

Université
de Liège



Faculté des Sciences
Laboratoire de Virologie et d'Immunologie

Modulation de l'activation du
facteur de transcription NF- κ B par un
inhibiteur d'histone désacétylases

Julie Horion

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de
Docteur en Sciences

Année académique 2007-2008

TABLE DES MATIERES

| | |
|---|----|
| RESUME | 1 |
| LISTE DES ABREVIATIONS | 2 |
| INTRODUCTION | 5 |
| 1. Généralités | 5 |
| 2. La chromatine | 5 |
| 2.1.Organisation chromatinienne..... | 5 |
| 2.2.Code des histones..... | 6 |
| 2.3.Interdépendance de modifications épigénétiques des histones..... | 7 |
| 3. Phosphorylation des histones | 8 |
| 4. Acétylation/désatélylation des histones | 8 |
| 4.1.Roles de l'acétylation des histones..... | 9 |
| 4.2.Dynamisme de la chromatine..... | 10 |
| 4.3.Complexes multiprotéiques..... | 11 |
| 4.4.Acétylation des protéines non-histoniqes..... | 12 |
| 5. HDACs | 13 |
| 5.1.Description des HDACs..... | 13 |
| 5.1.1. <i>Classification</i> | 13 |
| 5.1.2. <i>Localisation</i> | 14 |
| 5.2.Mécanisme d'action des HDACs..... | 15 |
| 5.3.Régulation des activités des HDACs..... | 15 |
| 6. Inhibiteurs des HDACs (HDACi) | 16 |
| 6.1.Description des HDACi..... | 16 |
| 6.2.Mécanisme d'inhibition des HDACi..... | 17 |
| 6.3.«Pas de généralités »..... | 18 |
| 6.4.Effets des HDACi sur les processus cellulaires – Importance en cancérologie..... | 19 |
| 6.4.1. <i>Voies cellulaires anti-tumorales induites par les HDACi</i> | 19 |
| 6.4.1.1. Arrêt du cycle cellulaire..... | 19 |
| 6.4.1.2. Différenciation..... | 20 |
| 6.4.1.3. Apoptose..... | 20 |
| 6.4.1.4. Angiogénèse..... | 21 |
| 6.4.1.5. Migration cellulaire..... | 21 |
| 6.4.2. <i>Spécificité des cellules tumorales</i> | 22 |
| 7. Le facteur de transcription NF-κB | 23 |

| | |
|--|----|
| 7.1. Généralités..... | 23 |
| 7.2. Inducteurs du NF- κ B..... | 24 |
| 7.3. Gènes sous le contrôle du NF- κ B..... | 24 |
| 7.4. Les protéines NF- κ B/Rel..... | 25 |
| 7.5. Les protéines I κ B..... | 26 |
| 7.6. Complexe IKK (I κ B Kinase)..... | 27 |
| 7.6.1. <i>Structure des IKKs</i> | 28 |
| 7.6.2. <i>Activités des IKKs</i> | 29 |
| 7.6.2.1. Rôle d'IKK β | 30 |
| 7.6.2.2. Rôle d'IKK α | 30 |
| 7.6.2.3. Rôle de NEMO..... | 31 |
| 7.7. Mécanisme d'activation du NF- κ B | 32 |
| 7.7.1. <i>Voie classique ou « canonique » d'activation du NF-κB</i> | 32 |
| 7.7.1.1. Activation du NF- κ B par le TNF α | 33 |
| 7.7.1.2. Activation du NF- κ B par l'IL-1 β | 34 |
| 7.7.1.3. Activation du NF- κ B par le PMA..... | 35 |
| 7.7.2. <i>Voie alternative d'activation du NF-κB</i> | 35 |
| 7.7.3. <i>Voies atypiques d'activation du NF-κB induites par un stress oxydant</i> | 36 |
| 7.8. Modifications post-traductionnelles du NF- κ B | 38 |
| 7.8.1. <i>Phosphorylation de p65</i> | 39 |
| 7.8.2. <i>Acétylation de p65</i> | 40 |
| | |
| OBJECTIFS | 41 |
| | |
| RESULTATS | 43 |
| | |
| PREMIERE PARTIE : EFFET DE LA TSA SUR DIFFERENTES VOIES DE SIGNALISATION DU NF-κB | 44 |
| | |
| 1. Introduction | 44 |
| | |
| 2. Voie canonique | 44 |
| 2.1. Activation du NF- κ B..... | 45 |
| 2.1.1. <i>Induction par le TNFα</i> | 45 |
| 2.1.2. <i>Induction par l'IL-1β</i> | 45 |
| 2.1.3. <i>Induction par le PMA</i> | 46 |
| 2.2. Activation du complexe IKK..... | 47 |
| 2.2.1. <i>Induction par le TNFα</i> | 47 |
| 2.2.2. <i>Induction par l'IL-1β</i> | 47 |
| 2.2.3. <i>Induction par le PMA</i> | 48 |
| 2.3. Effet de la TSA sur l'activité de phosphatases..... | 48 |
| 2.4. Activité transcriptionnelle du NF- κ B..... | 50 |
| | |
| 3. Effet de la TSA seule sur l'activation du NF-κB | 50 |
| | |
| 4. Voie alternative induite par la LTβ | 51 |

| | |
|--|----|
| 5. Voie atypique induite par le H₂O₂ | 51 |
| 6. Voie alternative induite par le PV | 52 |
| 6.1.Activation du NF-κB..... | 52 |
| 6.2.Phosphorylation d'IκBα..... | 53 |
| 6.3.Activité du complexe IKK..... | 54 |
| 6.4.Liaison du NF-κB au niveau du promoteur <i>ikbα</i> | 55 |
| 7. Conclusion de l'influence de la TSA sur la signalisation du NF-κB. | 56 |

DEUXIEME PARTIE : EFFET DE LA TSA SUR LES MÉCANISMES MOLÉCULAIRES EPIGÉNÉTIQUES INTERVENANT SUITE A UNE STIMULATION AU PV – COMPARAISON AVEC LE TNFα..... 57

| | |
|--|----|
| 1. Introduction | 57 |
| 2. IκBα | 57 |
| 2.1.ARN d'IκBα..... | 57 |
| 2.2.Activité transcriptionnelle du NF-κB..... | 58 |
| 2.3.Modifications épigénétiques du promoteur <i>ikbα</i> | 59 |
| 2.4.Effet de la TSA seule sur le promoteur <i>ikbα</i> | 60 |
| 2.5.Voie des MAPK..... | 61 |
| 2.6.Potentiel transactivateur de p65..... | 62 |
| 2.7.Conclusions..... | 63 |
| 3. IL8 | 65 |
| 3.1. ARN de l'IL8..... | 65 |
| 3.2.Activité transcriptionnelle du NF-κB..... | 65 |
| 3.3.Conclusions..... | 65 |
| 4. ICAM1 | 66 |
| 4.1. ARN d'ICAM1..... | 66 |
| 4.2.Activité transcriptionnelle du NF-κB..... | 66 |
| 4.3.Modifications épigénétiques du promoteur <i>icam-1</i> | 67 |
| 4.4 Conclusions..... | 68 |

PUBLICATION..... 70

DISCUSSION-PERSPECTIVES..... 71

| | |
|----------------------------------|----|
| 1. Voie classique | 72 |
| 2. Voie alternative | 74 |

| | |
|--|--------|
| 3. Activation par le H₂O₂ | 75 |
| 4. Activation par le PV | 76 |
| 5. Modifications épigénétiques au niveau des promoteurs <i>ikba</i> et <i>icam-1</i>- Comparaison en PV et TNFα | 77 |
| 5.1.Promoteur <i>ikba</i> | 77 |
| 5.2.Promoteur <i>icam-1</i> | 81 |
| MATERIELS & METHODES | 84 |
| 1. Lignées cellulaires | 84 |
| 2. Produits chimiques | 84 |
| 3. Anticorps | 84 |
| 4. Plasmides | 85 |
| 5. Transfection transitoire et test luciferase | 85 |
| 6. Extraction de protéines cytoplasmiques et nucléaires | 85 |
| 7. Western blot et EMSA | 86 |
| 8. Immunoprécipitation d'IκBα | 86 |
| 9. Immunoprécipitation du complexe IKK et test in vitro d'activité kinase des IKKs | 86 |
| 10. Extraction de protéines totales pour phospho-western blot | 87 |
| 11. Test d'activité phosphatase à sérine/thréonine | 87 |
| 12. RT-PCR quantitative en temps réel | 87 |
| 13. Test de protection à la ribonucléase (RPA) | 88 |
| 14. Test d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) | 88 |
| BIBLIOGRAPHIE | 89 |
| ANNEXES | 112 |

RESUME

Le NF- κ B est un facteur de transcription crucial dans la régulation de l'expression de gènes impliqués dans la réponse immune, la prolifération et la survie cellulaire.

Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés à l'implication des histone désacétylases ou HDACs sur l'activation de ce facteur de transcription. Dans ce but, nous avons utilisé un inhibiteur de HDACs, la TSA (Trichostatin A), qui favorise l'acétylation de nombreuses protéines.

Dans un premier temps, nous avons mis en évidence un prolongement de l'activation du NF- κ B par l'ajout de TSA à une stimulation de la voie classique induite par le TNF α (Tumor Necrosis Factor α), l'IL-1 β (Interleukin-1 β) et le PMA (Phorbol 12-Myristate 13-Acetate). Cette extension est mise en relation avec un retard de réapparition de l'inhibiteur I κ B α dans le cytoplasme. Elle provient, du moins en partie, d'une activité prolongée du complexe IKK. Par contre, ni la voie non-canonique {induite par la LT β (Lymphotoxin β)}, ni une voie du stress oxydant {induite par le H₂O₂ (peroxyde d'hydrogène)} ne présente cette extension de l'activation du NF- κ B par l'ajout de TSA.

Dans la suite de ce travail, nous avons démontré que la TSA prolonge également l'activation du NF- κ B après stimulation par le pervanadate (PV), un inhibiteur de tyrosine phosphatase qui initie une voie de signalisation atypique. Cette extension est également corrélée à une réapparition retardée d'I κ B α dans le cytoplasme. Cependant, l'activité du complexe IKK n'est pas prolongée, comme dans le cas du TNF α . En effet, des RT-PCR quantitatives révèlent une diminution du niveau de l'ARNm d'I κ B α après l'addition de TSA à une stimulation au PV. Des analyses *in vivo* par la technique de CHIP révèlent plusieurs problèmes au niveau du promoteur *ikb α* après induction au PV avec TSA : (i) diminution du recrutement de l'ARN Polymérase II ; (ii) phosphorylation et acétylation réduites de l'histone H3 sur la Ser10 et la Lys14, respectivement ; (iii) présence diminuée de p65 phosphorylé sur la Ser536 ; et (iv) réduction de la liaison d'IKK α . Le recrutement de ces protéines sur le promoteur *icam-1* n'est pas affecté de manière similaire.

L'ensemble de ces données suggère que les HDACs jouent un rôle global de répresseurs sur l'activation du NF- κ B par des mécanismes moléculaires spécifiques du stimulus et du promoteur.

INTRODUCTION

1. Généralités

Les cellules d'un organisme donné contiennent une information génétique identique. Pourtant, au sein de cet organisme, chaque type cellulaire possède un profil d'expression génique qui lui est propre. En effet, sur les quelques 20.000 gènes du génome humain (Pennisi, 2007), seul un nombre limité est exprimé au sein d'un même type cellulaire. De plus, le taux d'expression de ces gènes diffère d'un type cellulaire à l'autre, selon la spécificité cellulaire ou l'influence environnementale notamment. La base de cette différence d'expression est la régulation spatio-temporelle de la transcription des gènes. Celle-ci implique de nombreuses interactions entre la chromatine, la machinerie basale de transcription et les facteurs de transcription.

2. La chromatine

2.1. Organisation chromatinienne

L'ADN génomique est organisé en une structure compacte appelée chromatine grâce à l'intervention de protéines histoniques (Figure 1). En effet, ces histones se rassemblent en un cylindre d'octamère constitué de deux hétérodimères des histones H2A et H2B et de deux hétérodimères des histones H3 et H4. Cet octamère d'histone est entouré de 146 paires de bases (pb) d'ADN génomique afin de former l'unité structurale de la chromatine, le nucléosome. L'agencement des nucléosomes le long de l'ADN s'organise sur environ 200 pb ; sur les quelques 50 pb séparant deux nucléosomes est fixée l'histone H1. Les queues N-terminales des histones H3 et H4 font saillie du corps globulaire de l'octamère d'histone. Elles comportent une grande proportion d'acides aminés basiques, qui sont chargés positivement. Cette propriété assure une interaction de forte affinité avec l'ADN qui est chargé négativement (Figure 2a) (Luger *et al.*, 1997 ; Dutnall *et al.*, 1997).

Une structure aussi compacte rend difficilement accessibles les sites de reconnaissance pour la machinerie basale de transcription ainsi que pour les facteurs de transcription. C'est pourquoi, pour initier la transcription, la chromatine doit être remodelée sous une forme décondensée par l'intermédiaire de modifications post-traductionnelles des histones.

2.2. Code des histones

Depuis de quelques années, il est devenu évident que la chromatine est une entité dynamique comportant des changements fréquents entre états transcriptionnellement actifs (euchromatine) et réprimés (hétérochromatine) (Mellor, 2006 ; Clayton *et al.*, 2006). Ces changements sont étroitement régulés de manière spatio-temporelle. Les queues N-terminales des histones sont le siège de nombreuses modifications post-traductionnelles telles que l'acétylation, la phosphorylation, la méthylation, l'ubiquitination ou la sumoylation (Figure 2b). Ces modifications, qualifiées également d'épigénétiques, agissent de manière séquentielle ou en combinaison pour former le code des histones. Ce code fournit des sites de liaison pour des protéines effectrices qui les interprètent afin de favoriser ou d'inhiber la transcription des gènes (Strahl *et al.*, 2000 ; Jenuwein *et al.*, 2001 ; Fischle *et al.*, 2003).

Parmi les résidus ciblés par les modifications post-traductionnelles des histones, la lysine est un élément clé étant donné qu'elle peut subir les processus d'acétylation, de méthylation, d'ubiquitination et de sumoylation. L'acétylation et la méthylation impliquent de petits groupements chimiques, tandis que l'ubiquitination et la sumoylation ajoutent de plus gros fragments et engendrent des changements plus profonds de la chromatine. Un autre degré de complexité provient du fait que la méthylation peut avoir lieu plusieurs fois sur la même lysine (mono-, di- ou triméthylation), ce qui augmente encore la diversité des fonctions biologiques (Bannister and Kouzarides, 2005 ; Berger, 2007).

Certaines modifications de lysine ont des résultats fonctionnels relativement clairs (Tableau 1). C'est le cas de l'acétylation qui est principalement liée à une activation de la transcription, même si la situation réelle, détaillée au paragraphe 4.2 ci-dessous, atteint des niveaux élevés de complexité. La sumoylation, quant à elle, semble entraîner majoritairement une répression. Par contre, la méthylation et l'ubiquitination ont des effets variables et dépendants du résidu et du contexte. Par exemple, la triméthylation de la lysine 4 de l'histone H3 intervient dans l'induction de gènes tandis que la triméthylation de la lysine 9 se déroule

au niveau de l'hétérochromatine, qui est transcriptionnellement inerte. De même, deux sites d'ubiquitination des histones H2A et H2B sont corrélés respectivement avec une transcription active et réprimée (Berger, 2007).

Les résidus sérine, thréonine et arginine des histones subissent également des modifications post-traductionnelles. La phosphorylation vise les sérines et thréonines alors que les arginines peuvent être mono- ou diméthylés. Ces modifications semblent en général liées à une transcription active (Berger, 2007).

Les conséquences fonctionnelles de ces modifications épigénétiques des histones peuvent être soit directes, causant des changements structurels de la chromatine, soit indirectes, agissant *via* le recrutement de protéines effectrices (Berger, 2007).

Il est important de noter que les modifications post-traductionnelles des histones sont réversibles. Les HDACs (histone désacétylases) retirent les groupements acétyle, les sérine/thréonine phosphatases enlèvent les groupements phosphate et les ubiquitine protéases détachent les résidus ubiquitines. La méthylation des arginines est altérée par des déiminases par conversion des arginines mono-méthylées en citrulline. Des lysine déméthylases ont récemment été identifiées : (i) la classe LSD1 (lysine-specific demethylase 1) regroupe des enzymes responsables du retrait des groupements mono-méthylés des résidus lysine, et (ii) les enzymes de la classe jumonji enlèvent les groupements di- ou tri-méthylés des résidus lysine (Bannister and Kouzarides, 2005 ; Berger, 2007).

2.3. Interdépendance de modifications épigénétiques des histones

Une commutation binaire a été mise en évidence entre deux types de modifications post-traductionnelles de l'histone H3 (Figure 2b, encadrés mauves, et Figure 3). Elle permettrait de faire basculer la chromatine entre ses états condensé, transcriptionnellement inactif, et décondensé, transcriptionnellement actif. Dans les régions non transcrites du génome, la lysine 14 et la sérine 10 restent non modifiées alors que la lysine 9 est méthylée. Cette forme méthylée de la lysine 9 sert de consensus de liaison à la protéine HP1, qui est impliquée dans la formation de l'hétérochromatine. Cette méthylation bloque la phosphorylation du résidu voisin, la sérine 10. Par contre, dans les régions transcriptionnellement actives du génome, la lysine 14 est acétylée et la sérine 10 est

phosphorylée. Cette phosphorylation de la sérine 10 empêche la méthylation de la lysine 9. D'un autre côté, l'acétylation de la lysine 9 ou de la lysine 14 se combinant à la phosphorylation de la sérine 10 est responsable d'une activation de la transcription (Berger, 2001 ; Jenuwein *et al.*, 2001 ; Fischle *et al.*, 2003 ; Eissenberg *et al.*, 2005). Il est donc primordial de prendre en compte l'ensemble des modifications épigénétiques des queues N-terminales des histones dans l'étude de la chromatine.

3. Phosphorylation des histones

Les études sur la phosphorylation des histones concernent principalement l'histone H3. La forme phosphorylée de la sérine 10 de l'histone H3 est associée à une activation de la transcription mais aussi à la condensation des chromosomes en mitose (Johansen and Johansen, 2006 ; Berger, 2007). Deux kinases principales sont connues pour phosphoryler la sérine 10 : IKK α (I κ B Kinase α) et MSK1 (Mitogen- and Stress-activated protein Kinase 1).

Une stimulation au TNF α (Tumor Necrosis Factor α) induit la phosphorylation de l'histone H3 sur la sérine 10 par IKK α au niveau de promoteurs régulés par le facteur de transcription NF- κ B, tels que *ikb α* (Anest *et al.*, 2003 ; Yamamoto *et al.*, 2003 ; Gloire *et al.*, 2006a). La protéine MSK1 phosphoryle également ce résidu suite à un traitement à l'EGF (Epidermal Growth Factor) ou au TPA (Tetradecanoylphorbol Acetate) mais pas au TNF α (Strelkov and Davie, 2002 ; Duncan *et al.*, 2006). Dans chacun des cas, l'interaction avec CBP {CREB (cAMP Responsive Element Binding) Binding Protein} est favorisée permettant l'acétylation de l'histone H3 et l'activation de la transcription (Cheung *et al.*, 2000 ; Yamamoto *et al.*, 2003). MSK1 est également responsable de la phosphorylation de la sérine 28 de l'histone H3 (Zhong *et al.*, 2001 ; Dyson *et al.*, 2005).

4. Acétylation/désacétylation des histones

Les niveaux de base de l'acétylation des histones sont régis par un équilibre dynamique entre les activités opposées de deux types d'enzymes : les histone acétyltransférases (HATs) et les histone désacétylases (HDACs) (Vogelauer *et al.*, 2000 ; Eberharter and Becker, 2002).

Il existe deux principales familles de HATs regroupées selon leur homologie de séquence : (i) GNAT (Gcn5-related N-acetyltransferases), incluant PCAF (CBP/p300 associated factor) et (ii) MYST (MORF-Ybf2-Sas2-TIP60). Plusieurs facteurs liés à la transcription possèdent également une activité HAT, sans pour autant posséder d'homologie entre eux ou avec une des deux familles précitées. Cette « classe orpheline » comporte des protéines telles que CBP/p300, TAF_{II}250 {TBP (TATA Binding Protein) Associated Factor} et SRC-1 (Steroid Receptor Coactivator). Parmi toutes les HATs, CBP/p300 est actuellement l'une des plus puissantes et versatiles. La caractéristique commune aux HATs est leur domaine acétyltransférase (Figure 4). Les HATs de la famille GNAT et CBP/p300 contiennent également un bromodomaine impliqué dans la reconnaissance et la fixation des résidus lysine acétylés. La famille MYST semble quant à elle posséder un motif à doigt de zinc. La figure 5 représente diverses HATs ciblant les trois principaux résidus lysine de la queue N-terminale de l'histone (Sterner and Berger, 2000 ; Lee and Workman, 2007).

Les quatre classes de HDACs seront détaillées au paragraphe 5 ci-dessous.

4.1. Rôles de l'acétylation des histones

L'acétylation des histones consiste en un transfert réversible d'un groupement acétyle sur les résidus lysine de leurs queues N-terminales. Elle régule de nombreux processus cellulaires et engendre, *via* des sites d'acétylation singuliers ou combinés, différentes issues telles que l'assemblage des nucléosomes, la condensation de la chromatine et son repliement ainsi que la transcription des gènes (Shahbazian and Grunstein, 2007).

L'assemblage des nucléosomes est rendu possible par l'intervention de protéines chaperones qui ciblent spécifiquement les histones nouvellement synthétisées. Les nouvelles protéines histoniques sont produites durant la phase de synthèse (S) du cycle cellulaire, quand l'ADN est répliqué. Après leur synthèse, les histones sont rapidement acétylées, leur permettant d'être reconnues par les protéines chaperones. Celles-ci protégeraient les résidus acétylés de l'action des HDACs jusqu'à l'intégration dans la structure nucléosomique. Immédiatement après l'empaquetage en nucléosome, les histones sont désacétylées (Verreault, 2000 ; Shahbazian and Grunstein, 2007).

Un autre rôle pour l'acétylation des histones est de contrôler le degré de condensation de la chromatine. En effet, cette acétylation a pour conséquence la neutralisation de la charge positive portée par les histones. On assiste donc à une diminution de l'interaction entre les queues N-terminales des histones et l'ADN, mais également entre nucléosomes voisins. La chromatine adopte alors une conformation décondensée, relâchée (Angelov *et al.*, 2001 ; Shahbazian and Grunstein, 2007).

Une troisième application de l'acétylation des histones découle du fait qu'elle se révèle être un événement critique de la transcription des gènes. Les histones peuvent être acétylées et désacétylées de deux manières différentes pour réguler la transcription des gènes. Dans la première, les HATs et les HDACs sont recrutés aux séquences promotrices des gènes par des activateurs ou des répresseurs de la transcription, respectivement. Par ailleurs, les HATs comme les HDACs fonctionnent de façon globale en parcourant aléatoirement le génome et en ne ciblant pas de promoteur spécifique. Ces deux types de régulation des phénomènes d'acétylation/désacétylation, ciblée ou globale, affectent les niveaux de transcription des gènes (Kuo *et al.*, 1997 ; Shahbazian and Grunstein, 2007).

4.2. Dynamisme de la chromatine

D'un point de vue général, l'acétylation des histones par les HATs favorise la transcription des gènes en diminuant les interactions histones/ADN, ce qui facilite la liaison à l'ADN des facteurs de transcription et de la machinerie basale de la transcription. Par contre, les HDACs, désacétylant les histones, rendent l'ADN inaccessible et entraînent une répression de la transcription (Figure 6) (Berger, 2001 ; Narlikar *et al.*, 2002). Il existe donc une corrélation entre l'hyperacétylation des histones et l'activation de la transcription ainsi qu'entre l'hypoacétylation et la répression.

Cependant, la réalité est plus complexe et reflète une chromatine très dynamique. En effet, dans de nombreuses situations, on remarque que cette corrélation est hâtive et ne correspond qu'à la partie émergée de l'iceberg.

Des données récentes réalisées sur gènes transcriptionnellement actifs démontrent un rôle non négligeable des HDACs. En effet, certains gènes nécessitent une désacétylation des histones pour être transcrits. Ils sont caractérisés par un turnover très rapide

d'acétylation/désacétylation qui implique un recrutement d'HDACs dans le but de préparer une répression immédiate. Cela pourrait expliquer que l'acétylation est à peine détectable. Les activités des HATs aussi bien que des HDACs sont donc requises afin d'assurer une transcription correcte. Dans le cas des complexes comprenant Rpd3, la désacétylation permet de réprimer les initiations aberrantes situées dans la région codante (Carrozza *et al.*, 2005 ; Clayton *et al.*, 2006 ; Shahbazian and Grunstein, 2007).

Le rôle des HATs et des HDACs dans la transcription implique des mécanismes très subtils, dépendant notamment des résidus ciblés ainsi que des complexes multiprotéiques.

4.3. Complexes multiprotéiques

L'action cumulative des HATs et des HDACs au niveau des gènes actifs et réprimés est un déterminant critique de la liaison de protéines effectrices et de la transcription des gènes. C'est pourquoi il est important de prendre en compte les facteurs qui régulent les préférences des HATs et des HDACs pour une histone et une lysine données. La plupart du temps, les HATs et HDACs n'agissent pas seules mais sous forme de complexes multiprotéiques. Dans de nombreux cas, les complexes dans lesquels ces enzymes résident déterminent la préférence de substrat ou l'interaction avec d'autres facteurs et affectent donc leurs fonctions. En effet, chaque complexe contient une série de sous-unités ne comportant pas d'activité acétyltransférase. Ces sous-unités peuvent interagir avec différents activateurs spécifiques qui amènent les complexes aux divers gènes cibles (Narlikar *et al.*, 2002 ; Shahbazian and Grunstein, 2007).

La HAT de levure Gcn5 fait partie de plusieurs complexes, tels que SAGA, SLIK et ADA. Une grande homologie entre les protéines humaines GCN5 et PCAF témoigne du fait qu'elles donc font partie de complexes multiprotéiques similaires, impliquant une potentielle redondance. Elles sont capables d'interagir toutes deux avec CBP/p300. Ces complexes co-activateurs favorisent l'activation de la transcription. La HAT humaine TIP60, appartenant à la famille MYST, intervient dans un complexe qui joue un rôle important dans la réparation de l'ADN et l'apoptose. La famille des récepteurs nucléaires p160 regroupe les co-activateurs SRC-1, SRC-2 et SRC-3 (Sternier and Berger, 2000 ; Ikura *et al.*, 2000 ; Narlikar *et al.*, 2002 ; Lee and Workman, 2007).

Les co-répresseurs, comme le SMRT (silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor) et le N-CoR (nuclear hormone receptor corepressor), interviennent dans les complexes Sin3, NuDR ou CoREST. Ils participent à la répression de la transcription en recrutant, dans ces complexes, des HDACs et leur activité désacétylase. Par exemple, HDAC3 représente la sous-unité catalytique de différents complexes et les autres sous-unités tendent à réguler l'activité désacétylase et la spécificité du substrat de HDAC3 (Lee *et al.*, 2000 ; Wen *et al.*, 2000 ; Guenther *et al.*, 2001 ; Narlikar *et al.*, 2002).

Il reste encore à déterminer la façon dont la cellule régule l'abondance et la distribution de ces différents complexes afin de fournir les fonctions appropriées au bon endroit et au bon moment.

4.4. Acétylation des protéines non-histoniques

Des analyses phylogénétiques ont démontré que l'apparition des HDACs précède l'évolution des histones. Cela implique la probabilité que l'activité primaire de ces HDACs était dirigée contre des substrats non-histoniques (Gregoretti *et al.*, 2004). En effet, de nombreuses études ont mis en évidence une multitude de substrats non-histoniques pour les HATs et les HDACs (Figure 7). On retrouve notamment des composants du cytosquelette (α -tubuline, actine), des facteurs de transcription (p53, p65, pRB), des protéines chaperones (HSP90, HSP70), des kinases et des phosphatases (c-Abl tyrosine kinase, PTEN phosphatase), des facteurs de l'apoptose (Ku70), des protéines virales (Tat du HIV), des enzymes impliquées dans la réparation de l'ADN (ADN glycosylase, NBS1), et bien d'autres encore. Les phénomènes d'acétylation modifient les fonctions de protéines non-histoniques en influant sur : (i) l'interaction entre protéines, (ii) le potentiel transactivateur, (iii) la liaison à l'ADN, (iv) la localisation subcellulaire, ou encore (v) la stabilité de la protéine (Lee and Workman, 2007 ; Glozak and Seto, 2007 ; Yang and Seto, 2007).

Une des cibles non histoniques de l'acétylation est l' α -tubuline qui est désacétylée par HDAC6. Cela entraîne la dépolymérisation des microtubules et favorise la migration cellulaire. Ce caractère est à prendre en compte dans la prévention contre l'angiogénèse et les métastases par l'utilisation d'inhibiteur de HDACs (Matsuyama *et al.*, 2002 ; Hubbert *et al.*, 2002 ; Zhang *et al.*, 2003).

Certains facteurs de transcription voient également leurs fonctions modulées par l'acétylation (Glozak *et al.*, 2007). C'est le cas de p53 qui est un acteur important du contrôle du cycle cellulaire et de l'apoptose. L'acétylation de p53 dans sa partie C-terminale augmente sa capacité de liaison à l'ADN et donc sa capacité à activer ses gènes cibles (Gu and Roeder, 1997). En outre, sous sa forme acétylée, p53 voit sa stabilité accroître. Cela peut être expliqué par le fait que les lysines acétylées ne sont donc plus ubiquitinables, empêchant la dégradation de la protéine par le protéasome. Mdm2, l'ubiquitine ligase E3, recrute HDAC1 afin de désacétyler p53, de faciliter son ubiquitination et sa dégradation (Ito *et al.*, 2002). L'activation de p53 par différents types de dommages à l'ADN nécessite son acétylation. Par exemple, les dommages à l'ADN causés par les agents alkylants induisent l'acétylation de p53 sur la lysine 320 (Figure 8). Cela permet d'activer les gènes qui ont des sites de liaison de forte affinité pour p53, incluant p21 qui est impliqué dans l'arrêt du cycle cellulaire. Par contre, les dommages à l'ADN provoqués par l'inhibition de la topoisomérase II entraînent l'acétylation de p53 sur la lysine 373. Les gènes qui ont des sites de liaison de faible affinité pour p53 sont alors activés, tels que Bax qui promeut l'apoptose (Knights *et al.*, 2006).

La durée d'activation du facteur de transcription NF- κ B est également régulées par l'acétylation (cfr paragraphe 7.8.2) (Chen *et al.*, 2003 ; Quivy and Van Lint, 2004).

