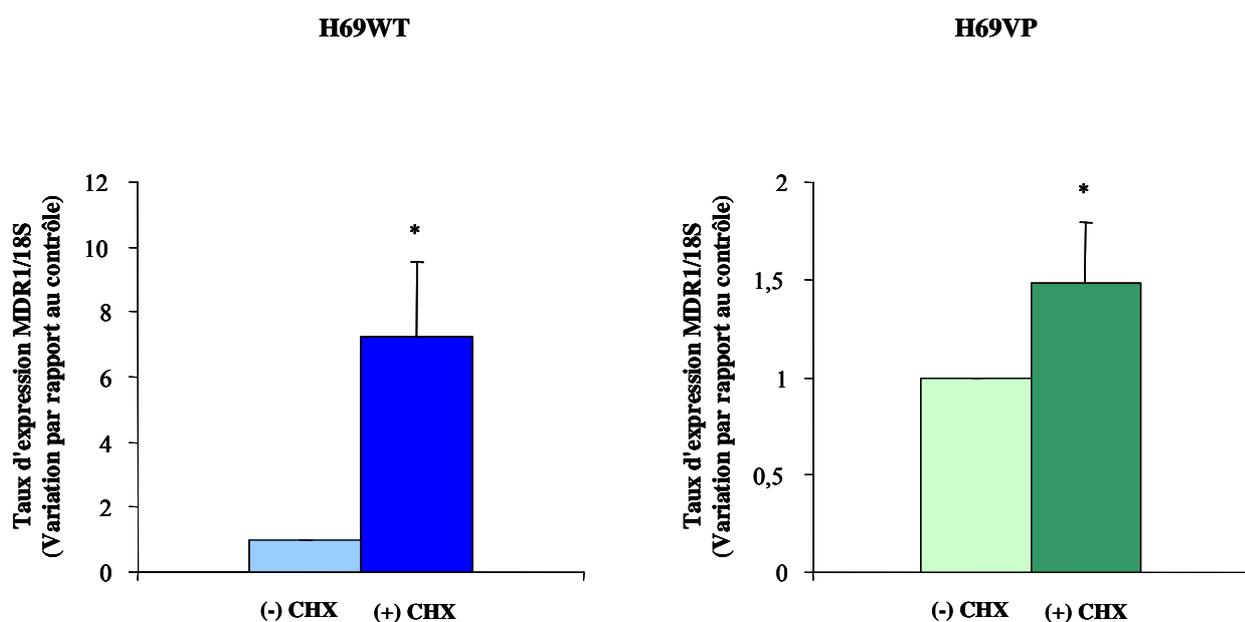


Figure 49. Effet du cycloheximide sur l'expression du gène *MDR1*.

Quantifications par RT-PCR en temps réel du taux d'ARNm *MDR1* par rapport à l'ARNr 18S dans des cellules H69WT et H69VP incubées ou non avec 10 µg/mL cycloheximide pendant 25 h. Les valeurs correspondent à la moyenne ± ET de 3 expériences indépendantes.

* : $p < 0,05$ en comparaison avec la valeur obtenue dans le contrôle non traité – Test *t* de Student

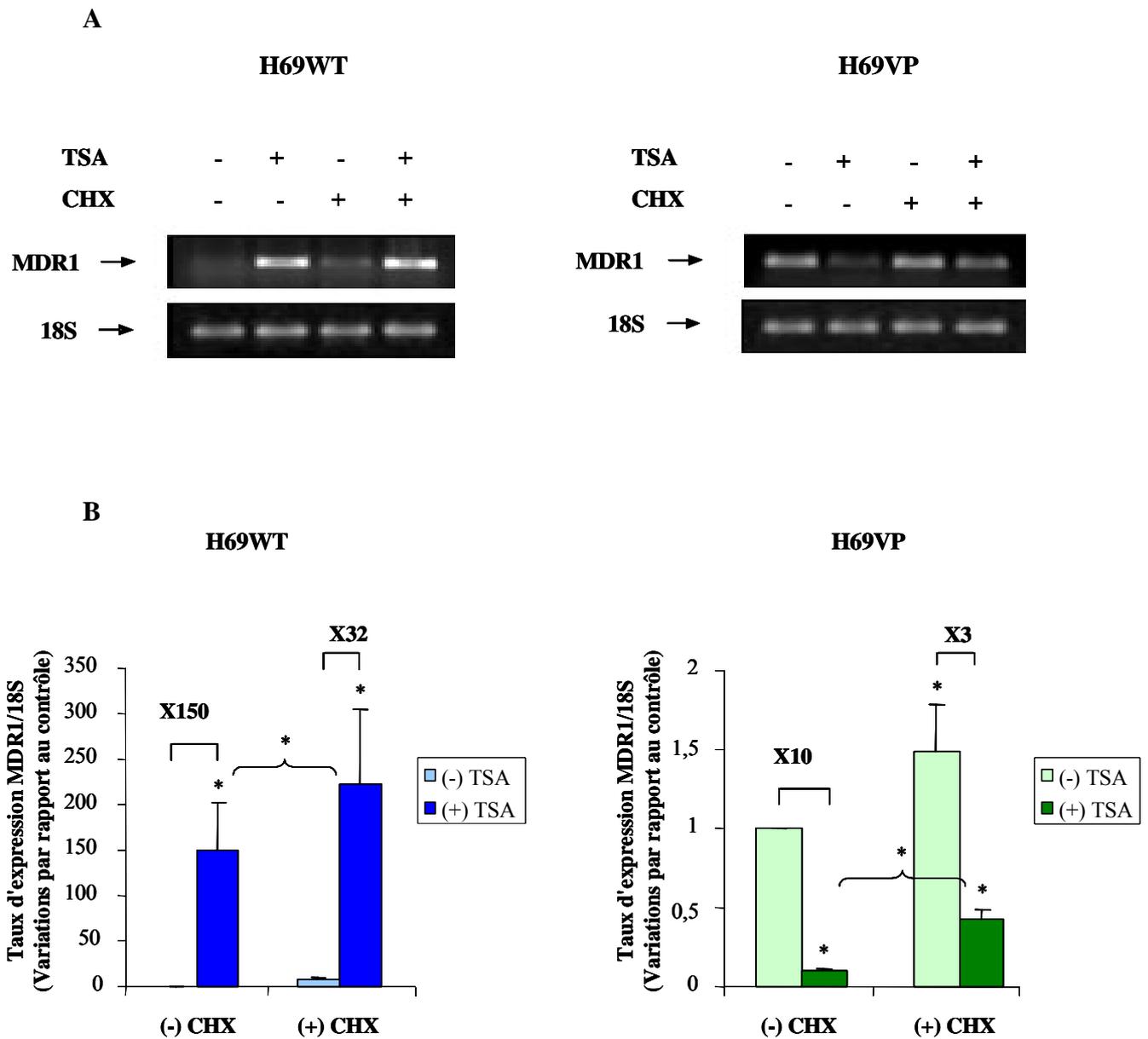


Figure 50. Rôle de la traduction dans la modulation de l'expression du gène *MDR1* par la TSA.

Etude de l'expression de l'ARNm *MDR1* dans des cellules H69WT et H69VP incubées ou non avec 100 ng/mL TSA pendant 24 h, en présence ou en absence de cycloheximide. A : Gel d'agarose à 2,5% des produits post-PCR (32 cycles et 25 cycles pour PCR *MDR1* dans les H69WT et H69VP respectivement ; 20 cycles pour PCR *18S*). B : Quantifications par RT-PCR en temps réel du taux d'ARNm *MDR1* par rapport à l'ARNr *18S*. Les valeurs correspondent à la moyenne \pm ET de 3 expériences indépendantes.

* : $p < 0,05$ en comparaison avec la valeur obtenue dans le contrôle correspondant (non traité avec la TSA) ou comme indiqué par l'accolade – Test *t* de Student

En conclusion, la TSA peut moduler l'expression du gène *MDR1* dans les cellules H69WT et H69VP en dépit de l'inhibition de la synthèse protéique *de novo*. Toutefois, dans la mesure où le pourcentage d'augmentation ou de diminution du taux d'ARNm *MDR1* par la TSA baisse après inhibition de la traduction, la TSA modifierait l'expression de facteurs activateurs ou répresseurs du gène *MDR1*, qui, par leur interaction avec son promoteur, influenceraient en partie sa transcription.

2.3.4. Modulation de l'expression du gène *c-jun* par la TSA

Des données de la littérature mettent l'accent sur l'importance du facteur de transcription *c-jun* dans la régulation de la transcription du gène *MDR1*. Certaines études démontrent que l'expression de *c-jun* induit celle de *MDR1*, alors que d'autres suggèrent le contraire (Fujita *et al.*, 2005 ; Labialle *et al.*, 2002 ; Miao *et al.*, 2003 ; Zhou *et al.*, 2006). Dans la mesure où le gène *c-jun* est sous contrôle épigénétique (Clayton *et al.*, 2000 ; Li *et al.*, 2003 ; Papeleu *et al.*, 2003), l'effet de la TSA sur l'expression du gène *MDR1* pourrait être médié par la modulation de l'expression de *c-jun*.

L'analyse par RT-PCR du taux d'ARNm *c-jun* a été réalisée sur des cellules H69WT et H69VP, incubées ou non en présence de TSA pendant 8 h, 12 h et 24 h. Le taux d'ARNm *c-jun* est identique dans les cellules sensibles et résistantes (figure 51) indiquant que, dans ce modèle cellulaire, il ne serait pas responsable de la différence d'activation basale du gène *MDR1* entre les cellules H69WT et H69VP. La TSA augmente d'une façon significative l'expression de l'ARNm *c-jun* dans les cellules sensibles et ce, dès 8h d'incubation (figure 52). Dans les cellules H69VP, la TSA induit la surexpression de l'ARNm *c-jun* après 8 h d'incubation, moment à partir duquel le taux de son ARNm diminue progressivement jusqu'à atteindre le niveau basal après 24 h d'incubation. Cette modification biphasique du niveau d'ARNm *c-jun* est similaire à la progression dans le temps de la quantité d'ARNm des gènes de réponse précoce caractérisés par une activation rapide et brève (Miao *et al.*, 2003 ; Sng *et al.*, 2005 ; Wallace *et al.*, 1998). Cette différence d'expression du gène *c-jun* entre les cellules sensibles et résistantes serait d'origine transcriptionnelle ou due à une différence de la stabilité de l'ARNm *c-jun*.

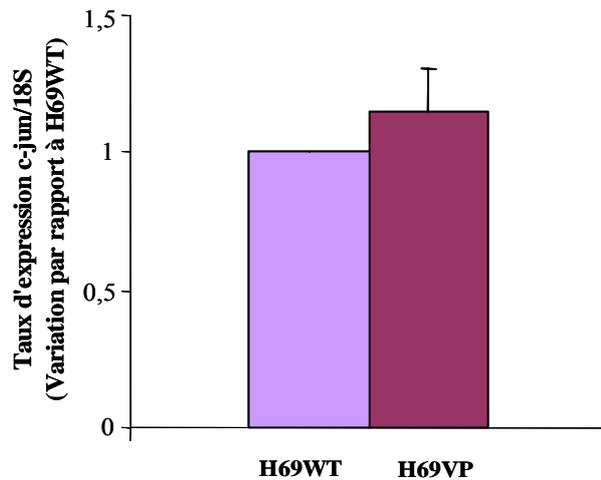


Figure 51. Expression de l'ARNm c-jun dans les cellules H69WT et H69VP.

Quantifications par RT-PCR en temps réel du taux d'ARNm c-jun par rapport à l'ARNr 18S. Les valeurs correspondent à la moyenne \pm ET de 3 expériences indépendantes.

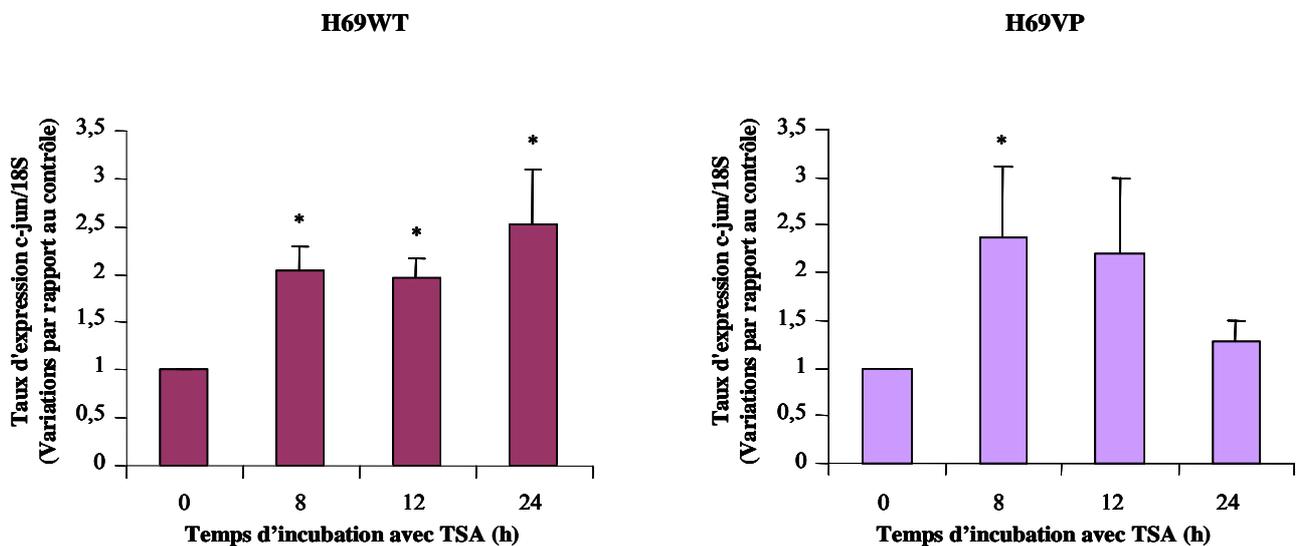


Figure 52. Effet de la TSA sur l'expression du gène c-jun.

Quantifications par RT-PCR en temps réel du taux d'ARNm c-jun par rapport à l'ARNr 18S dans des cellules H69WT et H69VP incubées ou non avec 100 ng/mL TSA pendant 8 h, 12 h et 24 h. Les valeurs correspondent à la moyenne \pm ET de 3 expériences indépendantes.

* : $p < 0,05$ en comparaison avec la valeur obtenue dans le contrôle non traité – Test *t* de Student

Miao ZH et Ding J ont montré que l'activation du gène *c-jun* dans les cellules K562/A02 résistantes diminue l'expression du gène *MDR1* et que l'augmentation du taux d'ARNm *c-jun* précède la réduction de celui de *MDR1* (Miao *et al.*, 2003). Ainsi, dans les cellules résistantes H69VP, l'augmentation de la quantité d'ARNm *c-jun* après 8 h et 12 h d'incubation avec la TSA pourrait contribuer à la diminution de celle de *MDR1* quand la TSA a agit pendant 12 h et 24 h. Les temps précoces n'ayant pas été analysés, il n'est pas possible d'exclure l'hypothèse que la baisse du taux d'ARNm *MDR1* après 8 h d'incubation avec la TSA soit ultérieure à la surexpression du gène *c-jun*. Dans les cellules H69WT, nous n'observons pas ce même schéma de corrélation entre l'expression de *c-jun* et celle de *MDR1*, l'augmentation du taux d'ARNm *c-jun* ne précédant pas une diminution de celui de *MDR1*.

Le facteur de transcription *c-jun* aurait peut-être deux effets inverses dans notre modèle cellulaire : activateur du gène *MDR1* dans les cellules H69WT et répresseur dans les cellules H69VP.

Nous avons montré que l'activité de la TSA sur l'expression du gène *MDR1* est de nature transcriptionnelle dans les cellules H69WT et H69VP. Le rôle des modifications épigénétiques de la chromatine semble donc important à analyser pour mieux comprendre les variations d'expression du gène *MDR1*.

2.4. Rôle(s) de la chromatine dans l'expression du gène *MDR1*

2.4.1. Modifications post-traductionnelles des histones au niveau du promoteur *MDR1* dans les cellules H69WT et H69VP

L'acétylation des histones a été largement associée aux régions de la chromatine où la transcription des gènes est active. Inversement, la désacétylation des histones se retrouve le plus souvent au niveau des gènes transcriptionnellement inactifs.

Les cellules H69VP exprimant fortement le gène *MDR1* comparativement aux cellules H69WT, cette différence d'expression pourrait provenir d'une accumulation d'histones acétylées au niveau du promoteur du gène *MDR1* dans les cellules résistantes.

Ainsi, deux régions du promoteur *MDR1* ont été étudiées par immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) pour analyser leur richesse en histones H3 et H4 acétylées : une région

proximale par rapport au site majeur d'initiation (+292 à +591) et une région distale (-981 à -817).

La quantité d'ADN immunoprécipité avec les histones (IP) est normalisée par rapport à l'input (INP) qui représente la quantité d'ADN de départ. Pour chaque immunoprécipitation, un échantillon d'ADN, où l'anticorps n'a pas été ajouté, a servi de contrôle négatif (-Ac).

Le rapport IP/INP est considéré comme égal à 1 pour les cellules H69WT. Les comparaisons sont faites entre les cellules H69VP et H69WT pour une même modification d'histones.

Les résultats récapitulatifs de la figure 53 montrent que, par rapport aux cellules H69WT, les cellules H69VP se caractérisent par une hyperacétylation des histones au niveau du promoteur *MDR1*. Cette hyperacétylation concerne les histones H3 et H4 de la région proximale et les histones H4 de la région distale. La di-méthylation de l'histone H3 sur la lysine 9 étant corrélée à une inhibition de la transcription, son implication dans les différences d'expression du gène *MDR1* a également été recherchée par ChIP. Il semble que celle-ci ne joue pas un rôle significatif, dans la mesure où aucune différence n'a pu être détectée entre les cellules sensibles et résistantes.

Ainsi, en comparaison avec les cellules sensibles H69WT, les cellules H69VP surexprimant le gène *MDR1* contiennent des histones hyperacétylées au niveau du promoteur *MDR1*.

2.4.2. Influence de la TSA sur les modifications des histones au niveau du promoteur *MDR1*

Les modifications post-traductionnelles des histones ont été analysées après incubation des cellules en présence de 100 ng/mL TSA pendant 8 h et 24 h. Cette étude, réalisée par ChIP comme décrit précédemment, montre des différences significatives des taux d'acétylation des histones au niveau du promoteur *MDR1* entre les cellules traitées et non traitées par la TSA.

Dans toutes les expériences de ChIP où l'effet de la TSA a été recherché, le rapport IP/INP est considéré comme égal à 100 pour les cellules non traitées H69WT et H69VP. Les comparaisons sont faites entre les cellules traitées et non traitées d'une même lignée.

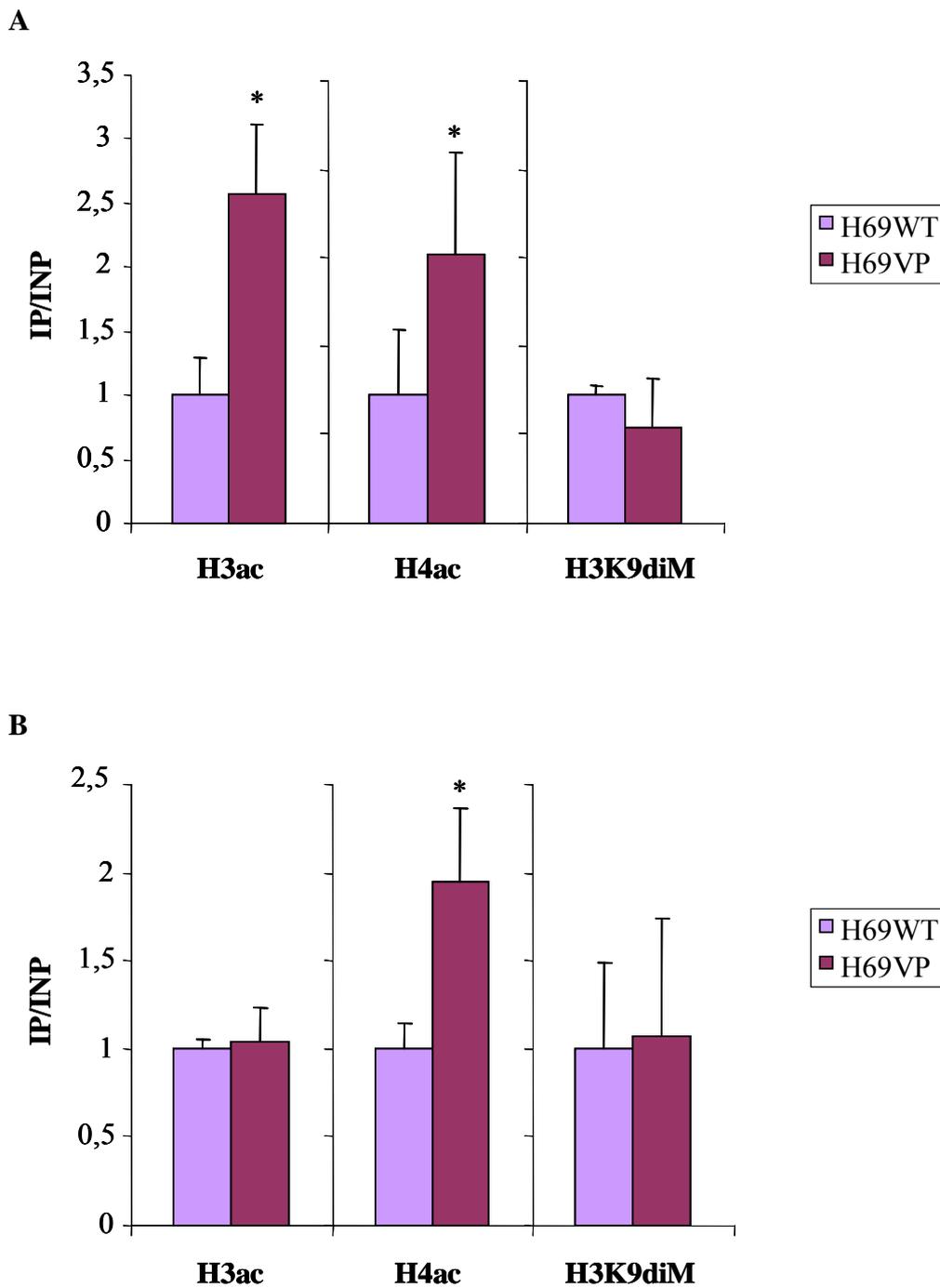


Figure 53. Modifications post-traductionnelles des histones au niveau du promoteur MDR1.

Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) réalisée sur des cellules H69WT et H69VP. Quantifications de l'ADN MDR1 immunoprécipité (IP) avec les anticorps anti-H3 di-acétylés, anti-H4 tétra-acétylés et anti-H3K9 di-méthylés par rapport à l'ADN MDR1 de départ (INP). A : région proximale du promoteur (+292 à +591). B : région distale du promoteur (-981 à -817). Les valeurs correspondent à la moyenne \pm ET de 3 expériences indépendantes.

* : $p < 0,05$ en comparaison avec la valeur obtenue dans les cellules H69WT – Test *t* de Student

2.4.2.1. Acétylation des histones H4

Dans les cellules H69WT, après 8 h d'incubation, la région proximale du promoteur MDR1 présente un taux d'histones H4 acétylées 8 fois plus important que dans les cellules non traitées par la TSA (figure 54). L'écart continue à augmenter après 24 h d'incubation. De même dans les cellules H69VP cette région du promoteur se retrouve de plus en plus enrichie en histones H4 acétylées en fonction du temps d'incubation avec la TSA.

La région distale du promoteur MDR1 affiche les mêmes variations de l'acétylation des histones H4 que la région proximale et ce, pour les 2 lignées cellulaires (figure 55). Nous remarquons que la différence d'acétylation entre les cellules incubées 24 h et les cellules non incubées avec la TSA est plus marquée pour la lignée sensible par rapport à la lignée résistante (10 fois vs 4 fois au niveau de la région proximale MDR1 et 9 fois vs 4 fois au niveau de la région distale). Ceci pourrait provenir du fait que les cellules H69VP ont un taux basal d'acétylation H4 plus important que les cellules H69WT.

2.4.2.2. Acétylation des histones H3

L'effet de la TSA sur l'acétylation des histones H3 au niveau du promoteur MDR1 apparaît différent : dans les cellules H69WT, une hyperacétylation progressive apparaît après 8 h jusqu'à 24 h d'incubation atteignant environ 300% de l'acétylation basale au niveau des régions proximale (figure 56) et distale du promoteur (figure 57). Cette progression de l'acétylation est similaire à celle des histones H4. Cependant, la TSA induit une hyperacétylation transitoire dans les cellules H69VP ; après 8 h d'incubation, le taux d'acétylation des histones H3 double dans la région proximale (figure 56) et se rapproche des 400% du taux basal dans la région distale (figure 57). Par contre, la poursuite de l'incubation jusqu'à 24 h résulte en une diminution du niveau d'acétylation du promoteur MDR1 au niveau des 2 régions étudiées et se rapproche du taux d'acétylation basal des histones H3, tout en lui restant légèrement supérieur (environ 150%).

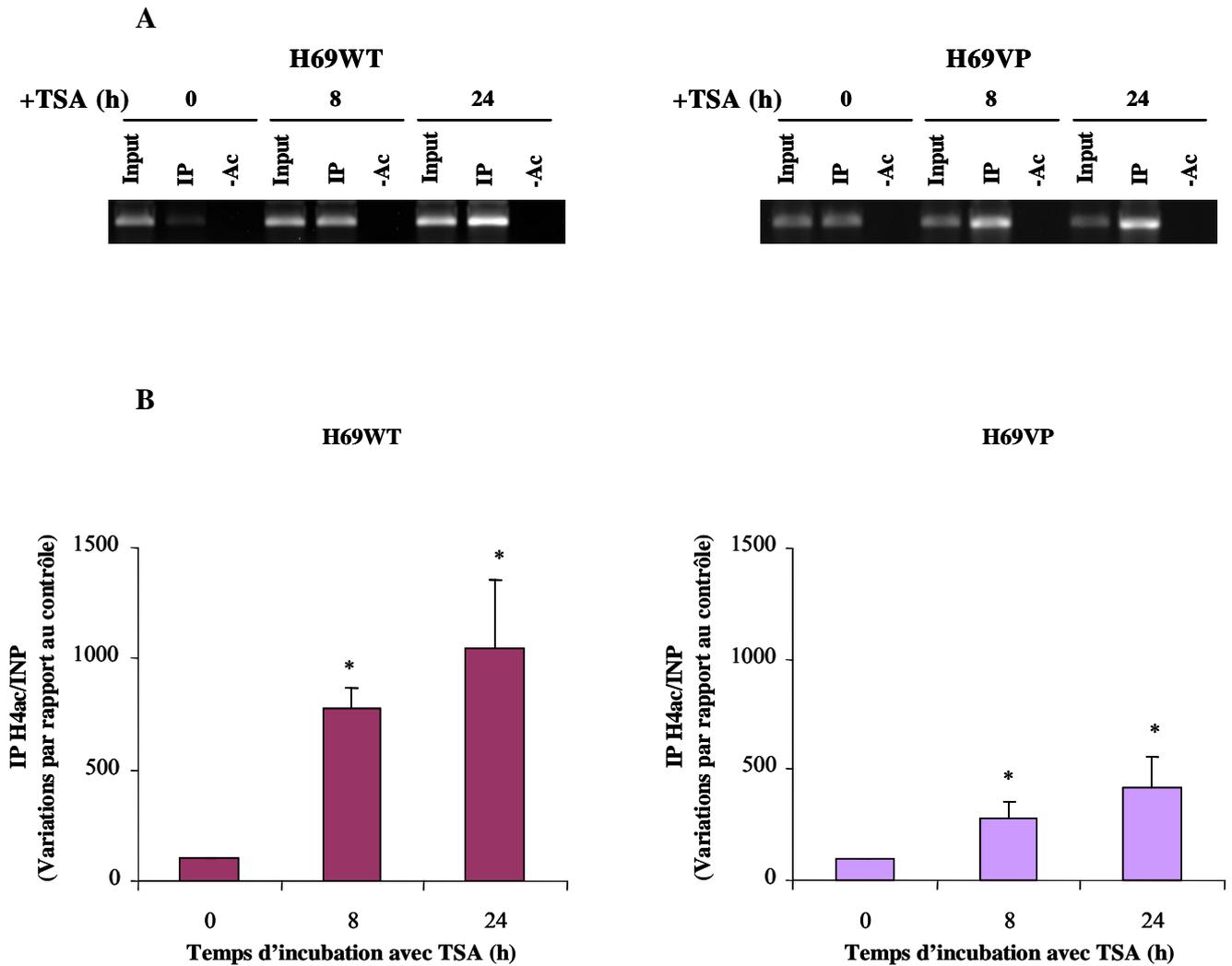


Figure 54. Acétylation par la TSA des histones H4 au niveau de la région proximale du promoteur MDR1. Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) réalisée sur des cellules H69WT et H69VP incubées ou non avec 100 ng/mL TSA pendant 8 h et 24 h. A : Gel d'agarose à 2% des produits post-PCR ChIP. Input : ADN MDR1 de départ. IP : ADN MDR1 immunoprécipité avec l'anticorps anti-H4 tétra-acétylées. -Ac: contrôle négatif sans anticorps. B : Quantifications de l'ADN MDR1 immunoprécipité (IP) par rapport à l'ADN MDR1 de départ (INP). Les valeurs correspondent à la moyenne \pm ET de 3 expériences indépendantes. * : $p < 0,05$ en comparaison avec la valeur obtenue dans le contrôle non traité – Test *t* de Student

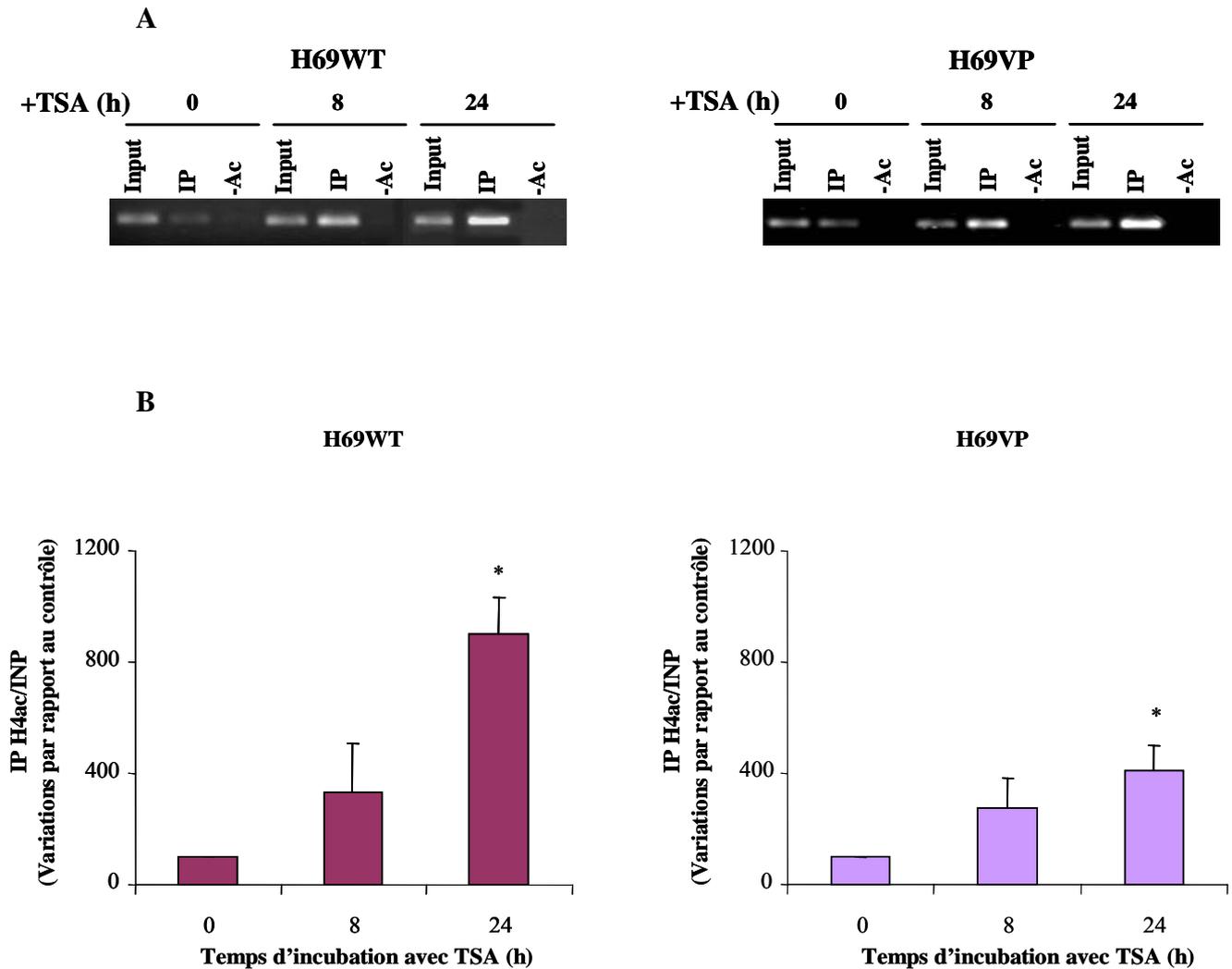


Figure 55. Acétylation par la TSA des histones H4 au niveau de la région distale du promoteur MDR1.

Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) réalisée sur des cellules H69WT et H69VP incubées ou non avec 100 ng/mL TSA pendant 8 h et 24 h. A : Gel d'agarose à 2% des produits post-PCR ChIP. Input : ADN MDR1 de départ. IP : ADN MDR1 immunoprécipité avec l'anticorps anti-H4 tétra-acétylés. -Ac: contrôle négatif sans anticorps. B : Quantifications de l'ADN MDR1 immunoprécipité (IP) par rapport à l'ADN MDR1 de départ (INP). Les valeurs correspondent à la moyenne \pm ET de 3 expériences indépendantes.

* : $p < 0,05$ en comparaison avec la valeur obtenue dans le contrôle non traité – Test *t* de Student

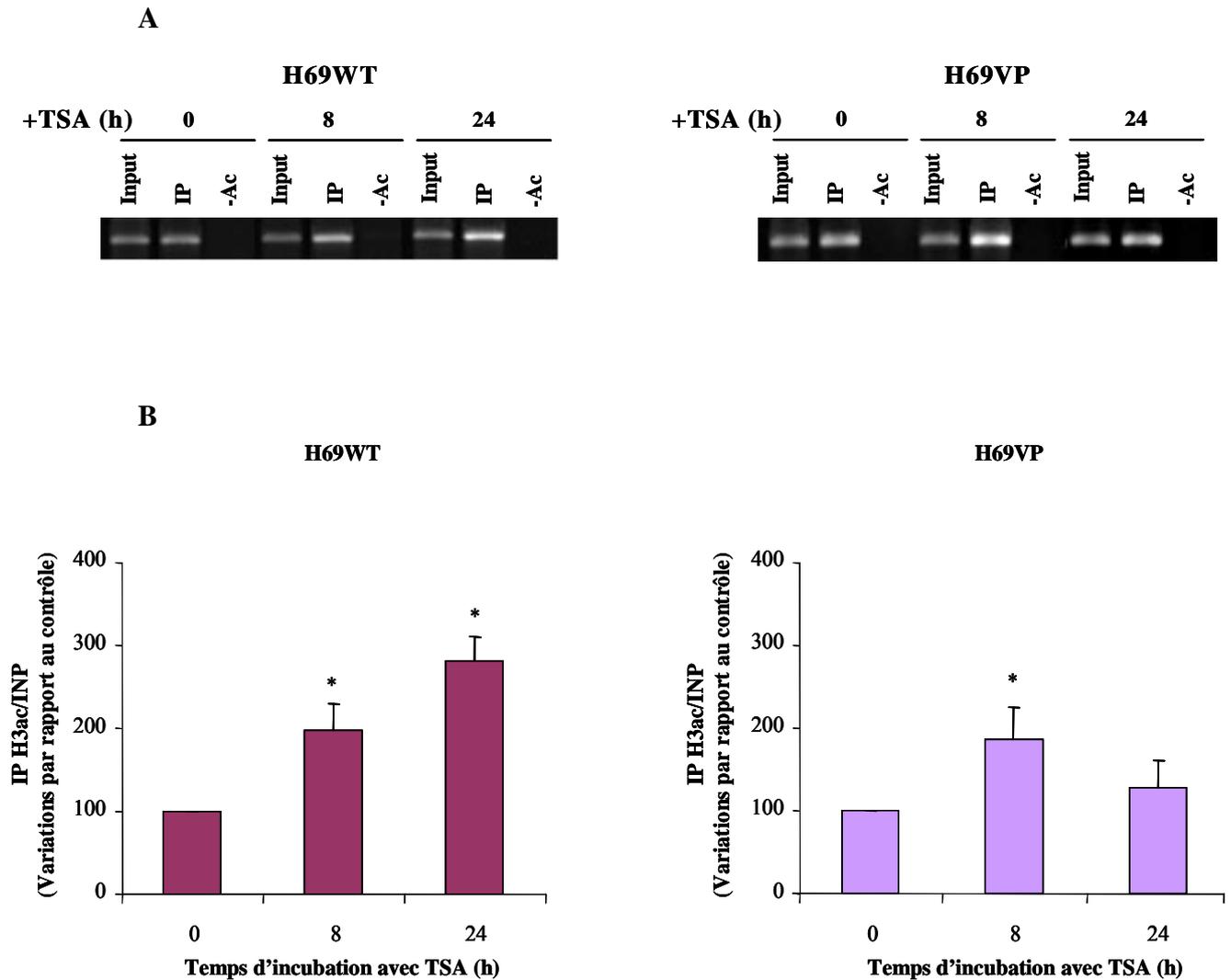


Figure 56. Acétylation par la TSA des histones H3 au niveau de la région proximale du promoteur MDR1. Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) réalisée sur des cellules H69WT et H69VP incubées ou non avec 100 ng/mL TSA pendant 8 h et 24 h. A : Gel d'agarose à 2% des produits post-PCR ChIP. Input : ADN MDR1 de départ. IP : ADN MDR1 immunoprécipité avec l'anticorps anti-H3 di-acétylées. -Ac: contrôle négatif sans anticorps. B : Quantifications de l'ADN MDR1 immunoprécipité (IP) par rapport à l'ADN MDR1 de départ (INP). Les valeurs correspondent à la moyenne \pm ET de 3 expériences indépendantes.
* : $p < 0,05$ en comparaison avec la valeur obtenue dans le contrôle non traité – Test t de Student

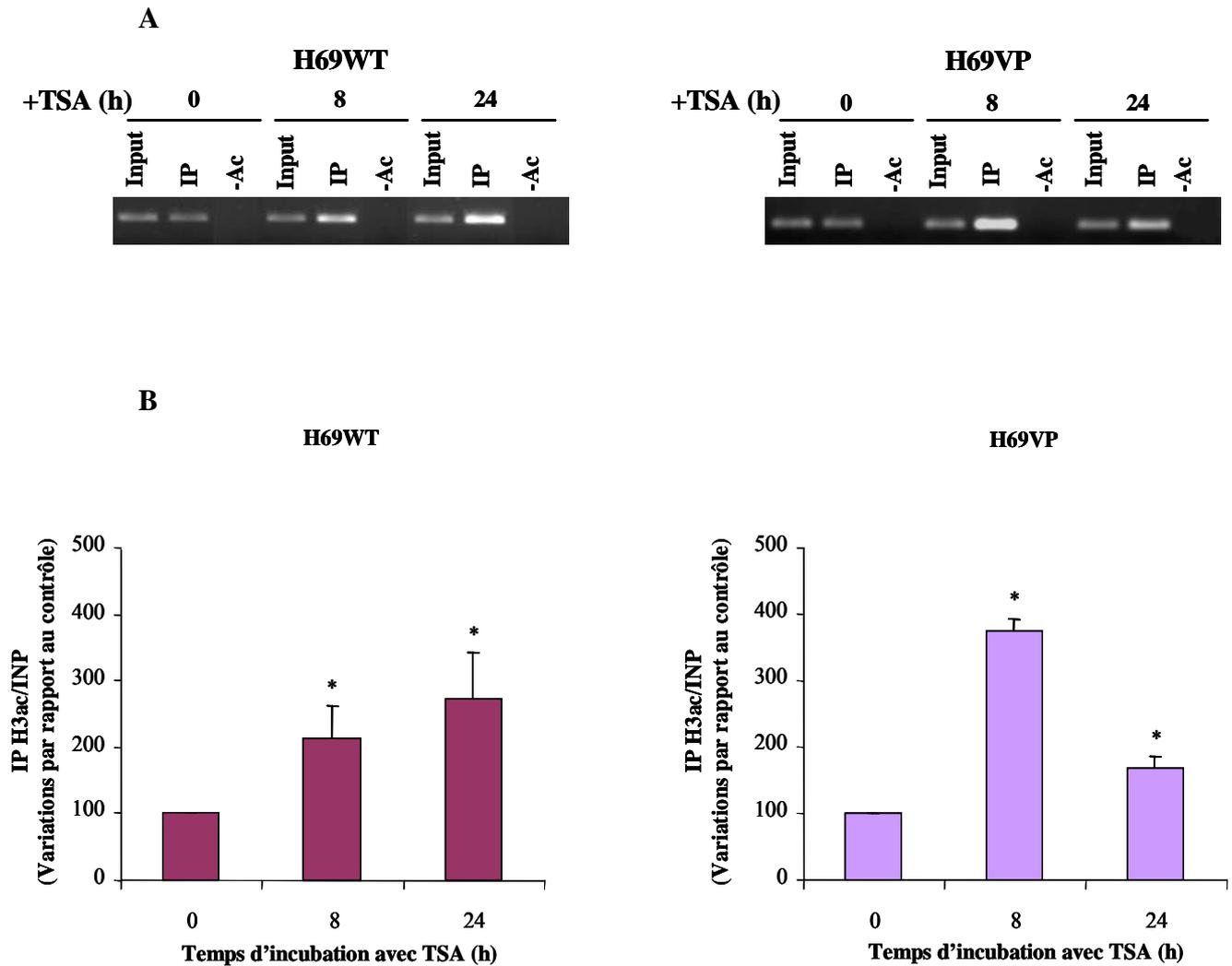


Figure 57. Acétylation par la TSA des histones H3 au niveau de la région distale du promoteur MDR1.

Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) réalisée sur des cellules H69WT et H69VP incubées ou non avec 100 ng/mL TSA pendant 8 h et 24 h. A : Gel d'agarose à 2% des produits post-PCR ChIP. Input : ADN MDR1 de départ. IP : ADN MDR1 immunoprécipité avec l'anticorps anti-H3 di-acétylées. -Ac: contrôle négatif sans anticorps. B : Quantifications de l'ADN MDR1 immunoprécipité (IP) par rapport à l'ADN MDR1 de départ (INP). Les valeurs correspondent à la moyenne \pm ET de 3 expériences indépendantes.

* : $p < 0,05$ en comparaison avec la valeur obtenue dans le contrôle non traité – Test *t* de Student

2.4.2.3. Méthylation des histones H3

La méthylation de l'histone H3 sur la lysine 9 au niveau du promoteur MDR1 a été recherchée en immunoprécipitant la chromatine avec un anticorps anti-H3K9diM, afin d'étudier sa contribution dans l'effet de la TSA.

Le taux de celle-ci n'est pas modifié par la présence de la TSA après 8 h et 24 h d'incubation, au niveau des régions proximale (figure 58) et distale du promoteur MDR1 (figure 59).

En conclusion, la TSA augmente progressivement l'acétylation des histones H3 et H4 au niveau du promoteur MDR1 dans les cellules H69WT, parallèlement à la surexpression du gène *MDR1*. Dans les cellules H69VP, après une hyperacétylation transitoire, la TSA induit une désacétylation des histones H3 au niveau du promoteur MDR1. L'étude de l'acétylation des histones H3 totales effectuée par western blot ne montrant pas une telle désacétylation, ces variations restent donc localisées et pourraient être liées à la répression du gène *MDR1* par la TSA dans les cellules H69VP.

2.4.3. Relation entre la méthylation de l'ADN et la modulation de l'expression du gène *MDR1* : effets de la TSA et/ou de la 5-aza-2'-désoxycytidine

2.4.3.1. Analyse de la méthylation des boîtes GC-50 et GC-110 du promoteur *MDR1*

L'inactivité transcriptionnelle du gène *MDR1* peut être associée à une désacétylation des histones et à une méthylation de l'ADN (El-Osta *et al.*, 2002). Son promoteur ne contient pas de boîte TATA mais plusieurs boîtes GC qui seraient essentielles à son activation (Baker *et al.*, 2003). La méthylation des boîtes GC-50 et GC-110 a été particulièrement étudiée car ces éléments se révèlent être des sites de fixation d'activateurs et de répresseurs du gène *MDR1* (Ando *et al.*, 2000 ; Baker *et al.*, 2003). Afin d'analyser le profil de méthylation de ces 2 boîtes, l'ADN des cellules H69WT et H69VP a subi un traitement au bisulfite de sodium qui permet de transformer les cytosines non méthylées en uraciles, les cytosines méthylées restant intactes. La détection de cette transformation est réalisée par MSP, une PCR spécifique à l'étude de la méthylation. Celle-ci est basée sur l'utilisation de 2 couples d'amorces au niveau de la séquence d'intérêt transformée par le bisulfite de sodium, en l'occurrence la boîte

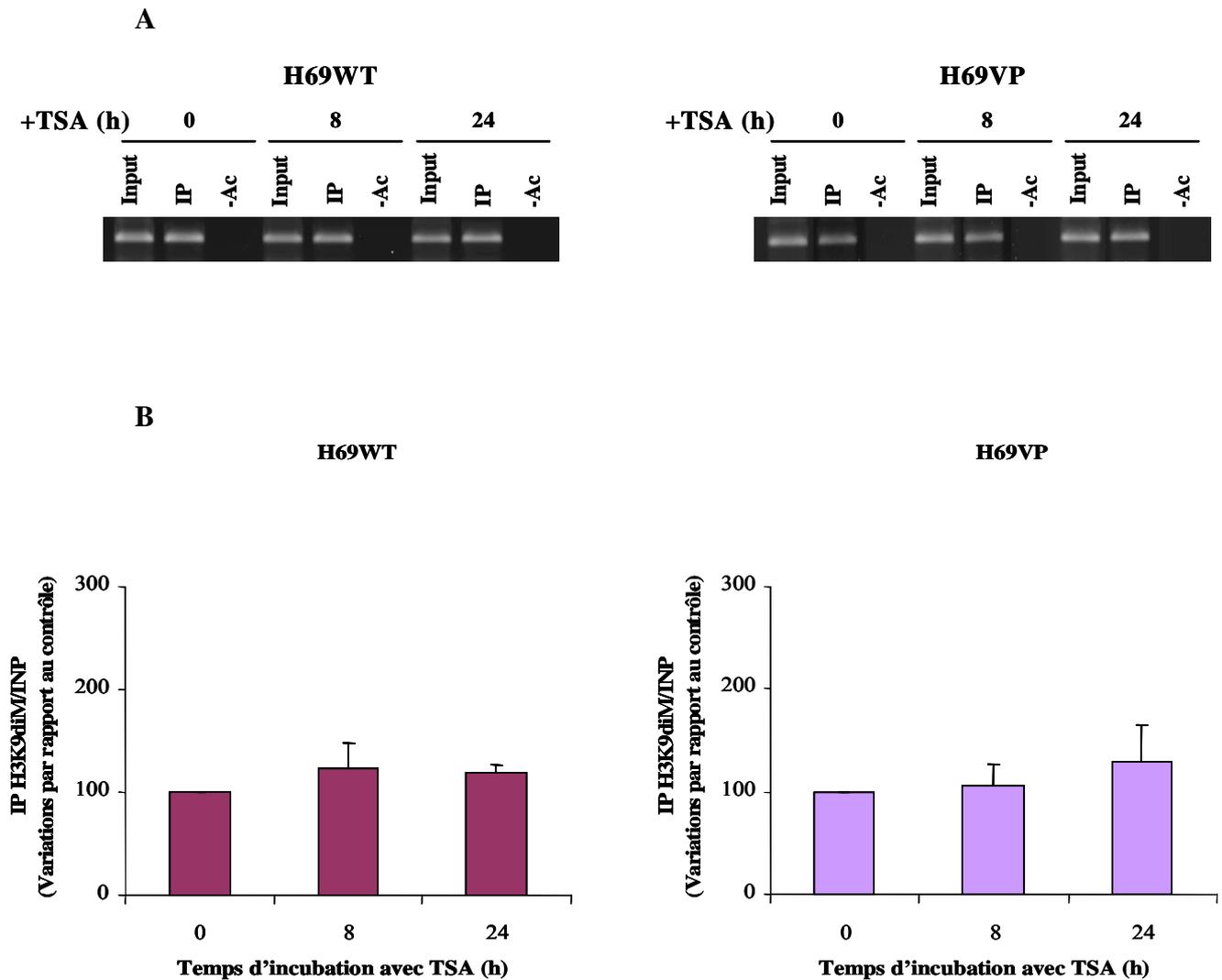


Figure 58. Effet de la TSA sur la di-méthylation de H3K9 au niveau de la région proximale du promoteur MDR1.

Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) réalisée sur des cellules H69WT et H69VP incubées ou non avec 100 ng/mL TSA pendant 8 h et 24 h. A : Gel d'agarose à 2% des produits post-PCR ChIP. Input : ADN MDR1 de départ. IP : ADN MDR1 immunoprécipité avec l'anticorps anti-H3K9 di-méthylées. -Ac: contrôle négatif sans anticorps. B : Quantifications de l'ADN MDR1 immunoprécipité (IP) par rapport à l'ADN MDR1 de départ (INP). Les valeurs correspondent à la moyenne \pm ET de 3 expériences indépendantes.

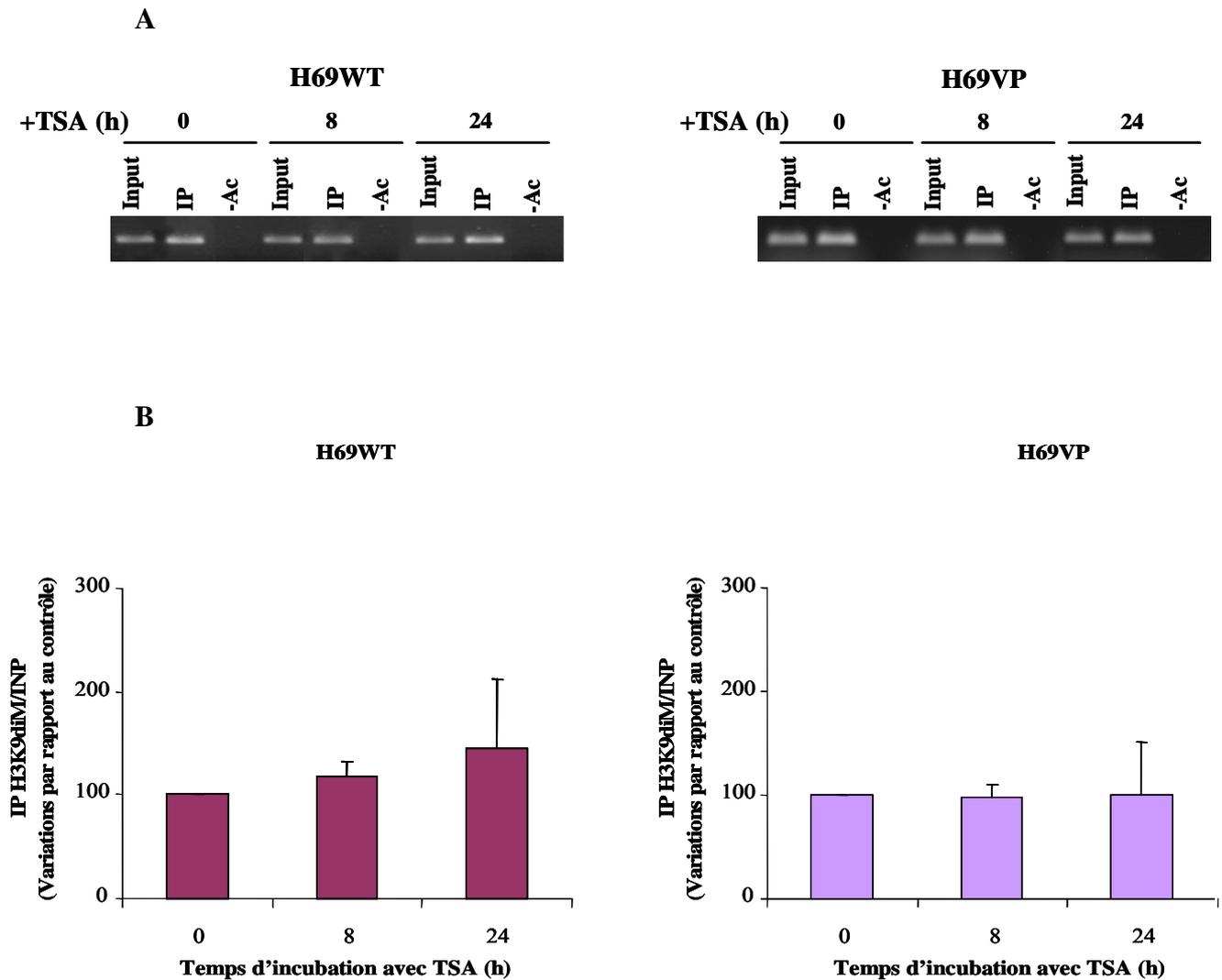


Figure 59. Effet de la TSA sur la di-méthylation de H3K9 au niveau de la région distale du promoteur MDR1.

Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) réalisée sur des cellules H69WT et H69VP incubées ou non avec 100 ng/mL TSA pendant 8 h et 24 h. A : Gel d'agarose à 2% des produits post-PCR ChIP. Input : ADN MDR1 de départ. IP : ADN MDR1 immunoprécipité avec l'anticorps anti-H3K9 di-méthylées. -Ac: contrôle négatif sans anticorps. B : Quantifications de l'ADN MDR1 immunoprécipité (IP) par rapport à l'ADN MDR1 de départ (INP). Les valeurs correspondent à la moyenne \pm ET de 3 expériences indépendantes.

GC-50 et GC-110 : les amorces U amplifient l'ADN préalablement non méthylé, alors que les amorces M reconnaissent l'ADN méthylé. Dans notre étude les amorces T ont été utilisées pour amplifier l'ADN total donc méthylé et non méthylé, afin d'estimer la quantité d'ADN de départ. L'ADN des cellules MCF7 étant hyperméthylé (David *et al.*, 2004) et celui des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) hypométhylé (Ando *et al.*, 2000), ces cellules ont servi de témoins positif et négatif de la méthylation, respectivement.

Le profil de méthylation des cellules H69WT et H69VP a été analysé avant et après incubation avec la TSA, la 5-aza-2'-désoxycytidine (5azadC), un agent déméthylant de l'ADN, et l'association de ces deux molécules. L'incubation avec la TSA a duré 8 h, 12 h ou 24 h ; la 5azadC a été administrée pendant 72 h et les cellules ont été collectées 33 h plus tard ; les 8 dernières heures d'incubation ont été faites en présence de TSA quand les cellules ont été traitées avec la combinaison 5azadC/TSA. Les résultats de la figure 60 montrent que les boîtes GC-50 et GC-110 sont hypométhylées à l'état basal dans les cellules H69WT et H69VP, étant donné que seules les amorces U ont permis une amplification de l'ADN. Cette hypométhylation caractérise en général les cellules résistantes à la chimiothérapie où le gène *MDR1* est exprimé (El-Osta *et al.*, 2002). Dans notre modèle cellulaire, les cellules sensibles semblent elles aussi hypométhylées. L'extinction du gène *MDR1* dans les cellules H69WT n'est donc pas liée à une hyperméthylation des boîtes GC-50 et GC-110.

De plus, il a été démontré que la TSA ne réactive l'expression du gène *MDR1* que si son promoteur est hypométhylé (El-Osta *et al.*, 2002 ; Jin *et al.*, 1998), la déméthylation pouvant être naturelle comme dans les cellules cancéreuses du côlon SW620 (Baker *et al.*, 2005) ou induite par un agent déméthylant de l'ADN (David *et al.*, 2004 ; El-Osta *et al.*, 2002). Dans les cellules H69WT la surexpression du gène *MDR1* par la TSA confirme que son promoteur est initialement hypométhylé. Un traitement de 8 h, 12 h et 24 h par la TSA n'altère pas le profil de méthylation des boîtes GC-50 et GC-110 dans les 2 lignées cellulaires (figure 60).

Par ailleurs, il a été constaté que la boîte GC-110 des cellules résistantes K562/ADM présentait une hyperméthylation par rapport à leurs homologues sensibles K562. La déméthylation de cette boîte, site de fixation d'un répresseur, diminue l'expression du gène *MDR1* dans les cellules K562/ADM, en favorisant probablement la fixation de ce répresseur (Ando *et al.*, 2000). La boîte GC-110 étant hypométhylée dans les cellules H69VP où le gène *MDR1* est fortement exprimé, le répresseur en question n'y serait donc pas actif ou sa fixation y serait probablement entravée.



Figure 60. Effet de la TSA sur la méthylation des boîtes GC-50 et GC-110 du promoteur MDR1.

Gel d'agarose à 2% des produits post-MSP des boîtes GC-50 et GC-110 dans des cellules H69WT et H69VP incubées ou non avec 100 ng/mL TSA pendant 8 h, 12 h et 24 h. Les amorces U amplifient les allèles non méthylés. Les amorces M amplifient les allèles méthylés. Les amorces T amplifient une région de l'ADN contenant les boîtes GC-50 et GC-110 indépendamment de leur état de méthylation. Les cellules MCF7 et les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) ont été utilisées comme témoins positif et négatif de la méthylation, respectivement. Ce résultat est représentatif de 3 expériences indépendantes.

L'utilisation de la 5azadC ou de l'association 5azadC+TSA dans notre modèle cellulaire n'induit aucune variation de l'état de méthylation des boîtes GC-50 et GC-110, les cellules H69WT et H69VP étant déjà hypométhylées à ces 2 sites (figure 61).

Comme pour d'autres promoteurs, les séquences d'ADN en aval du site d'initiation de la transcription se révèlent importantes pour l'activité du promoteur MDR1 (Cornwell *et al.*, 1993). Ainsi, nous avons exploré le profil de méthylation de la cytosine du doublet CpG située au niveau de l'élément Inr à +4 à partir du site majeur d'initiation de la transcription.

2.4.3.2. Analyse de la méthylation de l'élément Inr du promoteur MDR1

Le promoteur MDR1 ne contenant pas une boîte TATA, c'est l'élément initiateur (Inr) (-6 à +11) qui permet l'initiation de la transcription (Baker *et al.*, 2005 ; Labialle *et al.*, 2002). Ainsi, sa densité de méthylation a été étudiée au niveau de la cytosine du doublet CpG située à 4 paires de bases à partir du site majeur d'initiation de la transcription. Contrairement à la MSP, la technique utilisée dans ce cas est quantitative et permet donc d'évaluer le pourcentage de méthylation dans les cellules sensibles et résistantes. Cette technique, appelée COBRA (*combined bisulfite restriction analysis*), est basée sur un traitement de l'ADN au bisulfite de sodium, identique à celui réalisé pour la MSP, suivi d'une PCR afin d'amplifier la séquence d'intérêt puis d'une digestion des produits post-PCR par une enzyme de restriction, en l'occurrence la *TaqI* dans notre étude. Une coupure de l'ADN par cette enzyme signifie que la cytosine (+4) est méthylée ; cette coupure entraîne l'apparition d'une bande de 168 pb. Une absence de coupure signifie que ce site n'est pas méthylé et la taille de la bande reste de 192 pb. Les résultats de la figure 62 révèlent une forte densité de méthylation (99,4%) dans les cellules MCF7 choisies comme témoin positif de la méthylation. Les cellules mononucléées du sang (PBMC) ne contiennent que 2,3% de C (+4) méthylées et sont considérées comme témoin négatif. Les cellules H69WT révèlent un taux basal de méthylation supérieur à celui des cellules H69VP (11,5% vs 5%) au niveau de l'élément Inr. Cette densité de méthylation reste cependant très faible en comparaison de celle des cellules MCF7, mais pourrait intervenir dans l'extinction du gène *MDR1* des cellules sensibles, même s'il ne s'agit probablement pas d'un mécanisme essentiel. Les cellules H69VP sont nettement hypométhylées avec un taux de méthylation qui se rapproche de celui du témoin négatif.

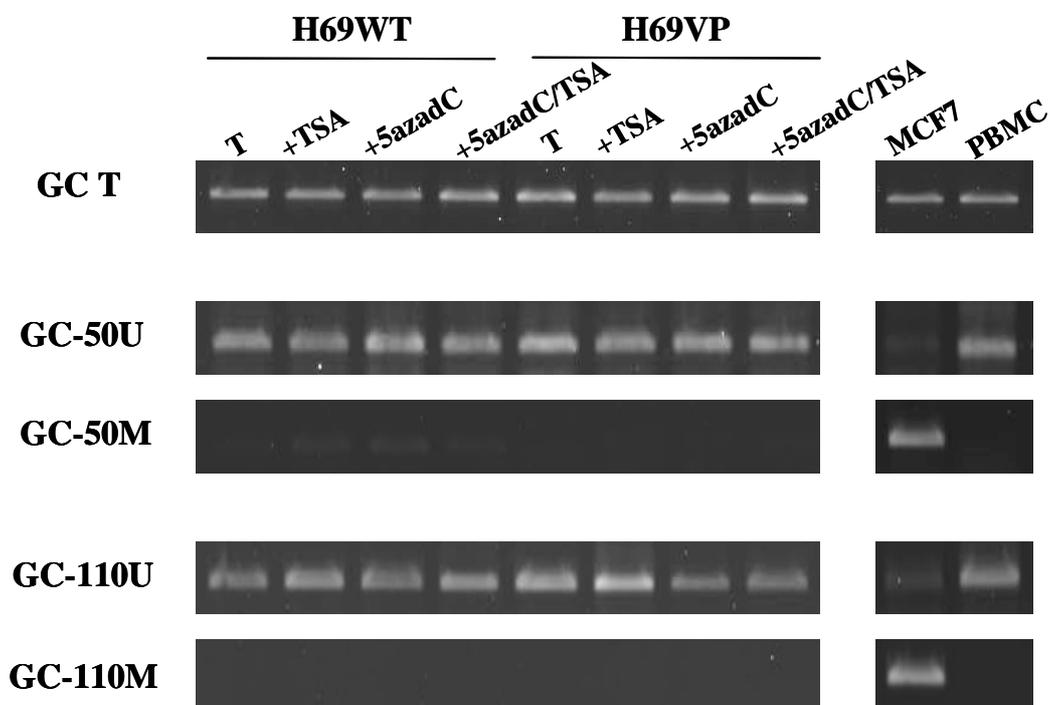


Figure 61. Analyse de la méthylation des boîtes GC-50 et GC-110 du promoteur MDR1 suite à l'action de la 5azadC ou de son association avec la TSA .

Gel d'agarose à 2% des produits post-MSP des boîtes GC-50 et GC-110 dans des cellules H69WT et H69VP incubées ou non avec 100 ng/mL TSA pendant 8 h, 2 μ M 5azadC pendant 72 h et 2 μ M 5azadC pendant 72 h puis 100 ng/mL TSA pendant 8 h. Les amorces U amplifient les allèles non méthylés. Les amorces M amplifient les allèles méthylés. Les amorces T amplifient une région de l'ADN contenant les boîtes GC-50 et GC-110 indépendamment de leur état de méthylation. Les cellules MCF7 et les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) ont été utilisées comme témoins positif et négatif de la méthylation, respectivement. Ce résultat est représentatif de 3 expériences indépendantes.

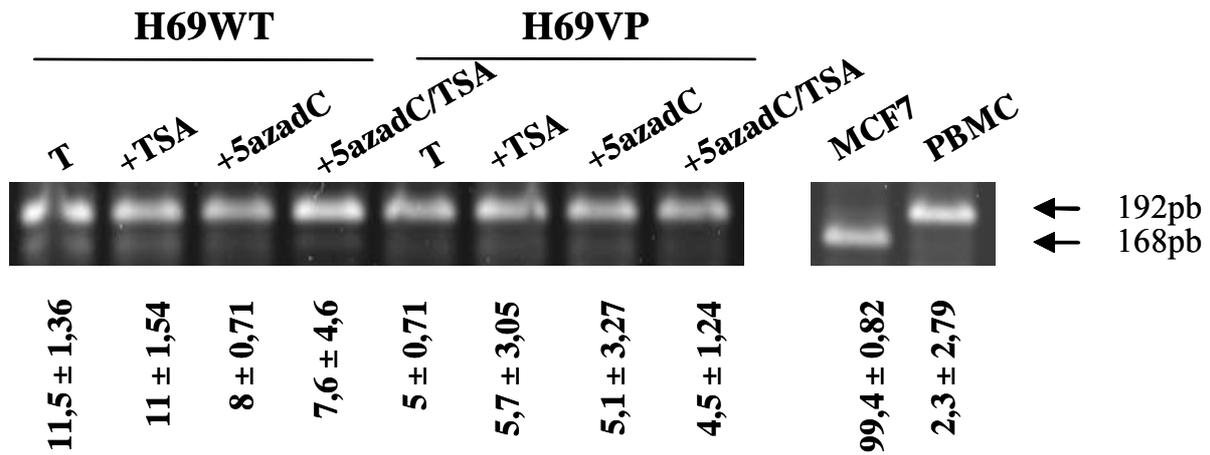


Figure 62. Profil de méthylation de l'élément Inr du promoteur MDR1 : effet de la TSA et de la 5azadC.
 Détection de la méthylation de la cytosine (+4) par COBRA sur gel d'agarose à 2,5%. Etude réalisée sur des cellules H69WT et H69VP incubées ou non avec 100 ng/mL TSA pendant 8 h, 2 µM 5azadC pendant 72 h et 2 µM 5azadC pendant 72 h puis 100 ng/mL TSA pendant 8 h. Les cellules MCF7 et les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) ont été utilisées comme témoins positif et négatif de la méthylation, respectivement. Les bandes méthylées (168 pb) et non méthylées (192 pb) sont quantifiées par densitométrie. La densité de méthylation (%) est marquée en dessous du puits correspondant. Les valeurs représentent la moyenne ± ET de 2 expériences indépendantes.

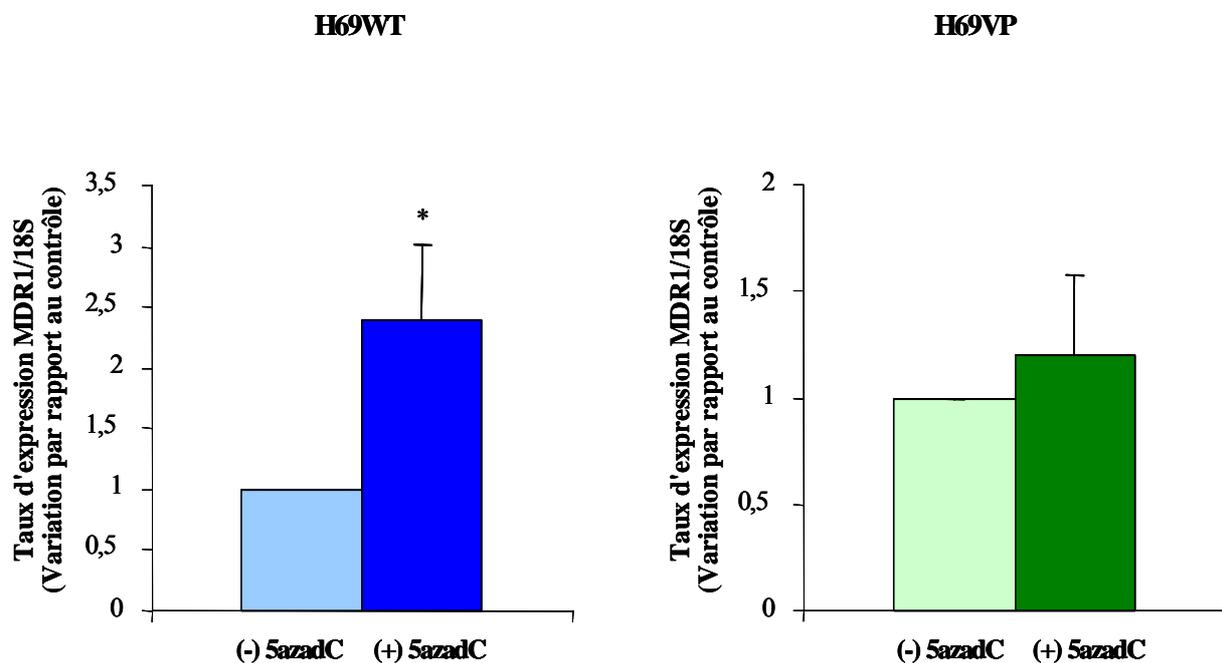


Figure 63. Effet de la 5azadC sur l'expression du gène MDR1.
 Quantifications par RT-PCR en temps réel du taux d'ARNm MDR1 par rapport à l'ARNr 18S dans des cellules H69WT et H69VP incubées ou non avec 2 µM 5azadC pendant 72 h. Les valeurs correspondent à la moyenne ± ET de 3 expériences indépendantes.
 * : $p < 0,05$ en comparaison avec la valeur obtenue dans le contrôle non traité – Test *t* de Student.

La TSA ne modifie pas le niveau de méthylation de l'élément Inr, tant dans les cellules sensibles que résistantes. Après incubation avec la 5azadC, le pourcentage de méthylation a tendance à diminuer dans les cellules H69WT, mais la différence ne semble pas significative. La C (+4) des cellules H69VP ne montre aucune modification de son taux de méthylation après action de la 5azadC ou de l'association 5azadC/TSA8h, ce taux étant déjà très faible.

Cependant l'absence d'altération du profil de méthylation aux sites étudiés ne signifie pas une absence d'activité sur l'expression génique. Ainsi, l'analyse de la méthylation a été complétée par l'évaluation de l'effet de la 5azadC seule ou associée à la TSA sur l'expression du gène *MDR1*.

2.4.3.3. Modulation de l'expression du gène *MDR1* par la TSA et/ou la 5azadC

La 5azadC a été testée pour sa capacité à moduler l'expression de l'ARNm *MDR1* dans les cellules H69WT et H69VP. Des cellules sensibles et résistantes ont été incubées en présence de 5azadC pendant 72 h, de TSA pendant 8 h et 24 h, et des 2 traitements successifs. Malgré une hypométhylation basale des cellules H69WT, la 5azadC induit une augmentation significative du taux d'ARNm *MDR1* qui devient 2,5 fois plus important (figure 63). Ceci n'est pas le cas dans les cellules H69VP où la 5azadC n'a aucun effet sur l'expression du gène *MDR1*. En associant la 5azadC à la TSA dans les cellules H69WT, l'expression de l'ARNm *MDR1* est plus importante que si les cellules sont incubées en présence de la 5azadC seule, mais reste équivalente à celle observée après un traitement avec la TSA uniquement (figure 64). Ainsi, le taux d'ARNm augmente progressivement après action de la TSA pendant 8 h et 24 h et ce taux est conservé quand les cellules ont été pré-incubées avec la 5azadC. Ce résultat montre l'importance de l'acétylation des histones dans la surexpression du gène *MDR1*. De plus, il révèle la faible méthylation du promoteur *MDR1* dans la lignée H69WT, au niveau des régions analysées ou ailleurs, étant donné que cette méthylation n'entrave pas l'activation du gène *MDR1* par la TSA.

Les cellules H69VP ne réagissent pas de la même façon : après 8 h d'incubation avec la TSA, le taux d'ARNm *MDR1* diminue, de la même façon que quand la 5azadC est associée à la TSA (figure 65). Après 24 h d'incubation, la TSA continue à diminuer l'expression du

gène *MDR1*, mais cette diminution est encore plus importante quand les cellules ont subi l'action déméthylante de la 5azadC.

Par conséquent, malgré une hypométhylation du promoteur MDR1 dans ces 2 lignées cellulaires, la 5azadC entraîne quelques modifications de son niveau d'expression, seule comme c'est le cas dans les cellules H69WT ou quand elle est associée à une incubation de 24h avec la TSA dans le cas des cellules H69VP.

Nos résultats confirment de récentes études indiquant que la régulation transcriptionnelle du gène *MDR1* est contrôlée au niveau de la chromatine (Baker *et al.*, 2005). Ainsi, après avoir analysé le rôle des modifications des histones et de la méthylation de l'ADN, l'effet de la TSA sur la fixation du facteur PCAF, co-activateur de la transcription impliqué dans l'activation du gène *MDR1*, a été étudié.

2.4.4. Effet de la TSA sur la fixation du facteur PCAF au niveau de la boîte Y du promoteur MDR1

L'induction rapide de la transcription du gène *MDR1* par divers agents tels que les inhibiteurs des HDACs, l'irradiation par les UV et la doxorubicine est médiée par la fixation d'un complexe protéique activateur au niveau de l'« enhancesome », sur la région proximale du promoteur MDR1 : le facteur NF-Y se fixe sur la boîte CCAAT inversée (boîte Y) (-82 à -73) et, en coopération avec Sp1, recrute la protéine PCAF, un co-activateur de la transcription ayant une activité histone acétyltransférase (HAT), résultant en l'acétylation des histones et probablement de la protéine NF-Y elle-même (Friedman *et al.*, 2002).

Ainsi, la recherche de l'effet de la TSA sur la fixation de PCAF est intéressante dans notre modèle cellulaire dans la mesure où celle-ci régule différemment l'expression du gène *MDR1* dans les cellules sensibles et résistantes.

La chromatine des cellules H69WT et H69VP, incubées pendant 24 h en présence ou en absence de 100 ng/mL TSA, a été immunoprécipitée à l'aide d'un anticorps anti-PCAF ; Un témoin négatif sans anticorps a été effectué en parallèle. La région -222 à +37 du promoteur MDR1 a été ensuite amplifiée par PCR pour estimer la quantité de protéine PCAF fixée. Okamura H *et al* ont montré que la fixation du facteur NF-Y au niveau du promoteur MDR1 est supérieure dans les cellules SCCTF résistantes, en comparaison avec leurs homologues sensibles SCCKN (Okamura *et al.*, 2004). Etant donné le lien physique entre les

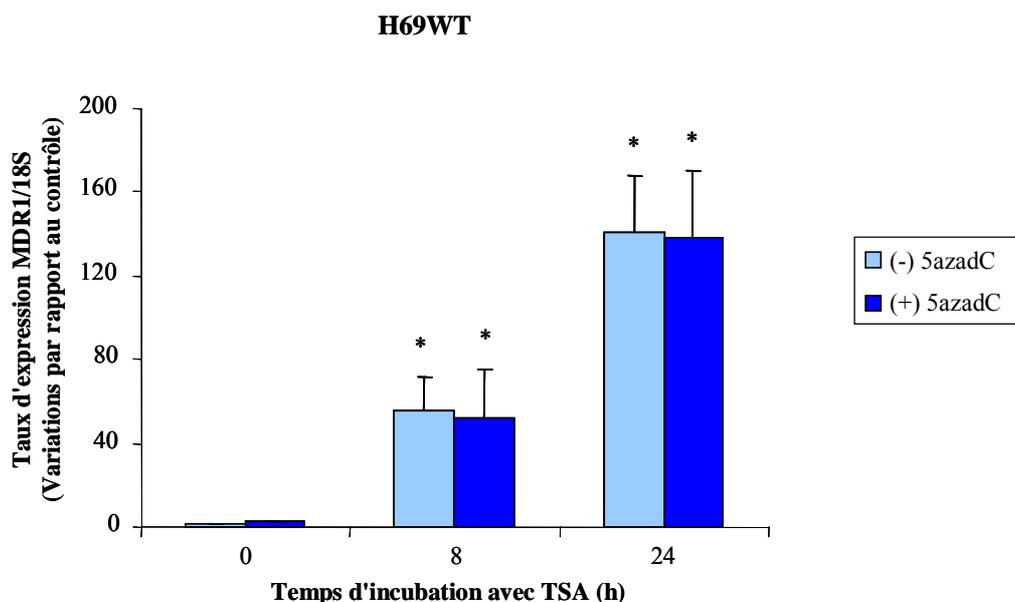


Figure 64. Expression du gène *MDR1* après association de la 5azadC à la TSA dans les cellules H69WT. Quantifications par RT-PCR en temps réel du taux d'ARNm *MDR1* par rapport à l'ARNr 18S dans des cellules H69WT incubées ou non avec 100 ng/mL TSA pendant 8 h et 24 h, 2 μ M 5azadC pendant 72 h et 2 μ M 5azadC pendant 72 h puis 100 ng/mL TSA pendant 8 h et 24 h. Les valeurs correspondent à la moyenne \pm ET de 3 expériences indépendantes.
* : $p < 0,05$ en comparaison avec la valeur obtenue dans le contrôle non traité avec la TSA – Test *t* de Student.

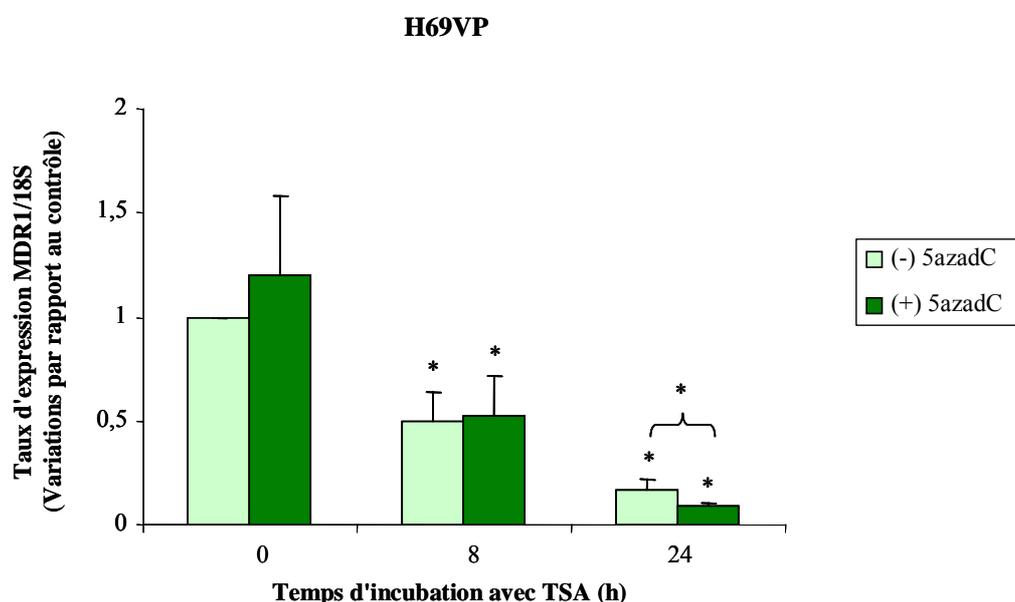


Figure 65. Expression du gène *MDR1* après association de la 5azadC à la TSA dans les cellules H69VP. Quantifications par RT-PCR en temps réel du taux d'ARNm *MDR1* par rapport à l'ARNr 18S dans des cellules H69VP incubées ou non avec 100 ng/mL TSA pendant 8 h et 24 h, 2 μ M 5azadC pendant 72 h et 2 μ M 5azadC pendant 72 h puis 100 ng/mL TSA pendant 8 h et 24 h. Les valeurs correspondent à la moyenne \pm ET de 3 expériences indépendantes.
* : $p < 0,05$ en comparaison avec la valeur obtenue dans le contrôle non traité avec la TSA – Test *t* de Student.

protéines NF-Y et PCAF, la fixation de PCAF sur le promoteur pourrait être plus importante dans les cellules H69VP surexprimant le gène *MDR1*, par rapport aux cellules H69WT. Toutefois, nos résultats montrent qu'à l'état basal, la quantité de PCAF fixée au niveau du promoteur est identique dans les cellules sensibles et résistantes (figure 66).

Une incubation de 24 h avec la TSA augmente, dans les cellules sensibles, la fixation de PCAF sur la région proximale du promoteur *MDR1* (figure 67). Ceci est en accord avec l'activation du gène *MDR1* qui en résulte ainsi qu'avec l'hyperacétylation des histones observées au niveau du promoteur.

Malgré l'inhibition du gène *MDR1* par la TSA dans les cellules H69VP, le recrutement de PCAF a été augmenté d'un facteur 2. Cependant, ce résultat n'est pas surprenant dans la mesure où PCAF a une activité HAT et qu'au niveau du promoteur *MDR1* les histones H3 et H4 sont hyperacétylées par la TSA dans les cellules H69VP. Il est à noter que l'effet de la TSA sur le recrutement de PCAF est plus marqué dans les cellules sensibles.

2.4.5. Conclusions

La TSA régule de façon inverse l'expression du gène *MDR1* dans notre modèle cellulaire : elle induit une surexpression de ce gène dans les cellules sensibles H69WT et une diminution de son expression dans les cellules résistantes H69VP. Cette régulation est due à son activité inhibitrice des HDACs. Elle a lieu au niveau transcriptionnel et ne résulte pas d'une modification de la stabilité de l'ARNm *MDR1*. L'inhibition de la synthèse protéique *de novo* diminue l'action de la TSA sur l'expression du gène *MDR1* sans pour autant l'annuler. L'effet de la TSA sur la transcription du gène *MDR1* dépend donc essentiellement d'une activité directe chromatinienne et partiellement de l'expression protéique d'autres gènes.

La surexpression du gène *MDR1* dans les cellules H69VP est associée à une hyperacétylation des histones au niveau de son promoteur.

La TSA réorganise l'architecture chromatinienne du locus *MDR1* en modifiant le niveau d'acétylation des histones H3 et H4 du promoteur. Une hyperacétylation progressive est observée dans les cellules H69WT et une hyperacétylation transitoire dans les cellules

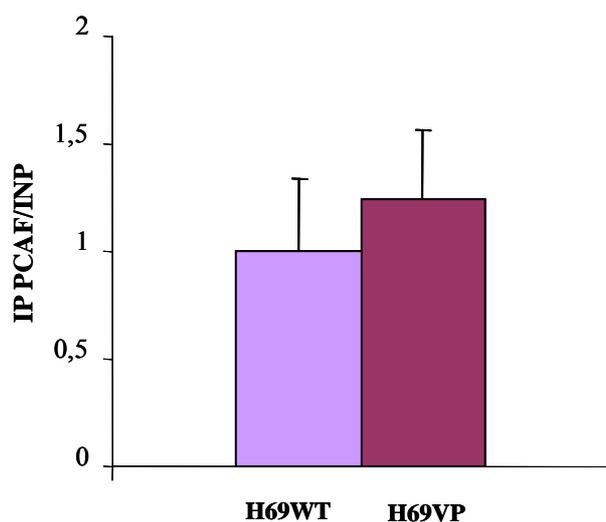


Figure 66. Fixation du facteur PCAF au niveau du promoteur MDR1 dans les cellules H69WT et H69VP. Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) réalisée sur des cellules H69WT et H69VP. Quantifications de l'ADN MDR1 immunoprécipité (IP) avec l'anticorps anti-PCAF par rapport à l'ADN MDR1 de départ (INP) (région -222 à +37). Les valeurs correspondent à la moyenne ± ET de 3 expériences indépendantes.

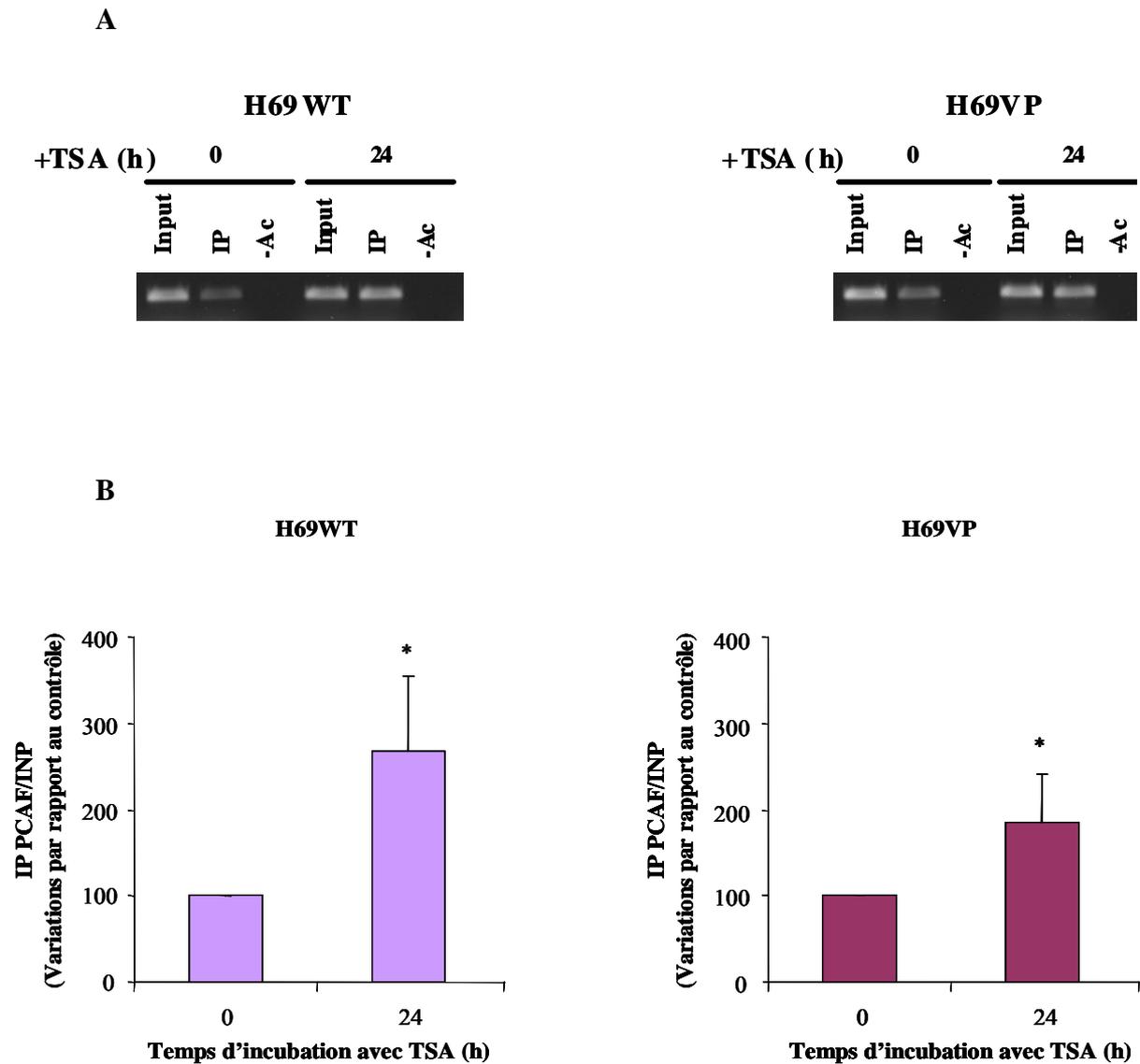


Figure 67. Recrutement du facteur PCAF au niveau du promoteur MDR1 après traitement par la TSA.

Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) réalisée sur des cellules H69WT et H69VP incubées ou non avec 100 ng/mL TSA pendant 24 h. A : Gel d'agarose à 2% des produits post-PCR ChIP au niveau de la région -222 à +37 du promoteur MDR1. Input : ADN MDR1 de départ. IP : ADN MDR1 immunoprécipité avec l'anticorps anti-PCAF. -Ac: contrôle négatif sans anticorps. B : Quantifications de l'ADN MDR1 immunoprécipité (IP) par rapport à l'ADN MDR1 de départ (INP). Les valeurs correspondent à la moyenne \pm ET de 3 expériences indépendantes.