5. HDACs

Dans ce paragraphe, les HDACs font l'objet d'une description plus détaillée visant à mettre en évidence leurs rôles biologiques et leurs implications éventuelles dans le développement de cancers.

5.1. Description des HDACs

5.1.1. Classification

Les dix-huits HDACs connues à ce jour ont été réparties en quatre classes distinctes selon leur homologie aux histone désacétylases de levure (Tableau 2). Elles peuvent également être regroupées en deux familles en fonction de la dépendance au cofacteur : la classique et la « silent information regulator 2 (Sir-2)-related protein » (sirtuin). La première

famille, impliquant les classes I, II et IV, requiert l'ion Zn^{2+} comme cofacteur, tandis que la seconde, correspondant à l'unique classe III, est dépendante l'ion NAD^+ (De Ruijter *et al.*, 2003 ; Thiagalingam *et al.*, 2003 ; Verdin *et al.*, 2003).

La classe I comporte une homologie de séquence avec la protéine Rpd3 de levure. Elle contient les HDAC1, 2, 3 et 8 qui ont une longueur comprise entre 350 et 500 acides aminés (De Ruijter *et al.*, 2003 ; Thiagalingam *et al.*, 2003).

La classe II réunit les HDAC4, 5, 7, 9 (classe IIa) et HDAC6 et 10 (classe IIB) qui sont toutes homologues à la protéine HDA1 de levure. La taille de ces HDACs équivaut approximativement au double de celle des HDACs de classe I et varie de 650 à 1250 acides aminés (De Ruijter *et al.*, 2003 ; Thiagalingam *et al.*, 2003 ; Verdin *et al.*, 2003).

La classe III rassemble les histone désacétylases SIRT1-7 par une homologie à la protéine Sir2 de levure. Elles sont également appelées sirtuins et leur taille est située entre 300 et 750 acides aminés. Leur domaine catalytique fonctionne comme une désacétylase à lysine dépendante du NAD^+ , mais également en tant que mono-ADP-ribosyltransférase (De Ruijter *et al.*, 2003 ; Thiagalingam *et al.*, 2003 ; Saunders and Verdin, 2007).

HDAC11 est actuellement le seul membre de la classe IV et partage des propriétés avec les classes I et II (De Ruijter *et al.*, 2003 ; Thiagalingam *et al.*, 2003 ; Verdin *et al.*, 2003).

Toutes les HDACs possèdent un seul domaine catalytique à l'exception des HDAC6 et 10 qui en contiennent deux. Cependant, ce deuxième domaine semble être non fonctionnel chez HDAC10 (Gallinari *et al.*, 2007).

5.1.2. Localisation

Les HDACs de la classe I sont exprimées de manière ubiquiste dans tous les types cellulaires et tissus. Elles se localisent généralement dans le noyau, même si HDAC3 se retrouve également dans le cytoplasme (Figure 9) (De Ruijter *et al.*, 2003 ; Thiagalingam *et al.*, 2003). En effet, HDAC3 peut être séquestré dans le cytoplasme par $I\kappa B\alpha$, l'inhibiteur du facteur de transcription NF- κB , dont l'analyse est détaillée au paragraphe 7. Après la dégradation d' $I\kappa B\alpha$ en réponse à la cytokine pro-inflammatoire TNF α , HDAC3 est sujet à

une translocation nucléaire, entraînant une augmentation de ces activités nucléaires (Viatour *et al.*, 2003 ; Gao *et al.*, 2006).

Les HDACs de la classe II sont capables de voyager entre le noyau et le cytoplasme en réponse à certains signaux cellulaires. L'expression de ces HDACs est différente selon les tissus concernés, avec des niveaux plus élevés dans le cœur, le cerveau et les muscles squelettiques (De Ruijter *et al.*, 2003 ; Thiagalingam *et al.*, 2003).

Les sirtuins regroupées dans la classe III des HDACs se retrouvent aussi bien dans le noyau que dans le cytoplasme (Saunders and Verdin, 2007).

HDAC11, l'unique membre de la classe IV, se situe principalement dans le noyau, comme les HDACs de la classe I. Par contre, à l'image des HDACs de la classe II, elle est exprimée différemment dans le cœur, le cerveau et les muscles squelettiques (De Ruijter *et al.*, 2003 ; Thiagalingam *et al.*, 2003).

5.2. Mécanisme d'action des HDACs

Le mécanisme d'action des HDACs implique le retrait du groupement acétyle. Le domaine catalytique des HDACs de classe I, II et IV est formé d'environ 390 acides aminés conservés (Figure 10). Chez les HDACs de classe III, il est d'environ 275 acides aminés. Le site actif consiste en une poche catalytique dans lequel s'insère soit un ion Zn^{2+} requis pour les HDACs des classes I, II et IV, soit un ion NAD^+ pour les sirtuins de la classe III (De Ruijter *et al.*, 2003 ; Saunders and Verdin, 2007).

5.3. Régulation des activités des HDACs

Etant donné la multitude de substrats histoniques et non histoniques, les HDACs sont des régulateurs essentiels pour des processus cellulaires, tels que l'expression des gènes, la croissance cellulaire, la survie, la différenciation et la prolifération (Kouzarides, 1999 ; Lehrmann *et al.*, 2002 ; Lagger *et al.*, 2003 ; Glozak and Seto, 2007). Il est donc crucial pour la cellule que leurs activités soient étroitement contrôlées par de multiples mécanismes : (i) interaction entre protéines, (ii) modifications post-traductionnelles (phosphorylation,

sumoylation), (iii) localisation subcellulaire, (iv) contrôle de l'expression, (v) disponibilité du cofacteur, et (vi) clivage protéolytique (Sengupta and Seto, 2004 ; Gallinari *et al.*, 2007). Malgré ces nombreux points de contrôle, une expression ou une activité aberrante des HDACs apparaît fréquemment dans les cellules cancéreuses. En effet, des déséquilibres dans les processus d'acétylation/désacétylation des protéines histoniques et non-histoniques ont un impact non-négligeable dans le développement de cancers (Johnstone, 2002 ; Dokmanovic and Marks, 2005 ; Glozak and Seto, 2007).

6. Inhibiteurs de HDACs (HDACi)

6.1. Description des HDACi

Vu le rôle majeur que les HDACs peuvent jouer, par un dysfonctionnement, dans le développement de cancers, les HDACi font l'objet de nombreuses études. Les premiers découverts sont des composés naturels comme le butyrate et la trichostatin A (TSA) (Tableau 3 et figure 10). Progressivement, des composés artificiels prometteurs ont été synthétisés. A ce jour, les inhibiteurs sont divisés en quatre classes : (i) acide aliphatique (butyrate, valproate), (ii) acide hydroxamique {TSA, suberoyanilide hydroxamic acid (SAHA ou Vorinostat ou Zolinza)}, (iii) peptide cyclique (depsipeptide ou FK-228, trapoxin), et (iv) benzamide (MS-275) (Kelly *et al.*, 2002 ; Thiagalingam *et al.*, 2003 ; Xu *et al.*, 2007).

L'activité désacétylase du butyrate a été découverte à la fin des années septante, c'est un inhibiteur non spécifique des HDACs. Tout comme le valproate, il fait partie des acides aliphatiques et cible les HDACs de classe I et IIa (Candido *et al.*, 1978 ; Thiagalingam *et al.*, 2003 ; Yang and Seto, 2007).

Il y a une vingtaine d'années, la TSA a été identifiée comme le premier inhibiteur spécifique. C'est un produit de fermentation de *Streptomyces*. A l'origine, la TSA était utilisée comme agent anti-fongique. Ce n'est que par après que l'on a découvert ses propriétés inhibitrices de la prolifération des cellules cancéreuses grâce à son action inhibitrice de HDACs. Elle est alors devenue un des outils principaux de la recherche sur l'acétylation des histones. Avec le SAHA, elles appartiennent à la classe des acides hydroxamiques. La TSA inhibe les classes I et II des HDACs (Yoshida *et al.*, 1990 ; De Ruijter *et al.*, 2003 ; Thiagalingam *et al.*, 2003 ; Gallinari *et al.*, 2007 ; Yang and Seto, 2007) alors que le groupe

de Dokmanovic (2007) a récemment démontré la spécificité du SAHA pour HDAC7, contrairement aux indications de la figure 10.

La classe des peptides cycliques comporte notamment le depsipeptide qui inhibe les HDAC1 et 2. Et enfin, dans la classe des benzamides, on retrouve le MS-275 ciblant les HDAC1, 2 et 3 (Xu *et al.*, 2007).

L'action des HDACi est réversible, sauf pour la trapoxin qui bloque irréversiblement les HDACs par la liaison covalente du groupement époxyétone (Furumai *et al.*, 2001).

Le butyrate et le valproate sont utilisés à des concentrations millimolaires, le SAHA et le MS-275 à des concentrations de micromolaires, et la TSA et le depsipeptide à des concentrations nanomolaires (Xu *et al.*, 2007). Les HDACi présentés dans le tableau 3 ont atteint la phase II d'essais cliniques, à l'exception de la TSA qui ne fait pas partie d'étude clinique. Le SAHA vient même d'être approuvé en 2006 par la « Food and Drugs Administration » (FDA) pour l'utilisation clinique sur des patients cancéreux atteints de lymphome cutané des cellules T (Riester *et al.*, 2007 ; Xu *et al.*, 2007).

La plupart des inhibiteurs touche une large série d'HDACs. Cependant, il pourrait être intéressant de recourir à une inhibition sélective. La tubacine a été mise en évidence pour sa capacité d'inhiber spécifiquement, et de manière réversible, l'activité d'HDAC6. Elle induit l'accumulation d' α -tubuline acétylée, et ce, sans affecter l'acétylation des histones, ni la progression du cycle cellulaire (Matsuyama *et al.*, 2002 ; Hubbert *et al.*, 2002 ; Zhang *et al.*, 2003). Le SAHA semble spécifique d'HDAC7 et le PCI-34051 aurait un rôle ciblé sur HDAC8 (Dokmanovic *et al.*, 2007 ; Balasubramanian *et al.*, 2008).

Les HDACs de la classe III sont insensibles aux inhibiteurs classiques mais sont inhibés par le nicotinamide (Saunders and Verdin, 2007).

6.2. Mécanisme d'inhibition des HDACi

Les HDACi fonctionnent en bloquant l'accès au site catalytique de manière réversible, à l'exception de la trapoxin. Les détails structuraux des interactions entre HDACi et leur substrat ont été élucidés par l'étude d'un homologue de HDAC (HDLP, HDAC-like protein) avec la TSA et le SAHA (Finnin *et al.*, 1999). Plus récemment, la structure cristallisée du

complexe entre HDAC8 et un acide hydroxamique a été résolue (Somoza *et al.*, 2004). Ces études favorisent la compréhension de la structure tridimensionnelle du site catalytique des HDACs et apportent un aperçu du mécanisme de désacétylation de substrats acétylés sur lysine. Il existe une interaction directe entre l'inhibiteur et le site actif composé de l'ion Zn^{2+} . L'accès au site actif étant bloqué, l'activité désacétylase est donc inhibée (Kelly *et al.*, 2002 ; De Ruijter *et al.*, 2003 ; Thiagalingam *et al.*, 2003 ; Dokmanovic and Marks, 2005).

6.3. « Pas de généralités »

De manière intéressante, moins de 10% des gènes voient leur expression modulée par l'inhibition des HDACs. En outre, il apparaît que cette inhibition ne conduit pas seulement à une activation des gènes mais également à une répression, et ce, en fonction de la nature du gène (Van Lint *et al.*, 1996 ; Glaser *et al.*, 2003 ; Nusinzon and Horvath, 2005 ; Hildmann *et al.*, 2007). Par exemple, il a été démontré que l'utilisation de TSA ou de SAHA entraînait une augmentation de l'expression de p21 accompagnée d'une diminution de l'expression de la thymidylate synthétase. Le premier étant un inhibiteur de CDK et le deuxième impliqué dans la synthèse de l'ADN, on obtient une convergence vers l'arrêt du cycle cellulaire (Glaser *et al.*, 2003). On peut également citer l'exemple des gènes dépendant de STAT5 qui sont réprimés par un inhibiteur de HDACs (TSA) étant donné que l'activation transcriptionnelle médiée par STAT5 nécessite une activité désacétylase (Rasclé *et al.*, 2003). La répression de la transcription du récepteur à l'androgène (AR) induite par l'utilisation d'inhibiteurs de HDACs (TSA et butyrate) résulte de l'induction d'un complexe suppresseur (Wang *et al.*, 2004). L'altération de la transcription d'un gène par un inhibiteur de HDAC semble être déterminée par la composition spécifique du complexe de facteurs liés à la transcription, incluant les HDACs.

Dans le cas où une hyperacétylation stable est requise pour une induction de gène efficace, l'inhibition des HDACs produisant une hyperacétylation localisée serait supposée augmenter l'expression des gènes. Inversement, pour les gènes requérant un turnover d'acétylation rapide (cfr paragraphe 4.2), l'inhibition des HDACs, malgré l'hyperacétylation, devrait inhiber l'expression des gènes en anéantissant le turnover. En effet, ce deuxième cas de figure a récemment été démontré pour un certain nombre de gènes comme *c-fos* et *c-jun* (Hazzalin and Mahadevan, 2005 ; Clayton *et al.*, 2006).

6.4. Effets des HDACi sur les processus cellulaires – Importance en cancérologie

Les HDACi représentent une classe prometteuse d'agents anticancéreux. L'utilisation des HDACi a permis de démontrer que des altérations de fonction ou d'expression des HDACs sont étroitement impliquées dans les processus d'initiation et de progression du cancer. En effet, ils favorisent la prolifération mais inhibent la différenciation et l'apoptose (initiation). Ces HDACs participent également à l'angiogénèse et à la migration cellulaire tandis qu'ils diminuent l'adhésion cellulaire (progression) (Figure 11). De manière globale, les HDACi enlèvent la répression d'un promoteur donné. Dans les cellules cancéreuses, les gènes réprimés sont souvent des suppresseurs de tumeurs, des inhibiteurs du cycle cellulaire, des facteurs de différenciation ou des inducteurs de l'apoptose (Kelly *et al.*, 2002 ; Glozak *et al.*, 2007).

6.4.1. Voies cellulaires anti-tumorales induites par les HDACi

6.4.1.1. Arrêt du cycle cellulaire

La restriction de la prolifération cellulaire est un évènement critique dans la prévention contre le cancer. Les HDACi ont la capacité de limiter cette prolifération *via* notamment l'induction de l'expression de deux facteurs importants pour la régulation de la croissance cellulaire, p21 et TGF- β (Transforming Growth Factor- β) (Figure 12) (Glozak *et al.*, 2007).

L'inhibiteur de CDK, p21, est une des cibles des HDACi les mieux étudiées. Le traitement de plusieurs types de cellules cancéreuses avec différents HDACi engendre l'augmentation de la transcription de ce gène à action anti-proliférative. Cette expression de p21 est indépendante de p53 et est corrélée avec une hyperacétylation des histones H3 et H4 dans sa région promotrice. On remarque aussi une réduction marquée de la liaison de HDAC1 et de c-myc (inhibiteur de p21) sur le promoteur de p21, accompagnée d'une augmentation du recrutement de l'ARN Polymérase II. L'inhibition de CDK par p21 entraîne l'arrêt du cycle cellulaire et le blocage de la prolifération (Sambucetti *et al.*, 1999 ; Richon *et al.*, 2000 ; Gui *et al.*, 2004 ; Li and Wu, 2004 ; Ocker and Schneider-Stock, 2007).

Dans les cellules normales, TGF- β inhibe la croissance cellulaire. TGF- β II fixe le ligand TGF- β , et TNF- β I transmet le signal par l'activation des membres de la famille Smad. Cependant, les cellules cancéreuses sont réfractaires à l'effet inhibiteur du TGF- β , la plupart du temps, en raison d'une perte des récepteurs au TGF- β (TGF- β R). On assiste donc à une prolifération anormale des cellules cancéreuses. L'utilisation de HDACi induit l'expression des deux sous-unités du TGF- β R afin de restaurer un contrôle sur la prolifération cellulaire (Osada *et al.*, 2001 ; Ammanamanchi and Brattain, 2004).

En plus des effets sur l'expression des gènes, l'accumulation d'histones acétylés induite par les HDACi peut influencer la progression dans le cycle cellulaire, en altérant la capacité des cellules tumorales de subir la mitose (Figure 12). Pour rappel (cfr paragraphe 4.1), l'état d'acétylation des histones est important pour la formation des nucléosomes durant la synthèse d'ADN. Une augmentation des histones acétylés durant les phases S (synthèse d'ADN) et G2 (pré-mitose) du cycle cellulaire peut activer un contrôle en G2. Cela induit un arrêt des cellules en phase G2. La perte de ce contrôle en G2 apparaît fréquemment dans le développement de cancers. Cela peut être pris en compte pour la sensibilité accrue des cellules cancéreuses comparées aux cellules normales face aux effets pro-apoptotiques des HDACi (Warrener *et al.*, 2003 ; Dokmanovic and Marks, 2005).

6.4.1.2. Différenciation

La perte d'expression de gènes impliqués dans la régulation de la prolifération est un caractère commun des cellules cancéreuses. L'inhibition de la différenciation cause également une prolifération inappropriée pouvant conduire au cancer. Par exemple, la perte d'expression des facteurs de différenciation de la famille GATA est observée dans plusieurs types de cancers. L'utilisation de la TSA restaure l'expression de ces facteurs de différenciation et de leurs cibles, dont le suppresseur de tumeur Dab2, et ce, grâce à une hyperacétylation des histones H3 et H4 de leurs promoteurs (Figure 12) (Caslini *et al.*, 2006 ; Glozak *et al.*, 2007).

6.4.1.3. Apoptose

Une caractéristique intéressante des HDACi vient du fait qu'il favorise l'apoptose. Il existe deux types d'apoptose : la voie extrinsèque et la voie intrinsèque (Figure 12).

La voie extrinsèque est initiée par la fixation de ligands tels que FasL, TNF α (Tumor Necrosis Factor α) ou TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) sur leurs « récepteurs de la mort » respectifs : Fas, récepteur au TNF (TNFR-1) ou récepteur à TRAIL. Ces diverses liaisons conduisent à l'activation des caspase-8 et caspase-10. Les HDACi sont capables d'augmenter l'expression des récepteurs et des ligands dans les cellules transformées mais pas dans les cellules normales (Ashkenazi, 2002 ; Nakata *et al.*, 2004 ; Insinga *et al.*, 2005).

La voie intrinsèque d'apoptose est médiée par le relargage de protéines mitochondriales, comme le cytochrome c ou AIF (apoptosis inducing factor), avec pour conséquence l'activation de caspases. Ce phénomène est régulé en partie par les protéines pro- et anti-apoptotiques de la famille bcl-2 (Jiang and Wang, 2004). D'une part, les HDACi augmentent les facteurs pro-apoptotiques (notamment Bim, Bax) et d'autre part, diminuent les facteurs anti-apoptotiques (notamment Bcl-2, Bcl-X_L) (Zhang *et al.*, 2004 ; Xu *et al.*, 2006). Des études approfondies démontrent que Bax est séquestré dans le cytoplasme par Ku70. L'acétylation de Ku70 par CBP et PCAF libère Bax qui migre vers la mitochondrie et initie l'apoptose. Le traitement de plusieurs types cellulaires par des HDACi favorise donc une apoptose dépendante de Bax (Cohen *et al.*, 2004 ; Subramanian *et al.*, 2005).

6.4.1.4. Angiogénèse

Outre qu'ils régulent les gènes impliqués dans l'initiation de cancer, les phénomènes d'acétylation et de désacétylation modulent les gènes responsables de la progression du cancer. Cela inclut le contrôle de l'angiogénèse. Les propriétés anti-angiogéniques des HDACi se manifestent par une diminution de l'expression des gènes pro-angiogéniques, tels que le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) ou le HIF-1 α (Hypoxia-Inducible Factor-1 α). Les HDACi jouent donc un rôle important dans la suppression de la néovascularisation des tumeurs en altérant les gènes directement impliqués dans l'angiogénèse (Deroanne *et al.*, 2002 ; Bolden *et al.*, 2006).

6.4.1.5. Migration cellulaire

La migration cellulaire est un déterminant important pour la formation de métastases du cancer. HDAC6 joue un rôle critique dans la migration cellulaire étant donné qu'il

désacétyle la tubuline (Figure 12). L'hyperacétylation des microtubules est corrélée à une grande stabilité et à une forte adhésion cellulaire, tandis que les microtubules sont plus dynamiques sous leur forme hypoacétylée. Il a été démontré qu'HDAC6 désacétyle directement l' α -tubuline, entraînant la dépolymérisation des microtubules, nécessaire à la migration cellulaire. Par conséquent, l'inhibition d'HDAC6 permet de prévenir la migration cellulaire, et donc les métastases, mais également d'augmenter l'adhésion cellulaire (Haggarty *et al.*, 2003 ; Tran *et al.*, 2007).

6.4.2. Spécificité des cellules tumorales

Les drogues chimiothérapeutiques conventionnelles ciblent les cellules en prolifération, se basant souvent sur de petites différences entre les cellules tumorales et les cellules normales. Par contre, les HDACi ont une cytotoxicité sélective, tuant les cellules tumorales et immortalisées, alors que les cellules normales apparaissent résistantes. En outre, ces inhibiteurs sont effectifs sur les cellules cancéreuses en prolifération mais également sur les non proliférantes qui ont un indice mitotique faible (Burgess *et al.*, 2004).

Les bases de la résistance relative des cellules normales aux HDACi comparées aux cellules tumorales ne sont pas exactement définies. La façon de réagir, des cellules transformées, aux HDACi semble être déterminée principalement par le type cellulaire, mais également par la structure et la concentration de l'HDACi. Les HDACi peuvent avoir un effet cytotoxique sur les cellules tumorales (prolifératrices et non prolifératrices), alors que les cellules normales peuvent être dix fois plus résistantes (Ungerstedt *et al.*, 2005). Cependant, l'accumulation des histones acétylées se déroule aussi bien dans les deux types cellulaires. La capacité d'inhibition de l'activité des HDACs est donc similaire (Marks *et al.*, 2001).

Une qualité importante des HDACi est leur capacité à induire la mort des cellules cancéreuses à des concentrations pour lesquelles les cellules normales sont relativement résistantes. En outre, le SAHA possède une réversibilité d'action relativement rapide. Cela implique que les cellules normales seraient capables de compenser les changements induits par les HDACi de manière plus efficace que les cellules cancéreuses (Xu *et al.*, 2007).

Une hypothèse expliquant cette spécificité tumorale a été formulée récemment. Elle se base sur l'accumulation de ROS (Figure 13) (Ungerstedt *et al.*, 2005 ; Dokmanovic and

Marks, 2005). La protéine Trx (Thioredoxin) est un antioxydant par sa propriété de capter les ROS. Elle peut aussi inhiber ASK1 (Apoptosis Signaling Kinase 1), qui lui-même est un inducteur de l'apoptose *via* JNK (Janus N-terminal Kinase) et p38. L'activation de Trx inhibe donc l'apoptose. La protéine TBP-2 (Trx Binding Protein-2) est capable de se lier à Trx pour l'inhiber. Dans le cas des cellules tumorales, l'utilisation de HDACi donne lieu à une augmentation de TBP-2 et donc à une inhibition de Trx. N'étant plus bloqués par Trx, les ROS s'accumulent. L'inhibition de Trx entraîne également une augmentation d'ASK1 qui induit l'apoptose des cellules tumorales. Par contre et paradoxalement, dans le cas des cellules normales, aucune augmentation de TBP-2 n'est induite par des HDACi. L'activité antioxydante de Trx est donc favorisée n'entraînant pas d'accumulation de ROS. En outre, Trx, *via* son action inhibitrice d'ASK1, empêche l'apoptose et permet donc la survie des cellules normales. L'impact de Trx pourrait donc être un déterminant essentiel de la résistance des cellules à la mort cellulaire induite par les HDACi.

7. Le facteur de transcription NF- κ B

7.1. Généralités

En 1986, un facteur nucléaire a été découvert dans les cellules B grâce à sa capacité à favoriser la transcription de la chaîne légère kappa (κ) des immunoglobulines (Sen and Baltimore, 1986). Il a dès lors été nommé de NF- κ B (Nuclear Factor- κ B). Par la suite, l'observation de sa présence dans de nombreux types cellulaires lui conféra son caractère ubiquitaire chez les eucaryotes. Le facteur de transcription NF- κ B est un élément clé dans la régulation de l'expression de gènes impliqués dans l'immunité innée et adaptative mais aussi dans la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire (Baeuerle and Henkel, 1994 ; Baldwin, 1996 ; Bonizzi and Karin, 2004).

La particularité de ce facteur de transcription réside en sa rapidité d'activation. Cette vitesse d'exécution se base sur le fait qu'il est séquestré dans le cytoplasme des cellules normales par une interaction avec une protéine inhibitrice de la famille I κ B. Suite à la réception d'un signal approprié, l'activation du NF- κ B requiert la dégradation de son inhibiteur afin de transactiver ses gènes cibles dans le noyau. Cette séquestration dans le cytoplasme permet la disponibilité immédiate du facteur de transcription, sans avoir recours à

une synthèse de protéine. Ce profil d'activation inductible existe dans la plupart des cellules, à l'exception de certains types cellulaires (kératinocytes et cellules B) dans lesquelles NF- κ B est trouvé dans le noyau sous une forme constitutivement activée (Baldwin, 1996 ; Karin and Ben-Neriah, 2000).

7.2. Inducteurs du NF- κ B

Il existe une multitude de stimuli qui induisent l'activation du NF- κ B (Baeuerle and Henkel, 1994 ; Karin and Ben-Neriah, 2002 ; Habraken and Piette, 2006) : (i) les cytokines pro-inflammatoires {TNF α , IL-1 β (Interleukin-1 β), LT β (Lymphotoxin β), ...}, (ii) les produits bactériens et viraux {LPS (Lipopolysaccharide), ARN double brin, ...}, (iii) les mitogènes {PMA (Phorbol 12-Myristate 13-Acetate), ...}, (iv) les stress physiques et chimiques (dommages à l'ADN, stress oxydant, photosensibilisation, ...), ...

7.3. Gènes sous le contrôle du NF- κ B

Le facteur de transcription NF- κ B régule la transcription d'un grand nombre de gènes codant pour des protéines qui peuvent être divisées en quatre grandes classes : (i) la réponse inflammatoire, (ii) la réponse immune, (iii) la prolifération cellulaire et l'apoptose, et (iv) l'inhibition du NF- κ B. La réponse inflammatoire induite par NF- κ B peut être médiée notamment par des cytokines (TNF α , IL-1 β , IL-6, LT β , ...), des chémokines {IL-8, MIP-1 α (macrophage inflammatory protein 1 α), MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1), RANTES (Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed and Secreted), ...} et des molécules d'adhésion {ICAM (intracellular adhesion molecule), VCAM (vascular cell adhesion molecule), ...}. NF- κ B joue également un rôle dans l'expression de gènes codant pour des protéines importantes pour la réponse immune, comme les protéines du MHC ou certaines cytokines {IL-12, INF- β (Interferon- β), ...}, mais également pour la prolifération et l'apoptose {c-IAP-1 (cellular inhibitor of apoptosis-1), c-IAP-2), Bcl-X_L (B-cell lymphoma-X_L), FasL, c-myc (cellular myelocytomatosis viral oncogene)...}. La dernière catégorie de gènes sous le contrôle du NF- κ B est celle codant pour ses propres inhibiteurs favorisant une

boucle rétroactive négative {I κ B α (inhibitor κ B α), A20} (Brown et al., 1993 ; Ghosh *et al.*, 1998 ; Karin and Lin, 2002 ; Ghosh and Karin, 2002 ; Heyninck and Beyaert, 2005).

Etant donné l'importance des fonctions biologiques régulées par NF- κ B, une activation aberrante de ce facteur de transcription joue un rôle critique dans le développement et la progression de cancers. Cela crée un lien mécanistique entre inflammation et cancer. L'étude des diverses voies d'activation du NF- κ B (détaillées aux paragraphes 7.7) permet de fournir des cibles attractives pour de nouvelles approches préventives et thérapeutiques (Karin, 2006 ; Escarcega, 2007).

7.4. Les protéines NF- κ B/Rel

La famille de protéines NF- κ B/Rel comporte cinq membres chez les mammifères (Figure 14) : NF- κ B1/p50 (et son précurseur p105), NF- κ B2/p52 (et son précurseur p100), p65 (RelA), RelB et c-Rel. Le NF- κ B est composé d'homo- ou d'hétérodimères formés de combinaisons variées de ces cinq sous-unités, dont le plus commun et le plus étudié est le dimère p50/p65 (Baldwin, 1996 ; Ghosh *et al.*, 1998). Chaque membre est important même si une certaine redondance de fonction est envisagée au vue des résultats d'études génétiques. En effet, à l'exception de p65 qui semble indispensable à la survie cellulaire, les protéines NF- κ B sont capables de compenser l'absence de l'une d'entre elles (Gerondakis *et al.*, 2006).

Chaque membre de la famille NF- κ B/Rel contient, dans sa partie N-terminale, un domaine d'homologie Rel (RHD, Rel Homology Domain) de +/- 300 acides aminés. Ce domaine contient le signal de localisation nucléaire (NLS) et est responsable de la liaison à l'ADN (Figure15), de la dimérisation et de l'association avec I κ B. Dans un complexe du NF- κ B, chacune des protéines apporte une partie du site de liaison à l'ADN. La séquence consensus de liaison sur laquelle se lie NF- κ B est constituée de 10 paires de bases 5'-GGGRNNYYCC-3' (où R est une purine, Y une pyrimidine et N n'importe quelle base) qui peut varier légèrement. Ces deux éléments conduisent à la liaison préférentielle de certains dimères pour certains sites NF- κ B contenus dans les promoteurs de gènes et confèrent une spécificité de réponse différente d'un gène à l'autre (Ghosh *et al.*, 1998 ; Jacobs and Harrison, 1998 ; Chen *et al.*, 1998 ; Karin and Ben-Neriah, 2000 ; Hayden and Ghosh, 2004).

Les protéines NF- κ B ont été groupées en deux classes. La première comprend NF- κ B1 et NF- κ B2 qui sont exprimés, respectivement, sous forme des précurseurs p105 et p100. Ils possèdent dans leur partie C-terminale des répétitions ankyrine servant de région d'interaction. Ce domaine est responsable de l'inhibition du dimère NF- κ B duquel ils font partie. Ces précurseurs appartiennent donc à la famille des inhibiteurs I κ Bs. Pour former les protéines actives p50 et p52, les répétitions ankyrine doivent être clivées. La seconde classe comprend p65 (RelA), RelB et c-Rel qui ne subissent pas de phénomène de maturation protéolytique. Seuls les membres de la classe 2 possèdent un domaine transactivateur (TAD, transcription activation domain) situé dans la région C-terminale. Ce domaine est responsable de leur capacité à activer la transcription des gènes cibles. De cette manière, les homodimères p50/p50 et p52/p52 sont transcriptionnellement inactifs et peuvent même être répresseurs en empêchant, par compétition, des dimères transcriptionnellement actifs (p50/p65, p50/c-Rel, p65/p65, p65/c-Rel ou p52/RelB) de se lier à leur site κ B sur l'ADN (Ghosh *et al.*, 1998 ; Karin and Ben-Neriah, 2000 ; Hayden and Ghosh, 2004).

7.5. Les protéines I κ B

L'aptitude du NF- κ B à se fixer au site spécifique du promoteur de ces gènes cibles est dissimulée par la liaison à un inhibiteur de la famille I κ B. Cette famille de protéines inhibitrices inclut les protéines I κ B α , I κ B β , I κ B γ , I κ B ϵ , Bcl-3 et les précurseurs p100 et p105 chez les mammifères (Figure 16). Elles sont caractérisées par la présence de motifs ankyrine qui sont responsables de l'interaction avec le RHD du NF- κ B. Cette interaction masque le signal de localisation nucléaire du facteur de transcription, contribuant à sa séquestration dans le cytoplasme. Les protéines I κ Bs les plus importantes pour la régulation du NF- κ B chez les mammifères sont I κ B α , I κ B β et I κ B ϵ car elles seules contiennent, dans leur partie N-terminale, le domaine régulateur qui mène à la dégradation de la protéine I κ B en réponse aux stimuli. Cette dégradation est fondamentale pour permettre l'activation inductible du NF- κ B. En outre, I κ B α et I κ B β possèdent, dans leur partie N-terminale, un domaine PEST, impliqué dans le turnover de ces protéines (Ghosh *et al.*, 1998 ; Karin and Ben-Neriah, 2000 ; Hayden and Ghosh, 2004).

Les protéines I κ Bs jouent également un rôle important dans l'arrêt de l'activation du facteur de transcription. En effet, l'expression des I κ Bs (à l'exception de I κ B β) est sous le contrôle de NF- κ B. Lorsque ce dernier est activé, les I κ Bs sont néosynthétisés. Elles peuvent entrer dans le noyau, décrocher le NF- κ B fixé sur l'ADN et, dans le cas d'I κ B α , retourner dans le cytoplasme en l'entraînant avec elle. Ce retrait est rendu possible car l'affinité du NF- κ B est plus grande pour I κ B que pour l'ADN (Karin and Ben-Neriah, 2000).

La protéine I κ B α de 37 kDa est particulièrement importante dans les phénomènes de séquestration cytoplasmique de NF- κ B. Elle est formée de trois domaines. Le domaine régulateur N-terminal contient des sérines (Ser32 et 36), une tyrosine (Tyr42) phosphorylables et des lysines (Lys21 et 22) ubiquitinables. Ces différents résidus sont impliqués dans la dégradation induite de la protéine. Le domaine central comporte des répétitions ankyrine nécessaires à l'interaction avec le dimère. Et le domaine C-terminal est riche en proline, glutamate, sérine et thréonine, couramment appelé région PEST. Elle est impliquée dans le turnover de la molécule.

Les protéines NF- κ B1 et NF- κ B2 sont synthétisées sous forme de précurseurs p105 et p100 respectivement. Afin d'obtenir des protéines p50 et p52 actives, les parties C-terminales de p105 et p100 sont partiellement clivées par le protéasome. La reconnaissance du site de clivage des deux précurseurs est réalisée grâce à une région riche en glycines (GRR, Glycin Rich Region). Le précurseur p100 est majoritairement associé à RelB, même s'il existe également des dimères p100(p52)/p65 ou p100(p52)/c-Rel. La protéolyse de p100 en p52 peut être stimulée par la LT β , le BAFF (B-cell Activating Fator) et la CD40 selon une voie alternative qui est détaillée au paragraphe 7.7.2. Par contre, le précurseur p105 est constitutivement protéolysé en p50. Cependant, après stimulation des cellules, p105 est complètement dégradé par le protéasome, libérant un homodimère p50 qui lui était alors associé (Solan *et al.*, 2002 ; Beinke and Ley, 2004 ; Dejardin, 2006).

7.6. Complexe IKK (I κ B Kinase)

La dégradation d'I κ B α , nécessaire à l'activation classique du NF- κ B, fait suite à une série d'événements dont la phosphorylation de deux sérines (32 et 36) situées dans la région N-terminale d'I κ B α par un complexe multiprotéique de 700-900 kDa, appelé complexe IKK

(I κ B Kinase). Ce complexe est principalement constitué de deux sous-unités catalytiques IKK α (IKK1) et IKK β (IKK2), et d'une sous-unité régulatrice IKK γ (NEMO, NF- κ B Essential Modulator) (DiDonato *et al.*, 1997 ; Mercurio *et al.*, 1997 ; Karin and Ben-Neriah, 2000).

7.6.1. Structure des IKKs

IKK α et IKK β sont des Ser/Thr kinases de 85 et 87 kDa, respectivement, qui partagent 50% d'homologie de séquences (Figure 17). Elles possèdent un domaine kinase dans leur partie N-terminale (avec la lysine 44) indispensable à la phosphorylation et à la dégradation de I κ B α . La dimérisation de ces deux kinases, médiée par un domaine « leucine zipper » central, est requise pour leur activité kinase. Le domaine hélice-boucle-hélice en région C-terminale leur confère une activité kinase maximale. Cette région C-terminale contient également une courte séquence conservée (Leu-Asp-Trp-ser-Trp-Leu, NDB pour NEMO-binding Domain) permettant la liaison de IKK α et IKK β avec NEMO. Cependant, l'affinité d'IKK β pour NEMO est plus forte que celle d'IKK α (May *et al.*, 2002 ; Hayden and Ghosh, 2004 ; Scheidereit, 2006 ; Drew *et al.*, 2007). En outre, le domaine kinase d'IKK α contient un NLS suggérant un rôle nucléaire décrit au paragraphe 7.6.2.2 (Sil *et al.*, 2004). De son côté, IKK β comporte un domaine « ubiquitin-like » crucial pour son activité (Carter *et al.*, 2003 ; May *et al.*, 2004).

NEMO est une protéine de 48 kDa qui ne possède pas d'homologie avec IKK α et IKK β (Figure 17). Elle contient un domaine à doigt de zinc dans sa partie C-terminale, un domaine « leucine zipper », deux domaines « coiled-coil » et deux hélices α . L'interaction avec IKK α et IKK β dépend du domaine KBD (Kinase-Binding Domain) de la région N-terminale, alors que la partie C-terminale médie le recrutement des kinases impliquées dans la modulation de l'activité du complexe IKK (Hayden and Ghosh, 2004 ; Scheidereit, 2006).

La majorité des complexes semble formée d'un hétérodimère d'IKK α et IKK β associé avec un homodimère de NEMO. Il existe néanmoins d'autres combinaisons de ces sous-unités, comme de simples homodimères d'IKK α ou des homodimères d'IKK β liés à des homodimères de NEMO. Ces différents types de complexes seraient dépendant du type

cellulaire et de l'activité biologique (Miller and Zandi, 2001 ; Senfleben *et al.*, 2001 ; Quirling *et al.*, 2004).

D'autres protéines sont connues pour interagir avec le complexe IKK et moduler son activité. C'est le cas de HSP90 (Heat Shock Protein 90) et de sa co-chaperone Cdc37 (Cell Division Cycle 37) qui interagissent directement et de manière transitoire avec le domaine kinase d'IKK α et IKK β . Ces protéines sont essentielles à l'assemblage du complexe et à son activation en réponse au TNF α (Chen *et al.*, 2002 ; Broemer *et al.*, 2004 ; Scheidereit, 2006 ; Hinz *et al.*, 2007). La protéine ELKS, riche en résidus E, L, K et S, participe également à l'activation du complexe IKK, soit de manière globale en recrutant I κ B α , soit de façon plus ciblée en coordination avec ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated), suite aux dommages à l'ADN (Ducut Silaga *et al.*, 2004 ; Wu *et al.*, 2006 ; Scheidereit, 2006). Par contraste, il existe aussi des protéines interagissant avec le complexe afin de réguler négativement son activité, comme HSP27 et HSP70 (Park *et al.*, 2003 ; Ran *et al.*, 2004).

7.6.2. Activités des IKKs

L'activation du complexe IKK par la cytokine pro-inflammatoire TNF α dépend de la phosphorylation de deux sérines du domaine catalytique, les sérines 176 et 180 pour IKK α et les sérines 177 et 181 pour IKK β . Cependant, IKK β est essentiel pour la phosphorylation inductible d'I κ B α , tandis qu'IKK α ne l'est pas. Dans ce type de complexe, le rôle d'IKK α est plutôt de moduler l'activité d'IKK β (Delhase *et al.*, 1999 ; O'Mahony *et al.*, 2000 ; Yamamoto *et al.*, 2000). Plusieurs kinases ont démontré, par des expériences de surexpression, leur pouvoir d'activation du complexe IKK par phosphorylation. C'est la cas de NIK (NF- κ B-Inducing Kinase), MEKK1 {Mitogen-activated protein/Extracellular signal-regulated kinase (ERK) Kinase Kinase1}, MEKK3, TAK1 (TGF- β -Activating Kinase 1) et NAK (NF- κ B Activating Kinase) (Hayden and Ghosh, 2004 ; Scheidereit, 2006 ; Shambharkar *et al.*, 2007). De manière alternative, les IKKs ont la capacité de s'activer par transautophosphorylation (Tang *et al.*, 2003).

7.6.2.1. Rôle d'IKK β

A côté de son activité principale de phosphorylation d'I κ B α , IKK β , de même qu'IKK α , phosphoryle p65 sur la sérine 536 afin de favoriser son pouvoir transactivateur nécessaire à la transcription des gènes dépendant du NF- κ B (Sakurai *et al.*, 2003 ; Chen and Greene, 2004). En outre, IKK β cible également NEMO dans le but de réguler l'activité du complexe (Prajapati and Gaynor, 2002 ; Carter *et al.*, 2003). Cette phosphorylation de NEMO sur la sérine 68 se situe dans son domaine de liaison aux IKKs (KBD). Elle atténue la dimérisation N-terminale de NEMO, l'interaction entre IKK β et NEMO ainsi que l'activité d'IKK α . Néanmoins, elle n'abolirait pas complètement l'activation du complexe IKK, mais servirait plutôt à ajuster l'activité du complexe et donc du NF- κ B (Palkowitsch *et al.*, 2008).

7.6.2.2. Rôle d'IKK α

Quant à IKK α , il possède une activité cruciale en tant que homodimère d'IKK α dans une voie alternative d'activation du NF- κ B (détaillée au paragraphe 7.7.2). En effet, il est impliqué dans la maturation protéolytique de p100 en p52 (Senftleben *et al.*, 2001 ; Dejardin, 2006). En outre, IKK α exerce des fonctions nucléaires impliquées dans l'activation de l'expression des gènes dépendant du NF- κ B, confortant la présence d'un NLS dans son domaine kinase. Il est responsable de la phosphorylation de protéines histoniques et non-histoniques (Sil *et al.*, 2004 ; Gloire *et al.*, 2006a).

En effet, plusieurs études ont démontré le recrutement d'IKK α sur le promoteur des gènes cibles du NF- κ B, dont *ikb α* suite à une stimulation au TNF α . Pour rappel (cfr paragraphe 3), l'histone H3 est phosphorylée sur la sérine 10 par IKK α , permettant l'interaction avec CBP qui est responsable de l'acétylation de l'histone H3 sur la lysine 14 (Anest *et al.*, 2003 ; Yamamoto *et al.*, 2003 ; Park *et al.*, 2006 ; Gloire *et al.*, 2006a).

De plus, la transcription des gènes médiée par NF- κ B (notamment *ciap-2* et *il-8*) requiert la phosphorylation par IKK α du co-répresseur SMRT sur la sérine 2410. Cela entraîne la dé-répression des gènes par un export nucléaire du complexe co-répresseur SMRT/HDAC3 (Figure 18). Ensuite, IKK α cible p65 pour une phosphorylation de la sérine

536 favorisant son acétylation sur la lysine 310 par CBP. La transcription peut alors avoir lieu. (Hoberg *et al.*, 2004 ; Hoberg *et al.*, 2006 ; Gloire *et al.*, 2006a).

Le groupe de Huang (2007) a démontré qu'IKK α augmente l'activité HAT de CBP en le phosphorylant sur les sérines 1382 et 1386. Cela favorise l'interaction de CBP avec p65 et l'expression des gènes dépendant du NF- κ B. Par contre, l'interaction avec p53 est diminuée et la transcription des gènes médiés par p53 sont inhibés. Cette phosphorylation de CBP par IKK α favorise donc la croissance cellulaire en dépit de l'apoptose (Huang *et al.*, 2007 ; Tergaonkar and Perkins, 2007). En outre, IKK α est également requis pour la liaison de p65 sur certains promoteurs (*icam-1* et *mcp-1*) et pour le retrait d'HDAC3, alors que d'autres promoteurs (*ikb α*) ne nécessitent pas IKK α (Gloire *et al.*, 2007).

Le rôle nucléaire d'IKK α est donc crucial dans plusieurs étapes de la transcription des gènes dépendant du NF- κ B.

7.6.2.3. Rôle de NEMO

NEMO est indispensable à l'activation du complexe IKK, étant donné qu'en son absence, il n'y a pas d'activation du complexe classique (Yamaoka *et al.*, 1998 ; Scheidereit, 2006). L'oligomérisation de NEMO facilite le positionnement et l'assemblage dynamique de l'hétérodimère IKK α /IKK β ainsi que l'activation du complexe (Tegethoff *et al.*, 2003 ; Agou *et al.*, 2004 ; Fontan *et al.*, 2007). En outre, son ubiquitination non dégradative sur la lysine 63 représente un événement critique (Tang *et al.*, 2003 ; Chen, 2005 ; Israël, 2003 ; Shambharkar *et al.*, 2007). A ce rôle cytoplasmique dans le complexe IKK s'ajoute un rôle nucléaire. En effet, NEMO a la capacité de migrer librement entre le cytoplasme et le noyau où il exerce plusieurs fonctions. Il entre tout d'abord en compétition avec IKK α et p65 pour la liaison au co-activateur transcriptionnel CBP. L'expression des gènes dépendant du NF- κ B sont alors réprimés (Verma *et al.*, 2004). Un second rôle nucléaire a été mis en évidence pour NEMO. Suite à des dommages à l'ADN, NEMO subit un bon nombre de modifications post-traductionnelles (sumoylation, phosphorylation, ubiquitination) dans le noyau et interagit avec ATM. Ce complexe NEMO/ATM est alors redirigé vers le cytoplasme où il va permettre l'activation du complexe IKK *via* l'intervention de ELKS (Sebban *et al.*, 2006 ; Habraken and Piette, 2006 ; Gloire *et al.*, 2006a).

7.7. Mécanismes d'activation du NF- κ B

Il existe différentes voies d'activation du NF- κ B, dépendant de l'inducteur en cause, qui induisent une multitude de cibles. Nous nous sommes intéressés à trois types de voies (Figure 19) (Imbert *et al.*, 1996 ; Karin and Ben-Neriah, 2000 ; Pomerantz and Baltimore, 2002 ; Storz and Toker, 2003 ; Dejardin, 2006 ; Gloire *et al.*, 2006b) : (i) la voie classique ou « canonique », induite notamment par le TNF α , l'IL-1 β , le LPS ou le PMA, (ii) la voie alternative, médiée par la LT β , BAFF ou le CD40, (iii) les voies atypiques, activées par un stress oxydant comme le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et le pervanadate de sodium (PV).

7.7.1. Voie classique ou « canonique » d'activation du NF- κ B

La voie canonique induite par le TNF α , l'IL-1 β , le LPS ou le PMA, bien qu'initiée à partir de récepteurs différents, converge vers le complexe IKK, composé d'un hétérodimère d'IKK α et IKK β et d'un homodimère de NEMO (Figure 19). Dans les cellules non induites, I κ B α séquestre NF- κ B dans le cytoplasme en masquant son NLS. Dans les minutes qui suivent la stimulation par ces inducteurs, le complexe IKK est activé par phosphorylation de sérines dans les domaines catalytiques de ses sous-unités IKK α et IKK β . Il s'en suit une phosphorylation spécifique d'I κ B α sur les sérines 32 et 36 par le complexe IKK qui permet sa polyubiquitination sur les lysines 21 et 22 (Traenckner *et al.*, 1995 ; Rodriguez *et al.*, 1996). I κ B α est alors dégradé par le protéasome 26S. Le NF- κ B libéré se dirige vers le noyau pour activer la transcription de ses gènes cibles. Parmi ceux-ci, on retrouve le gène codant pour la protéine I κ B α , qui lorsqu'elle est nouvellement synthétisée, retourne dans le noyau afin de décrocher NF- κ B de l'ADN. En effet, l'affinité du NF- κ B pour I κ B α est plus forte que pour l'ADN. Ce processus entraîne la terminaison du signal en exportant du noyau le complexe I κ B α /NF- κ B. En outre, un mécanisme de dégradation du p65 lié à l'ADN a été mis en évidence favorisant la terminaison de la transcription (Karin and Ben-Neriah, 2000 ; Hayden and Ghosh, 2004 ; Sacconi *et al.*, 2004).

Malgré la convergence de cette voie canonique vers le complexe IKK, chaque inducteur initie des événements différents en amont de ce complexe. Dans ce travail, nous avons étudié les cas du TNF α , de l'IL-1 β et du PMA.

7.7.1.1. Activation du NF- κ B par le TNF α

Le TNF α est une cytokine pro-inflammatoire qui joue le rôle de médiateur crucial dans l'inflammation, l'immunité, la prolifération, la différenciation et l'apoptose. Il exerce ses effets à travers la liaison à deux récepteurs distincts, TNF-R1 (TNF Receptor type 1) et TNF-R2 qui font partie de la superfamille des récepteurs au TNF (TNF-R) (Baud and Karin, 2001 ; Chen and Goeddel, 2002).

Cette superfamille regroupe un grand nombre de récepteurs, notamment ceux du FasL (Fas Ligand), de RANKL (Receptor-Activator of NF- κ B Ligand), TRAIL (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand), de la LT β , de BAFF, du CD40L et TWEAK (TNF-like Weak inducer of apoptosis) (Baud and Karin, 2001 ; Claudio *et al.*, 2002 ; Saitoh *et al.*, 2003).

Ces récepteurs n'ont pas d'activité enzymatique intrinsèque. La transmission du signal est donc réalisée par le recrutement de molécules intracellulaires adaptatrices. Ces molécules activent des protéines effectrices qui, à leur tour, activent des caspases et des facteurs de transcription, NF- κ B et AP-1 (Activating Protein-1) (Baud and Karin, 2001 ; Hayden and Ghosh, 2004).

L'activation du NF- κ B suite à la liaison du TNF α au TNF-R1 est représentée à la figure 20. Cette liaison induit la trimérisation du récepteur et la dissociation de SODD (Silencer Of Death Domain) du récepteur. Ce processus entraîne le recrutement de plusieurs protéines au niveau du domaine cytoplasmique du récepteur. La première protéine à être recrutée au TNF-R1 est TRADD (TNF-R-Associated Death Domain). Cette interaction fournit un point d'ancrage pour d'autres protéines telles que RIP (Receptor Interacting Protein), TRAF2 (TNF Related Associated Factor 2), TAK1 (Transforming Growth Factor- β -Activated Kinase 1) et FADD (Fas-Associated Death Domain). Ces dernières recrutent des enzymes clés pour l'initiation de deux types complexes de signalisation impliqués tout d'abord dans les cascades de MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) et l'activation du complexe IKK, ensuite dans l'apoptose (Chen and Goeddel, 2002 ; Blonska *et al.*, 2005 ; Shen and Pervaiz, 2006).

Le complexe I, lié à la membrane plasmique, comprend le TNF-R1, TRADD, RIP et TRAF2. La protéine TRAF2 permet le recrutement des IKKs au TNF-R1, et RIP est responsable de l'activation du complexe. Ces événements conduisent à l'activation du NF- κ B

et à l'expression de ces gènes cibles. Ce complexe I participe également à l'activation de la cascade des MAPK. Le complexe II cytoplasmique contient TRADD, RIP, FADD et la caspase-8. Il est essentiel à l'apoptose induite par le TNF α *via* la cascade des caspases (Shen and Pervaiz, 2006). Le TNF-R1 est donc capable d'entraîner deux réponses opposées : la survie et l'apoptose. L'ubiquitination de RIP permet de réguler le changement entre ces deux voies (O'Donnell et al., 2007).

7.7.1.2. Activation du NF- κ B par l'IL-1 β

La famille des récepteurs Toll/interleukin (TIR) comprend deux groupes de protéines transmembranaires, qui partagent des propriétés structurales et fonctionnelles. Ces récepteurs possèdent en commun un domaine cytoplasmique conservé appelé TIR (Toll/IL-1R), comportant trois régions hautement homologues (Box1, 2 et 3) (Figure 21a). Les membres de la sous-famille des récepteurs à l'IL-1 (IL-1R) sont caractérisés par trois domaines extracellulaires Ig (Immunoglobulin)-like. Les membres de la sous-famille des TLR (Toll-Like Receptor) reconnaissent les signaux d'alarme dérivant de microorganismes pathogènes (LPS) ou de l'hôte lui-même. Ils contiennent des répétitions riches en leucine dans leur partie extracellulaire (Martin and Wesche, 2002 ; Akira and Takeda, 2004).

La liaison de l'IL-1 β sur le récepteur de la famille TIR entraîne l'association au récepteur de MyD88 (Myeloid Differentiation primary-response protein 88) qui à son tour recrute IRAK4 (IL-1R-Associated Kinase 4) (Figure 21b). Ce complexe permet la fixation de IRAK1, qui se fait phosphoryler par IRAK4, et de TRAF6. IRAK1 phosphorylé et TRAF6 se dissocient alors du récepteur et forment un complexe avec TAK1, TAB1 (TAK1-binding protein) et TAB2. TAK1 et TAB2 sont alors phosphorylés et IRAK1 dégradé. Le complexe restant TRAF6/TAK1/TAB1/TAB2 migre alors dans le cytoplasme où TRAF6 se fait ubiquitiner. TAK1 ainsi activé phosphoryle les MAPK et le complexe IKK, permettant l'activation du NF- κ B (Martin and Wesche, 2002 ; Hayden and Ghosh, 2004 ; Akira and Takeda, 2004).

7.7.1.3. Activation du NF- κ B par le PMA

Les esters de phorbol, comme le PMA, ont été décrits à l'origine comme des inducteurs de tumeur. En outre, ces agents peuvent moduler un grand nombre de processus cellulaires tels que la croissance, la différenciation, l'apoptose et la transcription des gènes, et ce, *via* la voie de signalisation des PKC (Protein Kinase C) (Jaken, 1996 ; Parekh *et al.*, 2000). Le PMA diffuse à travers la membrane cellulaire et mime le diacylglycérol qui est l'activateur endogène des PKC. Il a été utilisé comme modèle pour l'analyse de mécanismes potentiels de la modulation de la croissance et de la différenciation cellulaires de nombreux types cellulaires (Steffan *et al.*, 1995 ; Legrand-Poels *et al.*, 1997 ; Lee *et al.*, 2002 ; Wang *et al.*, 2004).

Lors d'une induction au PMA qui mime la co-stimulation TCR/CD28 (T Cell Receptor/Cluster of Differentiation 28) des lymphocytes T, l'activation des IKKs implique l'activité de la PKC θ (Su *et al.*, 1994 ; Lin *et al.*, 2000). Une kinase supplémentaire aux IKKs classiques a été mise en évidence, IKK ϵ (Peters *et al.*, 2000). Elle est responsable de la phosphorylation d'I κ B α sur les deux sérines en réponse à une induction au PMA ou à une stimulation du TCR. De plus, NEMO est nécessaire à l'activation de TRAIL induite par le PMA (Siegmund *et al.*, 2001). Plus précisément, l'activation du NF- κ B suite à une stimulation au PMA requiert son domaine à doigt de zinc (Shefira and Horwitz, 2008).

7.7.2. *Voie alternative d'activation du NF- κ B*

Un mécanisme alternatif d'induction de l'activité du NF- κ B a été mis en évidence. Il se base sur la protéolyse inductible de p100, réalisée de manière dépendante d'IKK α et indépendante d'IKK β et NEMO. Cette voie peut être stimulée par les inducteurs suivants : la LT β , BAFF, CD40L et TWEAK. Les récepteurs spécifiques de ces ligands sont des membres de la superfamille des récepteurs au TNF. Ils contrôlent des processus cruciaux pour l'immunité et pour le développement des organes lymphoïdes secondaires (Senftleben *et al.*, 2001 ; Claudio *et al.*, 2002 ; Coope *et al.*, 2002 ; Saitoh *et al.*, 2003 ; Bonizzi and Karin, 2004 ; Dejardin, 2006).

Lorsqu'un de ces ligands se lie à son récepteur, la voie alternative est activée (Figure 19). La protéine NIK (NF- κ B-inducing kinase) phosphoryle un homodimère d'IKK α . Cet

homodimère ainsi activé phosphoryle p100 dans la partie C-terminale qui comporte des répétitions ankyrine. Une ubiquitination subséquente entraîne p100 vers le protéasome pour une dégradation partielle. Le p52 obtenu après cette maturation est activé et peut ainsi migrer vers le noyau pour réguler la transcription. En général, p100/p52 est lié à RelB. Une connexion avec la voie classique et le complexe IKK permet la reconstitution du pool cytoplasmique de p100 (Dejardin *et al.*, 2002 ; Dixit and Mak, 2002 ; Pomerantz and Baltimore, 2002 ; Solan *et al.*, 2003).

7.7.3. Voies atypiques d'activation du NF- κ B induites par un stress oxydant

On parle de situation de stress oxydant lorsque la concentration en espèces réactives de l'oxygène (ROS), comme le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), l'anion superoxyde (O₂⁻) et le radical hydroxyl (OH[•]), dépasse les capacités anti-oxydantes de la cellule. Ces hautes concentrations en ROS, générées lors des maladies inflammatoires chroniques ou aiguës ou lors de stress environnementaux, sont cytotoxiques. Elles peuvent en effet causer des dommages importants aux macromolécules, comme la peroxydation des lipides, l'oxydation des acides aminés (particulièrement des cystéines) et des cassures dans l'ADN. Si elles ne sont pas générées en trop grandes quantités, les ROS peuvent être utilisées comme seconds messagers par la cellule dans de nombreuses voies de signalisation, comme celles induites lors des réponses immunitaires et inflammatoires (Nordberg and Arner, 2001 ; Haddad, 2004 ; Gloire *et al.*, 2006b).

Le stress oxydant est intimement lié à l'activation du NF- κ B (Li and Karin, 1999) :

- L'ajout direct de H₂O₂ dans le milieu de culture provoque l'activation du NF- κ B dans différents types cellulaires (Canty *et al.*, 1999 ; Josse *et al.*, 2001 ; Takada *et al.*, 2003)
- Certains agents qui activent le NF- κ B, comme le TNF α conduisent à la production de ROS intracellulaires (Oka *et al.*, 2000 ; Kamata *et al.*, 2005)
- Des composés, tels que le PDTC (Pyrrolidine Dithiocarbamate) et la NAC (N-acetyl-L-cysteine) possédant des propriétés anti-oxydantes suppriment l'activation du NF- κ B (Meyer *et al.*, 1993 ; Oka *et al.*, 2000)

Les mécanismes d'activation du NF- κ B par un stress oxydant peuvent varier en fonction du type cellulaire étudié (cellules T ou épithéliales) et du stress induit (H_2O_2 ou pervanadate) (Figure 22) (Gloire *et al.*, 2006b). Le pervanadate est un puissant inhibiteur de protéine tyrosine phosphatase (PTP) par oxydation de cystéines contenues dans leur site catalytique (Huyer *et al.*, 1997). Par son action, il favorise l'activité des tyrosine kinases, donne lieu à une augmentation de la concentration intracellulaire en Ca^{2+} , à l'activation du NF- κ B et des MAPK (Imbert *et al.*, 1994 ; Zhao *et al.*, 1996). C'est aussi un composé insulino-mimétique par sa capacité à médier l'action métabolique de l'insuline à travers l'activation de ERK1/2 (Extracellular signal-Regulated Kinase 1/2), de la PI3K (Phosphatidylinositol 3-Kinase) et la PKB/Akt (Protein Kinase B) (Tsiani *et al.*, 1998 ; Srivastava and Mehdi, 2004).

La première voie a été mise en évidence dans les cellules T Jurkat stimulées au pervanadate de sodium (PV) (Imbert *et al.*, 1996). Elle implique une phosphorylation d'I κ B α sur la tyrosine 42 sans activation du complexe IKK. Selon le type cellulaire, cette phosphorylation provoque soit la dissociation du NF- κ B (Imbert *et al.*, 1996), soit la dégradation d'I κ B α (Mukhopadhyay *et al.*, 2000). La dissociation d'I κ B α du dimère NF- κ B, observée dans les cellules T Jurkat, dépend de la sous-unité régulatrice de la PI3K (Béraud *et al.*, 1999). La dégradation d'I κ B α dans les cellules épithéliales HeLa proviendrait de l'intervention du protéasome mais également de la calpaïne, protéase dépendante du calcium (Mukhopadhyay *et al.*, 2000).

L'activation du NF- κ B après phosphorylation d'I κ B α sur tyrosine est également détectée après stimulation par le H_2O_2 (Schoonbroodt *et al.*, 2000 ; Takada *et al.*, 2003). En outre, dans les cellules T, les sérines et thréonine de la région PEST de l'inhibiteur sont la cible de phosphorylations supplémentaires. La dégradation d'I κ B α associée est indépendante du protéasome. Elle se baserait uniquement sur une digestion par la calpaïne (Schoonbroodt *et al.*, 2000).

Plusieurs tyrosine kinases sont importantes pour la phosphorylation d'I κ B α sur la tyrosine 42 : (i) les kinases p56^{LCK} et ZAP-70 dans les cellules T Jurkat suite à une stimulation au PV (Livolsi *et al.*, 2001), (ii) la kinase c-Src dans les cellules HeLa induites par hypoxie/réoxygénation ou un traitement au PV (Fan *et al.*, 2003), (iii) la kinase Syk dans les cellules T Jurkat après traitement au H_2O_2 (Figure 22) (Takada *et al.*, 2003).