* : $p < 0,05$ en comparaison avec la valeur obtenue dans le contrôle non traité – Test t de Student

H69VP en ce qui concerne les histones H3. Ainsi les modifications de la texture nucléaire, étudiées au cours de la première partie des résultats, semblent refléter les variations observées au niveau des histones H3 du promoteur MDR1 et non les modulations de l'expression de l'ARNm MDR1.

Dans les cellules H69 sensibles et résistantes, le promoteur MDR1 est hypométhylé. L'effet de la TSA sur l'expression du gène *MDR1* ne résulte pas de l'altération de cet état de méthylation.

La surexpression basale du gène *MDR1* dans les cellules résistantes H69VP n'est pas due à une augmentation de la fixation du facteur PCAF au niveau du promoteur MDR1. Qu'il soit activateur ou répresseur, l'effet de la TSA sur la transcription du gène *MDR1* est accompagné du recrutement de la protéine PCAF au niveau de son promoteur dans les cellules H69WT et H69VP.

DISCUSSION

De nombreux travaux ont contribué à mieux comprendre la régulation du gène *MDR1*. Cependant, divers mécanismes moléculaires responsables de l'activation ou de la répression de ce gène restent faiblement élucidés. De même, les altérations nucléaires associées au phénotype MDR sont toujours mal connues.

Ce travail vise à étudier le rôle de l'acétylation des histones dans le phénotype chromatinien et la régulation du gène *MDR1* dans des cellules de carcinome pulmonaire à petites cellules, sensibles H69WT et résistantes H69VP.

➤ **Les cellules H69VP présentent une distribution homogène de la chromatine.**

Plusieurs études sur des lignées humaines et animales décrivent des modifications phénotypiques associées à la résistance MDR, modifications qui se manifestent, entre autres, au niveau de la morphologie et de la croissance cellulaires (Biedler, 1994). Parmi ces altérations, les conséquences de la résistance aux anticancéreux sur la texture nucléaire ont été peu explorées. Dans ce cadre, les travaux réalisés par les membres de notre équipe montrent que le phénotype nucléaire des cellules résistantes diffère de celui observé chez leurs homologues sensibles (Dufer *et al.*, 1995 ; Yatouji *et al.*, 2003). Des résultats similaires ont été également observés dans le modèle cellulaire utilisé dans notre étude. Les cellules H69VP ont, en effet, une chromatine plus uniformément distribuée que celle des cellules sensibles H69WT. Les variations texturales observées se rapprochent de celles retrouvées dans d'autres lignées cellulaires où la résistance est liée à une surexpression de la P-gp (CEM-VLB, HL60-Vinc, K562-Dox et OV1-VCR) (Dufer *et al.*, 1995 ; Yatouji *et al.*, 2003). Il est important de noter que ces variations ne concernent pas la condensation globale de la chromatine des cellules H69WT et H69VP, mais son organisation et sa distribution au sein du noyau.

Le facteur direct responsable de ces altérations texturales dans les cellules résistantes reste inconnu. Toutefois, l'expression de la P-gp ne semble pas à l'origine de ces modifications chromatinienne (Dufer *et al.*, 1995) qui pourraient provenir d'autres altérations survenant au cours de la sélection des cellules H69VP par l'étoposide. D'autre part, ces dernières surexpriment non seulement la P-gp mais aussi la MRP1, ce qui leur confère un phénotype MDR P-gp et non-P-gp dépendant. Ainsi, le profil textural de ces cellules résistantes pourrait être influencé par les deux protéines de transport. En effet, il a été précédemment montré que des cellules résistantes par un mécanisme lié à une surexpression de la MRP1 présentaient les mêmes modifications texturales (Dufer *et al.*, 1995).

➤ **L'acétylation des histones H3 et H4 n'est pas à l'origine des différences texturales entre cellules sensibles et résistantes.**

Malgré les changements évidents de l'organisation chromatinienne, les mécanismes biologiques responsables de la « signature phénotypique » des cellules sensibles et résistantes demeurent très ambigus. Il a été suggéré que des mécanismes épigénétiques, tels que l'acétylation et la méthylation des histones, pourraient jouer un rôle clé dans la détermination du profil chromatinien (Montironi *et al.*, 2003). L'étude du taux d'acétylation des histones H3 et H4 ne révélant aucune différence entre les cellules H69WT et H69VP, cette modification épigénétique ne semble pas à l'origine des variations texturales observées. Toutefois, l'acétylation n'a été analysée que pour la forme tétra-acétylée de l'histone H4 (K5, K8, K12 et K16) et la forme di-acétylée de l'histone H3 (K9 et K14) ; le résultat obtenu n'exclut donc pas la possibilité de variations au niveau des lysines étudiées individuellement. En effet, parallèlement à une décondensation chromatinienne, une légère hyperacétylation des histones H4 a été retrouvée dans les cellules OV1-VCR résistantes en comparaison avec leurs homologues sensibles IGROV1, mais celle-ci était nettement plus marquée au niveau des lysines 5 et 12 (Yatouji *et al.*, 2003). La di-méthylation de l'histone H3 au niveau de la lysine 9, modification associée à l'hétérochromatine facultative et à la répression des gènes de l'euchromatine (Santos-Rosa *et al.*, 2005), ne semble pas impliquée dans les variations nucléaires observées entre les 2 lignées cellulaires.

L'architecture et la flexibilité de la chromatine sont certes régulées par les modifications post-traductionnelles des histones, mais ces dernières ne se limitent pas à l'acétylation et la méthylation. D'autres modifications, comme la phosphorylation et l'ubiquitination, semblent impliquées dans divers processus cellulaires tels que la transcription, la réparation de l'ADN, l'apoptose et la condensation chromosomique (Gilbert *et al.*, 2005). Ainsi, la phosphorylation de l'histone H3 sur la sérine 10 est nécessaire à l'initiation et le maintien de la condensation chromosomique pendant la mitose et la méiose (Gilbert *et al.*, 2005 ; Santos-Rosa *et al.*, 2005 ; Wolffe *et al.*, 2000), mais joue aussi un rôle très important dans l'activation de la transcription chez les eukaryotes (Nowak *et al.*, 2004 ; Santos-Rosa *et al.*, 2005) tout comme la phosphorylation de l'histone H1 qui déstabilise la fibre chromatinienne (Wolffe *et al.*, 2000). L'ubiquitination des histones participerait au dépliage de la chromatine et est généralement associée à l'augmentation de l'expression génique (Jason *et al.*, 2002 ; Santos-Rosa *et al.*, 2005).

L'analyse de l'implication de ces modifications post-traductionnelles dans la morphologie nucléaire expliquerait peut-être les différences texturales observées dans les cellules sensibles et résistantes.

Par ailleurs, ces variations phénotypiques nucléaires pourraient trouver leur explication dans les divers autres mécanismes développés par les cellules pour modifier l'architecture de la chromatine :

D'une part, l'organisation de l'ADN au sein du noyau est régulée, en partie, par les protéines de la matrice nucléaire, les altérations de la structure nucléaire impliquant souvent une dérégulation de ces protéines (Santisteban *et al.*, 1995 ; Zink *et al.*, 2004). Ainsi l'expression des lamines et de la protéine NMP179 semble altérée dans les cellules cancéreuses dont la structure nucléaire est déformée (Debes *et al.*, 2005). De plus, il a été montré que dans les cellules CEM-VLB résistantes, la distribution d'un composant de la matrice nucléaire, la protéine NuMA (*nuclear mitotic apparatus*), est parallèle à la décondensation chromatinienne observée, comparativement aux cellules CEM sensibles (Rafki-Beljebbar *et al.*, 1999).

D'autre part, les nucléosomes peuvent être repositionnés par les facteurs de remodelage de la chromatine appartenant à la famille SWI/SNF ATP-dépendants (Gilbert *et al.*, 2005 ; Wolffe *et al.*, 2000).

Enfin, les protéines HMG14 et HMG17 (*high mobility group*) peuvent elles aussi décompacter la chromatine et activer la transcription (Bustin, 1999 ; Santisteban *et al.*, 1995).

Ces mécanismes intervenant dans la supra-organisation chromatinienne, ils pourraient également être impliqués dans l'apparition des différences texturales observées chez les cellules H69WT et H69VP.

➤ **Parallèlement à une chromatine « relâchée », le gène *MDRI* est fortement exprimé dans les cellules H69VP.**

La cytométrie en images est considérée actuellement comme un outil sensible pour le diagnostic et le pronostic en pathologie tumorale (Millot *et al.*, 2000) : plusieurs cancers ont ainsi été diagnostiqués comparativement à des lésions bénignes (de Prez *et al.*, 1990 ; Dreyer *et al.*, 2001 ; Salmon *et al.*, 1992 ; Verhest *et al.*, 1990) ou classés en fonction de leur grade ou leur type (de Prez *et al.*, 1990 ; Montironi *et al.*, 2004 ; Schmid *et al.*, 2006) grâce à leurs profils chromatiniens distincts. Le fait que l'architecture de la chromatine définisse des sous-

groupes pathologiques peut indiquer une interrelation entre l'organisation nucléaire et l'expression génique. En revanche, la nature de ces liens n'est toujours pas claire : est-ce que la structure pré-existe à la fonction et la conditionne, ou est-elle simplement la résultante de l'activité fonctionnelle ? Il semble que ces deux aspects soient étroitement interdépendants (Zink *et al.*, 2004).

L'état « relaxé » de la chromatine des cellules résistantes H69VP permettrait son ouverture et supposerait ainsi une plus grande activité transcriptionnelle. Ceci est le cas pour le gène *MDR1* : son expression est en effet 8000 fois plus importante dans les cellules résistantes. Malgré l'absence de différence d'acétylation des histones H3 et H4 entre les cellules H69WT et H69VP sur la globalité de la chromatine, des modifications localisées au niveau du promoteur *MDR1*, gène dont la transcription est sous contrôle épigénétique (El-Osta *et al.*, 2002), ont été observées et seront développées ultérieurement.

➤ **Les histones du cœur nucléosomique sont hyperacétylées par la TSA**

Afin d'étudier le rôle de l'acétylation des histones dans la texture de la chromatine, nous avons perturbé l'équilibre existant entre l'activité des HATs d'une part et celle des HDACs d'autre part en inhibant ces dernières par la TSA. La concentration de TSA à laquelle l'activité des HDACs est réduite de 50% (ou IC_{50}) a été mesurée *in vitro* et varie entre 1,4 et 38 nM pour différentes HDACs (Toth *et al.*, 2004). Dans toute notre étude, hormis l'analyse des effets de la TSA sur la prolifération cellulaire, nous avons utilisé une concentration de 100 ng/mL, ce qui correspond à 330 nM de TSA, afin d'assurer une inhibition significative des HDACs, tout en préservant la viabilité cellulaire. Dans ces conditions, une hyperacétylation des histones H3 et H4 est visible de 8 h à 24 h d'incubation dans les 2 lignées cellulaires. Cette hyperacétylation a aussi lieu au niveau des histones H2A et H2B. Plusieurs données de la littérature décrivent l'effet acétylant de la TSA dans un grand nombre de types cellulaires (Archer *et al.*, 2001 ; Hoshikawa *et al.*, 1994 ; Waterborg, 1993 ; Yoshida *et al.*, 1990).

L'acétylation des histones ayant lieu au niveau des résidus lysines, on s'attendrait à ce que la TSA, en augmentant le taux de la forme di-acétylée (K9 et K14) de l'histone H3, diminue d'une façon concomitante la di-méthylation sur la lysine 9 de cette même histone. Cependant, l'inhibition des HDACs n'a qu'un effet minime sur la di-méthylation de H3K9 dans les cellules H69WT et H69VP. Cette discordance peut être expliquée par la nature même de l'histone H3 sujette à l'une ou l'autre de ces modifications post-traductionnelles. En effet,

il a été montré que l'acétylation et la di-méthylation de H3K9 engagent des groupes distincts de molécules H3 ; la première a lieu préférentiellement au niveau du variant H3.3 et marque la compétence transcriptionnelle, tandis que la deuxième se retrouve majoritairement sur le variant H3.1 et dénote l'inactivité de la chromatine (Bartova *et al.*, 2005 ; Hake *et al.*, 2006 ; Hake *et al.*, 2006 ; Sarma *et al.*, 2005).

➤ La TSA induit l'apoptose

Les inhibiteurs des HDACs se sont révélés très efficaces pour induire l'arrêt de croissance, activer la différenciation et/ou provoquer l'apoptose des cellules cancéreuses (Sonnemann *et al.*, 2006).

Le traitement des cellules H69WT et H69VP par la TSA diminue leur prolifération cellulaire et résulte en l'apparition de cellules apoptotiques. Ceci indique que les cellules résistantes demeurent sensibles à l'effet de la TSA sur la croissance. Ces résultats rejoignent d'autres études précisant que les inhibiteurs des HDACs pouvaient surmonter la résistance pléiotropique médiée par l'expression de la P-gp, la MRP ou la BCRP (Castro-Galache *et al.*, 2003 ; Ruefli *et al.*, 2002 ; Tsurutani *et al.*, 2003). Les mécanismes par lesquels la TSA induit l'apoptose dans les cellules H69WT et H69VP n'ont pas été recherchés car ne font pas l'objet de notre étude. Cependant, plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer ce phénomène :

- 1) L'acétylation des histones provoque le relâchement de la chromatine et augmente l'accessibilité de l'ADN aux endonucléases (Lee *et al.*, 1996 ; Sealy *et al.*, 1978).
- 2) Etant donné la corrélation entre l'acétylation des histones et l'activité transcriptionnelle, la synthèse protéique *de novo* peut être impliquée dans l'induction de l'apoptose par les inhibiteurs des HDACs (Medina *et al.*, 1997).
- 3) La cytotoxicité des inhibiteurs des HDACs serait liée à l'acétylation de protéines non-histones telles que la α -tubuline (Blagosklonny *et al.*, 2002).

La littérature précise que les inhibiteurs des HDACs, en l'occurrence la TSA, induisent l'apoptose par une voie indépendante de p53 (Zhu *et al.*, 2001). Il a été montré que la protéine p53 est tronquée dans les cellules H69WT à la suite d'une mutation non-sens au niveau du codon 171 (Hensel *et al.*, 1991) ; de ce fait, l'activité apoptotique de la TSA est p53-indépendante dans notre modèle cellulaire.

La surexpression de la P-gp inhibe l'activation de la caspase-3 conférant ainsi une résistance à plusieurs inducteurs d'apoptose caspase-dépendants tels que l'irradiation UV et la stimulation des récepteurs de mort (Hu *et al.*, 2000 ; Jin *et al.*, 2000 ; Smyth *et al.*, 1998). Etant donné que la TSA induit le même taux d'apoptose dans les cellules H69WT et H69VP, nous pourrions supposer que son action soit caspase-indépendante dans les cellules résistantes, similaire à l'effet de SAHA, un autre inhibiteur des HDACs, sur les cellules CCRF-CEM résistantes (Ruefli *et al.*, 2002). Toutefois, en cas de mort cellulaire caspase-indépendante, les cellules ne présentent pas les modifications nucléaires spécifiques de l'apoptose (Kroemer *et al.*, 2005). Or, certaines cellules H69WT et H69VP marquées par la coloration de Feulgen révèlent le même aspect de condensation chromatinienne et de fragmentation nucléaire observé dans les cellules apoptotiques. De plus, l'induction de l'apoptose dans ces 2 lignées cellulaires coïncide avec la surexpression de la protéine Bax, qui contribue au contrôle de la voie apoptotique intrinsèque et qui conduit à l'activation des caspases (Johnstone, 2002).

L'activation des caspases a souvent été rapportée pour expliquer l'apoptose médiée par les inhibiteurs des HDACs (Henderson *et al.*, 2003). Toutefois, des investigations supplémentaires sont nécessaires afin de pouvoir émettre une hypothèse concernant la voie par laquelle la TSA induit l'apoptose dans les cellules H69WT et H69VP.

➤ **La TSA entraîne l'arrêt du cycle cellulaire**

Une incubation de 24 h avec la TSA induit une diminution du pourcentage de cellules en phase S et son augmentation concomitante en phases G₀/G₁ et G₂/M. Ces résultats sont en accord avec les données bibliographiques concernant les effets des inhibiteurs des HDACs sur le cycle cellulaire qui décrivent le plus souvent un arrêt en phases G₀/G₁ et/ou G₂/M (Boyle *et al.*, 2005 ; Vanhaecke *et al.*, 2004). Les mécanismes qui sous-tendent les effets antiprolifératifs des inhibiteurs des HDACs demeurent mal définis. Plusieurs hypothèses suggèrent que les modifications post-traductionnelles des histones mais aussi d'autres protéines seraient impliquées dans les effets de ces inhibiteurs sur la croissance cellulaire (Brinkmann *et al.*, 2001 ; Lin *et al.*, 2006). Dans notre étude, les effets de la TSA sur le cycle ne sont pas liés au statut de p53, ce gène étant muté dans la lignée H69WT (Hensel *et al.*, 1991). Il a été montré que la TSA peut induire l'expression de p21^{WAF1/CIP1} dans des lignées cellulaires où le gène p53 est muté (Donadelli *et al.*, 2003). La protéine p21^{WAF1/CIP1} est un inhibiteur de kinases cycline-dépendantes, dont la transcription est stimulée par p53 en

réponse à un dommage de l'ADN, ce qui résulte en l'arrêt du cycle cellulaire, principalement au niveau de la transition G₁/S mais aussi G₂/M (Donadelli *et al.*, 2003 ; Vermeulen *et al.*, 2003). De plus, les cellules déficientes en protéine Rb s'arrêtent majoritairement en phase G₂ après induction de la protéine p21^{WAF1/CIP1} (Donadelli *et al.*, 2003 ; Niculescu *et al.*, 1998). Nos résultats indiquent qu'après traitement par la TSA, l'arrêt cellulaire le plus significatif se situe en phase G₂/M. Les cellules H69WT étant déficientes en protéine Rb (Kashii *et al.*, 1994), l'effet de la TSA sur le cycle cellulaire pourrait être médié par la protéine p21 dans notre modèle d'étude.

➤ **L'inhibition des HDACs modifie la supra-organisation de la chromatine**

La texture de la chromatine dépendant du cycle cellulaire, seules les cellules en phase G₀/G₁ ont été analysées, au cours de notre étude, afin de pouvoir les comparer entre elles. Le traitement des cellules H69WT par la TSA pendant 8 h et jusqu'à 24 h résulte en une décondensation progressive de la chromatine. Ces observations sont en accord avec d'autres études montrant que la TSA induit la décondensation de la chromatine interphasique grâce à son activité sur les HDACs (Bartova *et al.*, 2005 ; Toth *et al.*, 2004). Il est important de préciser que l'hyperacétylation des histones n'induirait pas une redistribution des territoires chromosomiques mais modifierait uniquement leur niveau de condensation (Gilchrist *et al.*, 2004). L'inhibition des HDACs n'altère donc pas l'arrangement spatial de l'euchromatine et de l'hétérochromatine dans le noyau interphasique mais accentue plutôt leur compartimentation (Bartova *et al.*, 2005).

Cette décondensation de la chromatine est observée également dans les cellules H69VP incubées en présence de TSA mais celle-ci n'est que transitoire : après 12 h et 24 h d'incubation les paramètres de texture indiquent que la chromatine se recondense progressivement. La di-méthylation de H3K9, souvent corrélée à une chromatine silencieuse (Johnson *et al.*, 2004), pourrait expliquer ce virement de conformation vers un état de plus en plus fermé, d'autant plus que la littérature rapporte dans certains cas une augmentation de la quantité de H3K9 di-méthylées suite à l'action de la TSA (Bartova *et al.*, 2005). Or, dans notre étude, aucune différence significative de cette modification post-traductionnelle n'a été mise en évidence après 8 h, 12 h et 24 h d'incubation avec la TSA. Cette recondensation de la chromatine n'est donc pas liée à une augmentation de la forme di-méthylée de la lysine 9 sur l'histone H3. Toutefois, elle pourrait résulter de mécanismes impliquant d'autres modifications épigénétiques, telles que la phosphorylation des histones H1 et H3 corrélée à la condensation chromosomique pendant la mitose (Khorasanizadeh, 2004 ; Strahl *et al.*, 2000 ;

Th'ng, 2001). En effet, Biade *et al* ont montré que la TSA induit la compaction de la chromatine conjointement à une hyperphosphorylation des histones H1 et H3 dans la lignée HT-29 de carcinome du côlon (Biade *et al.*, 2001).

D'autre part, le facteur co-activateur p300 induit une hyperacétylation des histones grâce à son activité HAT, déstructurant ainsi la chromatine. De plus, son expression a été corrélée à des altérations nucléaires, morphologiques et texturales, médiées en partie par les lamines A et C de la matrice nucléaire dont l'expression est augmentée par ce facteur transcriptionnel (Debes *et al.*, 2005). Ainsi, dans la mesure où ces protéines semblent régulées par des mécanismes épigénétiques, la modulation de la texture chromatinienne par la TSA pourrait être imputée à ses effets sur la matrice nucléaire.

Il est à noter qu'après 24 h de traitement, des mottes chromatinienne apparaissent dans les noyaux des cellules H69WT. Ces phénomènes rappellent la condensation de la chromatine observée pendant l'apoptose. Cependant, les cellules que nous avons sélectionnées pour l'analyse de la texture sont celles dans lesquelles aucune condensation de l'ADN relative à un état mitotique ou apoptotique n'a pu être détectée visuellement après coloration par le Feulgen. Toutefois, ces modifications morphologiques pourraient être une manifestation précoce, « subvisible » des premiers stades de l'apoptose. Cette explication est en accord avec certaines études qui montrent une dégradation rapide de l'euchromatine acétylée car hypersensible aux nucléases pendant l'apoptose précoce, avant même la fragmentation de l'ADN caractéristique de l'apoptose et qui correspondrait à la digestion de l'hétérochromatine (Hendzel *et al.*, 1998). De même, au cours de l'apoptose, des modifications texturales significatives précèdent toute altération morphologique détectable en microscopie conventionnelle et toute dégradation de l'ADN (Palissot *et al.*, 1996).

Cette condensation de la chromatine, localisée dans les cellules sensibles, et générale dans les cellules résistantes, traduit-elle une désacétylation des histones malgré la présence de TSA dans le milieu de culture? Ceci semble peu probable dans la mesure où aucune diminution du taux d'acétylation des histones H3 et H4 nucléaires, ni même des autres histones et variants n'a été mise en évidence. De plus, il a été démontré que l'hypoacétylation des histones H3 et H4 pendant l'apoptose (Allera *et al.*, 1997 ; D'Arrigo *et al.*, 2003 ; Hendzel *et al.*, 1998) n'était pas responsable de la condensation chromatinienne observée (D'Arrigo *et al.*, 2003). Signalons que certaines études ont mis en évidence une hyperacétylation ainsi qu'une hyperphosphorylation des histones durant l'apoptose (Ajiro, 2000 ; Lee *et al.*, 1996 ;

Lee *et al.*, 1999). Ainsi, nous ne pouvons exclure le rôle de ces modifications dans la formation des mottes chromatiniennes au niveau des cellules H69WT et la recondensation de la chromatine des cellules H69VP.

Dans la mesure où la phosphorylation des histones H1, H2A et H3 précède la fragmentation de l'ADN, il a été suggéré que la première initie la seconde (Lee *et al.*, 1999 ; Th'ng, 2001), un schéma qui pourrait expliquer les résultats que nous obtenons dans les cellules H69WT et H69VP.

De plus, cette compaction de la chromatine reflèterait des altérations de la matrice nucléaire, annonçant l'imminence de l'apoptose. En effet, les lamines et la protéine NuMA, protéines qui maintiennent l'intégrité structurale du noyau, sont lysées pendant l'apoptose, participant ainsi à la condensation de la chromatine (Robertson *et al.*, 2000).

➤ **La texture de la chromatine reflète les modifications du niveau d'acétylation des histones H3 au niveau du promoteur MDR1**

Le gène *MDR1* étant sous contrôle épigénétique, des modifications du niveau d'acétylation des histones H3 et H4 au niveau de son promoteur pourraient moduler son expression (El-Osta *et al.*, 2002 ; Kantharidis *et al.*, 2000). Ceci semble se vérifier dans les 2 lignées cellulaires étudiées. Le promoteur MDR1 est en effet hyperacétylé dans les cellules H69VP, qui surexpriment ce gène de résistance, par rapport aux cellules H69WT sensibles. La chromatine des cellules résistantes étant uniformément distribuée, la configuration ouverte de la chromatine pourrait ainsi refléter l'architecture du locus MDR1 qui influencerait son expression.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons modulé la structure chromatinienne en modifiant le niveau d'acétylation des histones par la TSA. Cette dernière décondense la chromatine des cellules H69WT et, parallèlement, hyperacétyle les histones H3 et H4 au niveau du promoteur MDR1, ce qui est en accord avec la surexpression du gène *MDR1* observée. Cette hypothèse semble donc se confirmer dans les cellules H69WT où existe un lien cohérent entre l'ouverture de la chromatine, l'acétylation des histones au niveau du promoteur MDR1 et la transcription de ce gène de résistance.

Les cellules H69VP traitées avec la TSA montrent que ce sont surtout les histones H3 qui portent la signature de la réorganisation nucléaire. En effet, les 2 phases successives de

décondensation et recondensation de la chromatine qui ont lieu pendant les 24 h d'incubation s'accompagnent, au niveau du promoteur *MDR1*, d'une hyperacétylation des histones H3 suivie par une désacétylation progressive. Les histones H4 ne montrent pas cette allure d'acétylation biphasique mais sont progressivement acétylées en fonction du temps d'incubation.

En outre, l'expression du gène *MDR1* diminue progressivement avec l'exposition des cellules H69VP à l'action de la TSA. La corrélation directe entre l'expression du gène *MDR1* et l'architecture chromatinienne, dans la globalité du noyau ou localisée au niveau du promoteur *MDR1*, semble difficile à faire. En effet, l'activité du promoteur *MDR1* ne se résume pas à une simple régulation épigénétique mais dépend aussi d'une pléthore de facteurs de transcription, activateurs ou inhibiteurs (Baker *et al.*, 2005 ; Kantharidis *et al.*, 2000), pouvant être eux-mêmes régulés par des mécanismes épigénétiques (Tian *et al.*, 2005). Ceci explique pourquoi les modifications de la texture chromatinienne par la TSA dans les cellules H69WT et H69VP ne correspondent pas toujours aux variations d'expression du gène *MDR1*.

En conclusion, la texture de la chromatine semble refléter les modifications du niveau d'acétylation des histones H3 au niveau du promoteur *MDR1* dans les lignées H69WT et H69VP.

➤ **La transcription du gène *MDR1* est augmentée dans les cellules sensibles et diminuée dans les cellules résistantes après traitement par la TSA**

Les modifications post-traductionnelles des histones représentent un mécanisme potentiellement important par lequel les interactions histones-ADN peuvent être modulées pour permettre des changements particuliers dans l'activité génique. L'acétylation et la désacétylation des histones du cœur nucléosomique ont été largement étudiées ce qui a permis d'établir un modèle général dans lequel la désacétylation est liée à la chromatine inactive (Wilson *et al.*, 2002). Cependant, des études récentes suggèrent un scénario plus complexe et plus individualisé à l'égard de certains gènes et/ou promoteurs (Deckert *et al.*, 2001).

Bien que la majorité des gènes ne soit pas affectée (~90%), ceux qui sont influencés par l'inhibition des HDACs augmentent leur expression le plus souvent. Parmi ceux-ci, nous pouvons citer, à titre d'exemple, les gènes codant pour p21, la gelsoline, la cytokératine A et c-fos (Laribee *et al.*, 2001). Cependant, les inhibiteurs des HDACs suppriment aussi l'expression de certains gènes comme ceux correspondant à c-myc, IL-2, la cycline D1 et l'adiponectine. Ainsi, ces inhibiteurs régulent positivement ou négativement l'expression génique d'une façon gène-spécifique (Hu *et al.*, 2005 ; Qiao *et al.*, 2006).

- *La TSA ne déstabilise pas l'ARNm MDR1*

Notre étude montre que la TSA et le NaBut augmentent l'expression du gène *MDR1* dans les cellules H69WT et diminuent celle-ci dans les cellules H69VP. Bien que la majorité des données bibliographiques indiquent que les inhibiteurs des HDACs activent l'expression du gène *MDR1* et agissent sur le plan transcriptionnel (Morrow *et al.*, 1994), il a été récemment prouvé que l'augmentation de l'ARNm MDR1 après chimiothérapie peut résulter de l'augmentation de la stabilité de l'ARNm et non de l'activation de la transcription (Yague *et al.*, 2003). De plus, la TSA peut aussi diminuer l'expression génique en réduisant la stabilité de l'ARNm, comme c'est le cas pour le gène de l'ADN méthyltransférase DNMT3B (Xiong *et al.*, 2005). Nos résultats montrent que, dans les lignées cellulaires H69WT et H69VP, la TSA régule l'expression du gène *MDR1* au niveau de la transcription sans affecter la stabilité de son ARNm. Ainsi elle semble activer sa transcription dans les cellules sensibles et l'inhiber dans les cellules résistantes. Ce résultat suggère que la régulation transcriptionnelle par les inhibiteurs des HDACs est aussi lignée cellulaire- dépendante.