Le second type de voie engendré par un stress oxydant fait intervenir le complexe IKK. En effet, la stimulation des cellules HeLa par le H₂O₂ active le complexe IKK par phosphorylation de sérines dans le domaine kinase (Kamata *et al.*, 2002). Cependant, ce ne sont pas exactement les mêmes sérines que lors de l'activation de la voie classique. Les sérines 176 d'IKK α et 177 d'IKK β ne sont pas requises, tandis que les sérines 180 d'IKK α et 181 d'IKK β sont indispensables. En outre, la PKD (Protein Kinase D) semble responsable de cette activation du complexe IKK. Sous l'effet du H₂O₂, c-Src activé induit la phosphorylation sur la tyrosine 463 de la PKD par Abl. Le domaine catalytique étant alors exposé, la PKC δ phosphoryle la PKD sur les sérines 738 et 742 (Figure 22) (Storz and Toker, 2003 ; Storz *et al.*, 2004).

Récemment, notre laboratoire (Gloire *et al.*, 2006c) a mis en évidence une lipide phosphatase, SHIP-1 (SH2-containing inositol 5'-phosphatase 1) requise pour l'activation du complexe IKK dans les cellules T suite à une stimulation au H₂O₂. Dans le cas des cellules T déficientes en SHIP-1 telles que les Jurkat, l'activation du NF- κ B ne passe pas par le complexe IKK. Les kinases p56^{LCK}, ZAP70 et Syk prennent le relais en phosphorylant I κ B α sur la tyrosine 42. Par contre, pour les cellules contenant SHIP-1, comme les Jurkat JR et les CEM, le H₂O₂ induit l'activation des IKKs *via* l'intervention de SHIP-1 (Figure 22) (Gloire *et al.*, 2006b-c).

7.8. Modifications post-traductionnelles du NF- κ B

La régulation de l'activation du NF- κ B est déterminante au vue des impacts divers sur les processus cellulaires. Elle comprend de nombreuses modifications post-traductionnelles, comme la phosphorylation, l'acétylation, l'ubiquitination, la sumoylation, la neddylation, la nitration de tyrosine et la nitrosylation de cystéine (Amir *et al.*, 2002 ; Marshall *et al.*, 2004 ; Park *et al.*, 2005 ; Gao *et al.*, 2006 ; Perkins, 2006 ; Yakovlev *et al.*, 2007 ; Mabb and Miyamoto, 2007).

La phosphorylation et l'acétylation de p65 sont les mieux connues à ce jour. Elles jouent un rôle crucial dans la régulation de son activité et ainsi modulent l'intensité et la durée de l'activation du NF- κ B. Après la dégradation d'I κ B α , p65 subit des processus de phosphorylation, au niveau du cytoplasme ou du noyau, mais également d'acétylation dans le

noyau (Schmitz *et al.*, 2001 ; Vermeulen *et al.*, 2002 ; Campbell and Perkins, 2004 ; Chen and Greene, 2004).

7.8.1. Phosphorylation de p65

Il existe plusieurs sites de phosphorylation de p65 ciblés par des kinases dont l'activité varie en fonction de leur localisation cellulaire et du stimulus. Les principaux sites sont situés dans le domaine d'homologie Rel (sérines 276 et 311) et dans le domaine de transactivation (sérines 529 et 536) (Figure 23). La sérine 311 est phosphorylée par la PKC ζ , alors que la CKII (casein kinase II) contrôle la phosphorylation de la sérine 529 (Duran *et al.*, 2003 ; Wang *et al.*, 2000). Les deux autres résidus ont fait l'objet d'études plus détaillées.

Deux kinases sont responsables de la phosphorylation de la sérine 276. La sous-unité catalytique de la PKA (PKAc) cible ce résidu dans le cytoplasme des cellules induites au LPS. (Zhong *et al.*, 1997). D'un autre côté, une stimulation au TNF α entraîne l'activation de la MSK1 qui phosphoryle la sérine 276 de p65 dans le noyau (Vermeulen *et al.*, 2003).

En réponse à différents stimuli, tels que l'IL-1 β , le LPS, et le TNF α , la sérine 536 est phosphorylée par un grand nombre de kinases: IKK α , IKK β , IKK ϵ , TBK1 {TRAF family member-associated (TANK)-binding kinase 1} et RSK1 (Ribosomal Subunit 6 Kinase 1). La phosphorylation de ce résidu est indispensable au potentiel transactivateur de p65 (Sakurai *et al.*, 1999 ; Sakurai *et al.*, 2003 ; Buss *et al.*, 2004 ; Mattioli *et al.*, 2004 ; Bohuslav *et al.*, 2004 ; Adli and Baldwin, 2006).

Ces modifications de p65 favorisent son activité transactivatrice des gènes cibles en permettant l'interaction avec le co-activateur CBP/p300 et l'acétylation subséquente de p65. En effet, le statut de phosphorylation du NF- κ B détermine son association avec un co-activateur (CBP/p300) ou un co-répresseur (HDAC1) (Sheppard *et al.*, 1999 ; Zhong *et al.*, 2002 ; Chen *et al.*, 2005). Une étude récente démontre que la transcription du gène *ikb α* dépendante NF- κ B et induite par le TNF α est sujette à la régulation d'un équilibre dynamique entre les co-activateurs et co-répresseurs respectifs : SRC-1/SRC-2/SRC-3 et HDAC1/HDAC3/SMRT/NCoR (Gao *et al.*, 2005). Pour rejoindre l'idée du dynamisme de la chromatine (cfr paragraphe 4.2), la liaison des co-activateurs, mais également des co-

répresseurs, est nécessaire à cette activation du NF- κ B, avec une prédominance des co-activateurs.

7.8.2. Acétylation de p65

L'acétylation de p65 régule la durée d'activation du dimère NF- κ B (Figure 24) (Vanden Berghe *et al.*, 1999 ; Chen *et al.*, 2003 ; Quivy and Van Lint, 2004). En effet, la sous-unité du NF- κ B, p65, est acétylée par CBP/p300 mais la réponse biologique peut varier en fonction du résidu ciblé. L'acétylation de p65 sur les lysines 218, 221 et 310 augmente sa capacité à se lier à l'ADN et son activité transcriptionnelle, mais empêche l'association avec son inhibiteur I κ B α . Dans ce cas, la désacétylation par HDAC3 entraîne la liaison du NF- κ B avec I κ B α , facilitant son export hors du noyau (Figure 25) (Chen *et al.*, 2001, 2002 et 2004). Par contre, la modification des lysines 122 et 123 de p65 réduit son affinité pour l'ADN permettant sa liaison avec I κ B α et son export nucléaire (Kiernan *et al.*, 2003). En outre, p65 interagit avec HDAC1 et HDAC2 afin de réguler de manière négative l'expression des gènes cibles (Ashburner *et al.*, 2001).

La figure 25 récapitule l'importance de la phosphorylation et l'acétylation de p65, mais également des histones, sur l'activation du NF- κ B. L'activation des IKKs et la dégradation d'I κ B α sont contrôlées par des cascades de signalisation en amont. Cependant, il est désormais évident que les formes nucléaires du NF- κ B sont sujettes à une régulation étroite. Celle-ci implique des modifications post-traductionnelles du NF- κ B lui-même mais aussi des histones situés aux environs des gènes cibles. La phosphorylation et l'acétylation de p65 sont requises pour générer un dimère NF- κ B totalement actif. Il en va de même pour les histones dont les modifications post-traductionnelles entraîne des changements de conformation de la chromatine liés au contrôle de la transcription. C'est donc l'ensemble des modifications post-traductionnelles des protéines qu'il faut intégrer afin d'étudier la réponse transcriptionnelle.

OBJECTIFS

La transcription des gènes dépend, entre autres, de phénomènes d'acétylation/désacétylation des histones et de facteurs de transcription, comme NF- κ B. Ces modifications sont étroitement contrôlées par un équilibre dynamique entre les HATs et les HDACs. Une perturbation de cet équilibre est souvent rencontrée dans les cellules tumorales. En effet, des gènes suppresseurs de tumeurs voient leur transcription réprimée à cause d'une activation ou d'un recrutement anormaux de HDACs. Plusieurs études ont démontré que les HDACi, induisant une hyperacétylation des protéines, possèdent un pouvoir anti-tumoral lors d'exposition prolongée (plus de 24 heures). Ils sont capables de réactiver l'expression génique et d'altérer la croissance des cellules cancéreuses (Johnstone, 2002 ; Burgess *et al.*, 2004 ; Glozak *et al.*, 2007).

Les HDACi, tels que la TSA, semblent également pouvoir jouer un rôle éventuel dans les thérapies contre le virus du HIV-1. En effet, les traitements actuels HAART (Highly Active Anti-Retroviral Therapy) ne permettent pas l'élimination des cellules infectées de manière latente. Une stratégie potentielle pour résoudre cet obstacle serait de purger les réservoirs cellulaires de virus en forçant l'expression virale dans ces cellules en latence. Le maintien de la thérapie HAART, fournissant notamment des inhibiteurs de la protéase virale, est indispensable afin de rendre inactifs les virus sortant de latence. La combinaison TNF α avec TSA a été proposée pour induire l'expression virale étant donné qu'elle active de manière synergique NF- κ B au niveau du promoteur du LTR (Long Terminal Repeat) du HIV-1 (Quivy *et al.*, 2002 ; Demonté *et al.*, 2004 ; Vandergeeten *et al.*, 2007).

Néanmoins, moins de 10% des gènes ont leur expression modifiée par la TSA, qui est pourtant un HDACi à large spectre d'action (Van Lint *et al.*, 1996 ; Glaser *et al.*, 2003, Hildmann *et al.*, 2007). De plus, parmi ces 10%, l'expression des gènes est augmentée aussi bien que diminuée. Le contrôle des phénomènes d'acétylation est donc d'une complexité élevée et nécessite une étude approfondie des mécanismes de régulation.

Nous avons décidé d'examiner les effets de la TSA sur l'activation du facteur de transcription NF- κ B car il régule de l'expression de gènes impliqués dans la réponse immune, l'apoptose, la prolifération et la différenciation cellulaires.

Notre travail se base sur une étude visant à mettre en évidence les bases moléculaires de la synergie d'activation du NF- κ B induites au niveau du promoteur du LTR du virus de HIV-1 par de courts traitements au TNF α et à la TSA (Adam *et al.*, 2003). Cette analyse a démontré que le prolongement de l'activation du NF- κ B provient d'un retard de réapparition d'I κ B α dans le cytoplasme. Celui-ci est lié, du moins en partie, à une activité prolongée du complexe IKK ciblant I κ B α vers la dégradation.

Nous nous sommes intéressés à la mécanistique fondamentale de l'inhibition de HDAC sur plusieurs voies d'activation du NF- κ B, afin de déterminer une uniformité ou une spécificité de chacune de ces signalisations.

Dans la première partie, nous avons investigué les événements qui conduisent à la levée de l'inhibition du NF- κ B dans le cytoplasme responsable de son activation. La voie classique a tout d'abord été analysée par induction avec les cytokines pro-inflammatoires TNF α et IL-1 β , et avec l'ester de phorbol PMA. Cette voie requiert l'activité du complexe IKK et la phosphorylation d'I κ B α sur les sérines 32 et 36. Ensuite, nous avons abordé la voie alternative qui induit l'activation d'un homodimère d'IKK α ainsi que la phosphorylation et la protéolyse partielle de p100. Enfin, les voies atypiques d'activation du NF- κ B ont été investiguées après stimulation par deux types de stress oxydant : le H₂O₂ et le PV. Par inhibition des tyrosine phosphatases, ces stimuli favorisent l'activité de tyrosine kinases et la phosphorylation d'I κ B α sur la tyrosine 42.

Dans la seconde partie, nous avons focalisé notre attention sur deux types de voies d'activation, stimulées soit par le TNF α , soit par le PV. Ces inducteurs produisant tout deux un prolongement de l'activation du NF- κ B par l'ajout de TSA, nous nous sommes intéressés aux mécanismes moléculaires impliqués dans les modifications épigénétiques de promoteurs tels que *ikb α* et *icam-1*.

RESULTATS

Les résultats de ce travail ont été scindés en deux parties. La première partie traite de l'effet de la TSA sur différentes voies de signalisation du NF- κ B ; la seconde partie propose une comparaison entre des stimulations au pervanadate de sodium (PV) et au TNF α , et met en évidence les mécanismes moléculaires intervenant lors de co-traitements avec la TSA. Ces données ont fait l'objet d'une publication intitulée :

« Histone deacetylase inhibitor trichostatin A sustains sodium pervanadate-induced NF- κ B activation by delaying I κ B α mRNA resynthesis – comparison with TNF α ».

Julie Horion, Geoffrey Gloire, Nadia El Mjiyad, Vincent Quivy, Linda Vermeulen, Wim Vanden Berghe, Guy Haegeman, Carine Van Lint, Jacques Piette and Yvette Habraken.

J Biol Chem. 2007 May 25;282(21):15383-93. Epub 2007 Apr 4.

PREMIÈRE PARTIE : EFFET DE LA TSA SUR DIFFÉRENTES VOIES DE SIGNALISATION DU NF- κ B

1. Introduction

Notre programme de recherche fait suite à l'observation selon laquelle les inhibiteurs d'histone désacétylases entraînent un prolongement de l'activation du NF- κ B induit par le TNF α (Adam *et al.*, 2003). Nous avons voulu déterminer si les voies de signalisation du NF- κ B activées par d'autres inducteurs étaient similairement affectées. Nous avons donc comparé l'influence de la TSA, un inhibiteur d'histone désacétylase à large spectre d'action, sur diverses voies d'activation du NF- κ B : (i) la voie classique, requérant l'activation du complexe IKK, induite notamment par le TNF α , l'IL-1 β et le PMA, (ii) la voie alternative concernant l'homodimère IKK α , activée par la LT β et (iii) des voies atypiques, impliquant de multiples tyrosine kinases, médiées par le H₂O₂ ou le PV.

2. Voie canonique

La voie classique de signalisation du NF- κ B, également appelée voie canonique, est activée par les cytokines pro-inflammatoires TNF α et IL-1 β , et l'ester de phorbol PMA (cfr introduction, paragraphe 7.7.1). Cette voie implique l'activation du complexe IKK qui phosphoryle I κ B α sur les sérines 32 et 36. La dégradation subséquente de I κ B α par le protéasome 26S libère NF- κ B, qui peut ainsi transactiver ses gènes cibles dans le noyau. Parmi ces gènes cibles, on retrouve le gène codant pour l'inhibiteur I κ B α permettant un modèle d'autorégulation afin de terminer l'activation du NF- κ B (Brown *et al.*, 1993 ; Karin and Ben-Neriah, 2000). Nous nous sommes intéressés aux effets de l'inhibition des HDAC par la TSA sur l'activation du NF- κ B par ces trois inducteurs.

2.1. Activation du NF- κ B

Pour mettre en évidence l'activation du NF- κ B, nous avons réalisé des expériences EMSA (Electromobility Shift Assay) avec une sonde radioactive correspondant à la séquence κ B du LTR du virus HIV. Par la technique du western blot (WB), nous avons étudié à la dégradation de I κ B α , synonyme de l'arrêt de la séquestration du NF- κ B dans le cytoplasme.

2.1.1. Induction par le TNF α

La liaison du TNF α à son récepteur induit sa trimérisation et le recrutement séquentiel de nombreuses protéines au domaine cytoplasmique du récepteur, telles que TRADD, RIP, TRAF2 et FADD. Ceci engendre les activations du complexe IKK et du NF- κ B (cfr introduction, paragraphe 7.7.1.1).

Des cellules HeLa ont été traitées au TNF α (100 U/mL) en présence/absence de TSA (450 nM) durant des temps croissants de 10 minutes à 8 heures (Figure 26a). Des expériences d'EMSA ont permis de démontrer que la stimulation au TNF α seul induit une activation du NF- κ B à 10 et 30 minutes, alors que le traitement simultané de TNF α et TSA entraîne un prolongement de cette activation jusque 4 heures. La dégradation associée d'I κ B α dans le cytoplasme a été démontrée par la technique de western blot. L'induction au TNF α seul conduit à une dégradation d'I κ B α à 10 et 30 minutes. L'inhibiteur du NF- κ B est resynthétisé déjà après 1 heure pour mettre un terme à son activation et le séquestrer à nouveau dans le cytoplasme. Par contre, quand la TSA est ajoutée simultanément au traitement par le TNF α , un retard important de la réapparition d'I κ B α dans le cytoplasme est détecté.

2.1.2. Induction par l'IL-1 β

Le récepteur à l'IL-1 β dimérise suite à son interaction avec la cytokine. La formation de ce complexe transmembranaire est nécessaire à la transduction du signal par les protéines MyD88, IRAK, TRAF6 et TAK1, conduisant à l'activation du complexe IKK et donc du NF- κ B (cfr introduction, paragraphe 7.7.1.2).

La technique d'EMSA a également été utilisée pour déterminer l'influence de la TSA sur l'activation du NF- κ B induite par l'IL-1 β . Le traitement de cellules HeLa a été effectué avec l'IL-1 β (100 U/mL) en présence/absence de TSA (450 nM) durant des temps croissants de 10 minutes à 8 heures (Figure 26b). L'induction simultanée par l'IL-1 β et la TSA engendre un prolongement de l'activation du NF- κ B jusque 4 heures, alors qu'elle diminue déjà après 1 heure suite à une stimulation à l'IL-1 β seul. Cette extension de l'activation suite au co-traitement est corroborée par le fait que la réapparition d'I κ B α dans le cytoplasme est retardée en western blot.

2.1.3. Induction par le PMA

Le PMA est un ester de phorbol impliqué dans l'activation des Protéine Kinase C (PKC) de par son mimétisme avec le diacylglycérol (DAG). L'activation des PKCs est également dépendante de Ca²⁺. Nous avons donc ajouté, à chaque traitement au PMA, de l'ionomycine, un ionophore à Ca²⁺. Cette activation des PKCs entraîne notamment la signalisation du NF- κ B via le complexe IKK (cfr introduction, paragraphe 7.7.1.3).

L'activation du NF- κ B a été mise en évidence par la technique d'EMSA, suite au traitement de cellules HeLa par le PMA (200 nM) avec de l'ionomycine (141 nM) en présence/absence de TSA (450 nM) (Figure 26c). La stimulation au PMA/ionomycine donne lieu à une activation du NF- κ B à partir de 30 minutes jusque 2 heures, alors que l'ajout de TSA provoque un prolongement de cette activation jusque 4 heures. Des expériences de western blot ont permis de démontrer que la réapparition d'I κ B α dans le cytoplasme est différée de 2 heures suite au co-traitement PMA/ionomycine et TSA.

Nous pouvons donc suggérer que la TSA prolonge l'activation de la voie canonique du NF- κ B suite au traitement par le TNF α , l'IL-1 β ou le PMA. Ceci est corroboré par un retard de la réapparition d'I κ B α dans le cytoplasme.

2.2. Activité du complexe IKK

Afin de déterminer l'origine de l'extension de l'activation de la voie classique du NF- κ B, nous avons porté notre attention sur les événements responsables de la phosphorylation d'I κ B α et de sa dégradation subséquente, l'activation du complexe IKK. Pour ce faire, nous avons effectué des expériences d'activité kinase *in vitro* du complexe IKK. Celle-ci consiste tout d'abord en l'immunoprécipitation du complexe IKK via sa sous-unité régulatrice, IKK γ . L'activité kinase du complexe immunoprécipité a alors été mesurée par la phosphorylation *in vitro* du substrat recombinant GST-I κ B α_{1-54} purifié. Enfin, la détection de la forme phosphorylée du substrat GST-I κ B α sur les résidus Ser32 et 36 a été réalisée par western blot à l'aide d'un anticorps spécifique. L'utilisation d'un contrôle de charge a permis de vérifier l'efficacité de l'immunoprécipitation et la présence de quantités équivalentes d'IKK β dans chaque échantillon.

2.2.1. Induction par le TNF α

L'activité du complexe IKK suite à un traitement au TNF α est maximale à 5 minutes et diminue rapidement pour être à peine détectable après 2 et 4 heures (Figure 27a). Par contre, l'ajout de TSA à la stimulation au TNF α prolonge cette activité jusque 2 et 4 heures. Le contrôle de charge témoigne de la présence de quantités équivalentes d'IKK β dans chaque échantillon.

2.2.2. Induction par l'IL-1 β

L'IL-1 β induit fortement, et quasi exclusivement, l'activité du complexe IKK à 5 minutes, alors que cette activité persiste jusqu'au moins 2 heures de co-traitement à l'IL-1 β et TSA (Figure 27b). Le contrôle de charge témoigne de la présence de quantités équivalentes d'IKK β dans chaque échantillon.

2.2.3. Induction par le PMA

La stimulation par le PMA est plus lente que pour le TNF α et l'IL-1 β étant donné que le pic de l'activité du complexe IKK se situe aux alentours des 30 minutes et est presque indétectable à 2 et 4 heures (Figure 27c). Cependant, lorsque la TSA est ajoutée simultanément au PMA, l'activité du complexe IKK est nettement prolongée jusqu'au moins 4 heures. Le contrôle de charge témoigne de la présence de quantités équivalentes d'IKK β dans chaque échantillon.

Ces données indiquent clairement que la TSA engendre une extension de l'activité du complexe IKK suite à l'activation de la voie classique du NF- κ B par le TNF α , l'IL-1 β ou le PMA. La phosphorylation et la dégradation subséquente d'I κ B α serait alors également prolongée, permettant d'expliquer le retard de réapparition d'I κ B α dans le cytoplasme. Le groupe d'Adam *et al.* (2003) a d'ailleurs démontré, dans le cadre d'une co-stimulation au TNF α et TSA, que le prolongement de l'activation du NF- κ B provenait d'une activité persistante du complexe IKK et du protéasome 26S.

2.3. Effet de la TSA sur l'activité de phosphatases

Afin d'étudier les raisons de ce prolongement de l'activité des IKKs, nous nous sommes intéressés au système de terminaison du signal par déphosphorylation du complexe *via* l'action de phosphatases. Le rôle de la phosphatase PP2A a été mis en évidence dans la régulation de l'activation du NF- κ B. En effet, l'inhibition de la PP2A par l'acide okadaïque entraîne une activation persistante du NF- κ B associée à un prolongement de l'activité IKK, de la dégradation d'I κ B α ainsi que de la phosphorylation p65 (DiDonato *et al.*, 1997 ; Yang *et al.*, 2001 ; Miskolci *et al.*, 2003). Le groupe de Fu (2003) a également démontré que, dans les cellules normales, le complexe IKK phosphorylé est rapidement inactivé par l'intervention de PP2A lié à NEMO. Par contre, dans les cellules infectées par le virus HTLV (Human T-Lymphotropic virus), la protéine Tax se lie à NEMO, inhibant PP-2 et maintenant les IKKs sous une forme phosphorylée, active. Cela induit l'activation constitutive du NF- κ B.

De nombreux liens entre les phénomènes de phosphorylation et d'acétylation sont décrits dans la littérature, notamment pour des protéines telles que p53, l'histone H3 et p65 (Yamamoto *et al.*, 2003 ; Bode and Dong, 2004 ; Chen *et al.*, 2005). D'ailleurs, il existe des complexes formés d'HDACs et de phosphates à sérine/thréonine (PPs, Protein Phosphatases) contrôlant les activités de ceux deux types d'enzymes (Brush *et al.*, 2004). En inhibant ces HDACs par la TSA, l'activité de ces PP semble, elle-aussi, être affectée. Nous avons donc émis l'hypothèse que de pareils complexes pouvaient réguler les activités des IKKs. La présence de TSA inhibant ces complexes, empêcherait la déphosphorylation du complexe IKK qui conduisant à une extension de leur activation.

Nous avons alors testé les éventuelles modulations de l'activité phosphatase de la PP2A après stimulation de cellules HeLa par de la TSA ou par deux inhibiteurs de cette phosphatase, l'acide okadaïque et la calyculin A. L'activité phosphatase liée aux extraits cytoplasmiques a été déterminée par la fluorescence émise lors de la déphosphorylation d'un substrat, le DiFMU (6,8-difluoro-4-methylumbelliferyl). Nous avons réalisé des expériences préliminaires sur différentes concentrations d'acide okadaïque, de calyculin A et de TSA par induction des cellules *in vivo* ou par ajout *in vitro* dans le tampon de réaction. Ces concentrations ont été déterminées sur base de l'indice IC50 de chaque inhibiteur en les majorants d'un facteur 10 (Schönthal, 1998).

Le traitement *in vivo* des cellules avec l'acide okadaïque (OA) à une concentration de 500 nM diminue seulement de 45-50% l'activité de PP2A, malgré sa spécificité (Figure 28a). L'inhibition est semblable lors de l'ajout *in vitro* d'acide okadaïque à une concentration de 10 nM. Cependant, la stimulation *in vivo* avec une concentration de 450 nM de TSA ne semble réduire cette activité que de 20%. D'un autre côté, l'utilisation *in vitro* de diverses concentrations (25-50-75 nM) de calyculin A (CA) n'inhibe pas de plus de 35% l'activité de PP2A (Figure 28b). Quelque soit la concentration de TSA (100-450-1000 nM), l'inhibition est de l'ordre de 15%. Des analyses supplémentaires confirment ces résultats (Figure 28c). Cette technique de fluorescence du DiFMU met donc en évidence une inhibition de l'activité phosphatase de PP2A de 45% par l'acide okadaïque et de 15% par la TSA. Un profil similaire a été découvert en testant l'activité d'une autre phosphatase, PP1.

Ces résultats ont été obtenus sur l'ensemble des protéines cytoplasmiques. Pourtant, il est envisageable que l'effet potentiel de la TSA soit ciblé aux environs du complexe IKK. Nous avons alors tenté d'étudier l'activité phosphatase après avoir immunoprécipité le

complexe IKK. Cependant, aucune quantification de la fluorescence ne peut être établie car nous n'avons pas réussi à dissocier de manière efficace les billes, utilisées pour l'immunoprécipitation, des protéines. Etant donné les limites de ce test et le manque d'effet significatif de la TSA seule sur les activités de PP1 et de PP2A, nous n'avons pas investigué plus loin cette hypothèse.

2.4. Activité transcriptionnelle du NF- κ B

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'activité transcriptionnelle du NF- κ B afin d'évaluer son pouvoir transactivateur. Dans un premier temps, les cellules HeLa ont été transfectées transitoirement avec un gène rapporteur luciférase placé sous le contrôle d'un promoteur artificiel contenant cinq sites κ B. Après vingt heures de transfection, nous avons traité ces cellules au TNF α , à l'IL-1 β ou au PMA en présence/absence de TSA pendant 8 heures avant la lyse. La quantité de protéines a servi à normaliser l'activité luciférase détectée.

Nous avons observé que, quel que soit l'inducteur, TNF α , IL-1 β ou PMA, l'ajout de TSA provoque une augmentation importante de l'activité transcriptionnelle du NF- κ B (Figure 29).

3. Effet de la TSA seule sur l'activation du NF- κ B

La TSA, de par son action inhibitrice de HDAC, a la capacité de décondenser la chromatine et de rendre accessible l'ADN à la machinerie basale de transcription (cfr introduction, paragraphe 4).

Nous avons donc testé une éventuelle activation du NF- κ B après un traitement à la TSA seule (450 nM). La technique d'EMSA a permis de démontrer que le traitement des cellules HeLa par la TSA seule entraîne une activation mineure du NF- κ B lorsqu'on compare au témoin positif représenté par le TNF α 30 min (Figure 30a). D'ailleurs aucune dégradation d'I κ B α n'a pu être détectée par western blot. Nous avons également réalisé un essai d'activité kinase *in vitro* sur le complexe IKK pour lequel nous n'avons pas pu déceler d'activité kinase

comparé au témoin positif TNF α , mis à part une légère activité après 4 heures de traitement (Figure 30b). Cependant, cette activité peut être minimisée étant donné que, le témoin de charge indique que cet échantillon contient une quantité supérieure d'IKK β .

4. Voie alternative induite par la LT β

Une autre voie dite « alternative » peut être activée par la LT β . Son récepteur fait partie de la même famille que le récepteur au TNF α . La liaison du ligand à son récepteur permet la phosphorylation par NIK de l'homodimère IKK α . Celui-ci va alors phosphoryler p100 dans sa partie C-terminale, entraînant sa dégradation partielle par le protéasome. Le p52 obtenu, lié à RelB, peut ainsi migrer dans le noyau pour transactiver ses gènes cibles. La LT β cible également la voie classique, via une activation du complexe IKK de manière à reformer le pool cytoplasmique de p100 (cfr introduction, paragraphe 7.7.2).

Afin de focaliser l'impact de la TSA sur la voie alternative induisant l'activation de l'homodimère IKK α sans induire la voie classique, nous avons utilisé des cellules embryonnaires de souris (MEF) déficientes en NEMO. Elles ont été traitées à la LT β (50 ng/mL) durant des temps croissants de 2 à 48 heures (Figure 31). Les expériences d'EMSA ont été réalisées, dans ce cadre-ci, à l'aide d'une sonde radioactive correspondant au site répondant au p52/RelB du promoteur des immunoglobulines. Nous avons pu remarquer que la LT β seule induisait l'activation du NF- κ B principalement entre 8 et 16 heures de traitement. L'ajout de TSA (450 nM) n'est clairement pas impliqué dans un prolongement de l'activation du NF- κ B. Au contraire, il semble induire une activation précoce du NF- κ B, étant donné que l'on peut déjà observer une nette activation après 2 heures. En raison de l'absence de prolongement d'activation du NF- κ B, nous n'avons pas continué l'analyse de la voie alternative.

5. Voie atypique induite par le H $_2$ O $_2$

La première voie atypique que nous avons étudiée est initiée par la présence de H $_2$ O $_2$. Celui-ci active de nombreuses tyrosine kinases. En fonction du type cellulaire, l'activation du NF- κ B peut se faire de deux façons : (i) phosphorylation d'I κ B α sur la tyrosine 42, (ii)

activation du complexe IKK. I κ B α est soit dégradé, soit dissocié du NF- κ B, ce qui permet la transactivation des gènes cibles du NF- κ B libéré (cfr introduction, paragraphe 7.7.3).

Le traitement des cellules HeLa avec du H₂O₂ (250 μ M) entraîne une activation du NF- κ B, allant de 1 à 8 heures, mise en évidence par la technique d'EMSA (Figure 32a). Mais aucun prolongement de cette activation n'est détecté après ajout de TSA (450 nM), à l'exception d'une liaison plus importante après 4 heures de co-traitement. Par les expériences de western blot, nous n'avons pas pu remarquer de modification significative de la présence d'I κ B α dans le cytoplasme que ce soit après stimulation au H₂O₂ seul ou après la combinaison H₂O₂ et TSA (Figure 32a). Storz et Toker (2003) ont démontré que, dans les cellules HeLa, le H₂O₂ est impliqué dans l'activation du complexe IKK. Nous avons donc décidé de tester l'influence de la TSA sur l'activité kinase du complexe IKK induite après H₂O₂ (Figure 32b). L'activité induite par le H₂O₂ seul à 30 minutes est relativement comparable à celle détectée pour le témoin positif qui est le TNF α . Par contre, après 30 minutes de co-traitement, l'activation du complexe s'avère plus faible. Cette diminution ne semblant pas avoir de répercussion significative sur l'activation du NF- κ B, nous avons décidé de ne pas approfondir l'étude de cette voie atypique.

6. Voie alternative induite par le PV

Le pervanadate, inhibiteur de tyrosine phosphatase, est responsable d'un deuxième type de voie dite « atypique » d'activation du NF- κ B. Il induit la phosphorylation d'I κ B α sur la tyrosine 42 suivie de sa dissociation ou dégradation, libérant NF- κ B (cfr introduction, paragraphe 7.7.3). On peut trouver également une activation du complexe IKK suivant le type cellulaire (Mukhopadhyay *et al.*, 2000 ; Storz and Toker, 2003, Takada *et al.*, 2003).

6.1. Activation du NF- κ B

La technique d'EMSA a permis de démontrer une activation du NF- κ B allant de 30 min à 2 heures, suite au traitement des cellules HeLa par le PV seul (200 μ M) (Figure 33a). Par western blot, nous avons détecté une dégradation d'I κ B α à partir de 30 minutes et une réapparition totale après 4 heures. L'ajout de TSA (450 nM) entraîne un prolongement de

l'activation du NF- κ B jusque 4 à 8 heures de stimulation et un retard de la réapparition totale d'I κ B α dans le cytoplasme au-delà de 8 heures.

Nous avons vérifié que l'effet de la TSA pouvait être étendu à un autre inhibiteur de HDAC tel que le SAHA. Effectivement, le co-traitement PV et SAHA présente le même profil de prolongement d'activation du NF- κ B que le traitement combiné PV avec TSA. La réapparition d'I κ B α dans le cytoplasme est aussi retardée avec les deux inhibiteurs de HDAC.

Nous avons également testé l'influence de la TSA dans un autre type cellulaire que les cellules HeLa, les cellules T Jurkat. Le groupe de Béraud (1999) a démontré que, dans ce type cellulaire, le PV induit l'activation du NF- κ B via la phosphorylation sur tyrosine d'I κ B α suivie de sa dissociation du NF- κ B. Les expériences d'EMSA effectuées ne nous ont pas permis de détecter d'extension significative de l'activation du NF- κ B après addition de TSA (Figure 33b). Cependant, la phosphorylation d'I κ B α , représentée par le doublet en western blot, semble s'étendre de 30 minutes à 1 heure quand la TSA a été ajoutée. Ceci pourrait indiquer une activité prolongée de la tyrosine kinase d'I κ B α . L'utilisation des cellules T Jurkat a donc permis de mettre en évidence le fait que l'intensité des effets des inhibiteurs de HDAC sur l'activation du NF- κ B peut dépendre du type cellulaire.

Pour l'ensemble des expériences suivantes, nous avons donc continué d'utiliser la TSA comme inhibiteur de HDAC dans les cellules HeLa, pour lesquelles les effets sont les plus marqués.

6.2. Phosphorylations d'I κ B α

Nous venons de démontrer que le co-traitement des cellules HeLa par le PV et la TSA engendrait un prolongement de l'activation du NF- κ B. Nous nous sommes donc intéressés aux événements situés en amont, comme la phosphorylation d'I κ B α . Etant donné que le PV inhibe des tyrosine phosphatases, il est indirectement responsable de l'activation de nombreuses tyrosine kinases et donc de la phosphorylation d'I κ B α sur la tyrosine 42 (cfr introduction, paragraphe 7.7.3).

Nous avons donc réalisé des immunoprécipitations d'I κ B α , suivie de western blot avec des anticorps dirigés contre les tyrosine phosphorylées d'une part, et d'autre part, contre

I κ B α comme témoin de charge (Figure 34a). Un inhibiteur du protéasome, l'ALLN, a été ajouté à chaque échantillon, mis à part le non traité, afin d'empêcher la dégradation d'I κ B α après phosphorylation. Le PV seul induit la phosphorylation d'I κ B α sur tyrosine endéans les 30 minutes, puis celle-ci diminue nettement après 2 heures. Cependant, aucune différence de phosphorylation n'a été détectée après ajout de TSA. Le témoin de charge étant à peu près correct, nous avons considéré que la TSA n'avait pas d'effet sur la phosphorylation sur tyrosine d'I κ B α .

La phosphorylation d'I κ B α sur les sérines 32 et 36 a aussi été testée par immunoprécipitation d'I κ B α et western blot avec un anticorps reconnaissant I κ B α lorsqu'il est phosphorylé sur ces deux sérines (Figure 34b). Nous avons utilisé de l'ALLN, un inhibiteur du protéasome, dans chaque échantillon, mis à part le non traité, de manière à empêcher la dégradation de la forme phosphorylée d'I κ B α . Que ce soit après le traitement au PV seul ou avec la TSA, la phosphorylation d'I κ B α est semblable après 30 minutes. Le contrôle de charge témoigne de l'équivalence entre chaque échantillon.

Il apparaît donc que la phosphorylation d'I κ B α induite par le PV, que ce soit sur tyrosine ou sur sérine, n'est pas modifiée par la présence de TSA.

6.3. Activité du complexe IKK

Comme cité précédemment, Storz et Toker (2003) ont démontré que le PV induisait l'activation du complexe IKK dans les cellules HeLa. Dans notre travail, la TSA ne semble pas moduler la phosphorylation d'I κ B α . Nous avons donc effectué des expériences d'activité kinase *in vitro* pour déterminer si l'activation du complexe IKK pouvait être influencée par la TSA. Ce complexe IKK a été immunoprécipité, soumis à un test d'activité kinase *in vitro* en présence du substrat recombinant GST-I κ B α ₁₋₅₄ purifié et un western blot a été réalisé avec un anticorps dirigé contre la forme phosphorylée d'I κ B α (Figure 35). Le complexe IKK est effectivement activé après 30 minutes suite au traitement par le PV seul, mais de manière plus faible que le contrôle positif représenté par le TNF α . Cependant, l'ajout de TSA n'affecte pas significativement cette activité ; celle-ci semble légèrement augmentée après 30 minutes et diminuée après 2 heures. La différence n'étant pas marquée dans un sens ou dans l'autre, nous

avons considéré que la TSA n'avait pas d'effet significatif sur l'activation du complexe IKK induit par le PV.

Contrairement au cas de la voie classique, l'extension de l'activation du NF- κ B induite par le co-traitement PV et TSA ne proviendrait pas d'un prolongement de la phosphorylation d'I κ B α . Nous avons donc investigué l'environnement du promoteur *i κ b α* afin de comprendre le retard de la réapparition cytoplasmique de l'inhibiteur du NF- κ B.

6.4. Liaison du NF- κ B au niveau du promoteur *i κ b α*

Le promoteur *i κ b α* , représenté schématiquement à la figure 36, comporte trois sites κ B, κ B1, κ B2 et κ B3, dont le κ B1 est le principal inductible (Le Bail *et al.*, 1993 ; Algarté *et al.*, 1999). A proximité de ce site κ B1, on retrouve également un site Sp1, un site κ B-like chevauchant un site AP-2 et la TATA box. Nous avons réalisé des EMSA avec des sondes correspondant aux sites κ B1, Sp1 et κ B-like/AP-2 de manière à déterminer si l'accrochage de ces facteurs de transcription suite à une stimulation au PV peut être modulé par l'ajout de TSA (Figure 37). Nous avons pu remarquer que la fixation du NF- κ B sur le site κ B1 suit le même profil que celui de la liaison sur le site κ B correspondant au LTR du virus HIV. Effectivement, la TSA prolonge l'accrochage du NF- κ B induit par le PV sur le site κ B1 du promoteur *i κ b α* . Un accrochage prolongé apparaît également sur le site κ B-like/AP-2 après le co-traitement. Par contre, la liaison au site Sp1 n'est nullement modifiée par les stimulations PV et/ou TSA ; elle reste constante.

Nous avons ensuite réalisé des compétitions entre les sites κ B1 et κ B-like/AP-2 afin de vérifier que le site κ B1 est le principal inductible (Figure 38). Les expériences d'EMSA ont démontré que lorsqu'on utilise la sonde κ B1 chaude, un excès de 50 fois de sonde κ B-like/AP-2 froide est nécessaire pour déplacer totalement la liaison. Tandis que lors de l'utilisation de la sonde κ B-like/AP-2 chaude, un excès de seulement 25 fois est requis pour le déplacement de la liaison. Nous pouvons donc dire que le site κ B1 prédomine sur le site κ B/AP-2.

7. Conclusions de l'influence de la TSA sur la signalisation du NF- κ B

Nous pouvons conclure que la TSA engendre une extension de l'activation de la voie classique du NF- κ B lorsqu'elle est induite par le TNF α , l'IL-1 β et le PMA. Ceci peut être expliqué par le fait que l'activité du complexe IKK est prolongée, entraînant une extension de la phosphorylation et de la dégradation d'I κ B α . En l'absence de son inhibiteur, NF- κ B n'est pas décroché de son ADN cible et son activation est donc prolongée. Nous avons aussi pu démontrer que l'activité transcriptionnelle de ce NF- κ B activé est nettement augmentée par l'ajout de TSA.

La TSA seule n'engendre pas de manière significative d'activation du NF- κ B, ni de dégradation de I κ B α , ni d'activation du complexe IKK. Le prolongement de l'activation du NF- κ B obtenu avec les inducteurs de la voie canonique sont donc intrinsèques à l'activation de cette voie lors de la présence de la TSA.

Les voies alternatives activées par la LT β et le H₂O₂ n'ont pas retenu notre attention dans la suite de ce travail étant donné que nous n'avons pas observé de prolongement de l'activation du NF- κ B après ajout de TSA.

Par contre, la voie alternative induite par le PV subit une extension de l'activation du NF- κ B en présence de TSA. Cependant, ce prolongement n'est pas dû à une activité persistante du complexe IKK, comme dans le cas de la voie classique. Nous nous sommes donc intéressés au promoteur *ikb α* dans le but d'élucider l'origine du retard de réapparition d'I κ B α dans le cytoplasme. Il apparaît que la liaison du NF- κ B sur une sonde correspondant au site κ B1 du promoteur *ikb α* est également prolongée. Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons investigué les effets de la TSA sur les mécanismes moléculaires épigénétiques intervenant au niveau du promoteur *ikb α* lors d'une stimulation au PV.

SECONDE PARTIE : EFFET DE LA TSA SUR LES MÉCANISMES MOLÉCULAIRES EPIGÉNÉTIQUES INTERVENANT SUITE A UNE STIMULATION AU PV – COMPARAISON AVEC LE TNF α

1. Introduction

Dans la première partie de ce travail, nous avons étudié l'influence de la TSA sur l'activation de diverses voies de signalisation du NF- κ B : (i) la voie classique, induite notamment par le TNF α , (ii) la voie alternative stimulée par la LT β , (iii) la voie alternative élicitée par le H₂O₂, et enfin (iv) la voie alternative activée par le PV. De cette étude ressort le fait que les voies induites par le TNF α et par le PV subissent toutes deux, suite à la présence de TSA, un prolongement de l'activation du NF- κ B accompagné d'une réapparition différée d'I κ B α dans le cytoplasme. Dans le cas du TNF α , cette extension semble provenir d'une activité prolongée du complexe IKK permettant une phosphorylation et une dégradation continuées d'I κ B α . Par contre, pour le PV, la phosphorylation d'I κ B α , que ce soit sur tyrosine ou sur sérine, ne semble pas modifiée par la présence de TSA. Au cours de cette seconde partie, nous nous sommes donc focalisés sur la détermination de l'origine du retard de réapparition d'I κ B α dans le cytoplasme engendré par le traitement simultané PV et TSA. Nous avons mené cette étude en comparaison avec le co-traitement au TNF α et TSA.

2. I κ B α

2.1. ARN d'I κ B α

Etant donné que la réapparition différée d'I κ B α dans le cytoplasme après le traitement simultané au PV et TSA ne provient pas de sa phosphorylation et dégradation prolongées, nous avons investigué la synthèse de l'ARNm d'I κ B α . Pour cela, nous avons effectué deux types d'expériences : (i) la « Ribonuclease Protection Assay » (RPA) et (ii) la RT-PCR

quantitative en temps réel. Pour ces deux techniques, nous avons traité les cellules HeLa soit au PV, soit au TNF α en présence/absence de TSA et les ARN totaux ont été extraits. Pour les expériences de RPA, nous avons isolé les ARNm d'I κ B α à l'aide d'une sonde marquée radioactivement et soumis ces hybrides à un gel dénaturant (Figure 39a). Nous avons observé que le traitement au PV seul induit la synthèse de l'ARNm d'I κ B α d'un facteur deux par rapport aux cellules non traitées. L'ajout de TSA abolit complètement cette activation à 2 heures, alors qu'à 4 heures, cet effet n'est plus visible, permettant une synthèse retardée de l'ARN. Dans le cadre d'une stimulation au TNF α , la présence de TSA ne modifie aucunement la synthèse de l'ARN de I κ B α .

Ces résultats ont été confirmés par la technique de RT-PCR quantitative en temps réel. Pour ce faire, des amorces spécifiques de l'ARNm d'I κ B α ont été utilisées pour réaliser les RT-PCR quantitatives en temps réel. Le transcrite de la β 2-microglobuline a permis de normaliser les résultats obtenus. Après un traitement d'1 heure au PV seul, nous avons observé une stimulation de trois fois de la synthèse de l'ARNm d'I κ B α qui diminue progressivement à 2 et 4 heures de traitement (Figure 39b). Quand la TSA est ajouté au PV, il y a une forte réduction de cette synthèse de l'ARNm d'I κ B α après 1 et 2 heures de stimulation jusqu'à des niveaux comparables aux cellules non traitées. Cet effet semble se stabiliser à 4 heures, où nous avons observé une légère synthèse différée. Par contre, aucune différence significative de synthèse de l'ARNm n'apparaît entre les inductions au TNF α et celles au TNF α avec TSA.

Nous pouvons donc affirmer que la synthèse de l'ARNm d'I κ B α est retardée après l'addition de TSA au traitement par le PV, mais pas par le TNF α . Cette réduction peut être la cause de la présence prolongée du NF- κ B dans le noyau, étant donné qu'en l'absence d'inhibiteur nouvellement synthétisé, NF- κ B n'est plus rapatrié dans le cytoplasme.

2.2. Activité transcriptionnelle du NF- κ B

Des transfections transitoires ont été réalisées dans les cellules HeLa avec un gène rapporteur luciférase placé sous la dépendance du promoteur *ikb α* (Figure 40a) ou d'un promoteur artificiel comportant cinq sites κ B (Figure 40b). Pour le promoteur *ikb α* , le

traitement par le PV seul a permis de démontrer une forte activité transcriptionnelle qui, lors d'une addition de TSA, est réduite de manière drastique (Figure 40a, échelle logarithmique). Par contre, la présence de TSA ne modifie pas l'activité transcriptionnelle due au TNF α .

Dans le cas du promoteur comportant les cinq sites κ B, nous n'avons observé aucune différence d'activité transcriptionnelle entre les traitements PV seul et PV avec TSA (Figure 40b), alors que l'activité transcriptionnelle induite par le TNF α est clairement augmentée par l'ajout de TSA, comme nous l'avons déjà démontré à la figure 29.

2.3. Modifications épigénétiques du promoteur *ikb α*

Dans la première partie de ce travail, nous avons démontré que le NF- κ B, présent dans le noyau des cellules co-traitées au PV et TSA, est capable de se lier plus longtemps à une sonde *in vitro* en EMSA, que cette sonde contienne le site κ B du LTR du virus HIV ou le site κ B1 du promoteur *ikb α* (cfr paragraphe 6.1 et 6.4). Ces résultats mettent en évidence une présence prolongée du NF- κ B dans le noyau après ajout de TSA à une stimulation au PV. Cependant, l'expression correspondante de l'ARNm d'I κ B α est nettement réduite. Nous avons donc investigué, par la technique d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP), les recrutements *in vivo* de p65, l'ARN Pol II, ainsi que les modifications de l'histone H3 sur le promoteur *ikb α* (Figure 41). Quel que soit le stimulus, PV ou TNF α , l'augmentation approximative d'un facteur trois de la liaison de p65 n'est pas significativement modifiée par l'addition simultanée de TSA (Figure 41a).

Comme p65 est capable de se fixer sur le promoteur *ikb α* sans induire de synthèse de l'ARN, nous avons décidé d'analyser le recrutement de l'ARN Pol II sur ce promoteur (Figure 41b). Après 15 minutes de traitement, nous n'avons pas détecté de différence de liaison marquée entre l'induction au PV seul ou avec la TSA. Mais après 30 minutes, l'ajout de TSA diminue de 40% le recrutement engendré par le PV. Cet effet se stabilise après 1 heure. La fixation de l'ARN Pol II sur le promoteur *ikb α* est donc différée. Par contre, il n'y a pas de modification de la liaison après avoir traité au TNF α seul ou en présence de TSA.

Il est désormais accepté que l'acétylation des histones est un pré-requis au recrutement de la machinerie basale de la transcription (Narlikar *et al.*, 2002). De plus, le groupe de

Yamamoto (2003) a démontré que, sur le promoteur *ikb α* , la phosphorylation de l'histone H3 sur la Ser10 est nécessaire pour l'acétylation sur la Lys14. C'est pourquoi l'acétylation et la phosphorylation *in vivo* de l'histone H3 a été testée par des expériences de ChIP et normalisée avec l'histone H3 non modifiée (Figure 41c et d). Nous avons remarqué que l'acétylation de l'histone H3 sur la Lys14 et la phosphorylation de la Ser10 sont significativement diminuées après 15 et 30 minutes de traitement au PV avec TSA comparé au PV seul. Après 1 heure, les niveaux sont approximativement similaires. Par contre, lors d'une stimulation au TNF α , l'addition de TSA conduit à une augmentation des deux modifications post-traductionnelles sur le promoteur *ikb α* .

Nous pouvons donc conclure que l'altération de la synthèse de l'ARN de I κ B α induite par le co-traitement PV et TSA semble être due, du moins en partie, à un retard de recrutement de l'ARN Pol II et de l'acétylation et phosphorylation de l'histone H3 sur le promoteur *ikb α* . Ce retard de recrutement est spécifique au traitement au PV car les résultats obtenus après stimulation au TNF α sont nettement différents.

2.4. Effet de la TSA seule sur le promoteur *ikb α*

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'influence que la TSA pouvait avoir en traitement isolé sur le promoteur *ikb α* dans le cadre des modifications épigénétiques que nous avons étudié au paragraphe 2.3 et à la figure 41. Des expériences de ChIP ont été réalisées en immunoprécipitant p65, l'ARN Pol II, l'histone H3 acétylé sur la Lys14 ou l'histone H3 phosphorylé sur la Ser10 (Figure 42). Nous avons observé que la TSA seule n'a aucun effet sur le recrutement de p65 sur le promoteur *ikb α* , ni sur la phosphorylation de l'histone H3 sur la Ser10, que ce soit après 30 minutes ou 1 heure. Par contre, le recrutement de l'ARN Pol II et l'acétylation de la Lys14 sont nettement augmentés après traitement à la TSA seule. Ceci peut s'expliquer par l'activité inhibitrice de HDAC que possède la TSA. L'acétylation des histones qui s'en suit favorise donc l'accessibilité de la chromatine. Nous émettons l'hypothèse que l'ARN Pol II a donc la possibilité de se fixer sur le promoteur *ikb α* après stimulation à la TSA seule mais NF- κ B n'étant pas activé par la TSA, p65 n'entre pas dans le noyau et donc ne se lie pas au promoteur.

Nous pouvons conclure que les résultats observés lors de la co-stimulation au PV avec TSA sont intrinsèques à ce traitement et ne sont pas dus à la TSA seule étant donné que les effets observés sont opposés. Dans le cas du traitement simultané PV et TSA, il y a une nette diminution du recrutement de l'ARN Pol II et des modifications post-traductionnelles de l'histone H3. Alors que pour la TSA seule, la fixation de l'ARN Pol II et l'acétylation de l'histone H3 sont clairement augmentées.

2.5. Voie des MAPK

Nous venons de démontrer au paragraphe 2.3 que le retard de synthèse de l'ARN de I κ B α provenant d'un ajout de TSA à une stimulation au PV pouvait être expliqué notamment par une réduction de la phosphorylation de l'histone H3 sur le promoteur *ikb α* . Nous avons donc investigué les kinases responsables de cette phosphorylation. MSK1, activé par les MAPK ERK et p38 (Deak *et al.*, 1998), phosphoryle l'histone H3 sur la Ser10 et p65 sur la Ser276. L'activation de la voie des MAPK a été analysée par western blot sur les protéines totales extraites de cellules HeLa induites au PV ou au TNF α en présence/absence de TSA (figure 43a). Quel que soit le traitement (PV ou TNF α), nous n'avons pas détecté de modification par l'ajout de TSA de la phosphorylation globale d'ERK, de p38, de l'histone H3 et de p65. Des contrôles de charges ont été réalisés en utilisant des anticorps dirigés contre la forme non phosphorylée de chaque protéine. Le niveau élevé de phosphorylation de l'histone H3 sur le Ser10 dans les cellules non traitées peut être expliqué par le fait que cette phosphorylation apparaît suite à un stress cellulaire ou une stimulation mitotique, mais également durant la mitose. Pour cette dernière, MSK1 n'est pas impliqué (Soloaga *et al.*, 2003).

La TSA n'a pas l'air d'avoir d'effet sur la phosphorylation globale de la voie des MAPK. Cependant, étant donné que la phosphorylation de l'histone H3 sur la Ser10 est diminuée sur le promoteur *ikb α* suite au co-traitement PV et TSA, des expériences de CHIP ont été réalisées afin de vérifier le recrutement *in vivo* de p65 phosphorylé sur la Ser276 sur le promoteur *ikb α* (Figure 43b). Quel que soit le stimulus (PV ou TNF α , avec ou sans TSA), la liaison de p65 phosphorylé sur la Ser276 n'est pas significativement modifiée.

Nous pouvons donc affirmer que l'addition de TSA à une stimulation au PV ou au TNF α n'influence ni la phosphorylation globale des MAPK ERK et p38, et des cibles de MSK1 (histone H3 et p65), ni le recrutement de p65 phosphorylé sur la Ser276 sur le promoteur *ikb α* .

2.6. Potentiel transactivateur de p65

Nous nous sommes ensuite intéressés au potentiel transactivateur de p65. La Ser536 de p65, située dans le domaine transactivateur, est la cible de nombreuses kinases (Sakurai *et al.*, 2003, Buss *et al.*, 2004). Sa phosphorylation permet l'acétylation de la Lys310 par CBP/p300 et est, en partie, responsable de la capacité de transactivation de p65 (Chen *et al.*, 2005). La phosphorylation globale de p65 sur la Ser536 a été testée par western blot sur les protéines totales extraites de cellules HeLa traitées avec du PV ou du TNF α en présence/absence de TSA (Figure 44a). Aucune modification de la phosphorylation globale de p65 sur la Ser536 n'a été observée après ajout de TSA. Nous avons dès lors investigué, par la technique de ChIP, le recrutement *in vivo* de cette forme phosphorylée de p65 sur le promoteur *ikb α* (Figure 44b). La fixation obtenue après 30 minutes de stimulation au PV est significativement réduite lors de l'ajout de TSA, tandis qu'après 1 heure, la liaison est comparable avec ou sans TSA. Cette liaison est donc différée. Pour le traitement au TNF α , la présence de TSA conduit à l'augmentation du recrutement du p65 phosphorylé sur la Ser536.

Parmi les multiples kinases responsables de la phosphorylation de p65 sur la Ser536, IKK α a retenu plus particulièrement notre attention. En effet, de nombreuses études ont récemment décrit l'importance de son rôle nucléaire dans l'activation de la transcription. D'un côté, Mayo et ses collaborateurs (Hoberg *et al.*, 2004 et 2006) ont mis en évidence les phosphorylations médiées par IKK α de p65 sur la Ser536 et de SMRT sur la Ser2410. Ceci conduit à la dérepression des complexes SMRT-HDAC3 et à l'acétylation de p65 sur la Lys310 par CBP/p300. D'un autre côté, IKK α est capable de phosphoryler l'histone H3 sur la Ser10 au niveau du promoteur *ikb α* , ce qui permet l'acétylation de l'histone H3 sur la Lys14 par CBP/p300 (Yamamoto *et al.*, 2003, Anest *et al.*, 2003). Comme l'influence du co-traitement au PV et TSA sur l'expression retardée de l'ARNm de I κ B α semble résulter de problèmes de phosphorylation de l'histone H3 sur la Ser10 et de p65 sur la Ser536 au niveau

du promoteur *ikbα*, nous avons voulu déterminer l'existence d'un lien potentiel avec IKKα (Figure 44c). En effet, la TSA entraîne une réduction provisoire du recrutement d'IKKα sur le promoteur *ikbα* lorsqu'il est induit par le PV. Par contre, après stimulation TNFα avec TSA, la liaison d'IKKα est favorisée.

Nous pouvons affirmer que la stimulation au PV induit les recrutements de p65 phosphorylé sur la Ser536 et d'IKKα sur le promoteur *ikbα* mais ceux-ci sont réduits par l'ajout de TSA. Le potentiel transactivateur de p65 est donc affecté par le co-traitement au PV et TSA alors que la phosphorylation globale de p65 sur cette sérine n'est pas modifiée. Ces résultats font apparaître une spécificité intéressante du promoteur *ikbα*. Il existe également une spécificité de l'inducteur étant donné que l'induction au TNFα n'est pas modulée de la même façon.

2.7. Conclusions

Dans la première partie de ce travail, nous avons mis en évidence le fait que la TSA engendrait une extension de l'activation du NF-κB suite au traitement par le PV et le TNFα. Dans le cas du TNFα, cela semble s'expliquer, du moins en partie, par une activité prolongée du complexe IKK qui provoquerait une phosphorylation et une dégradation prolongée d'IκBα. L'absence d'IκBα permettrait à NF-κB de rester fixé plus longtemps à l'ADN cible. Par contre, les phosphorylations d'IκBα sur les résidus tyrosine et sérine induites par le PV ne s'avèrent pas modifiées par la présence de TSA. Nous avons donc investigué la synthèse de l'ARNm d'IκBα afin de déterminer un éventuel problème d'expression. Effectivement, l'ajout de TSA à une stimulation au PV provoque un retard de synthèse de l'ARNm d'IκBα, mais pas pour le TNFα.

L'activité transcriptionnelle du NF-κB sur le promoteur *ikbα* a ensuite été testée et nous a permis de démontrer une induction importante après le PV seul qui est fortement diminuée en présence de TSA. Par contre, aucune modification l'activité transcriptionnelle n'est observée suite au co-traitement au TNFα et TSA.

Afin de déterminer l'origine du problème de synthèse de l'ARNm d'IκBα, nous nous sommes intéressés aux événements moléculaires *in vivo* se déroulant après la stimulation au

PV avec TSA sur le promoteur *ikbα*. Les expériences de ChIP nous ont permis d'établir que l'altération de l'expression de l'ARNm d'IκBα induite par le co-traitement PV et TSA semble être due, du moins en partie, à un retard de recrutement de l'ARN Pol II et des modifications post-traductionnelles de l'histone H3 sur le promoteur *ikbα*. Cependant, les résultats sont nettement différents avec le TNFα.

Une des kinases responsables de la phosphorylation de l'histone H3 sur la Ser10 étant MSK1, nous avons étudié brièvement la voie des MAPK. Nous pouvons affirmer que l'addition de TSA à une stimulation au PV ou au TNFα n'influence ni la phosphorylation globale des MAPK ERK et p38, et des cibles de MSK1 (histone H3 et p65), ni le recrutement de p65 phosphorylé sur la Ser276 sur le promoteur *ikbα*.

Le potentiel transactivateur de p65 a alors été investigué. Nous avons remarqué que, sur le promoteur *ikbα*, le recrutement de p65 phosphorylé sur la Ser536 induit par le PV est significativement réduit lors de l'ajout de TSA, alors qu'aucune modification de la phosphorylation globale de p65 sur la Ser536 n'a été observée. Pour le traitement au TNFα, la présence de TSA conduit à l'augmentation de la liaison du p65 phosphorylé sur la Ser536.

Etant donné que IKKα est reconnu pour phosphoryler aussi bien l'histone H3 sur la Ser10 que p65 sur la Ser536, son recrutement *in vivo* sur le promoteur *ikbα* a été étudié. Une diminution transitoire de la fixation d'IKKα a été mise en évidence suite au co-traitement par le PV et la TSA alors qu'elle est favorisée après stimulation au TNFα avec TSA.

Nous pouvons donc conclure que le co-traitement au PV et TSA serait responsable, sur le promoteur *ikbα*, d'un retard de liaison d'IKKα entraînant une réduction des phosphorylations de p65 sur la Ser536 et de l'histone H3 sur la Ser10. D'une part, nous obtenons un potentiel transactivateur de p65 affecté. Et d'autre part, comme l'acétylation de l'histone H3 sur la Lys14 est dépendante de sa phosphorylation, il y a également une diminution d'acétylation, ce qui engendre un retard de recrutement de l'ARN Pol II. Ceci peut donc expliquer le fait que la synthèse de l'ARNm d'IκBα est différée, empêchant le décrochage du NF-κB de l'ADN cible.

Nous avons également pu déceler une spécificité d'action de la TSA en fonction de l'inducteur utilisé. En effet, le traitement au TNFα conduit, en présence de TSA, à des résultats différents de ceux provenant d'une stimulation au PV.

3. IL-8

3.1. ARN de l'IL-8

Afin de déterminer si les effets de la TSA observés sur le promoteur *ikbα* et sur la synthèse de l'ARNm peuvent s'appliquer à d'autres promoteurs dépendant du NF-κB, nous avons testé les promoteurs *il-8* et *icam-1*. Dans un premier temps, nous avons étudié le promoteur *il-8* (Josse *et al.*, 2001) et la synthèse de l'ARNm (Figure 45a). Les ARN totaux ont été isolés à partir de cellules HeLa traitées au PV ou au TNFα en présence/absence de TSA. Des RT-PCR quantitatives en temps réel ont permis d'analyser les ARN obtenus avec des amorces spécifiques. Les résultats obtenus ont été normalisés avec le transcrite de la β2-microglobuline. Le traitement au PV seul entraîne une forte synthèse de l'ARNm de l'IL-8 qui est nettement réduite par l'ajout de TSA. Cependant, nous avons détecté une augmentation de cette synthèse après 2 et 4 heures de co-traitement au TNFα et TSA.