- *Après inhibition des HDACs les cellules H69WT et H69VP surexpriment et sous expriment respectivement le gène MDR1*

Plusieurs données de la littérature évoquent l'augmentation de l'expression du gène *MDR1* par les inhibiteurs des HDACs dans plusieurs lignées cellulaires. Ainsi, le gène *MDR1* est surexprimé par la TSA dans les cellules SW620 du carcinome du côlon (Baker *et al.*, 2005 ; Jin *et al.*, 1998) et dans les cellules leucémiques CEM-Bcl2 (Baker *et al.*, 2005), ainsi que par le depsipeptide (appelé aussi FK228 ou FR901228) dans les cellules leucémiques KU812 (Yamada *et al.*, 2006) et NB4 (Tabe *et al.*, 2006). Ceci est conforme avec l'augmentation du taux d'ARNm MDR1 observé dans les cellules H69WT incubées en présence de TSA.

Toutefois, certaines études rapportent que dans les cellules sensibles CCRF-CEM, le SAHA, un inhibiteur des HDACs, n'altère pas l'expression de la P-gp (Ruefli *et al.*, 2001) et que la TSA n'active pas la transcription du gène *MDR1* (El-Osta *et al.*, 2002).

Les études réalisées sur les cellules résistantes CEM-A7R, Kasumi-1 et Kasumi-6, exprimant la P-gp, montrent que l'inhibition des HDACs augmente l'expression du gène *MDR1* (El-Osta *et al.*, 2002 ; Tabe *et al.*, 2006). Cette différence de régulation du gène *MDR1* entre cellules sensibles et résistantes après inhibition des HDACs a été imputée au statut de méthylation du promoteur MDR1 : l'acétylation des histones ne peut augmenter la transcription de ce gène de résistance que si son promoteur est hypométhylé (El-Osta *et al.*, 2002). Cependant, malgré

l'hypométhylation du promoteur MDR1 dans les cellules H69VP, la TSA n'augmente pas son expression, voire la diminue progressivement avec le temps de traitement. Ce résultat confirme la complexité de la régulation de ce gène de résistance.

- *L'inhibition de la traduction ne supprime pas la régulation du gène MDR1 par la TSA*

L'effet acétylant de certaines molécules a déjà été attribué à la diminution de l'expression génique. Ainsi, l'acétylation du facteur HMG1 par la protéine CBP diminue la transcription du gène IFN- β (Munshi *et al.*, 1998). De plus, la diminution de la transcription génique par la TSA a été attribuée, dans le cas des gènes *Hmga2* et *cycline D1* respectivement, à la perte de fixation des protéines Sp1/Sp3 et NF- κ B/p65 sur leurs promoteurs (Ferguson *et al.*, 2003 ; Hu *et al.*, 2005). Quelques rares données révèlent une diminution de la transcription du gène *MDR1* par les inhibiteurs des HDACs : la TSA réduit d'une façon significative l'expression de la P-gp et de son ARNm dans les cellules L1210R résistantes. Ces dernières étant murines, la diminution d'expression du gène *MDR1* pourrait résulter d'une différence de régulation de ce gène chez la souris (Castro-Galache *et al.*, 2003). Toutefois, dans les cellules humaines MCF7/Adr résistantes, la TSA diminue aussi l'expression de *MDR1* (Tian *et al.*, 2005). Cette diminution a été attribuée à la surexpression, par la TSA, du gène *WTH3* (Tian *et al.*, 2005), identifié comme régulateur négatif de *MDR1* (Shan *et al.*, 2002).

Nous avons montré que l'inhibition de la traduction n'empêche pas la régulation du gène *MDR1* par la TSA dans les cellules H69WT et H69VP. Celle-ci influencerait la transcription de ce gène en agissant directement sur la fixation de facteurs activateurs ou répresseurs sur le promoteur MDR1.

- *La TSA recrute la protéine PCAF au niveau de la boîte CCAAT inversée du promoteur MDR1*

Il a été décrit que le facteur NF-Y se lie à la boîte CCAAT inversée (-82 à -73) au niveau du promoteur MDR1, fixe la protéine PCAF à activité HAT et active l'expression basale de ce gène, ou induite par les inhibiteurs des HDACs (Hu *et al.*, 2000 ; Tanaka *et al.*, 2003). NF-Y semble donc un pivot de la régulation du gène *MDR1* et serait une bonne cible thérapeutique contre le phénotype MDR. Des études récentes révèlent que de nouvelles molécules anticancéreuses, telles que ET-743 et HMN-176, ont la propriété de diminuer l'expression de ce gène de résistance par des mécanismes encore mal connus mais interférant probablement avec le complexe NF-Y/PCAF (Friedman *et al.*, 2002 ; Jin *et al.*, 2000 ;

Kanzaki *et al.*, 2002 ; Tanaka *et al.*, 2003). De plus, les travaux de Jin et Scotto démontrent que le promoteur MDR1 est activé par la surexpression de PCAF (Jin *et al.*, 1998). Toutefois, une association directe *in vivo* entre le facteur PCAF et le promoteur MDR1 activé n'a jamais été montrée. Nous avons donc recherché l'effet de la TSA sur la fixation de PCAF dans les cellules H69WT et H69VP. Une étude réalisée sur les cellules SCCKN sensibles et SCCTF résistantes montre que ce sont ces dernières qui fixent le plus de protéines NF-Y au niveau du promoteur MDR1 (Okamura *et al.*, 2004). Ce résultat ne peut être généralisé à toutes les cellules sensibles et résistantes étant donné que, dans les lignées H69WT et H69VP, la quantité basale de PCAF, et probablement de NF-Y, fixée au niveau du promoteur MDR1 est identique dans les cellules sensibles et résistantes.

L'activation du promoteur MDR1 par la TSA, dans les cellules H69WT, est accompagnée du recrutement de PCAF au niveau de la boîte CCAAT inversée. Ceci est conforme avec les données bibliographiques décrivant l'importance de NF-Y et PCAF dans l'induction du gène *MDR1* par les inhibiteurs des HDACs (Jin *et al.*, 1998). Cependant, la répression du gène *MDR1* par la TSA ne semble pas nécessiter une baisse de la quantité de PCAF liée au promoteur MDR1. Cette dernière est même recrutée sur la boîte Y (ou CCAAT inversée) quand les cellules H69VP sont incubées en présence de TSA. Si l'action activatrice de la TSA est médiée par le facteur NF-Y, son action répressive du gène *MDR1* serait indépendante de la fixation de PCAF, et probablement de NF-Y lui-même, et prendrait son origine au niveau d'un autre site du promoteur.

La protéine PCAF ayant une activité HAT, son recrutement par la TSA est toutefois conforme à l'hyperacétylation induite par celle-ci au niveau du promoteur MDR1 dans les deux lignées cellulaires. Un exemple intéressant à citer, où l'on montre que l'acétylation du promoteur MDR1 n'empêche pas sa répression, est celui de l'ET-743 qui inhibe l'activation de MDR1 induite par la TSA (Jin *et al.*, 2000) et réduit la résistance des cellules aux anticancéreux en diminuant l'expression de la P-gp (Kanzaki *et al.*, 2002) ; il n'a cependant aucun effet sur l'hyperacétylation des histones induite par la TSA au niveau de la boîte CCAAT inversée du promoteur MDR1 (Jin *et al.*, 2000).

- *La TSA module l'expression de facteur(s) activateur(s) et/ou répresseur(s) du gène MDR1*

Si l'inhibition de la synthèse protéique *de novo* ne supprime pas l'action de la TSA elle réduit toutefois ses effets dans les cellules H69WT et H69VP. Etant donné que la stabilité

de l'ARNm MDR1 n'est pas modifiée par la TSA, la diminution de son effet sur l'expression de l'ARNm MDR1 dans les deux lignées cellulaires ne résulte pas d'une modification de l'expression de protéines qui régulent la stabilité de l'ARNm, mais plutôt de facteurs intervenant dans la transcription du gène *MDR1*. Il faut toutefois signaler que, dans les cellules H69WT, le taux de surexpression du gène *MDR1* par la TSA diminue après inhibition de la traduction. Par contre, le taux d'ARNm MDR1 reste supérieur à celui observé après traitement par la TSA seule. Ceci pourrait provenir de la saturation de la machinerie transcriptionnelle qui ne peut plus augmenter la vitesse de transcription au-delà d'un seuil donné.

Parmi les facteurs de transcription qui régulent positivement ou négativement le gène *MDR1*, la protéine c-jun semble jouer un rôle important (Fujita *et al.*, 2005 ; Labialle *et al.*, 2002 ; Miao *et al.*, 2003 ; Zhou *et al.*, 2006). D'une part, Ratnasinghe *et al* proposent que l'expression du facteur c-jun pourrait induire celle de la P-gp dans les cellules résistantes MCF-7 (Ratnasinghe *et al.*, 2001). La quantité d'ARNm c-jun est équivalente dans les cellules H69WT et H69VP et ne serait donc pas à l'origine de la résistance dans ces dernières. Toutefois, la TSA augmente progressivement l'expression de *c-jun* dans les cellules H69WT ; ce phénomène pourrait jouer un rôle dans l'augmentation de la transcription du gène *MDR1*. D'autre part, plusieurs études suggèrent que le facteur c-jun peut inhiber l'expression de la P-gp (Fujita *et al.*, 2005 ; Kang *et al.*, 2000 ; Miao *et al.*, 2003 ; Stein *et al.*, 1996). Miao et Ding ont démontré, pour la première fois, un lien direct entre l'activation de *c-jun* et l'inhibition du gène *MDR1* dans les cellules résistantes K562/A02 (Miao *et al.*, 2003). La surexpression de *c-jun* par la TSA étant transitoire dans les cellules H69VP, elle pourrait donc éventuellement jouer un rôle dans la diminution de l'activation du gène *MDR1*.

De plus, comme le facteur WTH3 est répresseur du gène *MDR1* (Tian *et al.*, 2005), la TSA diminuerait l'expression de ce dernier en augmentant celle de WTH3 (ou d'un autre facteur répresseur du gène *MDR1*) dans les cellules H69VP.

La discussion autour de l'effet de la TSA sur la transcription du gène *MDR1* dans les cellules H69WT et H69VP est d'autant plus intéressante quand l'interprétation est faite en fonction des modifications épigénétiques induites par celle-ci au niveau du promoteur MDR1.

➤ **La TSA modifie le niveau d'acétylation des histones H3 et H4 au niveau du promoteur MDR1**

Les inhibiteurs des HDACs hyperacétylent les histones H3 et/ou H4 des régions promotrices de la majorité des gènes qu'ils activent, tels que *TβRII* (Zhao et al., 2003), *IAP* (Hinnebusch et al., 2003) et *Mn-SOD* (Maehara et al., 2002). Nos résultats obtenus dans les cellules H69WT sont en accord avec les données de la littérature dans la mesure où les histones H3 et H4 sont hyperacétylées par la TSA et se retrouvent au niveau du promoteur MDR1 favorisant ainsi l'expression de ce gène. Dans les cellules H69VP la corrélation entre le niveau d'acétylation du promoteur MDR1 et la transcription génique n'est pas aussi évidente : la diminution de l'expression du gène *MDR1* n'est conditionnée, ni par la désacétylation des histones H4 qui, d'ailleurs, continuent à s'acétyler sous l'action de la TSA, ni même par celle des histones H3 au niveau du promoteur MDR1. En effet, après une hyperacétylation transitoire du promoteur, la TSA entraîne une baisse du taux des histones H3 acétylées après 24 h d'incubation. Cependant, l'acétylation résiduelle des histones H3 n'est jamais inférieure à leur acétylation basale. Ainsi, la désacétylation des histones H3 pourrait favoriser ou maintenir l'inhibition de l'expression du gène *MDR1* sans en être le facteur déclenchant. Cette désacétylation pourrait résulter d'un facteur répresseur qui, en se fixant sur le promoteur MDR1, déplace des protéines activatrices à activité HAT préférentiellement sur les histones H3, entraînant un remodelage nucléosomique qui ferme la chromatine et accentue l'inhibition de la transcription.

- *Comment l'hyperacétylation du promoteur MDR1 permet-elle l'inhibition de son activation ?*

Classiquement, l'hyperacétylation des histones au niveau de la région promotrice d'un gène après inhibition des HDACs laisse présager l'augmentation de la transcription de ce gène; l'ouverture de la chromatine faciliterait l'accès des facteurs de transcription à leur site de fixation ce qui activerait la transcription (Laribee et al., 2001).

Au contraire, dans les cellules H69VP, la TSA induit une diminution de l'expression du gène *MDR1*. Cette diminution a lieu dès 8 h de traitement, alors que les histones H3 et H4 sont hyperacétylées au niveau du promoteur MDR1. Un cas de figure semblable a été signalé et concerne l'inhibition de l'expression du gène PU.1 par la TSA malgré une hyperacétylation des histones H4 au niveau de son promoteur (Laribee et al., 2001). Quelques hypothèses peuvent être émises pour expliquer ce phénomène :

- L'augmentation de l'acétylation des histones dans la région promotrice du gène *MDR1* pourrait causer le déplacement des nucléosomes et masquer ainsi des sites d'activation critiques au niveau de l'ADN, entraînant la perte de fixation des facteurs trans-activateurs (Laribee *et al.*, 2001).
- La répression du gène *MDR1* ne serait pas directement liée à l'acétylation des histones au niveau du promoteur, mais plutôt à l'acétylation, grâce à la TSA, d'une protéine non-histone impliquée dans la transcription du gène *MDR1*. Un mécanisme d'action similaire a été proposé dans l'inhibition du promoteur MMTV par la TSA (Mulholland *et al.*, 2003 ; Wilson *et al.*, 2002). De plus, la répression de la transcription par PLZF, à partir de promoteurs possédant des sites de fixation pour cette protéine, requiert l'activité HAT de p300 pour induire l'acétylation de ce facteur (Guidez *et al.*, 2005).

Il est à remarquer que, dans les cellules H69VP, le traitement de 8 h avec la TSA entraîne une faible hyperacétylation des histones H3 au niveau de la région proximale du promoteur *MDR1*, en comparaison avec la région distale. Dans la mesure où des changements précoces de l'acétylation des histones H3, corrélés à la régulation du gène *MDR1*, sont associés à l'intron 1 de ce gène, ceci suggère que des sites de fixation pour des facteurs en *trans* se retrouvent au niveau de cette région et pourraient jouer un rôle important dans la régulation du gène *MDR1* (Baker *et al.*, 2005). Conformément à cette hypothèse, l'acétylation par la TSA des histones H3 de la région proximale du promoteur *MDR1*, se situant dans notre étude au niveau de l'intron 1, semble plus en accord avec la répression de ce gène que la partie distale. La région proximale serait ainsi hiérarchiquement dominante au niveau de la transcription (et peut-être de l'inhibition ?) du gène *MDR1* dans les cellules H69VP.

La comparaison de l'acétylation du promoteur *MDR1* entre les cellules H69WT et H69VP non traitées montre, en effet, que, par rapport à la région distale, la région proximale décrit mieux l'état actif du promoteur dans les cellules résistantes, car elle est non seulement riche en histones H4 acétylées mais aussi en histones H3 acétylées.

- *Comment une désacétylation des histones H3 peut-elle avoir lieu malgré l'inhibition des HDACs par la TSA?*

Dans les cellules H69VP, suite à l'hyperacétylation des histones H3 par la TSA, une désacétylation est observée après 24 h d'incubation au niveau du promoteur *MDR1*. Cette désacétylation est en accord avec la diminution de l'expression de ce gène de résistance mais pas avec la propriété de la TSA comme inhibiteur des HDACs. La diminution de l'acétylation

ne peut pas être expliquée par une perte d'activité de la TSA, l'hyperacétylation globale des histones H3 et H4 étant toujours conservée.

La littérature rapporte quelques exemples d'hypoacétylation H3 et/ou H4 après traitement par la TSA. C'est le cas par exemple des gènes *Hmga2* et *bcl-2* régulés négativement par celle-ci (Duan *et al.*, 2005 ; Ferguson *et al.*, 2003).

Dans les cellules H69VP, la désacétylation des histones H3 après 24 h d'incubation indique que la TSA induit une telle modification de la structure chromatinienne que la quantité d'histones H3 acétylées a significativement chuté, après une phase d'hyperacétylation. Cette baisse du niveau des histones H3 acétylées pourrait refléter une perte de nucléosomes plutôt qu'une désacétylation d'histones H3 liées au promoteur MDR1 (Deckert *et al.*, 2001). Toutefois, une perte de nucléosomes serait associée à une diminution concomitante du taux d'acétylation des histones H3 et H4. Or, dans notre étude, l'acétylation des histones H4 continue à augmenter au niveau du promoteur MDR1 des cellules H69VP, ce qui ne nous permet pas d'expliquer ces modifications épigénétiques par la perte nucléosomique.

Deux études évoquent une hyperacétylation transitoire suivie d'une désacétylation progressive des histones H3 et H4 au niveau des promoteurs MMTV (Mulholland *et al.*, 2003) et c-jun (Thomson *et al.*, 2001) après traitement par la TSA. De plus, Baker *et al.* ont montré qu'un traitement de 8 h avec la TSA induit l'hyperacétylation des histones H3 et H4 dans les cellules CEM-Bcl2. La prolongation du traitement jusqu'à 24 h n'amplifie pas l'hyperacétylation des histones H3, alors que celle des histones H4 est réduite. Aucune explication quant à la désacétylation des histones H4 n'a été fournie par les auteurs de cette étude (Baker *et al.*, 2005). Toutefois, ce phénomène bi-phasique, observé aussi au niveau des histones H3 du promoteur MDR1 dans les cellules H69VP, pourrait correspondre à l'inhibition, dans un premier temps, des HDACs-TSA sensibles. Ensuite, des HDACs-TSA insensibles pourraient entraîner une désacétylation localisée des histones H3 au niveau du promoteur MDR1 (Thomson *et al.*, 2001).

➤ **La TSA n'altère pas l'hypométhylation du promoteur MDR1**

Différentes études montrent que la méthylation du promoteur MDR1 régule son activité transcriptionnelle basale (El-Osta *et al.*, 2002 ; Nakayama *et al.*, 1998). Ces études décrivent une corrélation inverse entre la méthylation des sites CpG du promoteur et l'expression du gène *MDR1*. Ainsi la résistance aux anticancéreux médiée par la P-gp a

souvent été associée à l'hypométhylation du promoteur *MDR1* (David *et al.*, 2004 ; Kantharidis *et al.*, 1997 ; Kusaba *et al.*, 1999). Cependant, l'inhibition du gène *MDR1* n'est pas toujours liée à la méthylation de son promoteur. Ceci est le cas pour les cellules SW620 exprimant très faiblement ce gène de résistance alors que leur promoteur *MDR1* est hypométhylé (Baker *et al.*, 2005 ; Jin *et al.*, 1998). De même, dans notre modèle cellulaire, les deux lignées sensible H69WT et résistante H69VP sont hypométhylées au niveau du promoteur *MDR1*.

La surexpression du gène *MDR1* après chimiothérapie pourrait être attribuée à la déméthylation de son promoteur par les agents antiméthyliques (Nakayama *et al.*, 1998 ; Tada *et al.*, 2000). Dans les cellules H69WT et H69VP, la TSA régule l'expression du gène *MDR1* sans modifier le statut de méthylation de son promoteur. Ce résultat est conforme avec celui obtenu dans les cellules CCRF-CEM (El-Osta *et al.*, 2002) et paraît en accord avec l'activité principale de la TSA qui est l'inhibition des HDACs. Toutefois, différentes équipes ont montré que la TSA peut diminuer la méthylation de l'ADN. Selker a en effet trouvé que la TSA réduit la méthylation de l'ADN dans le champignon *Neurospora crassa* (Selker, 1998). De plus, la TSA induit la déméthylation partielle du gène *IGF2R* (Hu *et al.*, 2000). L'administration de butyrate de sodium résulte en une hypométhylation globale dans plusieurs lignées cancéreuses humaines (Cosgrove *et al.*, 1990). Par ailleurs, une étude récente décrit une nouvelle voie d'interaction entre la TSA et les ADN méthyltransférases par le biais de la réduction de la stabilité de l'ARNm DNMT3B (Xiong *et al.*, 2005).

La surexpression du gène *MDR1* par la TSA dans les cellules H69WT est conforme avec les données bibliographiques suggérant que l'activation du gène *MDR1* par hyperacétylation des histones requiert l'hypométhylation de son promoteur (El-Osta *et al.*, 2002).

La 5-aza-2'-désoxycytidine (5azadC), un agent déméthylant de l'ADN, n'a aucun effet sur l'expression du gène *MDR1* dans les cellules résistantes H69VP, confirmant ainsi le statut hypométhylé de son promoteur et rappelant le résultat obtenu dans les cellules CEM-Bcl2 (Baker *et al.*, 2005). Par contre, une surexpression du gène *MDR1*, quoique très faible, est observée dans les cellules sensibles incubées en présence de 5azadC. Ce résultat suppose que, malgré une hypométhylation générale, le promoteur *MDR1* des cellules H69WT est activé par une déméthylation de l'ADN et serait ainsi légèrement hyperméthylé par rapport à celui des cellules résistantes. Cette hyperméthylation est d'ailleurs perçue au niveau de l'élément Inr analysé au cours de cette étude. Une autre hypothèse peut aussi être émise : la 5azadC déméthyle le promoteur d'un gène codant pour un facteur activateur du gène *MDR1*. La

surexpression de ce dernier augmenterait l'expression du gène *MDR1*. Dans les cellules H69WT, l'association de la TSA à la 5azadC n'amplifie pas le taux d'ARNm MDR1 au-delà de celui obtenu avec la TSA seule. Des résultats similaires ont été trouvés dans les cellules CEM-Bcl2 et SW620 hypométhylées (Baker *et al.*, 2005). Ainsi, ce faible taux de doublets CpG méthylés au niveau du promoteur MDR1 ne semble pas empêcher l'action de la TSA dans les cellules H69WT.

Si la surexpression du gène *MDR1* par les inhibiteurs des HDACs nécessite l'hypométhylation préalable de son promoteur, à notre connaissance, aucune étude concernant la relation entre la répression du gène *MDR1* par ces inhibiteurs et le statut de méthylation du promoteur MDR1 n'a été publiée.

L'étude du niveau d'acétylation des histones H3 et H4 au niveau du promoteur MDR1 dans les cellules H69VP a montré qu'après une phase d'hyperacétylation, les histones H3 sont désacétylées quand la TSA a agit pendant 24 h, contrairement aux histones H4 qui continuent à s'acétyler. Cette observation pourrait suggérer la présence concomitante d'une désacétylation des histones H3 et non H4 et d'une méthylation de l'ADN comme observé dans l'allèle maternel non exprimé du gène *U2af1-rs1* soumis à empreinte (Gregory *et al.*, 2001). Ainsi, les modifications de l'acétylation des histones observées après 24 h d'incubation en présence de TSA pourraient résulter d'une hyperméthylation parallèle du promoteur MDR1, qui entraînerait la fixation de la protéine répressive MeCP2 recrutant elle-même des histones désacétylases (El-Osta *et al.*, 2002). Toutefois, nos résultats montrent que l'inhibition du gène *MDR1* par la TSA n'est pas due à une hyperméthylation subséquente de son promoteur ni au niveau des boîtes GC-50 et GC-110, ni au niveau de l'élément Inr. Il est vrai que la méthylation de l'ADN par la TSA est difficilement envisageable ; néanmoins, la littérature rapporte plusieurs cas d'hyperméthylation de l'ADN dans des cellules normales ou cancéreuses, suite à un traitement par le butyrate de sodium (Boffa *et al.*, 1994 ; Cosgrove *et al.*, 1990 ; de Haan *et al.*, 1986 ; Parker *et al.*, 1986).

De plus, il a été suggéré que la méthylation de la boîte GC-110 entrave la fixation d'un facteur répresseur du gène *MDR1* dans les cellules résistantes K562/ADM et augmente ainsi son expression (Ando *et al.*, 2000 ; Efferth *et al.*, 2001). Toutefois, la boîte GC-110 est hypométhylée dans les cellules CEM-A7R (El-Osta *et al.*, 2002) et H69VP, malgré la surexpression du gène *MDR1*. Le facteur répresseur ne serait pas automatiquement lié à la boîte GC-110 si celle-ci est déméthylée ou sa fixation ne serait pas suffisante pour inhiber la

transcription du gène *MDR1*. La combinaison de la 5azadC et de la TSA potentialise l'effet de la TSA administrée pendant 24 h. Dans la mesure où le promoteur MDR1 est fortement hypométhylé dans les cellules H69VP, ce résultat suggère que cette association pourrait activer la transcription d'un répresseur du gène *MDR1* potentialisant l'effet de la TSA après 24 h de traitement.

***CONCLUSION ET
PERSPECTIVES***

L'étude de la texture chromatinienne par analyse d'images a été abordée dans le but d'analyser l'impact de l'acétylation des histones sur le phénotype nucléaire des cellules sensibles et résistantes d'une part, et de rechercher une corrélation entre les modifications texturales et l'expression du gène *MDR1* d'autre part.

Les résultats ont montré que les cellules résistantes H69VP présentent une distribution plus uniforme de la chromatine, par rapport aux cellules sensibles H69WT. Les variations texturales observées apparaissent proches de celles retrouvées dans d'autres lignées tumorales résistantes surexprimant la P-gp (Dufer *et al.*, 1995 ; Yatouji *et al.*, 2003). Outre la classification des cellules entre normales et cancéreuses (Millot *et al.*, 2000), l'analyse de la texture nucléaire par cytométrie en images permet donc de distinguer les populations cellulaires résistantes des populations sensibles.

L'acétylation et la méthylation globales des histones n'apparaissent pas à l'origine des différences texturales observées dans les cellules H69WT et H69VP. Il serait cependant important de rechercher si d'autres modifications épigénétiques sont impliquées dans le phénotype nucléaire des cellules sensibles et résistantes.

De plus, la cytométrie en images a permis de détecter le remodelage de la chromatine induit par l'hyperacétylation des histones après un traitement par la trichostatine A (TSA). Les modifications texturales observées dans les deux lignées H69 n'apparaissent pas directement corrélées aux modulations d'expression du gène *MDR1* mais semblent refléter les modifications d'acétylation des histones H3 localisées au niveau du promoteur de ce gène. En termes de perspectives, il serait intéressant d'explorer la reproductibilité de cette corrélation dans d'autres lignées cellulaires sensibles et résistantes.

D'autre part, certains types de résistance ont été associés à la surexpression des ADN méthyltransférases augmentant le taux de méthylation global de l'ADN (Qiu *et al.*, 2002 ; Qiu *et al.*, 2005 ; Wang *et al.*, 2001). Ainsi, l'impact de la méthylation de l'ADN sur la texture nucléaire pourrait être étudié à l'aide d'agents déméthylants de l'ADN tels que la 5azadC. Cette analyse permettrait de mieux comprendre le rôle de cette modification épigénétique dans l'établissement du profil nucléaire des cellules sensibles et résistantes.

Dans un deuxième temps, nous avons montré que l'inhibition des HDACs diminue l'expression du gène *MDR1* dans les cellules H69VP, alors qu'elle augmente cette expression dans les cellules H69WT. Cette régulation apparaît de nature transcriptionnelle et

indépendante de l'état basal de méthylation du promoteur MDR1, ce dernier étant hypométhylé dans les deux lignées. De même, la modulation de l'expression du gène *MDR1* par la TSA ne correspond pas à des modifications de ce profil de méthylation. Par contre, des différences du niveau d'acétylation des histones ont été mises en évidence au niveau de la région promotrice MDR1 à la suite de l'inhibition des HDACs. En effet, la TSA induit une hyperacétylation des histones H3 et H4 au niveau du promoteur MDR1. Cette hyperacétylation est progressive dans les cellules H69WT et transitoire pour les histones H3 dans les cellules H69VP. Ces données nous permettent de proposer le modèle hypothétique suivant pour expliquer la régulation négative du gène *MDR1* par la TSA : dans un premier temps, la TSA favoriserait, dans les cellules résistantes, la répression passive du gène *MDR1*, probablement par la fixation de protéine(s) sur des sites de liaison de facteurs activateurs au niveau du promoteur MDR1. Dans un deuxième temps, une autre répression active serait mise en place à travers le recrutement d'histones désacétylases insensibles à l'action de la TSA. Ce mécanisme de répression serait indépendant de la méthylation du promoteur MDR1.

Malgré le lien étroit qui lie la méthylation de l'ADN à l'inhibition de la transcription, plusieurs études suggèrent que des mécanismes indépendants de la méthylation des îlots CpG des promoteurs peuvent exister et opérer pour réprimer la transcription des gènes (Baker *et al.*, 2004). Dans ce cadre, des avancées récentes dans le domaine de l'épigénétique suggèrent que la protéine MBD1, une protéine associée à la répression méthylation-dépendante, peut aussi se fixer sur l'ADN non méthylé et induire l'inhibition transcriptionnelle (Jorgensen *et al.*, 2004). Comme il a été proposé par Baker *et al.*, le gène *MDR1* pourrait représenter une des cibles de l'extinction transcriptionnelle médiée par MBD1 indépendamment de l'état de méthylation du promoteur (Baker *et al.*, 2004). Cette hypothèse est intéressante et pourrait expliquer l'inhibition de la transcription du gène *MDR1* par la TSA dans les cellules H69VP. En effet, la protéine MBD1 semble inhiber la transcription, d'une part à travers le complexe répresseur qu'elle forme avec la protéine MCAF (*MBD1-containing chromatin-associated factor*) et ce, en interférant avec l'activité transcriptionnelle de Sp1 (Fujita *et al.*, 2003) et, d'autre part, via une voie active liée à la désacétylation des histones (Ng *et al.*, 2000). Ainsi, l'implication de la protéine MBD1 pourrait correspondre au mécanisme de répression transcriptionnelle du gène *MDR1* par la TSA proposé ci-dessus concernant les cellules H69VP. Il serait donc intéressant d'évaluer par immunoprécipitation de la chromatine l'effet de la TSA sur la fixation de MBD1 au niveau du promoteur MDR1.