3.2. Activité transcriptionnelle du NF-κB

Nous avons réalisé des transfections transitoires afin de tester l'activité transcriptionnelle du NF-κB sur une construction représentant le promoteur *il-8* en fusion avec le gène rapporteur de la luciférase. Vingt heures après transfection, les cellules HeLa ont été traitées durant 8 heures avec du PV ou du TNFα en présence/absence de TSA. Après la lyse, l'activité luciférase a pu être détectée (Figure 45b). Nous avons observé une forte activité transcriptionnelle du NF-κB suite à une stimulation au PV, mais l'ajout de TSA entraîne une nette diminution. Par contre, nous avons observé que la TSA engendrait une augmentation de cette activité lorsqu'elle est induite par le TNFα.

3.3. Conclusions

Précédemment, nous avons démontré les effets marqués de la TSA sur le promoteur *ikbα* suite à des stimulations au PV et au TNFα. Nous avons ensuite vérifié si ces effets pouvaient s'appliquer à d'autres promoteurs en testant tout d'abord le promoteur *il-8*. Dans le

cas d'une induction au PV, la synthèse de l'ARNm de l'IL-8 réagit de la même façon que celle de I κ B α après addition de TSA. Effectivement, nous avons obtenu une nette réduction de la synthèse de l'ARNm de l'IL-8 après co-traitement au PV et TSA. Par contre, l'ajout de TSA provoque une augmentation de cette synthèse lorsqu'elle est induite au TNF α .

Les transfections transitoires nous ont clairement montré que la TSA entraîne une diminution de l'activité transcriptionnelle du NF- κ B après stimulation au PV et une augmentation lors d'un traitement au TNF α .

Etant donné que les résultats obtenus sur le promoteur *il-8* se rapprochent de ceux liés au promoteur *i κ b α* , nous avons décidé de ne pas investiguer d'avantage ce promoteur.

4. ICAM-1

4.1. ARN d'ICAM-1

Le troisième promoteur à avoir été étudié est le promoteur *icam-1* (Voragberger *et al.*, 1991). Nous nous sommes tout d'abord intéressé à la synthèse de l'ARNm d'ICAM-1. Les cellules HeLa ont été traitées avec du PV ou du TNF α en présence/absence de TSA. Les ARN totaux ont été isolés et analysés par RT-PCR quantitative en temps réel avec des amorces spécifiques. Le transcrit de la β 2-microglobuline a permis de normaliser les résultats. La comparaison entre les stimulations au PV et au PV avec TSA n'a révélé aucune différence significative de la synthèse de l'ARNm d'ICAM-1 (Figure 46a). Cependant, l'addition de TSA au traitement au TNF α initie une diminution de moitié l'expression de l'ARNm d'ICAM-1 après 1 heure. Celle-ci se stabilise et est même légèrement augmentée à 4 heures. Cet effet est similaire à celui obtenu après co-traitement au PV et TSA sur le promoteur *i κ b α* .

4.2. Activité transcriptionnelle du NF- κ B

Nous avons ensuite examiné l'activité transcriptionnelle du NF- κ B en transfectant transitoirement des cellules HeLa avec un gène rapporteur luciférase placé sous le contrôle du promoteur *icam-1*. Après vingt heures de transfection, ces cellules ont été traitées au PV ou

TNF α en présence/absence de TSA pendant 8 heures avant la lyse. L'activité luciférase détectée a été normalisée avec la quantité de protéine (Figure 46b). Pour les traitements au PV et au TNF α , la présence de TSA n'entraîne pas de changements marquants de l'activité transcriptionnelle du NF- κ B. Ces résultats indiquent que le promoteur *icam-1* ne réagit pas de la même façon que le promoteur *ikb α* aux stimulations par le PV ou le TNF α en présence de TSA. Nous avons donc mis en évidence une spécificité de promoteur pour les effets de la TSA sur les inductions au PV ou au TNF α .

4.3. Modifications épigénétiques du promoteur *icam-1*

Puisque l'influence de la TSA sur les gènes répondant au NF- κ B semble dépendre du promoteur considéré, nous avons exploré le promoteur *icam-1* dans le cadre de la fixation *in vivo* de p65 et de l'ARN Pol II mais aussi des modifications post-traductionnelles de l'histone H3 (Figure 47a et b). Des expériences de ChIP ont été réalisées sur des cellules HeLa traitées au PV ou TNF α en présence/absence de TSA. Quel que soit l'inducteur, PV ou TNF α , les recrutements de p65 et de l'ARN Pol II ne sont pas affectés par la présence de TSA. De manière intéressante, la TSA entraîne une augmentation de l'acétylation de l'histone H3 sur la Lys14 induite par le PV à 1 heure, alors qu'elle n'a aucun effet sur une stimulation au TNF α (Figure 47c). De plus, la phosphorylation de l'histone H3 sur la Ser10 par le PV est favorisée par l'ajout de TSA dès 15 minutes jusqu'à 1 heure (Figure 47d). Des résultats opposés ont été détectés avec le TNF α . En effet, une diminution de la phosphorylation de l'histone H3 est induite par l'addition de TSA à une stimulation au TNF α . Ces données confirment le fait que la TSA affecte différemment la régulation des promoteurs *ikb α* et *icam-1* de manière spécifique du stimulus.

Le recrutement des formes phosphorylées de p65 sur le promoteur *icam-1* a ensuite été étudié par la technique de ChIP sur des cellules HeLa traitées au PV ou TNF α en présence/absence de TSA. Que p65 soit phosphorylé sur la Ser276 ou sur la Ser536 suite à un traitement au PV ou au TNF α , sa liaison sur le promoteur *icam-1* n'est pas significativement modifiée par l'addition de TSA (Figure 48a et b). Le potentiel transactivateur de p65 n'apparaît donc pas modulé par la présence de TSA.

Etant donné qu'IKK α est responsable de la phosphorylation de l'histone H3 sur la Ser10 et de p65 sur la Ser536, nous avons également testé le recrutement d'IKK α sur le promoteur *icam-1* par des expériences de CHIP (Figure 48c). Nous avons observé que la présence de TSA n'induit pas de modification de cette liaison après stimulation au PV, alors que pour le traitement au TNF α , une augmentation de cette fixation est obtenue par ajout de TSA.

4.4. Conclusions

L'étude du promoteur *ikb α* a permis de mettre en évidence l'origine du retard de synthèse de l'ARNm d'IkB α suite au traitement simultané au PV et TSA. En effet, nous avons démontré que ce type d'induction provoque un retard de recrutement d'IKK α , de p65 phosphorylé sur la Ser536 et de l'ARN Pol II mais également une réduction de l'acétylation et de la phosphorylation de l'histone H3. Afin de vérifier si ces effets peuvent s'appliquer à d'autres promoteurs, nous avons testé le promoteur *icam-1*. Nous n'avons pas détecté, par la technique de RT-PCR quantitative en temps réel, de modification de la synthèse de l'ARNm d'ICAM-1 induit par le PV après ajout de TSA. Par contre, cette synthèse est réduite lors du co-traitement au TNF α et TSA. Nous avons donc décelé une similarité de réponse entre le promoteur *icam-1* après traitement TNF α avec TSA et le promoteur *ikb α* suite à une stimulation au PV avec TSA.

Les transfections transitoires ne nous ont pas montré de différence de l'activité transcriptionnelle suite à l'ajout de TSA que ce soit après stimulation au PV ou au TNF α .

Nous nous sommes ensuite intéressés aux modifications épigénétiques liées au promoteur *icam-1*. Grâce aux expériences de CHIP, nous avons démontré que les recrutements de p65 et de l'ARN Pol II ne sont pas modulés par la présence de TSA, que ce soit après stimulation au PV ou au TNF α . Par contre, l'acétylation et la phosphorylation de l'histone H3 induites par le PV sont clairement favorisées après ajout de TSA. Cependant, le co-traitement au TNF α et TSA ne modifie pas l'acétylation mais réduit la phosphorylation de cette histone H3. Les recrutements de p65 phosphorylé sur les Ser276 ou Ser536 induits par le PV ou le TNF α n'ont pas permis de mettre en évidence de modulation par la TSA. Etant donné que la phosphorylation de l'histone H3 est modifiée par l'ajout de TSA, nous avons testé la fixation

d'IKK α . De manière étonnante, aucune différence de liaison n'apparaît après un traitement simultané au PV et TSA, alors que la phosphorylation de l'histone H3 est favorisée. Par contre, une réduction du recrutement d'IKK α induite par le TNF α est observée lors de l'addition de TSA. Celle-ci est probablement liée à la diminution de phosphorylation de l'histone H3.

Ces résultats nous permettent d'affirmer qu'il existe une spécificité d'inducteur et de promoteur de l'activation du NF- κ B.

DISCUSSION - PERSPECTIVES

L'importance du facteur de transcription NF- κ B dans des processus biologiques très variés implique que ses fonctions doivent être étroitement régulées. Les divers acteurs de l'activation du NF- κ B participent à des interactions entre protéines et sont le siège de nombreuses modifications post-traductionnelles, telles que la phosphorylation, l'acétylation, l'ubiquitination, la sumoylation, la neddylation, la nitration de tyrosine et la nitrosylation de cystéine (Amir *et al.*, 2002 ; Marshall *et al.*, 2004 ; Park *et al.*, 2005 ; Gao *et al.*, 2006 ; Perkins, 2006 ; Yakovlev *et al.*, 2007 ; Mabb and Miyamoto, 2007).

Un traitement au TNF α combiné avec un inhibiteur de HDAC, la TSA, entraîne une extension de l'activation du NF- κ B. Celle-ci provient, du moins en partie, d'une activité prolongée du complexe IKK et d'un retard de la réapparition d'I κ B α dans le cytoplasme (Adam *et al.*, 2003). Une explication complémentaire est fournie par une étude décrivant la désacétylation de p65 par HDAC3 suite à une stimulation par le TNF α (cfr introduction, paragraphe 7.8.2). L'affinité de p65 pour I κ B α est alors augmentée, favorisant son export vers le cytoplasme (Chen *et al.*, 2001). L'inhibition des HDACs empêche donc l'interaction de p65 avec I κ B α , mais également son export nucléaire conduisant par conséquent à une résidence nucléaire de p65 plus longue.

Afin de cerner plus précisément l'importance des HDACs dans l'activation du NF- κ B, nous avons étudié les effets de leur inhibition par la TSA sur diverses voies de signalisation du NF- κ B : (i) la voie classique induite par le TNF α , l'IL-1 β ou le PMA, (ii) la voie alternative médiée par la LT β , et (iii) des voies atypiques stimulées par le H₂O₂ ou le PV. Dans la première partie de ce travail, nous avons démontré que la TSA agit sur l'activation du NF- κ B de manière dépendante du stimulus et du type cellulaire. En effet, les cellules HeLa ont permis de mettre en évidence le fait que l'inhibition d'HDACs par la TSA prolonge l'activation du NF- κ B induite par le TNF α , l'IL-1 β , le PMA et le PV. Ce prolongement est associé à un retard de réapparition d'I κ B α dans le cytoplasme. En l'absence d'I κ B α , NF- κ B n'est pas retiré de l'ADN et son activation s'en trouve donc prolongée. Par contre, les stimulations par la LT β et le H₂O₂ ne sont pas similairement affectées par l'ajout de TSA.

1. Voie classique

Dans le cadre de l'activation de la voie classique (TNF α , IL-1 β et PMA), ce prolongement en question est dû à une extension de l'activité du complexe IKK. Celle-ci est plus prononcée avec le PMA ou l'IL-1 β qu'avec le TNF α . Cela peut être expliqué par les diversifications existant entre ces trois types de signalisations qui mènent à l'activation du complexe IKK. En effet, comme nous l'avons décrit dans l'introduction (cfr paragraphe 7.1.1), la stimulation par le TNF α active les protéines TRADD, RIP, TRAF2, TAK1 et FADD en amont du complexe IKK (Chen and Goeddel, 2002 ; Blonska *et al.*, 2005). Dans le cas d'une induction à l'IL-1 β , ce sont les protéines MyD88, IRAK1, IRAK6, TAK1, TAB1 et TAB2 qui signalisent vers les IKKs (Akira and Takeda, 2004). Quant à la voie de signalisation induite par le PMA, elle passe par l'activation des PKCs (Lin *et al.*, 2000). Malgré ces différences d'intensité ou de cinétique, ces trois inducteurs de la voie classique en combinaison avec la TSA présentent une extension de l'activité du complexe IKK. Ce complexe étant le facteur commun aux trois voies, il est envisageable qu'il soit la cible directe de phénomènes d'acétylation/désacétylation. En effet, l'état d'acétylation des protéines situées en amont du complexe est assez peu connu. L'influence de la TSA sur l'activation des IKKs suite à une induction au TNF α est actuellement investiguée par le groupe du Dr Carine Van Lint. Il tente de mettre en évidence une interaction entre le complexe IKK et une HDAC ainsi qu'une acétylation potentielle des IKKs qui pourrait prolonger cette activité du complexe (communication personnelle).

Il serait intéressant de pouvoir disposer d'inhibiteurs spécifiques de chaque HDAC afin de cibler leur action. Ainsi, nous pourrions étudier de manière plus particulière le prolongement de l'activité du complexe IKK. Actuellement, la tubacine inhibe HDAC6, le SAHA aurait un rôle sélectif sur HDAC7 et le PCI-34051 sur HDAC8 (Zhang *et al.*, 2003 ; Dokmanovic *et al.*, 2007 ; Balasubramanian *et al.*, 2008). Par ailleurs, l'utilisation de souris KO pour une HDAC représente également un outil prometteur. Cependant, l'absence d'expression de certaines HDACs est létale au stade embryonnaire. C'est le cas d'HDAC1, HDAC7 et HDAC8, dont le rôle n'est visiblement pas suffisamment compensé par les autres HDACs. Par contre, les souris KO pour HDAC6 sont viables ; elles possèdent un développement normal malgré une tubuline hyperacétylée (Lagger *et al.*, 2002 ; Vannini *et al.*, 2004 ; Chang *et al.*, 2006).

De notre côté, nous avons soulevé l'éventualité d'une influence négative de la TSA sur l'action de phosphatases. Dans ce cas, l'inhibition directe ou indirecte par la TSA de la phosphatase responsable de la déphosphorylation et de la désactivation du complexe IKK pourrait expliquer le prolongement de l'activité des IKKs. En effet, une étude a mis en évidence des complexes entre des HDACs (HDAC1, HDAC6 et HDAC10) et des phosphatases à sérine/thréonine (PP1, Protein Phosphatase 1) (Brush *et al.*, 2004). L'inhibition des HDACs composant ces complexes module l'activité des phosphatases associées. Dans ce contexte, nous pouvons supposer que l'inhibition des HDACs empêche des phosphatases associées de déphosphoryler et donc de désactiver les IKKs. En outre, dans plusieurs études, PP2A a déjà été observée, dans plusieurs études, comme un acteur déterminant de la terminaison de l'activation du complexe IKK (DiDonato *et al.*, 1997 ; Fu *et al.*, 2003 ; Miskolci *et al.*, 2003). Dans cette optique, nous avons analysé l'activité phosphatase de PP2A mais également de PP1 en présence de TSA ou d'inhibiteurs spécifiques, l'acide okadaïque et la calyculin A. Nous avons effectué un test basé sur la fluorescence d'un substrat lorsqu'il est déphosphorylé, le DiFMU. Au cours de cette analyse, nous ne sommes pas parvenus à mettre en évidence une inhibition induite par la TSA supérieure à 15-20%. Nous pouvons donc avancer que la TSA n'a pas d'effet significatif sur les activités de PP1 et de PP2A dans nos conditions d'expérimentation. Néanmoins, l'acide okadaïque et la calyculin A inhibe seulement de 35 à 50% ces activités, alors que les concentrations utilisées sont supérieures d'un facteur 10 à l'indice IC50 des phosphatases. L'inhibition devrait être quasi totale. Cette technique présente donc des limites liées à un bruit de fond excessif. En outre, l'effet de la TSA que nous tentons de mettre en évidence est peut-être ciblé au niveau du complexe IKK. Cependant, nous n'avons pas réussi à détecter de fluorescence après immunoprécipitation du complexe IKK. Cette hypothèse n'a donc pas été approfondie.

D'autres publications soulignent la complexité du système. Tout d'abord, l'équipe de Kray (2005) a récemment remarqué, par l'utilisation d'acide okadaïque, que PP2A favoriserait l'activation des IKKs. Ensuite, d'autres phosphatases modulent négativement l'activation du complexe IKK, comme les PP2C (Hanada *et al.*, 2001 ; Li *et al.*, 2003 ; Prajapati *et al.*, 2004).

Enfin, l'action de la TSA sur la dissociation des complexes constitués d'HDAC1 et de PP1 ne serait pas toujours liée à une inhibition des activités de ces deux types d'enzymes. En effet, elle permettrait à PP1 d'être actif et de déphosphoryler Akt (Chen *et al.*, 2005). Cette

inactivation d'Akt permettrait à GSK3 β de médier l'apoptose (Alao *et al.*, 2006). La distinction entre les résultats de Brush (2004) et ceux de Chen (2005) et Alao (2006) pourrait provenir de la concentration de TSA utilisée et de la durée de traitement. Dans le premier cas, la TSA est utilisée à une concentration de 5 μ M pendant 1 heure, alors que dans le second, elle est de 0,5 μ M durant 12 à 48 heures. Ces données, à première vue, contradictoires sont intéressantes car elles permettent de faire un rapprochement avec d'autres études qui démontrent, d'une part, que le traitement par un inhibiteur d'HDAC (TSA ou butyrate) durant des temps courts (inférieurs à 8 heures) entraînent l'activation du NF- κ B dans le but probable de favoriser la survie cellulaire (Adam *et al.*, 2003). D'autre part, l'exposition prolongée (plus de 12 heures) des cellules à un inhibiteur d'HDAC (TSA, butyrate ou SAHA) amorcent les voies apoptotiques (Johnstone, 2002 ; Burgess *et al.*, 2004) (cfr introduction, paragraphe 6.4.1.3). En outre, cette exposition est responsable de la suppression de l'activation du NF- κ B via deux mécanismes : (i) la diminution de l'expression de sous-unités du protéasome (Place *et al.*, 2005), (ii) la réduction de l'expression du TNFR1 et de son exposition en surface (Imre *et al.*, 2006).

2. Voie alternative

L'effet de l'inhibition des HDACs sur l'activation de la voie alternative a été étudié dans des cellules MEFs déficientes en NEMO afin de ne pas activer la voie classique (cfr introduction, paragraphe 7.7.2). Ce travail n'a pas montré de prolongement de l'activation de la voie alternative du NF- κ B induite par la combinaison LT β et TSA, mais plutôt une activation plus hâtive. Ce résultat interpellant laisse supposer que des HDACs pourraient retarder l'activation de cette voie, autrement dit, que des phénomènes d'acétylation seraient requis. L'analyse plus précise du rôle des HDACs dans la voie alternative constitue certainement une voie de recherche prometteuse.

Il serait intéressant de tester l'acétylation de protéines essentielles à cette voie telles qu'IKK α et NIK. En effet, des études récentes ont démontré qu'IKK α phosphoryle l'histone H3 sur la Ser10 permettant l'acétylation subséquente de la Lys14 par CBP (Yamamoto *et al.*, 2003 ; Anest *et al.*, 2003). De plus, CBP est phosphorylé par IKK α , ce qui régule son activité HAT (Huang *et al.*, 2007). Cette proximité entre IKK α et CBP pourrait indiquer un signe d'acétylation potentielle d'IKK α favorisant son action sur la protéolyse partielle de p100.

D'un autre côté, NIK, contribuant à la phosphorylation de l'histone H3 par IKK α (Park *et al.*, 2006), pourrait également être une cible éventuelle d'acétylation. Par ailleurs, p52, issu de la protéolyse de p100, subit également une acétylation, jouant un rôle négatif sur la liaison de p65 à l'ADN (Hu and Colburn, 2005).

Dans la pratique, nous pourrions réaliser des tests d'acétylation d'IKK α , de NIK et de p52 après induction à la LTB β en présence TSA. Ces analyses pourraient être réalisées soit par incorporation d'acétyl CoA tritié, soit en western blot avec un anticorps reconnaissant les lysines acétylées après avoir immunoprécipité la kinase d'intérêt. Ensuite, le recrutement de ces trois protéines sur un promoteur cible de cette voie d'activation du NF- κ B, tel que SLC (Secondary Lymphoid tissue Chemokine) pourrait être observé par la technique de CHIP (Bonizzi and Karin, 2004).

3. Activation par le H₂O₂

Nous n'avons pas pu montrer de net prolongement de l'activation du NF- κ B induite par le H₂O₂ suite à l'addition simultanée de TSA, hormis une augmentation de la liaison après 4 heures de co-stimulation. Par contre, l'activité du complexe IKK semble diminuée par l'ajout de TSA plutôt qu'augmentée. Cette analyse n'a pas été approfondie dans ce travail étant donné la discordance entre l'activation du NF- κ B et celle des IKKs. Pourtant, la façon dont NF- κ B pourrait être activé malgré une diminution de l'activité du complexe IKK représente une piste attrayante. En effet, nous nous sommes basés sur les travaux de Storz et Toker (2003) démontrant une activation du complexe IKK par la PKD suite au H₂O₂ dans les cellules HeLa. Cependant, une phosphorylation d'I κ B α sur tyrosine est probable dans ce contexte de stress oxydant. Nous pourrions tester l'effet de l'inhibition des HDACs sur cette phosphorylation afin de déterminer sa responsabilité dans l'augmentation de l'activation du NF- κ B après 4 heures de traitement combiné au H₂O₂ et TSA. La réalisation de western blot avec un anticorps dirigé contre la forme phosphorylée sur tyrosine d'I κ B α ainsi que des CHIP permettraient de vérifier le recrutement, notamment, de p65 et de l'ARN Pol II.

En ce qui concerne l'activité du complexe IKK, une hypothèse expliquant la réduction en présence de TSA pourrait provenir d'une acétylation potentielle des IKKs suite à la TSA qui gênerait l'activation par la PKD. En effet, il a été constaté que seules les sérines 180 et

181 d'IKK α et d'IKK β , respectivement, sont nécessaires à l'activation du complexe induit par le H₂O₂ dans les cellules HeLa. Les sérines 176 et 177 ne sont pas requises (Kamata *et al.*, 2002). Ceci n'exclut pas la phosphorylation d'autres sérines des IKKs. Cette différence avec la voie classique qui active en plus les sérines 176 d'IKK α et 177 d'IKK β pourrait être une des raisons de la diminution de l'activité du complexe IKK suite à la co-stimulation avec H₂O₂ et TSA.

4. Activation par le PV

Le PV est un inducteur puissant de la phosphorylation d'I κ B α sur tyrosine par l'inhibition de tyrosine phosphatases. Par ailleurs, certaines stimulations physiologiques de l'activation du NF- κ B requièrent cette phosphorylation d'I κ B α sur tyrosine. C'est le cas du TNF α dans les macrophages isolés de la moelle qui active NF- κ B de manière dépendante de c-Src (Abu-Amer *et al.*, 1998). Le facteur de croissance EGF active également NF- κ B par l'intervention de la phosphorylation de la tyrosine 42 d'I κ B α . Cette voie est indépendante du complexe IKK (Sethi *et al.*, 2007).

L'inhibition des HDACs par l'ajout de TSA entraîne un prolongement de l'activation du NF- κ B par le PV, comme dans le cas de la voie classique. Cette extension est également corrélée avec un retard de réapparition d'I κ B α dans le cytoplasme. De manière surprenante, deux inducteurs de stress oxydant, le H₂O₂ et le PV, réagissent différemment face à la TSA. Cela peut être expliqué, du moins en partie, par le fait que l'inhibition des tyrosine phosphatases par le H₂O₂ est réversible, alors que celle engendrée par le PV ne l'est pas.

Cependant, aucune modification de la phosphorylation sur tyrosine d'I κ B α n'est détectée après ajout de TSA à une stimulation au PV. Nous n'avons pas d'avantage pu mettre en évidence d'activité prolongée du complexe IKK. La phosphorylation d'I κ B α ne semblant pas être la cible de la TSA, contrairement à la voie classique, nous nous sommes intéressés aux événements se déroulant au niveau du promoteur *i κ b α* . L'activation du NF- κ B est aussi prolongée sur le site κ B1 du promoteur *i κ b α* , alors que la réapparition de la protéine dans le cytoplasme est différée. Nous avons tenté de déterminer les raisons de ce retard induit par le PV additionné de TSA dans la seconde partie de ce travail. Une comparaison a été réalisée avec les effets de la TSA sur une stimulation au TNF α .

En outre, l'activation prolongée du NF- κ B induite par le traitement combiné au PV et TSA semble être reproductible avec d'autres inhibiteurs de HDACs, puisque nous l'avons également observée avec le SAHA dans les cellules HeLa. Néanmoins, cet effet n'est pas généralisable à tous les types cellulaires car les cellules T Jurkat ne présentent pas de modulation significative.

Nous pouvons donc affirmer que le rôle des HDACs dans l'activation du NF- κ B dépend de l'inducteur et du type cellulaire. Pour la suite de cette étude, nous avons décidé de nous focaliser sur l'utilisation de deux types d'inducteurs dans les cellules HeLa. Le premier est le TNF α , dont l'activation du NF- κ B est prolongée par la présence de TSA. Il s'agit de l'inducteur de la voie classique qui regroupe le plus de données bibliographiques. Le second inducteur étudié dans la suite de ce travail est le PV. Il présente également une extension de l'activation du NF- κ B en combinaison avec la TSA. Cependant, les mécanismes impliqués diffèrent pour ces deux inducteurs.

5. Modifications épigénétiques au niveau des promoteurs *ikb α* et *icam-1*

Au cours de ces dernières années, il est apparu que la voie de signalisation du NF- κ B subit plusieurs niveaux de régulation. L'aspect nucléaire de ce phénomène est maintenant largement étudié (Vermeulen *et al.*, 2002 ; Yamamoto *et al.*, 2003 ; Hoberg *et al.*, 2006 ; Gloire *et al.*, 2006a ; Habraken and Piette, 2006). En effet, le recrutement du NF- κ B aux gènes cibles et les événements liés à leur transcription dévoilent des cinétiques complexes et sont donc activement contrôlés (Natoli *et al.*, 2005).

5.1. Promoteur *ikb α*

Dans la suite de ce travail, nous avons comparé les effets de la TSA sur deux types de voies d'activation du NF- κ B induites, soit par le PV, soit par le TNF α . L'activation du NF- κ B est prolongée par la présence de TSA après chaque stimulus. Un rôle inhibiteur des HDACs sur l'activation du NF- κ B est donc mis en évidence pour les deux types de voies, mais par des mécanismes distincts. Nous avons analysé la synthèse de l'ARNm d'I κ B α induite par le PV

afin de déterminer une éventuelle perturbation de la transcription par la TSA malgré la présence du NF- κ B dans le noyau.

L'activité prolongée du complexe IKK induite par la co-stimulation au TNF α et à la TSA semble être impliquée dans la réapparition différée d'I κ B α dans le cytoplasme alors qu'il n'y a pas de modification significative de l'expression de l'ARNm d'I κ B α . Par contre, dans le cas d'une induction au PV, l'addition de TSA n'affecte pas les activités des IKKs et des tyrosine kinases en amont d'I κ B α . Cependant, la synthèse de l'ARNm d'I κ B α apparaît retardée, entraînant une persistance de la résidence nucléaire du NF- κ B. L'inhibition des HDACs par la TSA prolonge donc l'activation du NF- κ B induite par le PV en retardant la synthèse de son inhibiteur I κ B α .

Ensuite, nous avons étudié aux mécanismes moléculaires des modifications épigénétiques au niveau du promoteur *ikb α* afin de déterminer l'origine du retard d'expression de l'ARNm d'I κ B α après le co-traitement au PV avec TSA.

Dans ce travail, des expériences de CHIP ont permis de mettre en évidence plusieurs disfonctionnements au niveau du promoteur *ikb α* après une stimulation au PV en présence de TSA. Tout d'abord, nous avons remarqué que la liaison de p65 n'était pas modifiée alors que celle de l'ARN Pol II est réduite. Dans le cadre d'un traitement au PV seul, cette fixation de l'ARN Pol II n'est pas affectée. C'est donc l'inhibition des HDACs qui interfère entre le recrutement de l'ARN Pol II.

Depuis quelques années, de nombreuses études traitent des rôles nucléaires d'IKK α importants pour la phosphorylation de protéines histoniques et non-histoniques. Il a récemment été démontré qu'IKK α coordonne les phosphorylations de p65 sur la Ser536 et de SMRT sur la Ser2410 au niveau de promoteurs dépendant du NF- κ B, *ciap-2* et *il-8* (Hoberg *et al.*, 2006). Ces modifications désactivent le complexe co-répresseur SMRT/HDAC3 et permet l'acétylation de p65 sur la Lys310 par CBP/p300, ce qui augmente son pouvoir transactivateur. Cette interaction entre p65 et CBP est facilitée par IKK α qui phosphoryle les Ser1382 et 1386 de CBP afin d'augmenter son activité HAT et de favoriser l'expression des gènes dépendant du NF- κ B (Huang *et al.*, 2007). En plus de son importance pour le potentiel transactivateur de p65, IKK α est requis pour la liaison de p65 sur certains promoteurs (*icam-1* et *mcp-1*) et pour le retrait d'HDAC3, alors que d'autres promoteurs (*ikb α*) ne nécessitent pas IKK α (Gloire *et al.*, 2007). En outre, IKK α est responsable de la phosphorylation de l'histone

H3 sur la Ser10 au niveau du promoteur *ikbα* (Yamamoto *et al.*, 2003 ; Anest *et al.*, 2003 ; Park *et al.*, 2006). Cette phosphorylation semble requise pour l'acétylation subséquente de l'histone H3 sur la Lys14 par CBP/p300. Cette acétylation est nécessaire pour permettre l'accessibilité aux composants de la machinerie basale de la transcription, dont l'ARN Pol II.

Le recrutement de l'ARN Pol II induit par le PV étant modifié par la présence de TSA, nous avons analysé les phénomènes se déroulant avant cette liaison, tels que les modifications post-traductionnelles des histones et l'éventualité d'une implication pour IKKα. D'autres perturbations ont été mises en évidence sur ce promoteur suite au traitement combiné PV et TSA. Celles-ci conduisent à une diminution de la phosphorylation et de l'acétylation de l'histone H3 sur la Ser10 et la Lys14, respectivement, mais également à une réduction de p65 phosphorylé sur la Ser536 et d'IKKα.

Le potentiel transactivateur de p65 a donc été étudié à travers le recrutement de p65 phosphorylé sur la Ser536 au niveau du promoteur *ikbα*. Nous avons observé que la TSA diminue nettement sa liaison induite par le PV. Pourtant, la fixation de p65 non modifié ne change pas quelque soit le traitement. Cela implique la possibilité que p65 soit probablement phosphorylé après son recrutement au promoteur, comme cela a été proposé par le groupe de Hoberg grâce à l'intervention d'IKKα (2006).