Afin de vérifier que la TSA agit au niveau transcriptionnel, il serait nécessaire de mesurer l'activité du promoteur MDR1 dans les cellules H69WT et H69VP en présence de TSA. Cette étude peut être réalisée à l'aide d'une construction plasmidique dans laquelle le gène de la luciférase est placé sous le contrôle du promoteur MDR1 avec lequel il est couplé. Dans un second temps, il serait intéressant de définir la région du promoteur MDR1 requise pour l'activation ou l'inhibition de la transcription par la TSA en utilisant des séries de constructions de promoteur MDR1 délété/gène reporteur luciférase.

Enfin, il serait important de voir si la diminution de l'expression de l'ARNm MDR1 par la TSA se traduit au niveau protéique par une diminution de l'expression de la P-gp membranaire. Cette étude pourra être réalisée par cytométrie en flux.

Ce travail révèle l'effet répresseur que peuvent avoir les inhibiteurs des HDACs sur le gène *MDR1*, un effet très peu évoqué dans la littérature qui abonde pourtant de références évoquant l'effet activateur de l'inhibition des HDACs sur ce gène de résistance. Nos résultats suggèrent donc l'intérêt que pourraient présenter les inhibiteurs des HDACs dans le traitement des cancers multi-résistants.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

ABOLHODA A, WILSON AE, ROSS H, DANENBERG PV, BURT M, SCOTTO KW.
Rapid activation of MDR1 gene expression in human metastatic sarcoma after in vivo exposure to doxorubicin.
Clin Cancer Res 1999; 5 (11): 3352-3356.

ADCOCK IM, FORD P, BARNES PJ, ITO K.
Epigenetics and airways disease.
Respir Res 2006; 7 (1): 21.

AGRICOLA E, VERDONE L, XELLA B, DI MAURO E, CASERTA M.
Common chromatin architecture, common chromatin remodeling, and common transcription kinetics of Adr1-dependent genes in *Saccharomyces cerevisiae*.
Biochemistry 2004; 43 (27): 8878-8884.

AJIRO K.
Histone H2B phosphorylation in mammalian apoptotic cells. An association with DNA fragmentation.
J Biol Chem 2000; 275 (1): 439-443.

ALBERTS B, BRAY D, JOHNSON A, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K *et al*.
Essential Cell Biology. An introduction to the molecular biology of cell.
New-York: Garland Publishing; 1998.

ALLERA C, LAZZARINI G, PATRONE E, ALBERTI I, BARBORO P, SANNA P *et al*.
The condensation of chromatin in apoptotic thymocytes shows a specific structural change.
J Biol Chem 1997; 272 (16): 10817-10822.

ALLFREY VG, FAULKNER R, MIRSKY AE.
Acetylation and Methylation of Histones and Their Possible Role in the Regulation of Rna Synthesis.
Proc Natl Acad Sci U S A 1964; 51 786-794.

ALLIKMETS R, SCHRIML LM, HUTCHINSON A, ROMANO-SPICA V, DEAN M.
A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance.
Cancer Res 1998; 58 (23): 5337-5339.

ALVELO-CERON D, NIU L, COLLART DG.
Growth regulation of human variant histone genes and acetylation of the encoded proteins.
Mol Biol Rep 2000; 27 (2): 61-71.

AMBUDKAR SV, KIMCHI-SARFATY C, SAUNA ZE, GOTTESMAN MM.
P-glycoprotein: from genomics to mechanism.
Oncogene 2003; 22 (47): 7468-7485.

AMEZIANE N, BOGARD M, LAMORIL J.
Principes de biologie moléculaire en biologie clinique.
Paris: Elsevier; 2006.

ANDO T, NISHIMURA M, OKA Y.

Decitabine (5-Aza-2'-deoxycytidine) decreased DNA methylation and expression of MDR-1 gene in K562/ADM cells.

Leukemia 2000; 14 (11): 1915-1920.

ANGELOV D, MOLLA A, PERCHE PY, HANS F, COTE J, KHOCHBIN S *et al.*

The histone variant macroH2A interferes with transcription factor binding and SWI/SNF nucleosome remodeling.

Mol Cell 2003; 11 (4): 1033-1041.

ARCHER SY, JOHNSON JJ, KIM HJ, HODIN RA.

p21 gene regulation during enterocyte differentiation.

J Surg Res 2001; 98 (1): 4-8.

AUER G, ASKENSTEN U, AHRENS O.

Cytophotometry.

Hum Pathol 1989; 20 (6): 518-527.

BAKER EK, EL-OSTA A.

The rise of DNA methylation and the importance of chromatin on multidrug resistance in cancer.

Exp Cell Res 2003; 290 (2): 177-194.

BAKER EK, EL-OSTA A.

MDR1, chemotherapy and chromatin remodeling.

Cancer Biol Ther 2004; 3 (9): 819-824.

BAKER EK, JOHNSTONE RW, ZALCBERG JR, EL-OSTA A.

Epigenetic changes to the MDR1 locus in response to chemotherapeutic drugs.

Oncogene 2005; 24 (54): 8061-8075.

BALDWIN EL, OSHEROFF N.

Etoposide, topoisomerase II and cancer.

Curr Med Chem Anticancer Agents 2005; 5 (4): 363-372.

BANNISTER AJ, KOUZARIDES T.

Reversing histone methylation.

Nature 2005; 436 (7054): 1103-1106.

BARGOU RC, JURCHOTT K, WAGENER C, BERGMANN S, METZNER S, BOMMERT K *et al.*

Nuclear localization and increased levels of transcription factor YB-1 in primary human breast cancers are associated with intrinsic MDR1 gene expression.

Nat Med 1997; 3 (4): 447-450.

BARTELS PH, DA SILVA VD, MONTIRONI R, HAMILTON PW, THOMPSON D, VAUGHT L *et al.*

Chromatin texture signatures in nuclei from prostate lesions.

Anal Quant Cytol Histol 1998; 20 (5): 407-416.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BARTOVA E, PACHERNIK J, HARNICAROVA A, KOVARIK A, KOVARIKOVA M, HOFMANOVA J *et al.*
Nuclear levels and patterns of histone H3 modification and HP1 proteins after inhibition of histone deacetylases.
J Cell Sci 2005; 118 (Pt 21): 5035-5046.
- BARTSEVICH VV, JULIANO RL.
Regulation of the MDR1 gene by transcriptional repressors selected using peptide combinatorial libraries.
Mol Pharmacol 2000; 58 (1): 1-10.
- BATES SE, CURRIER SJ, ALVAREZ M, FOJO AT.
Modulation of P-glycoprotein phosphorylation and drug transport by sodium butyrate.
Biochemistry 1992; 31 (28): 6366-6372.
- BENSON LJ, GU Y, YAKOVLEVA T, TONG K, BARROWS C, STRACK CL *et al.*
Modifications of H3 and H4 during chromatin replication, nucleosome assembly, and histone exchange.
J Biol Chem 2006; 281 (14): 9287-9296.
- BENTIREN-ALJ M, BARBU V, FILLET M, CHARIOT A, RELIC B, JACOBS N *et al.*
NF-kappaB transcription factor induces drug resistance through MDR1 expression in cancer cells.
Oncogene 2003; 22 (1): 90-97.
- BHUSHAN A, ABRAMSON R, CHIU JF, TRITTON TR.
Expression of c-fos in human and murine multidrug-resistant cells.
Mol Pharmacol 1992; 42 (1): 69-74.
- BLADE S, STOBBE CC, BOYD JT, CHAPMAN JD.
Chemical agents that promote chromatin compaction radiosensitize tumour cells.
Int J Radiat Biol 2001; 77 (10): 1033-1042.
- BIEDLER JL.
Drug resistance: genotype versus phenotype--thirty-second G. H. A. Clowes Memorial Award Lecture.
Cancer Res 1994; 54 (3): 666-678.
- BIRD A.
DNA methylation patterns and epigenetic memory.
Genes Dev 2002; 16 (1): 6-21.
- BLAGOSKLONNY MV, ROBEY R, SACKETT DL, DU L, TRAGANOS F, DARZYNKIEWICZ Z *et al.*
Histone deacetylase inhibitors all induce p21 but differentially cause tubulin acetylation, mitotic arrest, and cytotoxicity.
Mol Cancer Ther 2002; 1 (11): 937-941.

BOFFA LC, MARIANI MR, PARKER MI.

Selective hypermethylation of transcribed nucleosomal DNA by sodium butyrate.
Exp Cell Res 1994; 211 (2): 420-423.

BONNER WM, WEST MH, STEDMAN JD.

Two-dimensional gel analysis of histones in acid extracts of nuclei, cells, and tissues.
Eur J Biochem 1980; 109 (1): 17-23.

BOULIKAS T.

Electrophoretic separation of histones and high-mobility-group proteins on acid-urea-Triton gels.
Anal Biochem 1985; 149 (2): 379-386.

BOYLE GM, MARTYN AC, PARSONS PG.

Histone deacetylase inhibitors and malignant melanoma.
Pigment Cell Res 2005; 18 (3): 160-166.

BOYSE EA, OLD LJ, CHOUROULINKOV I.

Cytotoxic Test for Demonstration of Mouse Antibody.
Methods Med Res 1964; 10 : 39-47.

BRINKMANN H, DAHLER AL, POPA C, SEREWKO MM, PARSONS PG, GABRIELLI BG *et al.*

Histone hyperacetylation induced by histone deacetylase inhibitors is not sufficient to cause growth inhibition in human dermal fibroblasts.
J Biol Chem 2001; 276 (25): 22491-22499.

BROCK I, HIPFNER DR, NIELSEN BS, JENSEN PB, DEELEY RG, COLE SP *et al.*

Sequential coexpression of the multidrug resistance genes MRP and *mdr1* and their products in VP-16 (etoposide)-selected H69 small cell lung cancer cells.
Cancer Res 1995; 55 (3): 459-462.

BUSTIN M.

Regulation of DNA-dependent activities by the functional motifs of the high-mobility-group chromosomal proteins.
Mol Cell Biol 1999; 19 (8): 5237-5246.

CAMERON EE, BACHMAN KE, MYOHANEN S, HERMAN JG, BAYLIN SB.

Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer.
Nat Genet 1999; 21 (1): 103-107.

CAMPHAUSEN K, BURGAN W, CERRA M, OSWALD KA, TREPEL JB, LEE MJ *et al.*

Enhanced radiation-induced cell killing and prolongation of gammaH2AX foci expression by the histone deacetylase inhibitor MS-275.
Cancer Res 2004; 64 (1): 316-321.

CARNEY DN, GAZDAR AF, BEPLER G, GUCCION JG, MARANGOS PJ, MOODY TW
et al.

Establishment and identification of small cell lung cancer cell lines having classic and variant features.

Cancer Res 1985; 45 (6): 2913-2923.

CARROZZA MJ, UTLEY RT, WORKMAN JL, COTE J.

The diverse functions of histone acetyltransferase complexes.

Trends Genet 2003; 19 (6): 321-329.

CASTRO-GALACHE MD, FERRAGUT JA, BARBERA VM, MARTIN-OROZCO E, GONZALEZ-ROS JM, GARCIA-MORALES P *et al.*

Susceptibility of multidrug resistance tumor cells to apoptosis induction by histone deacetylase inhibitors.

Int J Cancer 2003; 104 (5): 579-586.

CESARI M, HELIOT L, MEPLAN C, PABION M, KHOCHBIN S.

S-phase-dependent action of cycloheximide in relieving chromatin-mediated general transcriptional repression.

Biochem J 1998; 336 (Pt 3): 619-624.

CHEN GK, SALE S, TAN T, ERMOIAN RP, SIKIC BI.

CCAAT/enhancer-binding protein beta (nuclear factor for interleukin 6) transactivates the human MDR1 gene by interaction with an inverted CCAAT box in human cancer cells.

Mol Pharmacol 2004; 65 (4): 906-916.

CHILDS S, YEH RL, HUI D, LING V.

Taxol resistance mediated by transfection of the liver-specific sister gene of P-glycoprotein.

Cancer Res 1998; 58 (18): 4160-4167.

CHIN KV, UEDA K, PASTAN I, GOTTESMAN MM.

Modulation of activity of the promoter of the human MDR1 gene by Ras and p53.

Science 1992; 255 (5043): 459-462.

CHOMCZYNSKI P, SACCHI N.

Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.

Anal Biochem 1987; 162 (1): 156-159.

CHRISTMAN JK.

5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy.

Oncogene 2002; 21 (35): 5483-5495.

CLAYTON AL, ROSE S, BARRATT MJ, MAHADEVAN LC.

Phosphoacetylation of histone H3 on c-fos- and c-jun-associated nucleosomes upon gene activation.

Embo J 2000; 19 (14): 3714-3726.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

CLAYTON AL, MAHADEVAN LC.

MAP kinase-mediated phosphoacetylation of histone H3 and inducible gene regulation.
FEBS Lett 2003; 546 (1): 51-58.

COLE SP, BHARDWAJ G, GERLACH JH, MACKIE JE, GRANT CE, ALMQUIST KC *et al.*

Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line.
Science 1992; 258 (5088): 1650-1654.

COMBATES NJ, RZEPKA RW, CHEN YN, COHEN D.

NF-IL6, a member of the C/EBP family of transcription factors, binds and trans-activates the human MDR1 gene promoter.

J Biol Chem 1994; 269 (47): 29715-29719.

COMERFORD KM, WALLACE TJ, KARHAUSEN J, LOUIS NA, MONTALTO MC, COLGAN SP.

Hypoxia-inducible factor-1-dependent regulation of the multidrug resistance (MDR1) gene.
Cancer Res 2002; 62 (12): 3387-3394.

CORNWELL MM, SMITH DE.

SP1 activates the MDR1 promoter through one of two distinct G-rich regions that modulate promoter activity.

J Biol Chem 1993; 268 (26): 19505-19511.

COSGROVE DE, COX GS.

Effects of sodium butyrate and 5-azacytidine on DNA methylation in human tumor cell lines: variable response to drug treatment and withdrawal.

Biochim Biophys Acta 1990; 1087 (1): 80-86.

CUTHBERT GL, DAUJAT S, SNOWDEN AW, ERDJUMENT-BROMAGE H, HAGIWARA T, YAMADA M *et al.*

Histone deimination antagonizes arginine methylation.

Cell 2004; 118 (5): 545-553.

D'ARRIGO C, BARBORO P, MORMINO M, CORADEGHINI R, PARODI S, PATRONE E *et al.*

DNA supercoiling in apoptotic chromatin.

Biochem Biophys Res Commun 2003; 309 (3): 540-546.

DALTON WS, SCHEPER RJ.

Lung resistance-related protein: determining its role in multidrug resistance.

J Natl Cancer Inst 1999; 91 (19): 1604-1605.

DASCHNER PJ, CIOLINO HP, PLOUZEK CA, YEH GC.

Increased AP-1 activity in drug resistant human breast cancer MCF-7 cells.

Breast Cancer Res Treat 1999; 53 (3): 229-240.

DAVID GL, YEGNASUBRAMANIAN S, KUMAR A, MARCHI VL, DE MARZO AM, LIN X *et al.*

MDR1 promoter hypermethylation in MCF-7 human breast cancer cells: changes in chromatin structure induced by treatment with 5-Aza-cytidine.
Cancer Biol Ther 2004; 3 (6): 540-548.

DE HAAN JB, GEVERS W, PARKER MI.

Effects of sodium butyrate on the synthesis and methylation of DNA in normal cells and their transformed counterparts.
Cancer Res 1986; 46 (2): 713-716.

DE PREZ C, DE LAUNOIT Y, KISS R, PETEIN M, PASTEELS JL, VERHEST A *et al.*

Computerized morphonuclear cell image analyses of malignant disease in bladder tissues.
J Urol 1990; 143 (4): 694-9.

DEAN M, RZHETSKY A, ALLIKMETS R.

The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily.
Genome Res 2001; 11 (7): 1156-1166.

DEBES JD, SEBO TJ, HEEMERS HV, KIPP BR, HAUGEN DE AL, LOHSE CM *et al.*

p300 modulates nuclear morphology in prostate cancer.
Cancer Res 2005; 65 (3): 708-712.

DECKERT J, STRUHL K.

Histone acetylation at promoters is differentially affected by specific activators and repressors.
Mol Cell Biol 2001; 21 (8): 2726-2735.

DEELEY RG, COLE SP.

Substrate recognition and transport by multidrug resistance protein 1 (ABCC1).
FEBS Lett 2006; 580 (4): 1103-1111.

DERKS S, LENTJES MH, HELLEBREKERS DM, DE BRUINE AP, HERMAN JG, VAN ENGELAND M.

Methylation-specific PCR unraveled.
Cell Oncol 2004; 26 (5-6): 291-299.

DESIDERATO L, DAVEY MW, PIPER AA.

Demethylation of the human MDR1 5' region accompanies activation of P-glycoprotein expression in a HL60 multidrug resistant subline.
Somat Cell Mol Genet 1997; 23 (6): 391-400.

DI MAURO E, VERDONE L, CHIAPPINI B, CASERTA M.

In vivo changes of nucleosome positioning in the pretranscription state.
J Biol Chem 2002; 277 (9): 7002-7009.

DIGEL W, LUBBERT M.

DNA methylation disturbances as novel therapeutic target in lung cancer: preclinical and clinical results.
Crit Rev Oncol Hematol 2005; 55 (1): 1-11.

DOKMANOVIC M, MARKS PA.
Prospects: histone deacetylase inhibitors.
J Cell Biochem 2005; 96 (2): 293-304.

DONADELLI M, COSTANZO C, FAGGIOLI L, SCUPOLI MT, MOORE PS, BASSI C *et al.*
Trichostatin A, an inhibitor of histone deacetylases, strongly suppresses growth of pancreatic adenocarcinoma cells.
Mol Carcinog 2003; 38 (2): 59-69.

DOYLE LA, YANG W, ABRUZZO LV, KROGMANN T, GAO Y, RISHI AK *et al.*
A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells.
Proc Natl Acad Sci U S A 1998; 95 (26): 15665-15670.

DREYER T, KNOBLAUCH I, DOUDKINE A, MACAULAY CE, GARNER D, PALCIC B *et al.*
Nuclear texture features for classifying benign vs. dysplastic or malignant squamous epithelium of the larynx.
Anal Quant Cytol Histol 2001; 23 (3): 193-200.

DUAN H, HECKMAN CA, BOXER LM.
Histone deacetylase inhibitors down-regulate bcl-2 expression and induce apoptosis in t(14;18) lymphomas.
Mol Cell Biol 2005; 25 (5): 1608-1619.

DUFER J, MILLOT-BROGLIO C, OUM'HAMED Z, LIAUTAUD-ROGER F, JOLY P, DESPLACES A *et al.*
Nuclear DNA content and chromatin texture in multidrug-resistant human leukemic cell lines.
Int J Cancer 1995; 60 (1): 108-114.

EBERHARTER A, BECKER PB.
Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin. Second in review series on chromatin dynamics.
EMBO Rep 2002; 3 (3): 224-229.

EFFERTH T, FUTSCHER BW, OSIEKA R.
5-Azacytidine modulates the response of sensitive and multidrug-resistant K562 leukemic cells to cytostatic drugs.
Blood Cells Mol Dis 2001; 27 (3): 637-648.

EGGER G, LIANG G, APARICIO A, JONES PA.
Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy.
Nature 2004; 429 (6990): 457-463.

EKWALL K.
Genome-wide analysis of HDAC function.
Trends Genet 2005; 21 (11): 608-615.

- EL-OSTA A, KANTHARIDIS P, ZALCBERG JR, WOLFFE AP.
Precipitous release of methyl-CpG binding protein 2 and histone deacetylase 1 from the methylated human multidrug resistance gene (MDR1) on activation.
Mol Cell Biol 2002; 22 (6): 1844-1857.
- FERGUSON M, HENRY PA, CURRIE RA.
Histone deacetylase inhibition is associated with transcriptional repression of the Hmga2 gene.
Nucleic Acids Res 2003; 31 (12): 3123-3133.
- FISCHLE W, WANG Y, ALLIS CD.
Histone and chromatin cross-talk.
Curr Opin Cell Biol 2003; 15 (2): 172-183.
- FITZGERALD DJ, WILLINGHAM MC, CARDARELLI CO, HAMADA H, TSURUO T, GOTTESMAN MM *et al.*
A monoclonal antibody-Pseudomonas toxin conjugate that specifically kills multidrug-resistant cells.
Proc Natl Acad Sci U S A 1987; 84 (12): 4288-4292.
- FOJO T, BATES S.
Strategies for reversing drug resistance.
Oncogene 2003; 22 (47): 7512-7523.
- FRIEDMAN D, HU Z, KOLB EA, GORFAJN B, SCOTTO KW.
Ecteinascidin-743 inhibits activated but not constitutive transcription.
Cancer Res 2002; 62 (12): 3377-3381.
- FROMMEL TO, COON JS, TSURUO T, RONINSON IB.
Variable effects of sodium butyrate on the expression and function of the MDR1 (P-glycoprotein) gene in colon carcinoma cell lines.
Int J Cancer 1993; 55 (2): 297-302.
- FRY CJ, PETERSON CL.
Chromatin remodeling enzymes: who's on first?
Curr Biol 2001; 11 (5): R185-197.
- FUJITA N, WATANABE S, ICHIMURA T, OHKUMA Y, CHIBA T, SAYA H *et al.*
MCAF mediates MBD1-dependent transcriptional repression.
Mol Cell Biol 2003; 23 (8): 2834-2843.
- FUJITA T, WASHIO K, TAKABATAKE D, TAKAHASHI H, YOSHITOMI S, TSUKUDA K *et al.*
Proteasome inhibitors can alter the signaling pathways and attenuate the P-glycoprotein-mediated multidrug resistance.
Int J Cancer 2005; 117 (4): 670-682.
- FUKS F.
[DNA methyltransferases: from chromatin remodeling to cancer].
Med Sci (Paris) 2003; 19 (4): 477-80.

FUKS F.

DNA methylation and histone modifications: teaming up to silence genes.
Curr Opin Genet Dev 2005; 15 (5): 490-495.

FUKS F.

The view from the biochemist : Comment on "Chromatin code, local non-equilibrium dynamics, and the emergence of transcription regulatory programs" by Arndt Benecke.
Eur Phys J E Soft Matter 2006; 19 (3): 367-369.

GARCIA-RAMIREZ M, ROCCHINI C, AUSIO J.

Modulation of chromatin folding by histone acetylation.
J Biol Chem 1995; 270 (30): 17923-17928.

GEICK A, EICHELBAUM M, BURK O.

Nuclear receptor response elements mediate induction of intestinal MDR1 by rifampin.
J Biol Chem 2001; 276 (18): 14581-14587.

GILBERT N, GILCHRIST S, BICKMORE WA.

Chromatin organization in the mammalian nucleus.
Int Rev Cytol 2005; 242: 283-336.

GILCHRIST S, GILBERT N, PERRY P, BICKMORE WA.

Nuclear organization of centromeric domains is not perturbed by inhibition of histone deacetylases.
Chromosome Res 2004; 12 (5): 505-516.

GILL G.

SUMO and ubiquitin in the nucleus: different functions, similar mechanisms?
Genes Dev 2004; 18 (17): 2046-2059.

GIROUD F.

Approches cytométriques de la prolifération et de la différenciation : notion de faciès chromatinien.
Thèse 3 cycle: Pharm.: Grenoble: 1987; 106.

GOLDSMITH ME, GUDAS JM, SCHNEIDER E, COWAN KH.

Wild type p53 stimulates expression from the human multidrug resistance promoter in a p53-negative cell line.
J Biol Chem 1995; 270 (4): 1894-1898.

GOLDSTEIN LJ, GALSKI H, FOJO A, WILLINGHAM M, LAI SL, GAZDAR A *et al.*

Expression of a multidrug resistance gene in human cancers.
J Natl Cancer Inst 1989; 81 (2): 116-124.

GOTTESMAN MM.

Mechanisms of cancer drug resistance.
Annu Rev Med 2002; 53: 615-627.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

GOTTLICHER M, MINUCCI S, ZHU P, KRAMER OH, SCHIMPF A, GIAVARA S *et al.*
Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells.

Embo J 2001; 20 (24): 6969-6978.

GREGORY RI, RANDALL TE, JOHNSON CA, KHOSLA S, HATADA I, O'NEILL LP *et al.*

DNA methylation is linked to deacetylation of histone H3, but not H4, on the imprinted genes Snrpn and U2af1-rs1.

Mol Cell Biol 2001; 21 (16): 5426-5436.

GRUNSTEIN M.

Histone acetylation in chromatin structure and transcription.

Nature 1997; 389 (6649): 349-352.

GUIDEZ F, HOWELL L, ISALAN M, CEBRAT M, ALANI RM, IVINS S *et al.*

Histone acetyltransferase activity of p300 is required for transcriptional repression by the promyelocytic leukemia zinc finger protein.

Mol Cell Biol 2005; 25 (13): 5552-5566.

HAKE SB, ALLIS CD.

Histone H3 variants and their potential role in indexing mammalian genomes: the "H3 barcode hypothesis".

Proc Natl Acad Sci U S A 2006; 103 (17): 6428-6435.

HAKE SB, GARCIA BA, DUNCAN EM, KAUER M, DELLAIRE G, SHABANOWITZ J *et al.*

Expression patterns and post-translational modifications associated with mammalian histone H3 variants.

J Biol Chem 2006; 281 (1): 559-568.

HASSAN AH, PROCHASSON P, NEELY KE, GALASINSKI SC, CHANDY M, CARROZZA MJ *et al.*

Function and selectivity of bromodomains in anchoring chromatin-modifying complexes to promoter nucleosomes.

Cell 2002; 111 (3): 369-379.

HEIKE Y, HAMADA H, INAMURA N, SONE S, OGURA T, TSURUO T.

Monoclonal anti-P-glycoprotein antibody-dependent killing of multidrug-resistant tumor cells by human mononuclear cells.

Jpn J Cancer Res 1990; 81 (11): 1155-1161.

HENDERSON C, BRANCOLINI C.

Apoptotic pathways activated by histone deacetylase inhibitors: implications for the drug-resistant phenotype.

Drug Resist Updat 2003; 6 (5): 247-256.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

HENDZEL MJ, WEI Y, MANCINI MA, VAN HOOSER A, RANALLI T, BRINKLEY BR *et al.*

Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation.

Chromosoma 1997; 106 (6): 348-360.

HENDZEL MJ, NISHIOKA WK, RAYMOND Y, ALLIS CD, BAZETT-JONES DP, TH'NG JP.

Chromatin condensation is not associated with apoptosis.

J Biol Chem 1998; 273 (38): 24470-24478.

HENIKOFF S, FURUYAMA T, AHMAD K.

Histone variants, nucleosome assembly and epigenetic inheritance.

Trends Genet 2004; 20 (7): 320-326.

HENSEL CH, XIANG RH, SAKAGUCHI AY, NAYLOR SL.

Use of the single strand conformation polymorphism technique and PCR to detect p53 gene mutations in small cell lung cancer.

Oncogene 1991; 6 (6): 1067-1071.

HERMAN JG, BAYLIN SB.

Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation.

N Engl J Med 2003; 349 (21): 2042-2054.

HEROLD C, GANSLMAYER M, OCKER M, HERMANN M, GEERTS A, HAHN EG *et al.*

The histone-deacetylase inhibitor Trichostatin A blocks proliferation and triggers apoptotic programs in hepatoma cells.

J Hepatol 2002; 36 (2): 233-240.

HERRERA JE, BERGEL M, YANG XJ, NAKATANI Y, BUSTIN M.

The histone acetyltransferase activity of human GCN5 and PCAF is stabilized by coenzymes.

J Biol Chem 1997; 272 (43): 27253-27258.

HINNEBUSCH BF, HENDERSON JW, SIDDIQUE A, MALO MS, ZHANG W, ABEDRAPO MA *et al.*

Transcriptional activation of the enterocyte differentiation marker intestinal alkaline phosphatase is associated with changes in the acetylation state of histone H3 at a specific site within its promoter region in vitro.

J Gastrointest Surg 2003; 7 (2): 237-244; discussion 244-245.

HIROTA T, LIPP JJ, TOH BH, PETERS JM.

Histone H3 serine 10 phosphorylation by Aurora B causes HP1 dissociation from heterochromatin.

Nature 2005; 438 (7071): 1176-1180.

HOSHIKAWA Y, KWON HJ, YOSHIDA M, HORINOUCHE S, BEPPU T.

Trichostatin A induces morphological changes and gelsolin expression by inhibiting histone deacetylase in human carcinoma cell lines.

Exp Cell Res 1994; 214 (1): 189-197.

HU J, COLBURN NH.

Histone deacetylase inhibition down-regulates cyclin D1 transcription by inhibiting nuclear factor-kappaB/p65 DNA binding.

Mol Cancer Res 2005; 3 (2): 100-109.

HU JF, PHAM J, DEY I, LI T, VU TH, HOFFMAN AR.

Allele-specific histone acetylation accompanies genomic imprinting of the insulin-like growth factor II receptor gene.

Endocrinology 2000; 141 (12): 4428-4435.

HU XF, SLATER A, RISCHIN D, KANTHARIDIS P, PARKIN JD, ZALCBERG J.

Induction of MDR1 gene expression by anthracycline analogues in a human drug resistant leukaemia cell line.

Br J Cancer 1999; 79 (5-6): 831-837.

HU Z, JIN S, SCOTTO KW.

Transcriptional activation of the MDR1 gene by UV irradiation. Role of NF-Y and Sp1.

J Biol Chem 2000; 275 (4): 2979-2985.

INCE TA, SCOTTO KW.

Stable transfection of the P-glycoprotein promoter reproduces the endogenous overexpression phenotype: the role of MED-1.

Cancer Res 1996; 56 (9): 2021-2024.

ISSA JP.

Aging, DNA methylation and cancer.

Crit Rev Oncol Hematol 1999; 32 (1): 31-43.

JACKSON JP, LINDROTH AM, CAO X, JACOBSEN SE.

Control of CpNpG DNA methylation by the KRYPTONITE histone H3 methyltransferase.

Nature 2002; 416 (6880): 556-560.

JAENISCH R, BIRD A.

Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals.

Nat Genet 2003; 33 Suppl 245-254.

JASON LJ, MOORE SC, LEWIS JD, LINDSEY G, AUSIO J.

Histone ubiquitination: a tagging tail unfolds?

Bioessays 2002; 24 (2): 166-174.

JIN J, CAI Y, LI B, CONAWAY RC, WORKMAN JL, CONAWAY JW *et al.*

In and out: histone variant exchange in chromatin.

Trends Biochem Sci 2005; 30 (12): 680-687.

JIN S, SCOTTO KW.

Transcriptional regulation of the MDR1 gene by histone acetyltransferase and deacetylase is mediated by NF-Y.

Mol Cell Biol 1998; 18 (7): 4377-4384.

JIN S, GORFAJN B, FAIRCLOTH G, SCOTTO KW.

Ecteinascidin 743, a transcription-targeted chemotherapeutic that inhibits MDR1 activation.
Proc Natl Acad Sci U S A 2000; 97 (12): 6775-9.

JOHNSON L, MOLLAH S, GARCIA BA, MURATORE TL, SHABANOWITZ J, HUNT DF *et al.*

Mass spectrometry analysis of Arabidopsis histone H3 reveals distinct combinations of post-translational modifications.
Nucleic Acids Res 2004; 32 (22): 6511-6518.

JOHNSON RA, INCE TA, SCOTTO KW.

Transcriptional repression by p53 through direct binding to a novel DNA element.
J Biol Chem 2001; 276 (29): 27716-27720.

JOHNSTONE RW.

Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer.
Nat Rev Drug Discov 2002; 1 (4): 287-299.

JORGENSEN HF, BEN-PORATH I, BIRD AP.

Mbd1 is recruited to both methylated and nonmethylated CpGs via distinct DNA binding domains.
Mol Cell Biol 2004; 24 (8): 3387-3395.

JOYCE D, ALBANESE C, STEER J, FU M, BOUZAHZAH B, PESTELL RG.

NF-kappaB and cell-cycle regulation: the cyclin connection.
Cytokine Growth Factor Rev 2001; 12 (1): 73-90.

JULIANO RL, LING V.

A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants.
Biochim Biophys Acta 1976; 455 (1): 152-162.

JUTTERMANN R, LI E, JAENISCH R.

Toxicity of 5-aza-2'-deoxycytidine to mammalian cells is mediated primarily by covalent trapping of DNA methyltransferase rather than DNA demethylation.
Proc Natl Acad Sci U S A 1994; 91 (25): 11797-11801.

KAMAKAKA RT, BIGGINS S.

Histone variants: deviants?
Genes Dev 2005; 19 (3): 295-310.

KANG CD, AHN BK, JEONG CS, KIM KW, LEE HJ, YOO SD *et al.*

Downregulation of JNK/SAPK activity is associated with the cross-resistance to P-glycoprotein-unrelated drugs in multidrug-resistant FM3A/M cells overexpressing P-glycoprotein.
Exp Cell Res 2000; 256 (1): 300-307.

KANTHARIDIS P, EL-OSTA A, DESILVA M, WALL DM, HU XF, SLATER A *et al.*

Altered methylation of the human MDR1 promoter is associated with acquired multidrug resistance.
Clin Cancer Res 1997; 3 (11): 2025-2032.

KANTHARIDIS P, EL-OSTA S, SILVA M, LEE G, HU XF, ZALCBERG J.
Regulation of MDR1 gene expression: emerging concepts.
Drug Resist Updat 2000; 3 (2): 99-108.

KANZAKI A, TAKEBAYASHI Y, REN XQ, MIYASHITA H, MORI S, AKIYAMA S *et al.*
Overcoming multidrug drug resistance in P-glycoprotein/MDR1-overexpressing cell lines by ecteinascidin 743.
Mol Cancer Ther 2002; 1 (14): 1327-1334.

KAO CF, OSLEY MA.
In vivo assays to study histone ubiquitylation.
Methods 2003; 31 (1): 59-66.

KARASAWA Y, OKISAKA S.
Inhibition of histone deacetylation by butyrate induces morphological changes in Y79 retinoblastoma cells.
Jpn J Ophthalmol 2004; 48 (6): 542-551.

KASHII T, MIZUSHIMA Y, MONNO S, NAKAGAWA K, KOBAYASHI M.
Gene analysis of K-, H-ras, p53, and retinoblastoma susceptibility genes in human lung cancer cell lines by the polymerase chain reaction/single-strand conformation polymorphism method.
J Cancer Res Clin Oncol 1994; 120 (3): 143-148.

KAWABATA S, OKA M, SHIOZAWA K, TSUKAMOTO K, NAKATOMI K, SODA H *et al.*
Breast cancer resistance protein directly confers SN-38 resistance of lung cancer cells.
Biochem Biophys Res Commun 2001; 280 (5): 1216-1223.

KELLER H, KNEISSEL M.
SOST is a target gene for PTH in bone.
Bone 2005; 37 (2): 148-158.

KHORASANIZADEH S.
The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation.
Cell 2004; 116 (2): 259-272.

KINGSTON RE, NARLIKAR GJ.
ATP-dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity.
Genes Dev 1999; 13 (18): 2339-2352.

KRISHNA R, MAYER LD.
Multidrug resistance (MDR) in cancer. Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs.
Eur J Pharm Sci 2000; 11 (4): 265-283.

KROEMER G, MARTIN SJ.
Caspase-independent cell death.
Nat Med 2005; 11 (7): 725-730.

- KUO MT, LIU Z, WEI Y, LIN-LEE YC, TATEBE S, MILLS GB *et al.*
Induction of human MDR1 gene expression by 2-acetylaminofluorene is mediated by effectors of the phosphoinositide 3-kinase pathway that activate NF-kappaB signaling.
Oncogene 2002; 21 (13): 1945-1954.
- KUSABA H, NAKAYAMA M, HARADA T, TORIGOE K, GREEN ED, SCHERER SW *et al.*
Maintenance of hypomethylation status and preferential expression of exogenous human MDR1/PGY1 gene in mouse L cells by YAC mediated transfer.
Somat Cell Mol Genet 1997; 23 (4): 259-274.
- KUSABA H, NAKAYAMA M, HARADA T, NOMOTO M, KOHNO K, KUWANO M *et al.*
Association of 5' CpG demethylation and altered chromatin structure in the promoter region with transcriptional activation of the multidrug resistance 1 gene in human cancer cells.
Eur J Biochem 1999; 262 (3): 924-932.
- KUWANO M, ODA Y, IZUMI H, YANG SJ, UCHIUMI T, IWAMOTO Y *et al.*
The role of nuclear Y-box binding protein 1 as a global marker in drug resistance.
Mol Cancer Ther 2004; 3 (11): 1485-1492.
- KUZMICHEV A, JENUWEIN T, TEMPST P, REINBERG D.
Different EZH2-containing complexes target methylation of histone H1 or nucleosomal histone H3.
Mol Cell 2004; 14 (2): 183-193.
- LABIALLE S, GAYET L, MARTHINET E, RIGAL D, BAGGETTO LG.
Transcriptional regulators of the human multidrug resistance 1 gene: recent views.
Biochem Pharmacol 2002; 64 (5-6): 943-948.
- LABIALLE S, DAYAN G, GAYET L, RIGAL D, GAMBRELLE J, BAGGETTO LG.
New invMED1 element cis-activates human multidrug-related MDR1 and MVP genes, involving the LRP130 protein.
Nucleic Acids Res 2004; 32 (13): 3864-3876.
- LAMPIDIS TJ, KOLONIAS D, PODONA T, ISRAEL M, SAFA AR, LOTHSTEIN L *et al.*
Circumvention of P-GP MDR as a function of anthracycline lipophilicity and charge.
Biochemistry 1997; 36 (9): 2679-2685.
- LARIBEE RN, KLEMSZ MJ.
Loss of PU.1 expression following inhibition of histone deacetylases.
J Immunol 2001; 167 (9): 5160-5166.
- LEE E, FURUKUBO T, MIYABE T, YAMAUCHI A, KARIYA K.
Involvement of histone hyperacetylation in triggering DNA fragmentation of rat thymocytes undergoing apoptosis.
FEBS Lett 1996; 395 (2-3): 183-187.

LEE E, NAKATSUMA A, HIRAOKA R, ISHIKAWA E, ENOMOTO R, YAMAUCHI A.
Involvement of histone phosphorylation in thymocyte apoptosis by protein phosphatase inhibitors.

IUBMB Life 1999; 48 (1): 79-83.

LEE YS, PAEK KS, KANG ES, JANG HS, KIM HJ, KANG YJ *et al.*

Involvement of nuclear factor kappaB in up-regulation of aldose reductase gene expression by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in HeLa cells.

Int J Biochem Cell Biol 2005; 37 (11): 2297-2309.

LEHNERT M.

Clinical multidrug resistance in cancer: a multifactorial problem.

Eur J Cancer 1996; 32A (6): 912-920.

LEONESSA F, CLARKE R.

ATP binding cassette transporters and drug resistance in breast cancer.

Endocr Relat Cancer 2003; 10 (1): 43-73.

LI J, GOROSPE M, BARNES J, LIU Y.

Tumor promoter arsenite stimulates histone H3 phosphoacetylation of proto-oncogenes c-fos and c-jun chromatin in human diploid fibroblasts.

J Biol Chem 2003; 278 (15): 13183-13191.

LIN HY, CHEN CS, LIN SP, WENG JR, CHEN CS.

Targeting histone deacetylase in cancer therapy.

Med Res Rev 2006; 26(4): 397-413.

LIST AF, KOPECKY KJ, WILLMAN CL, HEAD DR, PERSONS DL, SLOVAK ML *et al.*

Benefit of cyclosporine modulation of drug resistance in patients with poor-risk acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group study.

Blood 2001; 98 (12): 3212-3220.

LITMAN T, DRULEY TE, STEIN WD, BATES SE.

From MDR to MXR: new understanding of multidrug resistance systems, their properties and clinical significance.

Cell Mol Life Sci 2001; 58 (7): 931-959.

LIU YY, HAN TY, GIULIANO AE, CABOT MC.

Ceramide glycosylation potentiates cellular multidrug resistance.

Faseb J 2001; 15 (3): 719-730.

LOIZOU JI, MURR R, FINKBEINER MG, SAWAN C, WANG ZQ, HERCEG Z.

Epigenetic information in chromatin: the code of entry for DNA repair.

Cell Cycle 2006; 5 (7): 696-701.

LOMVARDA S, THANOS D.

Nucleosome sliding via TBP DNA binding in vivo.

Cell 2001; 106 (6): 685-696.

LONGLEY DB, HARKIN DP, JOHNSTON PG.

5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies.
Nat Rev Cancer 2003; 3 (5): 330-338.

LONGLEY DB, JOHNSTON PG.

Molecular mechanisms of drug resistance.
J Pathol 2005; 205 (2): 275-292.

LOO TW, CLARKE DM.

Recent progress in understanding the mechanism of P-glycoprotein-mediated drug efflux.
J Membr Biol 2005; 206 (3): 173-185.

LUGER K.

Dynamic nucleosomes.
Chromosome Res 2006; 14 (1): 5-16.

MADDEN SL, COOK DM, MORRIS JF, GASHLER A, SUKHATME VP, RAUSCHER FJ, III.

Transcriptional repression mediated by the WT1 Wilms tumor gene product.
Science 1991; 253 (5027): 1550-1553.

MAEHARA K, UEKAWA N, ISOBE K.

Effects of histone acetylation on transcriptional regulation of manganese superoxide dismutase gene.
Biochem Biophys Res Commun 2002; 295 (1): 187-192.

MAGER J, MONTGOMERY ND, DE VILLENA FP, MAGNUSON T.

Genome imprinting regulated by the mouse Polycomb group protein Eed.
Nat Genet 2003; 33 (4): 502-507.

MAI A, MASSA S, ROTILI D, CERBARA I, VALENTE S, PEZZI R *et al.*

Histone deacetylation in epigenetics: an attractive target for anticancer therapy.
Med Res Rev 2005; 25 (3): 261-309.

MANCHESTER KL.

Use of UV methods for measurement of protein and nucleic acid concentrations.
Biotechniques 1996; 20 (6): 968-970.

MARGUERON R, TROJER P, REINBERG D.

The key to development: interpreting the histone code?
Curr Opin Genet Dev 2005; 15 (2): 163-176.

MARTHINET E, DIVITA G, BERNAUD J, RIGAL D, BAGGETTO LG.

Modulation of the typical multidrug resistance phenotype by targeting the MED-1 region of human MDR1 promoter.
Gene Ther 2000; 7 (14): 1224-1233.

MARTIN C, ZHANG Y.

The diverse functions of histone lysine methylation.
Nat Rev Mol Cell Biol 2005; 6 (11): 838-849.

- MCKITTRICK E, GAFKEN PR, AHMAD K, HENIKOFF S.
Histone H3.3 is enriched in covalent modifications associated with active chromatin.
Proc Natl Acad Sci U S A 2004; 101 (6): 1525-1530.
- MECHETNER EB, RONINSON IB.
Efficient inhibition of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance with a monoclonal antibody.
Proc Natl Acad Sci U S A 1992; 89 (13): 5824-5828.
- MEDINA V, EDMONDS B, YOUNG GP, JAMES R, APPLETON S, ZALEWSKI PD.
Induction of caspase-3 protease activity and apoptosis by butyrate and trichostatin A (inhibitors of histone deacetylase): dependence on protein synthesis and synergy with a mitochondrial/cytochrome c-dependent pathway.
Cancer Res 1997; 57 (17): 3697-3707.
- METZGER E, WISSMANN M, YIN N, MULLER JM, SCHNEIDER R, PETERS AH *et al.*
LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor-dependent transcription.
Nature 2005; 437 (7057): 436-439.
- MIAO ZH, DING J.
Transcription factor c-Jun activation represses mdr-1 gene expression.
Cancer Res 2003; 63 (15): 4527-4532.
- MICKLEY LA, BATES SE, RICHERT ND, CURRIER S, TANAKA S, FOSS F *et al.*
Modulation of the expression of a multidrug resistance gene (mdr-1/P-glycoprotein) by differentiating agents.
J Biol Chem 1989; 264 (30): 18031-18040.
- MILLOT C, DUFER J.
Clinical applications of image cytometry to human tumour analysis.
Histol Histopathol 2000; 15 (4): 1185-200.
- MINATO K, KANZAWA F, NISHIO K, NAKAGAWA K, FUJIWARA Y, SAIJO N.
Characterization of an etoposide-resistant human small-cell lung cancer cell line.
Cancer Chemother Pharmacol 1990; 26 (5): 313-317.
- MINUCCI S, PELICCI PG.
Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer.
Nat Rev Cancer 2006; 6 (1): 38-51.
- MIYAMOTO K, USHIJIMA T.
Diagnostic and therapeutic applications of epigenetics.
Jpn J Clin Oncol 2005; 35 (6): 293-301.
- MIYAZAKI M, KOHNO K, UCHIUMI T, TANIMURA H, MATSUO K, NASU M *et al.*
Activation of human multidrug resistance-1 gene promoter in response to heat shock stress.
Biochem Biophys Res Commun 1992; 187 (2): 677-684.

MODRAK DE, GOLD DV, GOLDENBERG DM.
Sphingolipid targets in cancer therapy.
Mol Cancer Ther 2006; 5 (2): 200-208.

MONNERET C.
Histone deacetylase inhibitors.
Eur J Med Chem 2005; 40 (1): 1-13.

MONTIRONI R, SCARPELLI M, MAZZUCHELLI R, HAMILTON PW, THOMPSON D, RANGER-MOORE J *et al.*
Subvisual changes in chromatin organization state are detected by karyometry in the histologically normal urothelium in patients with synchronous papillary carcinoma.
Hum Pathol 2003; 34 (9): 893-901.

MONTIRONI R, THOMPSON D, SCARPELLI M, MAZZUCHELLI R, PEKEDI P, HAMILTON PW *et al.*
Karyometry detects subvisual differences in chromatin organization state between cribriform and flat high-grade prostatic intraepithelial neoplasia.
Mod Pathol 2004; 17 (8): 928-937.

MORIZONO K, XIE Y, RINGPIS GE, JOHNSON M, NASSANIAN H, LEE B *et al.*
Lentiviral vector retargeting to P-glycoprotein on metastatic melanoma through intravenous injection.
Nat Med 2005; 11 (3): 346-352.

MORROW CS, NAKAGAWA M, GOLDSMITH ME, MADDEN MJ, COWAN KH.
Reversible transcriptional activation of *mdr1* by sodium butyrate treatment of human colon cancer cells.
J Biol Chem 1994; 269 (14): 10739-10746.

MULHOLLAND NM, SOETH E, SMITH CL.
Inhibition of MMTV transcription by HDAC inhibitors occurs independent of changes in chromatin remodeling and increased histone acetylation.
Oncogene 2003; 22 (31): 4807-4818.

MUNSHI A, KURLAND JF, NISHIKAWA T, TANAKA T, HOBBS ML, TUCKER SL *et al.*
Histone deacetylase inhibitors radiosensitize human melanoma cells by suppressing DNA repair activity.
Clin Cancer Res 2005; 11 (13): 4912-4922.

MUNSHI N, MERIKA M, YIE J, SENGER K, CHEN G, THANOS D.
Acetylation of HMG I(Y) by CBP turns off IFN beta expression by disrupting the enhanceosome.
Mol Cell 1998; 2 (4): 457-467.

NAKAYAMA M, WADA M, HARADA T, NAGAYAMA J, KUSABA H, OHSHIMA K *et al.*
Hypomethylation status of CpG sites at the promoter region and overexpression of the human MDR1 gene in acute myeloid leukemias.
Blood 1998; 92 (11): 4296-4307.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- NAN X, HYNDMAN L, AGBI N, PORTEOUS DJ, BOYD AC.
Potent stimulation of gene expression by histone deacetylase inhibitors on transiently transfected DNA.
Biochem Biophys Res Commun 2004; 324 (1): 348-354.
- NG HH, JEPPESEN P, BIRD A.
Active repression of methylated genes by the chromosomal protein MBD1.
Mol Cell Biol 2000; 20 (4): 1394-1406.
- NICULESCU AB, 3RD, CHEN X, SMEETS M, HENGST L, PRIVES C, REED SI.
Effects of p21(Cip1/Waf1) at both the G1/S and the G2/M cell cycle transitions: pRb is a critical determinant in blocking DNA replication and in preventing endoreduplication.
Mol Cell Biol 1998; 18 (1): 629-643.
- NIELSEN SJ, SCHNEIDER R, BAUER UM, BANNISTER AJ, MORRISON A, O'CARROLL D *et al.*
Rb targets histone H3 methylation and HP1 to promoters.
Nature 2001; 412 (6846): 561-565.
- NIGHTINGALE KP, O'NEILL LP, TURNER BM.
Histone modifications: signalling receptors and potential elements of a heritable epigenetic code.
Curr Opin Genet Dev 2006; 16 (2): 125-136.
- NISHIOKA K, CHUIKOV S, SARMA K, ERDJUMENT-BROMAGE H, ALLIS CD, TEMPST P *et al.*
Set9, a novel histone H3 methyltransferase that facilitates transcription by precluding histone tail modifications required for heterochromatin formation.
Genes Dev 2002; 16 (4): 479-489.
- NOWAK SJ, CORCES VG.
Phosphorylation of histone H3: a balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation.
Trends Genet 2004; 20 (4): 214-220.
- OGRETMEN B, SAFA AR.
Negative regulation of MDR1 promoter activity in MCF-7, but not in multidrug resistant MCF-7/Adr, cells by cross-coupled NF-kappa B/p65 and c-Fos transcription factors and their interaction with the CAAT region.
Biochemistry 1999; 38 (7): 2189-2199.
- OGRETMEN B, SAFA AR.
Identification and characterization of the MDR1 promoter-enhancing factor 1 (MEF1) in the multidrug resistant HL60/VCR human acute myeloid leukemia cell line.
Biochemistry 2000; 39 (1): 194-204.
- OGURA M, TAKATORI T, TSURUO T.
Purification and characterization of NF-R1 that regulates the expression of the human multidrug resistance (MDR1) gene.
Nucleic Acids Res 1992; 20 (21): 5811-5817.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- OHGA T, UCHIUMI T, MAKINO Y, KOIKE K, WADA M, KUWANO M *et al.*
Direct involvement of the Y-box binding protein YB-1 in genotoxic stress-induced activation of the human multidrug resistance 1 gene.
J Biol Chem 1998; 273 (11): 5997-6000.
- OKAMURA H, YOSHIDA K, SASAKI E, MORIMOTO H, HANEJI T.
Transcription factor NF-Y regulates *mdr1* expression through binding to inverted CCAAT sequence in drug-resistant human squamous carcinoma cells.
Int J Oncol 2004; 25 (4): 1031-1037.
- OZVEGY-LACZKA C, CSEREPES J, ELKIND NB, SARKADI B.
Tyrosine kinase inhibitor resistance in cancer: role of ABC multidrug transporters.
Drug Resist Updat 2005; 8 (1-2): 15-26.
- OZVEGY C, LITMAN T, SZAKACS G, NAGY Z, BATES S, VARADI A *et al.*
Functional characterization of the human multidrug transporter, ABCG2, expressed in insect cells.
Biochem Biophys Res Commun 2001; 285 (1): 111-117.
- PALISSOT V, LIAUTAUD-ROGER F, CARPENTIER Y, DUFER J.
Image cytometry of early nuclear events during apoptosis induced by camptothecin in HL-60 leukemic cells.
Cytometry 1996; 25 (4): 341-348.
- PAPELEU P, LOYER P, VANHAECKE T, ELAUT G, GEERTS A, GUGUEN-GUILLOUZO C *et al.*
Trichostatin A induces differential cell cycle arrests but does not induce apoptosis in primary cultures of mitogen-stimulated rat hepatocytes.
J Hepatol 2003; 39 (3): 374-382.
- PARKER MI, DE HAAN JB, GEVERS W.
DNA hypermethylation in sodium butyrate-treated WI-38 fibroblasts.
J Biol Chem 1986; 261 (6): 2786-2790.
- PAWLAK-ROBLIN C, TOSI PF, PERRIN L, DEVY J, VENTEO L, ALBERT P *et al.*
Inhibition of multidrug resistance by immunisation with synthetic P-glycoprotein-derived peptides.
Eur J Cancer 2004; 40 (4): 606-613.
- PERRY RP.
Selective effects of actinomycin D on the intracellular distribution of RNA synthesis in tissue culture cells.
Exp Cell Res 1963; 29: 400-406.
- PETERSON CL.
HDAC's at work: everyone doing their part.
Mol Cell 2002; 9 (5): 921-922.

PETERSON CL, LANIEL MA.

Histones and histone modifications.

Curr Biol 2004; 14 (14): R546-551.

PICHLER A, ZELCER N, PRIOR JL, KUIL AJ, PIWNICA-WORMS D.

In vivo RNA interference-mediated ablation of MDR1 P-glycoprotein.

Clin Cancer Res 2005; 11 (12): 4487-4494.

PRINETTI A, MILLIMAGGI D, D'ASCENZO S, CLARKSON M, BETTIGA A, CHIGORNO V *et al.*

Lack of ceramide generation and altered sphingolipid composition are associated with drug resistance in human ovarian carcinoma cells.

Biochem J 2006; 395 (2): 311-318.

PUSARLA RH, BHARGAVA P.

Histones in functional diversification. Core histone variants.

Febs J 2005; 272 (20): 5149-5168.

QIAO L, SCHAACK J, SHAO J.

Suppression of adiponectin gene expression by histone deacetylase inhibitor valproic acid.

Endocrinology 2006; 147 (2): 865-874.

QIU YY, MIRKIN BL, DWIVEDI RS.

Differential expression of DNA-methyltransferases in drug resistant murine neuroblastoma cells.

Cancer Detect Prev 2002; 26 (6): 444-453.

QIU YY, MIRKIN BL, DWIVEDI RS.

Inhibition of DNA methyltransferase reverses cisplatin induced drug resistance in murine neuroblastoma cells.

Cancer Detect Prev 2005; 29 (5): 456-463.

RAFKI-BELJEBBAR N, LIAUTAUD-ROGER F, PLOTON D, DUFER J.

Textural analysis of nuclear mitotic apparatus antigen (NuMA) spatial distribution in interphase nuclei from human drug-resistant CEM lymphoblasts.

Anal Cell Pathol 1999; 18 (4): 175-181.

RAMASWAMY A, BAHAR I, IOSHIKHES I.

Structural dynamics of nucleosome core particle: comparison with nucleosomes containing histone variants.

Proteins 2005; 58 (3): 683-696.

RATNASINGHE D, DASCHNER PJ, ANVER MR, KASPRZAK BH, TAYLOR PR, YEH GC *et al.*

Cyclooxygenase-2, P-glycoprotein-170 and drug resistance; is chemoprevention against multidrug resistance possible?

Anticancer Res 2001; 21 (3C): 2141-2147.

REDON C, PILCH D, ROGAKOU E, SEDELNIKOVA O, NEWROCK K, BONNER W.
Histone H2A variants H2AX and H2AZ.
Curr Opin Genet Dev 2002; 12 (2): 162-169.

RIDGWAY P, ALMOUZNI G.
CAF-1 and the inheritance of chromatin states: at the crossroads of DNA replication and repair.
J Cell Sci 2000; 113 (Pt 15) 2647-2658.

ROBERTSON JD, ORRENIUS S, ZHIVOTOVSKY B.
Review: nuclear events in apoptosis.
J Struct Biol 2000; 129 (2-3): 346-358.

ROBEY RW, ZHAN Z, PIEKARZ RL, KAYASTHA GL, FOJO T, BATES SE.
Increased MDR1 expression in normal and malignant peripheral blood mononuclear cells obtained from patients receiving depsipeptide (FR901228, FK228, NSC630176).
Clin Cancer Res 2006; 12 (5): 1547-1555.

RUEFLI AA, AUSSERLECHNER MJ, BERNHARD D, SUTTON VR, TAINTON KM, KOFLER R *et al.*
The histone deacetylase inhibitor and chemotherapeutic agent suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) induces a cell-death pathway characterized by cleavage of Bid and production of reactive oxygen species.
Proc Natl Acad Sci U S A 2001; 98 (19): 10833-10838.

RUEFLI AA, BERNHARD D, TAINTON KM, KOFLER R, SMYTH MJ, JOHNSTONE RW.
Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) overcomes multidrug resistance and induces cell death in P-glycoprotein-expressing cells.
Int J Cancer 2002; 99 (2): 292-298.

SALMON I, KISS R, FRANC B, GASPERIN P, HEIMANN R, PASTEELS JL *et al.*
Comparison of morphonuclear features in normal, benign and neoplastic thyroid tissue by digital cell image analysis.
Anal Quant Cytol Histol 1992; 14 (1): 47-54.

SAMPATH J, SUN D, KIDD VJ, GRENET J, GANDHI A, SHAPIRO LH *et al.*
Mutant p53 cooperates with ETS and selectively up-regulates human MDR1 not MRP1.
J Biol Chem 2001; 276 (42): 39359-39367.

SANTISTEBAN MS, BRUGAL G.
Fluorescence image analysis of the MCF-7 cycle related changes in chromatin texture. Differences between AT- and GC-rich chromatin.
Anal Cell Pathol 1995; 9 (1): 13-28.

SANTORO R, GRUMMT I.
Epigenetic mechanism of rRNA gene silencing: temporal order of NoRC-mediated histone modification, chromatin remodeling, and DNA methylation.
Mol Cell Biol 2005; 25 (7): 2539-2546.

SANTOS-ROSA H, CALDAS C.

Chromatin modifier enzymes, the histone code and cancer.
Eur J Cancer 2005; 41 (16): 2381-2402.

SARMA K, REINBERG D.

Histone variants meet their match.
Nat Rev Mol Cell Biol 2005; 6 (2): 139-149.

SCANLON KJ, ISHIDA H, KASHANI-SABET M.

Ribozyme-mediated reversal of the multidrug-resistant phenotype.
Proc Natl Acad Sci U S A 1994; 91 (23): 11123-11127.