Nous basant sur les études précédentes (Yamamoto *et al.*, 2003 ; Anest *et al.*, 2003 ; Hoberg *et al.*, 2006), nous émettons l'hypothèse que les HDACs pourraient jouer un rôle dans l'activité et/ou le recrutement d'IKKα au niveau du promoteur *ikbα* dans le cas de l'induction au PV. L'expression réduite de l'ARN d'IκBα après le traitement combiné PV et TSA résulterait d'une perturbation transitoire du recrutement d'IKKα sur le promoteur *ikbα*. Cela influencerait les évènements suivants importants pour la transcription. D'un côté, cela réduit la phosphorylation de l'histone H3 sur la Ser10, qui est un prérequis pour l'acétylation de la Lys14 et le recrutement de l'ARN Pol II. D'un autre côté, cela diminue la phosphorylation de p65 sur la Ser536, nécessaire à sa transactivation à travers l'intervention de CBP/p300. En l'absence temporaire de l'ARN Pol II et d'activité transactivatrice de p65, la synthèse de l'ARNm d'IκBα serait différée.

Nous avons également analysé le rôle d'une autre kinase responsable de la phosphorylation de l'histone H3, MSK1 qui se situe dans la voie des MAPK (Deak *et al.*, 1998). Par la technique de western blot, nous avons remarqué que l'addition de TSA à une

stimulation au PV ne modifie ni la phosphorylation des kinases en amont de MSK1, ERK et p38, ni celle de ces cibles, l'histone H3 (Ser10) et p65 (Ser276). L'activité globale de MSK1 ne semble donc pas affectée par ce traitement combiné. De plus, des expériences de ChIP ont permis d'observer que la liaison de p65 phosphorylé sur la Ser276 sur le promoteur *ikbα* n'est pas significativement modifiée après induction au PV avec TSA. Ces résultats suggèrent que MSK1 n'est pas impliqué dans le retard de synthèse de l'ARNm d'IκBα. D'ailleurs, le groupe de Saccani (2002) a démontré que la phosphorylation de l'histone H3 au niveau du promoteur *ikbα* se déroule de manière indépendante de p38, corroborant l'absence d'engagement de MSK1 dans ce processus.

Par contre, un argument supplémentaire en faveur de l'implication d'IKKα dans notre modèle provient d'une analyse des cellules *IKKα^{-/-}* qui présentent un recrutement correct de p65 sur le promoteur *ikbα* mais dévoilent des problèmes de phosphorylation de la Ser10 et d'acétylation de la Lys14 de l'histone H3 (Yamamoto *et al.*, 2003). De leur côté, Hoberg et ses collaborateurs (2004) ont remarqué une perte de liaison de p65 sur les promoteurs *ciap-2* et *il-8* dans les cellules *IKKβ^{-/-}*.

Etant donné le rôle joué par IKKα dans la dé-répression du complexe co-répresseur SMRT/HDAC3, il serait intéressant de déterminer leur fixation au promoteur *ikbα* suite au traitement par le PV seul ou en présence de TSA par la technique de ChIP.

IKKα semblerait être un acteur majeur dans la synthèse de l'ARNm d'IκBα par l'intervention des phosphorylations de l'histone H3 et de p65 au niveau du promoteur *ikbα*. Cependant, d'autres travaux du laboratoire ont mis en évidence la nécessité d'IKKα pour la liaison de p65 sur les promoteurs *icam-1*, alors que, pour le promoteur *ikbα*, IKKα est quasiment dispensable pour cette fixation de p65 (Gloire *et al.*, 2007). Nous pouvons donc supposer qu'IKKα est requis pour la transcription de ces deux gènes mais par des mécanismes différents, dépendant du promoteur considéré.

Une explication potentielle de cette distinction peut découler du fait que moins de 10% des gènes semble modifié par l'inhibition des HDACs. De plus, selon la nature du gène, ces modifications entraînent soit une activation, soit une répression de la transcription (Van Lint *et al.*, 1996 ; Glaser *et al.*, 2003 ; Nusinzon and Horvath, 2005 ; Hildmann *et al.*, 2007). En effet, certains gènes requiert l'activité d'HDACs pour être transcrits (Clayton *et al.*, 2006) (cfr introduction, paragraphe 4.2). L'inhibition d'HDACs entraîne pour ces gènes une diminution

de la transcription. Il a été démontré que le gène *ikbα* fait partie de ces gènes (Peart *et al.*, 2005). D'ailleurs, deux études ont remarqué la persistance d'HDAC3 sur le promoteur *ikbα* suite à une stimulation au TNF α , lui suggérant un rôle (Gao *et al.*, 2005 ; Gloire *et al.*, 2007). Etant donné l'implication d'I κ B α dans la terminaison de l'activation du NF- κ B, nous pouvons supposer que son gène est régulé de manière différente du gène *icam-1*, qui est responsable de la médiation de la réponse dépendante du NF- κ B.

Nous pouvons donc postuler que la transcription du gène *ikbα* nécessite un turnover rapide et que HDAC3 soit requis pour la transcription de l'ARNm d'I κ B α . L'inhibition d'HDAC3 par la TSA entraîne alors une diminution de cette synthèse, malgré la liaison de p65 au promoteur. Dans le cas d'une stimulation au TNF α , l'expression de l'ARNm n'est pas réduite suite à l'addition de TSA. La fixation d'IKK α sur le promoteur pourrait contrecarrer la diminution de cette expression en favorisant les phosphorylations de p65 et de l'histone H3. Cela permettrait l'acétylation de l'histone H3 et le recrutement de l'ARN Pol II. Dans le cas d'une induction au PV, le problème de recrutement d'IKK α dû à la présence de TSA retarderait les modifications subséquentes de l'histone H3 et de p65. La synthèse de l'ARNm serait alors réduite et retardée jusqu'à la liaison d'IKK α .

5.2. Promoteur *icam-1*

Nous avons démontré que, pour le promoteur *icam-1*, la présence de TSA augmente la phosphorylation de l'histone H3 et la liaison d'IKK α induites par le PV, alors qu'elle réduit celle induites par le TNF α . Cette situation est globalement à l'opposé de celle observé sur le promoteur *ikbα*. Néanmoins, le recrutement de l'ARN Pol II sur le promoteur *icam-1* n'apparaît pas modifié par le traitement combiné PV ou TNF α avec la TSA. L'étude de ce promoteur mériterait d'être approfondie afin de clarifier la situation.

Une observation intéressante de ce travail réside dans le fait que l'influence de la TSA sur l'activation du NF- κ B est nettement spécifique du promoteur en cause. Nous avons montré que les promoteurs *ikbα* et *icam-1* répondent différemment à la co-stimulation par le PV ou le TNF α avec la TSA en terme de recrutement de protéines et de modifications épigénétiques de l'histone H3. Cette spécificité des promoteurs a déjà été mise en évidence par le groupe de Sacconi (2001 ; 2002). Il décrit trois types de promoteurs régulés par NF- κ B

sur base de la phosphorylation de l'histone H3 et la dépendance de p38. Le premier type, regroupant les promoteurs *il-8* et *mcp-1*, est associé à une phosphorylation de l'histone H3 et nécessite p38. La deuxième catégorie, comprenant le promoteur *ikbα*, requiert la phosphorylation de l'histone H3 indépendamment de p38. Enfin, le troisième groupe, composé des promoteurs *mip-1α* et *tnfα*, fixe NF-κB sans faire intervenir la p38, ni la phosphorylation de l'histone H3.

Dans cette optique, il serait logique de vérifier le recrutement de MSK1 ainsi que d'IKKα sur ces promoteurs par la technique de ChIP. Nos résultats obtenus sur le promoteur *ikbα* apparaissent similaires à ceux de Saccani (2002) dans le sens où MSK1 et la p38 ne semblent pas requis, contrairement à la phosphorylation de l'histone H3 qui serait médiée par IKKα. Etant donné que le promoteur *icam-1* a été décrit comme réagissant de la même façon que le promoteur *mcp-1* (Gloire *et al.*, 2007), nous supposons qu'il appartient au premier type de promoteur. D'ailleurs, le traitement combiné au PV avec TSA favorise la phosphorylation de la Ser10 de l'histone H3 au niveau du promoteur *icam-1*, sans modification du recrutement d'IKKα. Cette observation pourrait suggérer une implication potentielle de MSK1 dans cette phosphorylation, et non d'IKKα comme pour le promoteur *ikbα*. Ces caractéristiques correspondent au premier type de promoteur décrit par le groupe de Saccani (2002). Par contre, la situation est plus confuse au niveau du promoteur *icam-1* dans le cas d'une stimulation au TNF en présence de TSA. En ce qui concerne le promoteur *il-8*, nous n'avons pas étudié les mécanismes épigénétiques car le profil de synthèse de l'ARNm ressemblait à celui d'*ikbα*. Cependant, dans les travaux de Saccani (2002), ces deux promoteurs font parties de catégories différentes. Il serait donc intéressant d'investiguer les mécanismes épigénétiques du promoteur *il-8* par la technique de ChIP.

En outre, une arginine méthyltransférase, CARM1 (Co-activator-associated arginine methyltransferase 1), représente un nouveau co-activateur transcriptionnel du NF-κB et fonctionne de manière spécifique au promoteur. En effet, les gènes tels que *icam-1* requièrent CARM1 pour la transcription dépendant du NF-κB, alors que la transcription des gènes comme *ikbα* est indépendante de CARM1. CARM1 coactive la transactivation médiée par NF-κB de manière synergique avec CBP/p300 (Covic *et al.*, 2005). Il serait donc intéressant de déterminer l'influence de l'inhibition des HDACs sur l'activité de CARM1 au niveau des promoteurs cités par des expériences de ChIP. Nous pourrions également analyser une

éventuelle interaction avec IKK α par des expériences de co-immunoprécipitation suite à une stimulation au PV ou au TNF α en présence/absence de TSA.

En conclusion, nos résultats suggèrent que l'activation du NF- κ B peut être influencée de plusieurs façons par un inhibiteur d'HDAC à large spectre, tel que la TSA. Les HDACs ont un rôle global d'inhibition par différents mécanismes qui dépendent de l'inducteur et du promoteur considéré. L'étude des mécanismes moléculaires régissant l'influence des HDACs dans la spécificité des promoteurs peut être un outil intéressant pour le développement de stratégies de traitements contre les cancers et les virus tels que le HIV, le BLV ou le EBV (Quivy *et al.*, 2002 ; Demonté *et al.*, 2004 ; Vandergeeten *et al.*, 2007 ; Glozak *et al.*, 2007 ; Merezak *et al.*, 2002 ; Lagneaux *et al.*, 2007 ; Seo *et al.*, 2008).

Enfin, il est important de noter que, même si l'on considère que la TSA est un inhibiteur à large spectre, elle est inefficace contre les HDACs de classe III, les sirtuins. Ces HDACs peuvent donc jouer un rôle non négligeable dans les phénomènes d'acétylation/désacétylation des 90% de gènes non modulés par l'inhibition d'HDACs « classiques » (classe I, II et IV). En effet, les observations mises en évidence par l'utilisation de TSA ne sont qu'une petite goutte d'eau dans l'océan de la régulation de l'expression de gènes impliqués dans les diverses fonctions de la cellule. La recherche en biologie moléculaire a encore de beau jour devant elle...

I κ B α ₍₁₋₅₄₎ (un don du Dr R. Gaynor, Université du Texas Southwestern Center, Dallas). Un western blot a ensuite été réalisé en utilisant un anticorps anti-I κ B α phosphorylé sur les Ser32 et 36.

10. Extraction de protéines totales pour phospho-western blot

Les cellules traitées ont été lavées avec une solution saline de tampon phosphate froide et rapidement lysées dans un tampon de lyse « SDS-blue » (62,5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 10% glycérol, 0,03% poudre de bleu de bromophénol, and 50 mM DTT). Les lysats totaux ont été soniqués pendant 50 secondes, bouillis pendant 3 minutes, et utilisés pour un western blot comme décrit précédemment (Volanti *et al.*, 2002).

11. Test d'activité phosphatase à sérine/thréonine

Les cellules HeLa ont été lysées dans du tampon hypotonique (cfr paragraphe 6) afin d'obtenir des extraits cytoplasmiques. 2,5 μ g d'extraits ont été soumis à un test d'activité phosphatase à l'aide du kit « RediPlate™ 96 EnzChek® Serine-Threonine Phosphatase Assay » (Invitrogen). L'activité phosphatase a été déterminée par la fluorescence émise lors de la déphosphorylation d'un substrat, le DiFMU (6,8-difluoro-4-methylumbelliferyl). Les longueurs d'onde d'excitation/émission du DiFMU sont de 358/452nm. La fluorescence émise par le DiFMU a été mesurée avec le compteur « Wallac Victor-2™ 1420 multilabel » (PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA).

12. RT-PCR quantitative en temps réel

Les échantillons d'ARN totaux ont été extraits avec le kit « RNeasy Mini » (Qiagen) en accord avec les recommandations du fournisseur. Un μ g d'ARN ont subit une transcription inverse (Invitrogen). Pour la PCR quantitative en temps réel, les ADN complémentaires obtenus (cDNA) ont été analysé, en triplicat, avec le « SYBR Green Master Mix » (Applied Biosystems, Foster City, CA) dans le système séquentiel de détection ABI. Les résultats ont été normalisés avec l'ARN de la β 2-microglobuline. Les sondes utilisées pour analyser les

différents transcrits ont été désignés avec le software Primer ExpressTM (Applied Biosystems) : *ikbα*, FW, 5'-CCAACCAGCCAGAAATTGCT-3' and RV, 5'-TCTCGGAGCTCAGGATCACA-3' ; *icam-1*, FW, 5'-TGCCAAGAGGGGAGGGGTGC-3' and RV, 5'-GCCCCGGGGAGGCTCCGTGC-3' ; *β2-microglobulin*, FW, 5'-GAGTATGCCTGCCGTGTG-3' and RV, 5'-AATCCAAATGCGGCATCT-3' (Eurogentec).

13. Test de protection à la ribonucléase (RPA)

Les cellules HeLa ont été traitées avec du PV ou du TNF α en présence/absence de TSA. Nous avons extrait les ARN totaux à l'aide du kit « RNAqueous Phenol Free Total RNA Isolation » (Ambion). Les sondes radioactives correspondant aux ARN d'IkB α et de la GAPDH ont été transcrites *in vitro* avec le kit « RiboprobeTM in vitro transcription systems » (Promega). Seize μ g d'ARN totaux ont été hybridés à la sonde IkB α et 2 μ g à la sonde GAPDH durant 16 heures à 42°C. Les hybrides ARNm/sonde ont été traités à la ribonucléase et extraits à l'aide du kit RPAII (Ambion). Ces hybrides ont été analysés sur un gel dénaturant 6%, qui a été séché et autoradiographié. Nous avons ensuite quantifiés les résultats aux PhosphorImager (Molecular Dynamics). Les résultats obtenus avec la sonde GAPDH ont permis de normaliser ceux de la sonde IkB α .

14. Test d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP)

Les tests d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) ont été effectués avec des solutions préparées dans notre laboratoire suivant le protocole « Upstate Cell signaling ». La chromatine a été clivée en fragments d'une longueur comprise entre 200 et 1000 paires de bases par sonication pendant 15 minutes. Cette sonication a été réalisée dans un bain d'eau générant un haut pouvoir d'ultra-son (Bioruptor, Diagenode, Belgique) : 15 cycles de 30 s ON, 30 s OFF (1cycle/min) à la puissance maximale. Pour réduire le bruit de fond non spécifique, les billes de protéine A-agarose (Pierce), utilisé pour l'immunoprécipitation, ont été pré-saturées avec de l'ADN de sperme de hareng (Sigma). Les immunoprécipitations ont été réalisées avec 2 μ g d'anticorps différents : anti-p65, -RNA Pol II, -histoneH3 acétylé sur Lys14, -histoneH3 phosphorylé sur Ser10, -p65 phosphorylé sur Ser276, -p65 phosphorylé sur Ser536 et -IKK α . Pour tester la liaison aspécifique sur les billes, un anticorps non relevant a

été utilisé comme contrôle de l'immunoprécipitation (anticorps anti-FLAG, Sigma). Une extraction d'ADN au phénol/chloroforme a été réalisée et l'ADN immunoprécipité a été analysé par PCR quantitative en temps réel avec le « SYBR Green Master Mix » dans le système de détection séquentiel ABI. Tous les tests CHIP réalisés présentés correspondent à une moyenne de trois expériences indépendantes. Les sondes, correspondant à la région promotrice de chaque gène, ont été désignées en utilisant le software Prime Express™ : *ikbα*, FW, 5'-CGCTCATCAAAAAGTCCCTG-3' and RV, 5'-GGAATTTCCAAGCCAGTCAGAC-3'; *icam-1*, FW, 5'-CCCGATTGCTTTAGCTTGGAA-3' et RV, 5'-CCGGAACAAATGCTGCAGTTAT-3' (Eurogentec). Comme contrôle de spécificité de liaison, nous avons amplifié la région non-codante proche du gène de l'albumine (Kouskouti and Talianidis, 2005).

BIBLIOGRAPHIE

A

Abu-Amer Y., Ross F. P., McHugh K. P., Livolsi A., Peyron J-F. and Teitelbaum S. L. 1998. Tumor necrosis factor- α activation of nuclear transcription factor- κ B in marrow macrophages is mediated by c-Src tyrosine phosphorylation of I κ B α . *The Journal of Biological Chemistry*, **273**, 29417-29423.

Adam E., Quivy V., Bex F., Chariot A., Collette Y., Vanhulle C., Schoonbroodt S., Goffin V., Nguyễn T. L-A., Gloire G., Carrard G., Friguet B., de Launoit Y., Burny A., Bours V., Piette J. and Van Lint C. 2003. Potentiation of tumor necrosis factor-induced NF- κ B activation by deacetylase inhibitors is associated with a delayed cytoplasmic reappearance of I κ B α . *Molecular and Cellular Biology*, **23**, 6200-6209.

Adli M. and Baldwin A. S. 2006. IKK-i/IKK ϵ controls constitutive, cancer cell-associated NF- κ B activity via regulation of Ser-536 p65/RelA phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry*, **281**, 26976-26984.

Agou F., Traincard F., Vinolo E., Courtois G., Yamaoka S., Israël A. and Véron M. 2004. The trimerization domain of NEMO is composed of the interacting C-terminal CC2 and LZ coiled-coil subdomains. *The Journal of Biological Chemistry*, **279**, 27861-27869.

Akira S. and Takeda K. 2004. Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews Immunology*, **4**, 499-511.

Alao J. P., Stavropoulo A. V., Lam E. W-F. and Coombes R. C. 2006. Role of glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) in mediating the cytotoxic effects of the histone deacetylase inhibitor trichostatin A (TSA) in MCF-7 breast cancer cells. *Molecular Cancer*, **5:40**.

Algarté M., Kwon H., Génin P. and Hiscott J. 1999. Identification by in vivo genomic footprinting of a transcriptional switch containing NF- κ B and Sp1 that regulates the I κ B α promoter. *Molecular and Cellular Biology*, **19**, 6140-6153.

Amir R. E., Iwai K. and Ciechanover A. 2002. The NEDD8 pathway is essential for SCF ^{β} _{TrCP}-mediated ubiquitination and processing of the NF-kappa B precursor p105. *The Journal of Biological Chemistry*, **277**, 23253-23259.

Ammanamanchi S. and Brattain M. G. 2004. Restoration of Transforming Growth Factor- β Signaling through Receptor RI Induction by Histone Deacetylase Activity Inhibition in Breast Cancer Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, **279**, 32620-32625.

Anest V., Hanson J. L., Cogswell P. C., Steinbrecher K. A., Strahl B. D. and Baldwin A. S. 2003. A nucleosomal function for I κ B kinase- α in NF- κ B-dependent gene expression. *Nature*, **423**, 659-663.

Angelov D., Vitolo J. M., Mutskov V., Dimitrov S. and Hayes J. J. 2001. Preferential interaction of the core histone tail domains with linker DNA. *PNAS*, **98**, 6599-6604.

Arnér E. S. J. and Holmgren A. 2000. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur. J. Biochem.*, **267**, 6102-6109.

Ashburner B. P., Westerheide S. D. and Baldwin Jr. A. S. 2001. The p53 (RelA) Subunit of NF- κ B Interacts with the Histone Deacetylase (HDAC) Corepressors HDAC1 and HDAC2 To Negatively Regulate Gene Expression. *Molecular and Cellular Biology*, **21**, 7065-7077.

Ashkenazi A. 2002. Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Cancer*, **2**, 420-430.

B

Baeuerle P. A. and Baltimore D. 1996. NF- κ B : Ten Years After. *Cell*, **87**, 13-20.

Baeuerle P. A. and Henkel T. 1994. Function and activation of NF- κ B in the immune system. *Annu Rev Immunol.*, **12**, 141-179.

Balasubramanian S., Ramos J., Luo W., Sirisawad M., Verner E. and Buggy J. J. 2008. A novel histone deacetylase 8 (HDAC8)-specific inhibitor PCI-34051 induces apoptosis in T-cell lymphomas. *Leukemia*, 1-9.

Baldwin Jr A. S. 1996. The NF- κ B and I κ B proteins : New Discoveries and Insights. *Annu Rev Immunol.*, **14**, 649-681.

Bannister A. J. and Kouzarides T. 2005. Reversing histone methylation. *Nature*, **436**, 1103-1106.

Baud V. and Karin M. 2001. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *TRENDS in Cell Biology*, **11**, 372-377.

Beinke S. and Ley S. C. 2004. Functions of NF- κ B1 and NF- κ B2 in immune cell biology. *Biochem J.*, **382**, 393-409.

Béraud C., Henzel W. J. and Baeuerle P. A. 1999. Involvement of regulatory and catalytic subunits of phosphoinositide 3-kinase in NF- κ B activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 429-434.

Berger S. L. 2001. The Histone Modification Circus. *Science*, **292**, 64-65.

Berger S. L. 2007. The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature*, **447**, 407-412.

Blonska M., Shambharkar P. B., Kobayashi M., Zhang D., Sakurai H., Su B. and Lin X. 2005. TAK1 is recruited to the tumor necrosis factor- α (TNF- α) receptor 1 complex in a receptor-interacting protein (RIP)-dependent manner and cooperates with MEKK3 leading to NF- κ B activation. *The Journal of Biological Chemistry*, **280**, 43056-43063.

Bode A. M. and Dong Z. 2004. Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nature Reviews Cancer*, **4**, 793-805.

Bohuslav J., Chen L-F., Kwon H., Mu Y. and Greene W. C. 2004. p53 induces NF- κ B activation by an I κ B kinase-independent mechanism involving phosphorylation of p65 by ribosomal S6 kinase 1. *The Journal of Biological Chemistry*, **279**, 26115-26125.

- Bolden J. E., Peart M. J. and Johnstone R. W.** 2006. Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Drug Discovery*, **5**, 769-784.
- Bonizzi G. and Karin M.** 2004. The two NF- κ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *TRENDS in Immunology*, **25**, 280-288.
- Broemer M., Krappmann D. and Scheidereit C.** 2004. Requirement of Hsp90 activity for I κ B kinase (IKK) biosynthesis and for constitutive and inducible IKK and NF- κ B activation. *Oncogene*, **23**, 5378-5386.
- Brown K., Park S., Kanno T., Franzoso G. and Siebenlist U.** 1993. Mutual regulation of the transcriptional activator NF- κ B and its inhibitor, I κ B- α . *Procl. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 2532-2536.
- Brush M. H., Guardiola A., Connor J. H., Yao T-P. and Shenokilar S.** 2004. Deacetylase inhibitors disrupt cellular complexes containing protein phosphatases and deacetylases. *The Journal of Biological Chemistry*, **279**, 7685-7691.
- Burgess A., Ruefli A., Beamish H., Warrenner R., Saunders N., Johnstone R. and Gabrielli B.** 2004. Histone deacetylase inhibitors specifically kill nonproliferating tumour cells. *Oncogene*, **23**, 6693-6701.
- Buss H., Dörrie A., Schmitz M. L., Hoffmann E., Resch K. and Kracht M.** 2004. Constitutive and interleukin-1-inducible phosphorylation of p65 NF- κ B at serine 536 is mediated by multiple protein kinases including I κ B kinase (IKK)- α , IKK β , IKK ϵ , TRAF family member-associated (TANK)-binding kinase 1 (TBK1), and an unknown kinase and couples p65 to TATA-binding protein-associated factor II31-mediated interleukin-8 transcription. *The Journal of Biological Chemistry*, **279**, 55633-55643.

C

- Campbell K. J. and Perkins N. D.** 2004. Post-translational modification of RelA(p65) NF- κ B. *Biochemical Society Transactions*, **32**, 1087-1089.
- Candido E. P. M., Reeves R. and Davie J. R.** 1978. Sodium Butyrate Inhibits Histone Deacetylation in Cultured Cells. *Cell*, **14**, 105-113.
- Canty T. G. Jr, Boyle E. M. Jr, Farr A., Morgan E. N., Verrier E. D., Pohlman T. H.** 1999. Oxidative stress induces NF- κ B nuclear translocation without degradation of I κ B α . *Circulation*, **100**, II-361-II-364.
- Carrozza M. J., Li B., Florens L., Suganuma T., Swanson S. K., Lee K. K., Shia W-J., Anderson S., Yates J., Washburn M. P. and Workman J. L.** 2005. Histone H3 Methylation by Set2 Directs Deacetylation of Coding Regions by Rpd3S to Suppress Spurious Intragenic Transcription. *Cell*, **123**, 581-592.
- Carter R. S., Pennington K. N., Ungurait B. J. and Ballard D. W.** 2003. In vivo identification of inducible phosphoacceptors in the IKK γ /NEMO subunit of human I κ B kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, **278**, 19642-19648.
- Carter R. S., Pennington K. N., Ungurait B. J., Arrate P. and Ballard D. W.** 2003. Signal-induced Ubiquitination of I κ B Kinase- β . *The Journal of Biological Chemistry*, **278**,

48903-48906.

Caslini C., Capo-chichi C. D., Roland I. H., Nicolas E., Yeung A. T. and Xu X-X. 2006. Histone modification silence the GATA transcription factor genes in ovarian cancer. *Oncogene*, **25**, 5446-5461.

Chang S., Young B. D., Li S., Qi X., Richardson J. A., Olson E. N. 2006. Histone deacetylase 7 maintains vascular integrity by repressing matrix metalloproteinase 10. *Cell*, **126**, 321-334.

Chen C-S., Weng S-C., Tseng P-H., Lin H-P. and Chen C-S. 2005. Histone acetylation-independent effect of histone deacetylase inhibitors on akt through the reshuffling of protein phosphatase 1 complexes. *The Journal of Biological Chemistry*, **280**, 38879-38887.

Chen F. E., Huang D-B., Chen Y-Q. and Ghosh G. 1998. Crystal structure of p50/p65 heterodimer of transcription factor NF- κ B bound to DNA. *Nature*, **39**, 410-413.

Chen G., Cao P. and Goeddel D. V. 2002. TNF-induced recruitment and activation of the IKK complex require Cdc37 and Hsp90. *Molecular Cell*, **9**, 401-410.

Chen L-F. and Greene W. C. 2003. Regulation of distinct biological activities of the NF- κ B transcription factor complex by acetylation. *J. Mol. Med.*, **81**, 549-557.

Chen L-F. and Greene W. C. 2004. Shaping the nuclear action of NF- κ B. *Molecular Cell Biology*, **5**, 392-401.

Chen L-F., Fischle W., Verdin E. and Greene W. C. 2001. Duration of Nuclear NF- κ B Action Regulated by Reversible Acetylation. *Science*, **293**, 1653-1657.

Chen L-F., Mu Y. and Greene W. C. 2002. Acetylation of RelA at discrete sites regulates distinct nuclear functions of NF- κ B. *The EMBO Journal*, **21**, 6359-6548.

Chen L-F., Williams S. A., Mu Y., Nakano H., Duerr J. M., Buckbinder L. and Greene W. C. 2005. NF- κ B RelA phosphorylation regulates RelA acetylation. *Molecular and Cellular Biology*, **25**, 7966-7975.

Chen Z. J. 2005. Ubiquitin signalling in the NF- κ B pathway. *Nature Cell Biology*, **7**, 758-766.

Cheung P., Tanner K. G., Cheung W. L., Sassone-Corsi P., Denu J. M. and Allis C. D. 2000. Synergistic coupling of histone H3 phosphorylation and acetylation in response to epidermal growth factor stimulation. *Molecular Cell*, **5**, 905-915.

Claudio E., Brown K., Park S., Wang H. and Siebenlist U. 2002. BAFF-induced NEMO-independent processing of NF- κ B2 in maturing B cells. *Nature Immunology*, **3**, 958-965.

Clayton A. L., Hazzalin C. A. and Mahadevan L. C. 2006. Enhanced Histone Acetylation and Transcription. *Molecular Cell*, **23**, 289-296.

Cohen H. Y., Lavu S., Bitterman K. J., Hekking B., Imahiyerobo T. A., Miller C., Frye R., Ploegh H., Kessler B. M. and Sinclair D. A. 2004. Acetylation of the C terminus of Ku70 by CBP and PCAF controls Bax-mediated apoptosis. *Molecular Cell*, **13**, 627-638.

Coope H. J., Atkinson P. G. P., Huhse B., Belich M., Janzen J., Holman M. J., Klaus G. G. B., Johnston L. H. and Ley S. C. 2002. CD40 regulates the processing of NF- κ B2

p100 to p52. *The EMBO Journal*, **21**, 5375-5385.

Covic M., Hassa P. O., Saccani S., Buerki C., Meier N. I., Lombardi C., Imhof R., Bedford M. T., Natoli G. and Hottiger M. O. 2005. Arginine methyltransferase CARM1 is a promoter-specific regulator of NF- κ B-dependent gene expression. *The EMBO Journal*, **24**, 85-96.

D

De Ruijter A. J. M., Van Gennip A. H., Caron H. N., Kemp S. and Van Kuilenburg A. B. P. 2003. Histone deacetylases (HDACs) : characterization of the classical HDAC family. *Biochem J.*, **370**, 737-749.

Deak M., Clifton A. D., Lucocq J. M. and Alessi D. R. 1998. Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB. *The EMBO Journal*, **17**, 4426-4441.

Dejardin E. 2006. The alternative NF- κ B pathway from biochemistry to biology: pitfalls and promises for future drug development. *Biochemical Pharmacology*, **72**, 1161-1179.

Dejardin E., Droin N. M., Delhase M., Haas E., Cao Y., Makris C., Li Z-W., Karin M., Ware C. F. and Green D. R. 2002. The lymphotoxin- β receptor induces different patterns of gene expression via two NF- κ B pathways. *Immunity*, **17**, 525-535.