SCHMID K, ANGERSTEIN N, GELEFF S, GSCHWENDTNER A.

Quantitative nuclear texture features analysis confirms WHO classification 2004 for lung carcinomas.
Mod Pathol 2006; 19 (3): 453-459.

SCOTTO KW, JOHNSON RA.

Transcription of the multidrug resistance gene MDR1: a therapeutic target.
Mol Interv 2001; 1 (2): 117-125.

SCOTTO KW.

Transcriptional regulation of ABC drug transporters.
Oncogene 2003; 22 (47): 7496-7511.

SEALY L, CHALKLEY R.

DNA associated with hyperacetylated histone is preferentially digested by DNase I.
Nucleic Acids Res 1978; 5 (6): 1863-1876.

SELKER EU.

Trichostatin A causes selective loss of DNA methylation in Neurospora.
Proc Natl Acad Sci U S A 1998; 95 (16): 9430-9435.

SENGUPTA N, SETO E.

Regulation of histone deacetylase activities.
J Cell Biochem 2004; 93 (1): 57-67.

SHAN J, YUAN L, BUDMAN DR, XU HP.

WTH3, a new member of the Rab6 gene family, and multidrug resistance.
Biochim Biophys Acta 2002; 1589 (2): 112-123.

SHAROM FJ.

The P-glycoprotein efflux pump: how does it transport drugs?
J Membr Biol 1997; 160 (3): 161-175.

SHAROM FJ, YU X, LU P, LIU R, CHU JW, SZABO K *et al.*

Interaction of the P-glycoprotein multidrug transporter (MDR1) with high affinity peptide chemosensitizers in isolated membranes, reconstituted systems, and intact cells.
Biochem Pharmacol 1999; 58 (4): 571-586.

SHI YJ, MATSON C, LAN F, IWASE S, BABA T, SHI Y.
Regulation of LSD1 histone demethylase activity by its associated factors.
Mol Cell 2005; 19 (6): 857-864.

SHIIO Y, EISENMAN RN.
Histone sumoylation is associated with transcriptional repression.
Proc Natl Acad Sci U S A 2003; 100 (23): 13225-13230.

SHILATIFARD A.
Chromatin Modifications by Methylation and Ubiquitination: Implications in the Regulation of Gene Expression.
Annu Rev Biochem 2006; 75: 243-269.

SMITH AJ, VAN HELVOORT A, VAN MEER G, SZABO K, WELKER E, SZAKACS G *et al.*
MDR3 P-glycoprotein, a phosphatidylcholine translocase, transports several cytotoxic drugs and directly interacts with drugs as judged by interference with nucleotide trapping.
J Biol Chem 2000; 275 (31): 23530-23539.

SMYTH MJ, KRASOVSKIS E, SUTTON VR, JOHNSTONE RW.
The drug efflux protein, P-glycoprotein, additionally protects drug-resistant tumor cells from multiple forms of caspase-dependent apoptosis.
Proc Natl Acad Sci U S A 1998; 95 (12): 7024-7029.

SNG JC, TANIURA H, YONEDA Y.
Inhibition of histone deacetylation by trichostatin A intensifies the transcriptions of neuronal c-fos and c-jun genes after kainate stimulation.
Neurosci Lett 2005; 386 (3): 150-155.

SONNEMANN J, HARTWIG M, PLATH A, SARAVANA KUMAR K, MULLER C, BECK JF.
Histone deacetylase inhibitors require caspase activity to induce apoptosis in lung and prostate carcinoma cells.
Cancer Lett 2006; 232 (2): 148-160.

SPOTSWOOD HT, TURNER BM.
An increasingly complex code.
J Clin Invest 2002; 110 (5): 577-582.

STEIN U, WALTHER W, WUNDERLICH V.
Point mutations in the *mdr1* promoter of human osteosarcomas are associated with in vitro responsiveness to multidrug resistance relevant drugs.
Eur J Cancer 1994; 30A (10): 1541-1545.

STEIN U, WALTHER W, SHOEMAKER RH.
Modulation of *mdr1* expression by cytokines in human colon carcinoma cells: an approach for reversal of multidrug resistance.
Br J Cancer 1996; 74 (9): 1384-1391.

STERNER R, FERRARI N, VIDALI G.

Histones and Other Basic Nuclear Proteins : posttranslational modifications of histones.
Boca Raton: CRC Press; 1989, 197–250.

STRAHL BD, ALLIS CD.

The language of covalent histone modifications.

Nature 2000; 403 (6765): 41-45.

SUN ZW, ALLIS CD.

Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast.

Nature 2002; 418 (6893): 104-108.

SUNDSETH R, MACDONALD G, TING J, KING AC.

DNA elements recognizing NF-Y and Sp1 regulate the human multidrug-resistance gene promoter.

Mol Pharmacol 1997; 51 (6): 963-971.

SUZUKI T, YOKOZAKI H, KUNIYASU H, HAYASHI K, NAKA K, ONO S *et al.*

Effect of trichostatin A on cell growth and expression of cell cycle- and apoptosis-related molecules in human gastric and oral carcinoma cell lines.

Int J Cancer 2000; 88 (6): 992-997.

SYNOLD TW, DUSSAULT I, FORMAN BM.

The orphan nuclear receptor SXR coordinately regulates drug metabolism and efflux.

Nat Med 2001; 7 (5): 584-590.

SZAKACS G, PATERSON JK, LUDWIG JA, BOOTH-GENTHE C, GOTTESMAN MM.

Targeting multidrug resistance in cancer.

Nat Rev Drug Discov 2006; 5 (3): 219-234.

TABE Y, KONOPLEVA M, CONTRACTOR R, MUNSELL M, SCHOBBER WD, JIN L *et al.*

Up-regulation of MDR1 and induction of doxorubicin resistance by histone deacetylase inhibitor depsipeptide (FK228) and ATRA in acute promyelocytic leukemia cells.

Blood 2006; 107 (4): 1546-1554.

TADA Y, WADA M, KUROIWA K, KINUGAWA N, HARADA T, NAGAYAMA J *et al.*

MDR1 gene overexpression and altered degree of methylation at the promoter region in bladder cancer during chemotherapeutic treatment.

Clin Cancer Res 2000; 6 (12): 4618-4627.

TAKATORI T, OGURA M, TSURUO T.

Purification and characterization of NF-R2 that regulates the expression of the human multidrug resistance (MDR1) gene.

Jpn J Cancer Res 1993; 84 (3): 298-303.

TAKEBE N, ZHAO SC, URAL AU, JOHNSON MR, BANERJEE D, DIASIO RB *et al.*

Retroviral transduction of human dihydropyrimidine dehydrogenase cDNA confers resistance to 5-fluorouracil in murine hematopoietic progenitor cells and human CD34+-enriched peripheral blood progenitor cells.

Cancer Gene Ther 2001; 8 (12): 966-973.

TAMARU H, SELKER EU.

A histone H3 methyltransferase controls DNA methylation in *Neurospora crassa*.
Nature 2001; 414 (6861): 277-283.

TANAKA H, OHSHIMA N, IKENOYA M, KOMORI K, KATOH F, HIDAKA H.
HMN-176, an active metabolite of the synthetic antitumor agent HMN-214, restores chemosensitivity to multidrug-resistant cells by targeting the transcription factor NF-Y.
Cancer Res 2003; 63 (20): 6942-6947.

TARASOVA NI, SETH R, TARASOV SG, KOSAKOWSKA-CHOLODY T, HRYCZYNA CA, GOTTESMAN MM *et al.*

Transmembrane inhibitors of P-glycoprotein, an ABC transporter.
J Med Chem 2005; 48 (11): 3768-3775.

TH'NG JPH.

Histone modifications and apoptosis: Cause or consequence?
Biochem. Cell Biol. 2001; 79: 305-311.

THOMSON S, CLAYTON AL, MAHADEVAN LC.

Independent dynamic regulation of histone phosphorylation and acetylation during immediate-early gene induction.
Mol Cell 2001; 8 (6): 1231-1241.

THOTTASSERY JV, ZAMBETTI GP, ARIMORI K, SCHUETZ EG, SCHUETZ JD.

p53-dependent regulation of MDR1 gene expression causes selective resistance to chemotherapeutic agents.
Proc Natl Acad Sci U S A 1997; 94 (20): 11037-11042.

TIAN K, JURUKOVSKI V, WANG XP, KAPLAN MH, XU H.

Epigenetic regulation of WTH3 in primary and cultured drug-resistant breast cancer cells.
Cancer Res 2005; 65 (21): 10024-10031.

TOTH KF, KNOCH TA, WACHSMUTH M, FRANK-STOHR M, STOHR M, BACHER CP *et al.*

Trichostatin A-induced histone acetylation causes decondensation of interphase chromatin.
J Cell Sci 2004; 117 (Pt 18): 4277-4287.

TSE C, CAPEAU J.

[Real time PCR methodology for quantification of nucleic acids].
Ann Biol Clin (Paris) 2003; 61 (3): 279-293.

TSUKADA Y, FANG J, ERDJUMENT-BROMAGE H, WARREN ME, BORCHERS CH, TEMPST P *et al.*

Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins.
Nature 2006; 439 (7078): 811-816.

TSURUTANI J, SODA H, OKA M, SUENAGA M, DOI S, NAKAMURA Y *et al.*

Antiproliferative effects of the histone deacetylase inhibitor FR901228 on small-cell lung cancer lines and drug-resistant sublines.
Int J Cancer 2003; 104 (2): 238-242.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- UCHIMURA Y, ICHIMURA T, UWADA J, TACHIBANA T, SUGAHARA S, NAKAO M *et al.*
Involvement of SUMO modification in MBD1- and MCAF1-mediated heterochromatin formation.
J Biol Chem 2006; *in press*.
- UEDA K, CORNWELL MM, GOTTESMAN MM, PASTAN I, RONINSON IB, LING V *et al.*
The *mdr1* gene, responsible for multidrug-resistance, codes for P-glycoprotein.
Biochem Biophys Res Commun 1986; 141 (3): 956-962.
- UEDA K, PASTAN I, GOTTESMAN MM.
Isolation and sequence of the promoter region of the human multidrug-resistance (P-glycoprotein) gene.
J Biol Chem 1987; 262 (36): 17432-17436.
- VAIL DM, AMANTEA MA, COLBERN GT, MARTIN FJ, HILGER RA, WORKING PK.
Pegylated liposomal doxorubicin: proof of principle using preclinical animal models and pharmacokinetic studies.
Semin Oncol 2004; 31 (6 Suppl 13): 16-35.
- VAKOC CR, MANDAT SA, OLENCHOCK BA, BLOBEL GA.
Histone H3 lysine 9 methylation and HP1gamma are associated with transcription elongation through mammalian chromatin.
Mol Cell 2005; 19 (3): 381-391.
- VANHAECKE T, PAPELEU P, ELAUT G, ROGIERS V.
Trichostatin A-like hydroxamate histone deacetylase inhibitors as therapeutic agents: toxicological point of view.
Curr Med Chem 2004; 11 (12): 1629-1643.
- VERDONE L, CASERTA M, DI MAURO E.
Role of histone acetylation in the control of gene expression.
Biochem Cell Biol 2005; 83 (3): 344-353.
- VERHEST A, KISS R, D'OLNE D, LARSIMONT D, SALMON I, DE LAUNOIT Y *et al.*
Characterization of human colorectal mucosa, polyps, and cancers by means of computerized morphonuclear image analyses.
Cancer 1990; 65 (9): 2047-2054.
- VERMEULEN K, VAN BOCKSTAELE DR, BERNEMAN ZN.
The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer.
Cell Prolif 2003; 36 (3): 131-149.
- VILABOIA NE, GALAN A, TROYANO A, DE BLAS E, ALLER P.
Regulation of multidrug resistance 1 (MDR1)/P-glycoprotein gene expression and activity by heat-shock transcription factor 1 (HSF1).
J Biol Chem 2000; 275 (32): 24970-24976.

- WADKINS RM, JARES-ERIJMAN EA, KLEMENT R, RUDIGER A, JOVIN TM.
Actinomycin D binding to single-stranded DNA: sequence specificity and hemi-intercalation model from fluorescence and ¹H NMR spectroscopy.
J Mol Biol 1996; 262 (1): 53-68.
- WALLACE CS, LYFORD GL, WORLEY PF, STEWARD O.
Differential intracellular sorting of immediate early gene mRNAs depends on signals in the mRNA sequence.
J Neurosci 1998; 18 (1): 26-35.
- WANG C, MIRKIN BL, DWIVEDI RS.
DNA (cytosine) methyltransferase overexpression is associated with acquired drug resistance of murine neuroblastoma cells.
Int J Oncol 2001; 18 (2): 323-329.
- WANG X, HE C, MOORE SC, AUSIO J.
Effects of histone acetylation on the solubility and folding of the chromatin fiber.
J Biol Chem 2001; 276 (16): 12764-12768.
- WATERBORG JH.
Histone synthesis and turnover in alfalfa. Fast loss of highly acetylated replacement histone variant H3.2.
J Biol Chem 1993; 268 (7): 4912-4917.
- WATTEL E, SOLARY E, HECQUET B, CAILLOT D, IFRAH N, BRION A *et al.*
Quinine improves results of intensive chemotherapy (IC) in myelodysplastic syndromes (MDS) expressing P-glycoprotein (PGP). Updated results of a randomized study. Groupe Francais des Myelodysplasies (GFM) and Groupe GOELAMS.
Adv Exp Med Biol 1999; 457: 35-46.
- WEYN B, TJALMA W, VAN DE WOUWER G, VAN DAELE A, SCHEUNDERS P, JACOB W *et al.*
Validation of nuclear texture, density, morphometry and tissue syntactic structure analysis as prognosticators of cervical carcinoma.
Anal Quant Cytol Histol 2000; 22 (5): 373-382.
- WILSON MA, RICCI AR, DEROO BJ, ARCHER TK.
The histone deacetylase inhibitor trichostatin A blocks progesterone receptor-mediated transactivation of the mouse mammary tumor virus promoter in vivo.
J Biol Chem 2002; 277 (17): 15171-15181.
- WOLFFE AP, GUSCHIN D.
Review: chromatin structural features and targets that regulate transcription.
J Struct Biol 2000; 129 (2-3): 102-122.
- WYSOCKA J, ALLIS CD, COONROD S.
Histone arginine methylation and its dynamic regulation.
Front Biosci 2006; 11 344-355.

- XIAO JJ, HUANG Y, DAI Z, SADEE W, CHEN J, LIU S *et al.*
Chemoresistance to depsipeptide FK228 [(E)-(1S,4S,10S,21R)-7-[(Z)-ethylidene]-4,21-diisopropyl-2-oxa-12,13-dithia-5,8,20,23-tetraazabicyclo[8,7,6]-tricos-16-ene-3,6,9,22-pentanone] is mediated by reversible MDR1 induction in human cancer cell lines.
J Pharmacol Exp Ther 2005; 314 (1): 467-475.
- XIONG Y, DOWDY SC, PODRATZ KC, JIN F, ATTEWELL JR, EBERHARDT NL *et al.*
Histone deacetylase inhibitors decrease DNA methyltransferase-3B messenger RNA stability and down-regulate de novo DNA methyltransferase activity in human endometrial cells.
Cancer Res 2005; 65 (7): 2684-2689.
- XIONG Z, LAIRD PW.
COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay.
Nucleic Acids Res 1997; 25 (12): 2532-4.
- XU D, KANG H, FISHER M, JULIANO RL.
Strategies for inhibition of MDR1 gene expression.
Mol Pharmacol 2004; 66 (2): 268-275.
- YAGUE E, ARMESILLA AL, HARRISON G, ELLIOTT J, SARDINI A, HIGGINS CF *et al.*
P-glycoprotein (MDR1) expression in leukemic cells is regulated at two distinct steps, mRNA stabilization and translational initiation.
J Biol Chem 2003; 278 (12): 10344-10352.
- YAMADA H, ARAKAWA Y, SAITO S, AGAWA M, KANO Y, HORIGUCHI-YAMADA J.
Depsipeptide-resistant KU812 cells show reversible P-glycoprotein expression, hyper-acetylated histones, and modulated gene expression profile.
Leuk Res 2006; 30 (6): 723-734.
- YAMADA T, TAKAOKA AS, NAISHIRO Y, HAYASHI R, MARUYAMA K, MAESAWA C *et al.*
Transactivation of the multidrug resistance 1 gene by T-cell factor 4/beta-catenin complex in early colorectal carcinogenesis.
Cancer Res 2000; 60 (17): 4761-4766.
- YAN Y, CHEN H, COSTA M.
Epigenetics protocols.
Totowa: Humana Press; 2004, 9-20.
(Methods in molecular biology; 287).
- YANG XJ.
Lysine acetylation and the bromodomain: a new partnership for signaling.
Bioessays 2004; 26 (10): 1076-1087.
- YATOUJI S, TRUSSARDI-REGNIER A, TRENTESAUX C, LIAUTAUD-ROGER F, DUFER J.
Nuclear texture and chromatin structure in OV1/VCR human multidrug-resistant cell line.
Int J Oncol 2003; 23 (4): 1225-1230.

YOSHIDA M, KIJIMA M, AKITA M, BEPPU T.

Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A.

J Biol Chem 1990; 265 (28): 17174-17179.

YOSHIDA M, FURUMAI R, NISHIYAMA M, KOMATSU Y, NISHINO N, HORINOUCI S.

Histone deacetylase as a new target for cancer chemotherapy.

Cancer Chemother Pharmacol 2001; 48 (Suppl 1): S20-26.

ZALENSKY AO, SIINO JS, GINEITIS AA, ZALENSKAYA IA, TOMILIN NV, YAU P *et al.*

Human testis/sperm-specific histone H2B (hTSH2B). Molecular cloning and characterization.

J Biol Chem 2002; 277 (45): 43474-43480.

ZHANG Y, REINBERG D.

Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails.

Genes Dev 2001; 15 (18): 2343-2360.

ZHAO S, VENKATASUBBARAO K, LI S, FREEMAN JW.

Requirement of a specific Sp1 site for histone deacetylase-mediated repression of transforming growth factor beta Type II receptor expression in human pancreatic cancer cells.

Cancer Res 2003; 63 (10): 2624-2630.

ZHONG X, SAFA AR.

RNA helicase A in the MEF1 transcription factor complex up-regulates the MDR1 gene in multidrug-resistant cancer cells.

J Biol Chem 2004; 279 (17): 17134-17141.

ZHOU J, LIU M, ANEJA R, CHANDRA R, LAGE H, JOSHI HC.

Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in cancer cells by the c-Jun NH2-terminal kinase.

Cancer Res 2006; 66 (1): 445-452.

ZHU WG, LAKSHMANAN RR, BEAL MD, OTTERSON GA.

DNA methyltransferase inhibition enhances apoptosis induced by histone deacetylase inhibitors.

Cancer Res 2001; 61 (4): 1327-1333.

ZINK D, FISCHER AH, NICKERSON JA.

Nuclear structure in cancer cells.

Nat Rev Cancer 2004; 4 (9): 677-687.

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Représentation des principaux mécanismes cellulaires de la résistance.....	7
Figure 2. Structures des principaux transporteurs ABC.....	10
Figure 3. Eléments du promoteur MDR1 en amont du site majeur d'initiation de la transcription (+1).....	18
Figure 4. <i>Enhancesome</i> MDR1.....	20
Figure 5. Représentation schématique du site de fixation HT de p53 au niveau du promoteur MDR1.....	21
Figure 6. Structure du nucléosome.....	26
Figure 7. Architecture du coeur nucléosomique.....	27
Figure 8. Différents niveaux de compaction de la chromatine.....	27
Figure 9. Configuration en poignée de mains des dimères H3-H4 et H2A-H2B.....	29
Figure 10. Modifications post-traductionnelles des histones du coeur nucléosomique.....	33
Figure 11. Réactions d'acétylation et de désacétylation des lysines de la queue N-terminale des histones.....	34
Figure 12. Modèle de régulation de la structure nucléosomique par acétylation réversible des histones.....	35
Figure 13. Représentation schématique d'un chromosome de levure montrant les régions régulées par différentes HDACs.....	40
Figure 14. Composition des complexes répresseurs contenant des HDACs.....	41
Figure 15. Formes méthylées des résidus lysines et arginines des histones.....	43
Figure 16. Interactions entre les différentes modifications des histones.....	50
Figure 17. Influence des modifications des histones sur la fixation de HP1.....	51
Figure 18. Mécanisme de méthylation de la cytosine au niveau de l'ADN.....	53
Figure 19. Transmission du profil de méthylation de l'ADN.....	54
Figure 20. Mécanismes de répression transcriptionnelle par la méthylation de l'ADN.....	56
Figure 21. Modèle de cycle d'auto-consolidation des états réprimés de la chromatine.....	58
Figure 22. Modèle de mécanisme de contrôle de la transcription du gène <i>MDR1</i> en réponse à des modifications épigénétiques.....	64
Figure 23. Structure développée de l'étoposide.....	71
Figure 24. Structure développée de la trichostatine A.....	72
Figure 25. Structure développée du cycloheximide.....	73

Figure 26. Structure développée de l'actinomycine D.....	74
Figure 27. Structure développée de la 5-aza-2'-désoxycytidine.....	74
Figure 28. Suivi en temps réel d'une réaction PCR.....	76
Figure 29. Description du faciès chromatinien : quelques exemples.....	84
Figure 30. Représentation schématique d'un cytomètre en flux.....	95
Figure 31. Représentation schématique de la technique de ChIP.....	100
Figure 32. Schéma représentatif des différentes étapes de la MSP.....	106
Figure 33. Etapes de la réaction de conversion par le bisulfite.....	106
Figure 34. Expression de l'ARNm MDR1 dans les cellules H69WT et H69VP.....	118
Figure 35. Acétylation des histones H4 et H3 dans les cellules H69WT et H69VP.....	120
Figure 36. Effet de la TSA sur la viabilité des cellules H69WT et H69VP.....	122
Figure 37. Acétylation des histones H4 et H3 par la TSA.....	125
Figure 38. Analyse par AUT-PAGE des formes acétylées des histones et de leurs variants.....	126
Figure 39. Effet de la TSA sur la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3.....	129
Figure 40. Effet de la TSA sur la texture nucléaire.....	130
Figure 41. Anormalité nucléaire induite par la TSA.....	132
Figure 42. Effet de la TSA sur l'expression du gène <i>MDR1</i>	135
Figure 43. Effet du NaBut sur l'expression du gène <i>MDR1</i>	135
Figure 44. Rôle de la transcription dans la modulation de l'expression du gène <i>MDR1</i> par la TSA.....	137
Figure 45. Effet de la TSA sur la stabilité de l'ARNm MDR1 selon un mécanisme indépendant de la transcription.....	139
Figure 46. Effet de la TSA sur la stabilité de l'ARNm MDR1 selon un mécanisme dépendant de la transcription.....	141
Figure 47. Effet du cycloheximide sur la modulation de l'expression de Bax par la TSA...	143
Figure 48. Effet du cycloheximide sur la modulation de l'expression de la cycline D1 par la TSA.....	143
Figure 49. Effet du cycloheximide sur l'expression du gène <i>MDR1</i>	145
Figure 50. Rôle de la traduction dans la modulation de l'expression du gène <i>MDR1</i> par la TSA.....	146
Figure 51. Expression de l'ARNm c-jun dans les cellules H69WT et H69VP.....	148
Figure 52. Effet de la TSA sur l'expression du gène c-jun.....	148
Figure 53. Modifications post-traductionnelles des histones au niveau du promoteur MDR1.....	151

Figure 54. Acétylation par la TSA des histones H4 au niveau de la région proximale du promoteur MDR1.....	153
Figure 55. Acétylation par la TSA des histones H4 au niveau de la région distale du promoteur MDR1.....	154
Figure 56. Acétylation par la TSA des histones H3 au niveau de la région proximale du promoteur MDR1.....	155
Figure 57. Acétylation par la TSA des histones H3 au niveau de la région distale du promoteur MDR1.....	156
Figure 58. Effet de la TSA sur la di-méthylation de H3K9 au niveau de la région proximale du promoteur MDR1.....	158
Figure 59. Effet de la TSA sur la di-méthylation de H3K9 au niveau de la région distale du promoteur MDR1.....	159
Figure 60. Effet de la TSA sur la méthylation des boîtes GC-50 et GC-110 du promoteur MDR1.....	161
Figure 61. Analyse de la méthylation des boîtes GC-50 et GC-110 du promoteur MDR1 suite à l'action de la 5azadC ou de son association avec la TSA.....	163
Figure 62. Profil de méthylation de l'élément Inr du promoteur MDR1 : effet de la TSA et de la 5azadC.....	164
Figure 63. Effet de la 5azadC sur l'expression du gène <i>MDR1</i>	164
Figure 64. Expression du gène <i>MDR1</i> après association de la 5azadC à la TSA dans les cellules H69WT.....	167
Figure 65. Expression du gène <i>MDR1</i> après association de la 5azadC à la TSA dans les cellules H69VP.....	167
Figure 66. Fixation du facteur PCAF au niveau du promoteur MDR1 dans les cellules H69WT et H69VP.....	169
Figure 67. Recrutement du facteur PCAF au niveau du promoteur MDR1 après traitement par la TSA.....	170

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I. Membres des familles d'HATs et leurs substrats correspondants.	37
Tableau II. Membres des familles d'HDACs et leurs substrats correspondants.....	39
Tableau III. Description des paramètres de texture.....	85
Tableau IV. Valeurs des paramètres de texture dans les cellules H69WT et H69VP en phase G ₀ /G ₁	118
Tableau V. Effet de la TSA (100 ng/mL) sur le cycle cellulaire.	123

EL KHOURY Victoria – Etude de modifications épigénétiques corrélées à l’expression du gène *MDR1* et à la texture nucléaire dans des cellules de carcinome pulmonaire H69 sensibles et résistantes à la chimiothérapie.

Th. De Dr. Université de Reims Champagne-Ardenne : 2006 ; n°

RESUME

La résistance aux anticancéreux résulte souvent de l’expression de la P-gp, une protéine à efflux codée par le gène *MDR1* dont les mécanismes de régulation sont encore mal connus. Au cours de ce travail l’effet de modifications épigénétiques sur le phénotype nucléaire et l’expression du gène *MDR1* a été analysé dans des cellules de carcinome pulmonaire sensibles H69WT et résistantes à la chimiothérapie H69VP.

Différentes techniques ont été développées pour étudier la texture de la chromatine (cytométrie par analyse d’images), le cycle cellulaire (cytométrie en flux), les modifications post-traductionnelles des histones (western blot, AUT-PAGE) et les mécanismes de régulation du gène *MDR1* (RT-PCR en temps réel, CHIP, MSP, COBRA).

Il apparaît que les cellules H69VP surexprimant le gène *MDR1* présentent, comparativement à leurs homologues sensibles H69WT, des altérations texturales nucléaires correspondant à un aspect « décondensé » de la chromatine. L’inhibition des histones désacétylases par la trichostatine A (TSA) modifie la supra-organisation de la chromatine dont la texture manifeste alors une décondensation progressive dans les cellules sensibles et transitoire dans les cellules résistantes. Ces modifications de la structure chromatiniennne semblent refléter les variations du taux d’acétylation des histones H3 localisées au niveau du promoteur *MDR1*.

La TSA induit une surexpression du gène *MDR1* dans les cellules H69WT et une diminution de son expression dans les cellules H69VP. Cette régulation apparaît de nature transcriptionnelle et n’est pas liée à une modification de la stabilité de l’ARNm *MDR1*. L’inhibition de la synthèse protéique *de novo* réduit mais ne supprime pas l’effet de la TSA sur l’expression du gène *MDR1*. Ces résultats suggèrent que la TSA modifie l’expression et la fixation à l’ADN d’un ou plusieurs facteurs de transcription impliqués dans la régulation de ce gène de résistance. D’autre part, la modulation différentielle de l’expression du gène *MDR1* par la TSA ne correspond pas à une différence de méthylation basale du promoteur *MDR1*, ni à des variations de l’état de méthylation de ce promoteur au cours du traitement par la TSA. Toutefois, la TSA modifie le profil épigénétique du promoteur *MDR1* au niveau duquel elle induit une hyperacétylation des histones H3 et H4, progressive dans les cellules H69WT et transitoire pour les histones H3 dans les cellules H69VP. Enfin, malgré ses effets inverses sur l’expression du gène *MDR1* dans les deux lignées cellulaires, la TSA augmente le recrutement du facteur co-activateur PCAF au niveau du promoteur de ce gène.

Nos résultats suggèrent l’intérêt que pourraient présenter les inhibiteurs des HDACs dans le traitement des cancers multi-résistants.

SPECIALITE : Biologie cellulaire et moléculaire

MOTS-CLES : gène *MDR1*, modification post-traductionnelle, acétylation, code histone, méthylation ADN, cytométrie d’image.

JURY :

Rapporteurs : Dr. BAGGETTO LG (Université Claude Bernard Lyon 1)
Pr. RONOT X (Université Joseph Fourier, Grenoble)

Examineurs : Pr. ROBERT J (Institut Bergonié, Bordeaux)
Dr. GARNOTEL R (Université de Reims Champagne-Ardenne)
Dr. MORJANI H (Université de Reims Champagne-Ardenne)

Directeur de thèse : Pr. DUFER J (Université de Reims Champagne-Ardenne)

Adresse de l’auteur :

EL KHOURY Victoria, 22 pl. Maurice Utrillo – 51100 Reims.