Delhase M., Hayakawa M., Chen Y. and Karin M. 1999. Positive and negative regulation of I κ B kinase activity through IKK β subunit phosphorylation. *Science*, **284**, 309-313.

Demonté D., Quivy V., Colette Y. and Van Lint C. 2004. Administration of HDAC inhibitors to reactivate HIV-1 expression in latent cellular reservoirs: implications for the development of therapeutic strategies. *Biochemical Pharmacology*, **68**, 1231-1238.

Deroanne C., Bonjean K., Servotte S., Devy L., Colige A., Clause N., Blacher S., Verdin E., Foidart J-M. Nussgens B. V. and Castronovo V. Histone deacetylases inhibitors as anti angiogenic agents altering vascular endothelial growth factor signaling. *Oncogene*, **21**, 427-436.

DiDonato J. A., Hayakawa M., Rothwarf D. M., Zandi E. and Karin M. 1997. A cytokine-responsive I κ B kinase that activates the transcription factor NF- κ B. *Nature*, **388**, 519-521.

Dixit V. and Mak T. W. 2002. NF- κ B Signaling : Many Roads Lead To Madrid. *Cell*, **111**, 615-619.

Dokmanovic M. and Marks P. A. 2005. Prospects: histone deacetylase inhibitors. *Journal of Cellular Biochemistry*, **96**, 293-304.

Dokmanovic M., Perez G., Xu W., Ngo L., Clarke C., Parmigiani R. B. and Marks P. A. 2007. Histone deacetylase inhibitors selectively suppress expression of HDAC7. *Mol Cancer Ther.*, **6**, 2525-2534.

Drew D., Shimada E., Huynh K., Bergqvist S., Talwar R., Karin M. and Ghosh G. 2007. Inhibitor κ B Kinase β Binding by Inhibitor κ B Kinase γ . *Biochemistry*, **46**, 12482-12490.

Ducut Sigala J. L., Bottero V., Young D. B., Shevchenko A., Mercurio F. and Verma I. M. 2004. Activation of Transcription Factor NF- κ B Requires ELKS, an I κ B Kinase Regulatory Subunit. *Science*, **304**, 1963-1967.

Duncan E. A., Anest V., Cogswell P. and Baldwin A. S. 2006. The kinases MSK1 and MSK2 are required for epidermal growth factor-induced, but not tumor necrosis factor-induced, histone H3 Ser10 phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry*, **281**, 12521-12525.

Duran A., Diaz-Meco M. T. and Moscat J. 2003. Essential role of RelA Ser311 phosphorylation by ζ PKC in NF- κ B transcriptional activation. *The EMBO Journal*, **22**, 3910-3918.

Dutnall R. N. and Ramakrishnan V. 1997. Twists and turns of the nucleosome : tails without ends. *Structure*, **5**, 1225-1259.

Dyson M. H., Thomson S., Inagaki M., Goto H., Arthur S. J., Nightingale K., Iborra F. J. and Mahadevan L. C. 2005. MAP kinase-mediated phosphorylation of distinct pools of histone H3 at S10 or S28 via mitogen- and stress-activated kinase 1/2. *Journal of Cell Science*, **118**, 2247-2259.

E

Eberharter A. and Becker P. B. 2002. Histone acetylation : a switch between repressive and permissive chromatin. *EMBO reports*, **3**, 224-229.

Eissenberg J. C. and Elgin S. C. R. 2005. Antagonizing the neighbours. *Nature*, **438**, 1090-1091.

Escarcega R. O., Fuentes-Alexandro S., Garcia-Carrasco M., Gatica A. and Zamora A. 2007. The Transcription Factor Nuclear Factor- κ B and Cancer. *Clinical Oncology*, **19**, 154-161.

F

Fan C., Li Q., Ross D. and Engelhardt J. F. 2003. Tyrosine phosphorylation of I κ B α activates NF κ B through a redox-regulated and c-Src-dependent mechanism following hypoxia/reoxygenation. *The Journal of Immunology*, **278**, 2072-2080.

Finnin M. S., Donigian J. R., Cohen A., Richon V. M., Rifkind R. A., Marks P. A., Breslow R., Pavletich N. P. 1999. Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. *Nature*, **401(6749)**, 188-193.

Fischle W., Wang Y. and Allis C. D. 2003. Binary switches and modification cassettes in histone biology and beyond. *Nature*, **425**, 475-479.

Fontan E., Traincard F., Levy S. G., Yamaoka S., Véron M. and Agou F. 2007. NEMO oligomerization in the dynamic assembly of the I κ B kinase core complex. *FEBS Journal*, **274**, 2540-2551.

Fu D-X., Kuo Y-L., Liu B-Y., Jeang K-T. and Giam C-Z. 2003. Human T-lymphotropic virus type I tax activates I-kappa B kinase by inhibiting I-kappa B kinase-associated serine/threonine protein phosphatase 2A. *The Journal of Biological Chemistry*, **278**, 1487-1493.

Furumai R., Komatsu Y., Nishino N., Khochbin S., Yoshida M. and Horinouchi S. 2001. Potent histone deacetylase inhibitors built from trichostatin A and cyclic tetrapeptide antibiotics including trapoxin. *PNAS*, **98**, 87-92.

G

Gallinari P., Di Marco S., Jones P., Pallaoro M. and Steinkühler C. 2007. HDACs, histone deacetylation and gene transcription : from molecular biology to cancer therapeutics. *Cell Research*, **17**, 195-211.

Gao F., Cheng J., Shi T. and Yeh E. T. H. 2006. Neddylation of a breast cancer-associated protein recruits a class III histone deacetylase that represses NF- κ B-dependent transcription. *Nature Cell Biology*, **8**, 1171-1177.

Gao Z., Chiao P., Zhang X., Zhang X., Lazar M. A., Seto E., Young H. A. and Ye J. 2005. Coactivators and corepressors of NF- κ B in I κ B α gene promoter. *The Journal of Biological Chemistry*, **280**, 21091-21098.

Gao Z., He Q., Peng B., Chiao P. J. and Ye J. 2006. Regulation of Nuclear Translocation of HDAC3 by I κ B α Is Required for Tumor Necrosis Factor Inhibition of Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ Function. *The Journal of Biological Chemistry*, **281**, 4540-4547.

Gerondakis S., Grumont R., Gugasyan R., Wong L., Isomura I., Ho W. and Banerjee A. 2006. Unravelling the complexities of the NF- κ B signalling pathway using mouse knockout and transgenic models. *Oncogene*, **25**, 6781-6799.

Ghosh S. and Karin M. 2002. Missing Pieces in the NF- κ B Puzzle. *Cell*, **109**, S81-S96.

Ghosh S., May M. J. and Kopp E. B. 1998. NF- κ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.*, **16**, 225-260.

Glaser K. B., Staver M. J., Waring J. F., Stender J., Ulrich R. G. and Davidsen S. K. 2003. Gene Expression Profiling of Multiple Histone Deacetylase (HDAC) Inhibitors : Defining a Common Gene Set Produced by HDAC Inhibition in T24 and MDA Carcinoma Cell Lines. *Molecular Cancer Therapeutics*, **2**, 151-163.

Gloire G., Horion J., El Mjiyad N., Bex F., Chariot A., Dejardin E. and Piette J. 2007. Promoter-dependent effect of IKK α on NF- κ B/p65 DNA binding. *The Journal of Biological Chemistry*, **282**, 21308-21318.

Gloire G., Charlier E., Rahmouni S., Volanti C., Chariot A., Erneux C. and Piette J. 2006c. Restoration of SHIP-1 activity in human leukemic cells modifies NF- κ B activation pathway and cellular survival upon oxidative stress. *Oncogene*, **25**, 5485-5494.

Gloire G., Dejardin E. and Piette J. 2006a. Extending the nuclear roles of I κ B kinase subunits. *Biochemical Pharmacology*, **72**, 1081-1089.

- Gloire G., Legrand-Poels S. and Piette J.** 2006b. NF- κ B activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochemical Pharmacology*, **72**, 1493-1505.
- Glozak M. A. and Seto E.** 2007. Histone deacetylases and cancer. *Oncogene*, **26**, 5420-5432.
- Gregorette I. V., Lee Y-M. and Goodson H. V.** 2004. Molecular Evolution of the Histone Deacetylase Family : Functional Implications of Phylogenetic Analysis. *J. Mol. Biol.*, **338**, 17-31.
- Gu W. and Roeder R. G.** 1997. Activation of p53 Sequence-Specific DNA Binding by Acetylation of the p53 C-Terminal Domain. *Cell*, **90**, 595-606.
- Guenther M. G., Barak O. and Lazar M. A.** 2001. The SMRT and N-CoR Corepressors Are Activating Cofactors for Histone Deacetylase 3. *Molecular and Cellular Biology*, **21**, 6091-6101.
- Gui C-Y., Ngo L., Xu W. S., Richon V. M. and Marks P. A.** 2003. Histone deacetylase (HDAC) inhibitor activation of p21^{WAF1} involves changes in promoter-associated proteins, including HDAC1. *PNAS*, **101**, 1241-1246.
- Guoqing C. and Goeddel D. V.** 2002. TNF-R1 Signaling : A beautiful Pathway. *Science*, **296**, 1634-1635.

H

- Habraken Y. and Piette J.** 2006. NF- κ B activation by double-strand breaks. *Biochemical Pharmacology*, **72**, 1132-1141.
- Haddad J. J.** 2004. Oxygen sensing and oxidant/redox-related pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **316**, 969-977.
- Haggarty S. J., Koeller K. M., Wong J. C., Grozinger C. M. and Schreiber S. L.** 2003. Domain-selective small-molecule inhibitor of histone deacetylase 6 (HDAC6)-mediated tubulin deacetylation. *PNAS*, **100**, 4389-4394.
- Hanada M., Ninomiya-Tsuji J., Komaki K-I., Onhishi M., Katsura K., Kanamaru R., Matsumoto K. and Tamura S.** 2001. Regulation of the TAK1 signaling pathway by protein phosphatase 2C. *The Journal of Biological Chemistry*, **276**, 5753-5759.
- Hayden M. S. and Ghosh S.** 2004. Signaling to NF- κ B. *Genes & Development*, **18**, 2195-2224.
- Hazzalin C. A. and Mahadevan L. C.** 2005. Dynamic Acetylation of All Lysine 4-Methylated Histone H3 in the Mouse Nucleus : Analysis at c-fos and c-jun. *PLoS Biology*, **3**, 2111-2126.
- Heyninck K. and Beyaert R.** 2005. A20 inhibits NF- κ B activation by dual ubiquitin-editing functions. *TRENDS in Biochemical Sciences*, **30**, 1-4.
- Hildmann C. and Riester D.** 2007. Histone deacetylases--an important class of cellular regulators with a variety of functions. *Appl Microbiol Biotechnol*, **75**, 487-497.
- Hinz M., Broemer M., Arslan S. C., Otto A., Mueller E-C., Dettmer R. and Scheidereit**

C. 2007. Signal responsiveness of I κ B kinases is determined by Cdc37-assisted transient interaction with Hsp90. *The Journal of Biological Chemistry*, **282**, 32311-32319.

Hoberg J. E., Popko A. E., Ramsey C. S. and Mayo M. W. 2006. I κ B kinase α -mediated derepression of SMRT potentiates acetylation of RelA/p65 by p300. *Molecular and Cellular Biology*, **26**, 457-471.

Hoberg J. E., Yeung F. and Mayo M. W. 2004. SMRT derepression by the I κ B kinase α : a prerequisite to NF- κ B transcription and survival. *Molecular Cell*, **16**, 245-255.

Hu J. and Colburn N. H. 2005. Histone deacetylase inhibition down-regulates cyclin D1 transcription by inhibiting nuclear factor- κ B/p65 DNA binding. *Mol Cancer Res.*, **3**, 100-108.

Huang W-C., Ju T-K., Hung M-C. and Chen C-C. 2007. Phosphorylation of CBP by IKK α Promotes Cell Growth by Switching the Binding Preference of CBP from p53 to NF- κ B. *Molecular Cell*, **26**, 75-87.

Hubbert C., Guardiola A., Shao R., Kawaguchi Y., Ito A., Nixon A., Yoshida M., Wang X-F. and Yao T-P. 2002. HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase, *Nature*, **417**, 455-458.

Huyer G., Liu S., Kelly J., Moffat J., Payette P., Kennedy B., Tsaprailis G., Gresser M. J. and Ramachandran C. 1997. Mechanism of inhibition of protein-tyrosine phosphatases by vanadate and pervanadate. *The Journal of Biological Chemistry*, **272**, 843-851.

Ikura T., Ogryzko V. V., Grigoriev M., Groisman R., Wang J., Horikoshi M., Scully R., Qin J. and Nakatani Y. 2000. Involvement of the TIP60 Histone Acetylase Complex in DNA Repair and Apoptosis. *Cell*, **102**, 463-473.

I

Imbert V., Peyron J-F., Farahi Far D., Mari B., Auberger P. and Rossi B. 1994. Induction of tyrosine phosphorylation and T-cell activation by vanadate peroxide, an inhibitor of protein tyrosine phosphatases. *Biochem. J.*, **297**, 163-173.

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

Imre G., Gekeler V., Leja A., Beckers T. and Boehm M. 2006. Histone deacetylase inhibitors suppress the inducibility of nuclear factor- κ B by tumor necrosis factor- α receptor-1 down-regulation. *Cancer Res.*, **66**, 5409-5418.

Insinga A., Monestrioli S., Ronzoni S., Gelmetti V., Marchesi F., Viale A., Altucci L., Nervi C., Minucci S. and Pelicci P. G. 2005. Inhibitors of histone deacetylases induce tumor-selective apoptosis through activation of the death receptor pathway. *Nature Medicine*, **11**, 71-76.

Israël A. 2006. NF- κ B activation: Nondegradative ubiquitination implicates NEMO. *TRENDS in Immunology*, **27**, 395-397.

Ito A., Kawaguchi Y., Lai C-H., Kovacs J. J., Higashimoto Y., Appella E. and Yao T-P. 2002. MDM2-HDAC1-mediated deacetylation of p53 is required for its degradation. *The EMBO Journal*, **21**, 6236-6245.

J

Jacobs M. D. and Harrison S. C. 1998. Structure of an I κ B α /NF- κ B Complex. *Cell*, **95**, 749-758.

Jaken S. 1996. Protein kinase C isozymes and substrates. *Current Opinion in Cell Biology*, **8**, 168-173.

Jenuwein T. and Allis D. 2001. Translating the Histone Code. *Science*, **293**, 1074-1080.

Jiang X. and Wang X. 2004. Cytochrome C-Mediated Apoptosis. *Annu. Rev. Biochem.*, **73**, 87-106.

Johansen K. M. and Johansen J. 2006. Regulation of chromatin structure by histone H3S10 phosphorylation. *Chromosome Research*, **14**, 393-404.

Johnstone R. W. 2002. Histone-deacetylase inhibitors : novel drugs for the treatment of cancer. 2002. *Nat Rev Drug Discov.*, **1(4)**, 287-299.

Josse C., Boelart J. R., Best-Belpomme M. and Piette J. 2001. Importance of post-transcriptional regulation of chemokine genes by oxidative stress. *Biochem. J.*, **360**, 321-333.

K

Kamata H., Honda S., Maeda S., Chang L., Hirata H. and Karin M. 2005. Reactive oxygen species promote TNF α -induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases. *Cell*, **11**, 649-661.

Kamata H., Manabe T., Oka S-I., Kamata K. and Hirata H. 2002. Hydrogen peroxide activates I κ B kinases through phosphorylation of serine residues in the activation loops. *FEBS Letters*, **519**, 231-237.

Karin M. 2006. Nuclear factor- κ B in cancer development and progression. *Nature*, **44**, 431-436.

Karin M. and Ben-Neriah Y. 2000. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annual Review of Immunology*, **18**, 621-663.

Karin M. and Lin A. 2002. NF- κ B at the crossroads of life and death. *Nature Immunology*, **3**, 221-227.

Kelly W. K., O'Connor O. A. and Marks P. A. 2002. Histone deacetylase inhibitors : from target to clinical trials. *Expert Opin. Investig. Drugs*, **11(12)**, 1695-1713.

Kiernan R., Brès V., Ng R. W. M., Coudart M-P., El Messaoudi S., Sardet C., Jin D-Y., Emiliani S. and Benkirane M. 2003. Post-activation Turn-off of NF- κ B-dependent Transcription Is Regulated by Acetylation of p65. *The Journal of Biological Chemistry*, **278**,

2758-2766.

Knights C. D., Catania J., Di Giovanni S., Muratoglu S., Perez R., Swartzbeck A., Quong A. A., Zhang X., Beerman T., Pestell R. G. and Avantaggiati M. L. 2006. Distinct p53 acetylation cassettes differentially influence gene-expression patterns and cell fate. *The Journal of Cell Biology*, **173**, 533-544.

Kouskouti A. and Talianidis I. 2004. Histone modifications defining active genes persist after transcriptional and mitotic inactivation. *The EMBO Journal*, **24**, 347-357.

Kouzarides T. 1999. Histone acetylases and deacetylases in cell proliferation. *Current Opinion in Genetics & Development*, **9**, 40-48.

Kray A. E., Carter R. S., Pennington K. N., Gomez R. J., Sanders L. E., Llanes J. M., Khan W. N., Ballard D. W. and Wadzinski B. E. 2005. Positive regulation of I κ B kinase signaling by protein serine/threonine phosphatase 2A. *The Journal of Biological Chemistry*, **280**, 35974-35982.

Kuo M-H., Zhou J., Jambeck P., Churchill M. E. A. and Allis C. D. 2008. Histone acetyltransferase activity of yeast Gcn5p is required for the activation of target genes in vivo. *Genes and development*, **12**, 627-639.

L

Lagger G., Doetzelhofer, Schuettengruber B., Haidweger E., Simboeck E., Tischler J., Chiocca S., Suske G., Rotheneder H., Wintersberger E. and Seiser C. The Tumor Suppressor p53 and Histone Deacetylase 1 Are Anatomical Regulators of the Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor p21/WAF1/CIP1 Gene. *Molecular and Cellular Biology*, **23**, 2669-2679.

Lagger G., O'Carroll D., Rembold M., Khier H., Tischler J., Weitzer G., Schuettengruber B., Hauser C., Brunmeir R., Jenuwein T. and Seiser C. 2002. Essential function of histone deacetylase 1 in proliferation control and CDK inhibitor repression. *EMBO Journal*, **21**, 2672-2681.

Lagneaux L., Gillet N., Stamatopoulos B., Delforge A., Dejeneffe M., Massy M., Meuleman N., Kentos A., Martiat P., Willems L. and Bron D. 2007. Valproic acid induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells through activation of the death receptor pathway and potentiates TRAIL response. *Experimental Hematology*, **35**, 1527-1537.

Le Bail O., Schmidt-Ullrich R. and Israël A. 1993. Promoter analysis of the gene encoding the I κ B- α /MAD3 inhibitor of NF- κ B: positive regulation by members of the rel/NF- κ B family. *The EMBO Journal*, **12**, 5043-5049.

Lee H-W., Ahn D-H., Crawley S. C., Li J-D., Gum Jr. J. R., Basbaum C. B., Fan N. Q., Szymkowski D. E., Han S-Y., Lee B. H., Sleisenger M. H. and Kim Y. S. 2002. Phorbol 12-myristate 13-acetate up-regulates the transcription of MUC2 intestinal mucin via ras, ERK, and NF- κ B. *The Journal of Biological Chemistry*, **277**, 32624-32631.

Lee K. K. and Workman J. L. 2007. Histone acetyltransferase complexes : one size doesn't fit all. *Molecular Cell Biology*, **8**, 284-295.

Lee S-K., Kim J-H., Lee Y. C., Cheong J. and Lee J. W. 2000. Silencing Mediator of Retinoic and Thyroid Hormone Receptors, as a Novel Transcriptional Corepressor Molecule of Activating Protein-1, Nuclear Factor- κ B, and Serum Response Factor. *The Journal of Biological Chemistry*, **275**, 12470-12474.

Legrand-Poels S., Zecchinon L., Piret B., Schoonbroodt S. and Piette J. 1997. Involvement of different transduction pathways in NF- κ B activation by several inducers. *Free Radic Res.*, **27**, 301-309.

Lehrmann H., Pritchard L. L. and Harel-Bellan A. 2002. Histone acetyltransferases and deacetylases in the control of cell proliferation and differentiation. *Adv Cancer Res*, **86**, 41-65.

Li H. and Wu X. 2004. Histone deacetylase inhibitor, Trichostatin A, activates p21^{WAF1/CIP1} expression through downregulation of c-myc and release of the repression of c-myc from the promoter in human cervical cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **324**, 860-867.

Li M. G., Katsura K., Nomiya H., Komaki K-I., Ninomiya-Tsuji J., Matsumoto K., Kobayashi T. and Tamura S. 2003. Regulation of the interleukin-1-induced signaling pathways by a novel member of the protein phosphatase 2C family (PP2C ϵ). *The Journal of Biological Chemistry*, **278**, 12013-12021.

Li N. and Karin M. 1999. Is NF- κ B the sensor of oxidative stress? *The FASEB Journal*, **13**, 1137-1143.

Lin X., O'Mahony A., Mu Y., Geleziunas R. and Greene W. C. 2000. Protein kinase C- θ participates in NF- κ B activation induced by CD3-CD28 costimulation through selective activation of I κ B kinase β . *Molecular and Cellular Biology*, **20**, 2933-2940.

Livolsi A., Busuttil V., Imbert V., Abraham R. T. and Peyron J-F. 2001. Tyrosine phosphorylation-dependent activation of NF-kappa B. Requirement for p56 LCK and ZAP-70 protein tyrosine kinases. *Eur. J. Biochem.*, **268**, 1508-1515.

Luger K., Mäder A. W., Richmond R. K., Sargent D. F. and Richmond T. J. 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 angström resolution. *Nature*, **389**, 251-260.

M

Mabb A. M. and Miyamoto S. 2007. SUMO and NF- κ B ties. *Cell. Mol. Life Sci.*, **64**, 1979-1996.

Marks P. A., Rifkind R. A., Richon V. M., Breslow R., Miller T. and Kelly W. K. 2001. Histone deacetylases and cancer : causes and therapies. *Cancer*, **1**, 194-202.

Marshall H. E., Hess D. T. and Stamler J. S. 2004. S-nitrosylation: physiological regulation of NF- κ B. *PNAS*, **101**, 8841-8842.

Martin M. U. and Wesche H. 2002. Summary and comparison of the signaling mechanisms of the Toll/interleukin-1 receptor family. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1592**, 265-280.

Matsuyama A., Shimazu T., Sumida Y., Saito A., Yoshimatsu Y., Seigneurin-Berny D.,

Osada H., Komatsu Y., Nishino N., Khochbin S., Horinouchi S. and Yoshida M. 2002. In vivo destabilization of dynamic microtubules by HDAC6-mediated deacetylation. *The EMBO Journal*, **21**, 6820-6831.

Mattioli I., Sebald A., Bucher C., Charles R-P., Nakano H., Doi T., Kracht M. and Schmitz M. L. 2004. Transient and selective NF- κ B p65 serine 536 phosphorylation induced by T cell costimulation is mediated by I κ B kinase beta and controls the kinetics of p65 nuclear import. *The Journal of Immunology*, **172**, 6336-6344.

May M. J., Larsen S. E., Shim J. H., Madge L. A. and Ghosh S. 2004. A novel ubiquitin-like domain in I κ B kinase β is required for functional activity of the kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, **279**, 45528-45539.

May M. J., Marienfeld and Ghosh S. 2002. Characterization of the I κ B-kinase NEMO Binding Domain. *The Journal of Chemistry*, **277**, 45992-46000.

Mellor J. 2006. Dynamic nucleosomes and gene transcription. *Trends in Genetics*, **22**, 320-329.

Mercurio F., Zhu H., Murray B. W., Shevchenko A., Bennet B. L., Li J. W., Young D. B., Barbosa M. and Mann M. 1997. IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated I κ B kinases essential for NF- κ B activation. *Science*, **278**, 860-865.

Merezak C., Reichert M., Van Lint C., Kerkhofs P., Portetelle D., Willems L. and Kettmann R. 2002. Inhibition of histone deacetylases induces bovine leukemia virus expression in vitro and in vivo. *Journal of Virology*, **76**, 5034-5042.

Meyer M., Schreck R. and Baeuerle P. A. 2005. H₂O₂ and antioxidants have opposite effects on activation of NF- κ B and AP-1 in intact cells: AP-1 as secondary antioxidant-responsive factor. *The EMBO Journal*, **12**, 2005-2015.

Miller B. S. and Zandi E. 2001. Complete Reconstitution of Human I κ B Kinase (IKK) Complex in Yeast. Assessment of its stoichiometry and the role of IKK γ on the complex activity in the absence of stimulation. *The Journal of Biological Chemistry*, **276**, 36320-36326.

Miskolci V., Castro-Alcaraz S., Nguyen P., Vancura A., Davidson D. and Vancurova I. 2003. Okadaic acid induces sustained activation of NF κ B and degradation of the nuclear I κ B α in human neutrophils. *Arch Biochem Biophys.*, **417**, 44-52.

Mukhopadhyay A., Manna S. K. and Aggarwal B. B. 2000. Pervanadate-induced nuclear factor- κ B activation requires tyrosine phosphorylation and degradation of I κ B α . Comparison with tumor necrosis factor- α . *The Journal of Biological Chemistry*, **275**, 8549-8555.

N

Nakata S., Yoshida T., Horinaka M., Shiraishi T., Wakada M. and Sakai T. 2004. Histone deacetylase inhibitors upregulate death receptor 5/TRAIL-R2 and sensitize apoptosis induced by TRAIL/APO2-L in human malignant tumor cells. *Oncogene*, **23**, 6261-6271.

Narlikar G. J., Fan H-Y. and Kingston R. E. 2002. Cooperation between Complexes that Regulate Chromatin Structure and Transcription. *Cell*, **108**, 475-487.

Natoli G., Sacconi S., Bosisio D. and Marazzi I. 2005. Interactions of NF- κ B with chromatin: the art of being at the right place at the right time. *Nature Immunology*, **6**, 439-445.

Ng H. H. and Bird A. 2000. Histone deacetylases : silencers for hire. *Elsevier science TIBS*, **25**, 121-126.

Nordberg J. and Arnér E. S. J. 2001. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology & Medicine*, **31**, 1287-1312.

Nusinzon I. and Horvath C. M. 2005. Histone Deacetylases as Transcriptional Activators? Role Reversal in Inducible Gene Regulation. *Science's stke*, **296**, 1-6.

O

O'Donnell M. A., Legarda-Addison D., Skountzos P., Yeh W. C. and Ting A. T. 2007. Ubiquitination of RIP1 regulates an NF- κ B-independent cell-death switch in TNF signaling. *Current Biology*, **17**, 418-424.

O'Mahony A., Lin X., Geleziunas R. and Greene W. C. 2000. Activation of the heterodimeric I κ B kinase alpha (IKK α)-IKK β complex is directional: IKK α regulates IKK β under both basal and stimulated conditions. *Molecular and Cellular Biology*, **20**, 1170-1178.

Ocker M and Schneider-Stock R. 2007. Histone deacetylase inhibitors : Signalling towards p21^{cip1/waf1}. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **39**, 1367-1374.

Oka S-I., Kamata H., Kamata K., Yagisawa H. and Hirata H. 2000. N-Acetylcysteine suppresses TNF-induced NF- κ B activation through inhibition of I κ B kinases. *FEBS Letters*, **472**, 196-202.

Osada H., Tatematsu Y., Masuda A., Saito T., Sugiyama M., Yanagisawa K. and Takahashi T. 2001. Heterogeneous Transforming Growth Factor (TGF)- β Unresponsiveness and Loss of TGF- β Receptor Type II Expression Caused by Histone Deacetylation in Lung Cancer Cell Lines. *Cancer Research*, **61**, 8331-8339.

P

Palkowitsch L., Leidner J., Ghosh S. and Marienfeld R. B. 2008. Phosphorylation of serine 68 in the I κ B kinase (IKK)-binding domain of NEMO interferes with the structure of the IKK complex and tumor necrosis factor- α -induced NF- κ B activity. *The Journal of Biological Chemistry*, **283**, 76-86.

Parekh D. B., Ziegler W. and Parker P. J. 2000. Multiple pathways control protein kinase C phosphorylation. *The EMBO Journal*, **19**, 496-503.

Park G. Y., Wang X., Hu N., Pedchenko T. V., Blackwell T. S. and Christman J. W. 2006. NIK is involved in nucleosomal regulation by enhancing histone H3 phosphorylation by IKK α . *The Journal of Biological Chemistry*, **281**, 18684-18690.

Park K-J., Gaynor R. B. and Kwak Y. T. 2003. Heat shock protein 27 association with the I

κ B kinase complex regulates tumor necrosis factor alpha-induced NF- κ B activation. *The Journal of Biological Chemistry*, **278**, 35272-35278.

Park S. W., Huq M. D. M., Hu X. and Wei L-N. 2005. Tyrosine nitration on p65: a novel mechanism to rapidly inactivate nuclear factor- κ B. *Molecular & Cellular Proteomics*, **4**, 300-309.

Peart M. J., Smyth G. K., van Laar R. K., Bowtell D. D., Richon V. M., Marks P. A., Holloway A. J. and Johnstone R. W. 2005. Identification and functional significance of genes regulated by structurally different histone deacetylase inhibitors. *PNAS*, **102**, 3697-3702.

Pennisi E. 2007. Working the (gene count) numbers : finally, a firm answer ? *Science*, **316**, 1113.

Perkins N. D. 2006. Post-translational modifications regulating the activity and function of the nuclear factor κ B pathway. *Oncogene*, **25**, 6717-6730.

Peters R. T., Liao S-M. and Maniatis T. 2000. IKK ϵ is part of a novel PMA-inducible I κ B kinase complex. *Molecular Cell*, **5**, 513-522.

Place R. F., Noonan E. J. and Giardina C. 2005. HDAC inhibition prevents NF- κ B activation by suppressing proteasome activity: down-regulation of proteasome subunit expression stabilizes I κ B α . *Biochemical Pharmacology*, **70**, 394-406.

Pomerantz J. L. and Baltimore D. 2002. Two Pathways to NF- κ B. *Molecular Cell*, **10**, 693-701.

Prajapati S. and Gaynor R. B. 2002. Regulation of I κ B kinase (IKK) γ /NEMO function by IKK β -mediated phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry*, **277**, 24331-24339.

Prajapati S., Verma U., Yamamoto Y., Kwak Y. T. and Gaynor R. B. 2004. Protein phosphatase 2C β association with the I κ B kinase complex is involved in regulating NF- κ B activity. *The Journal of Biological Chemistry*, **279**, 1739-1746.

Q

Quirling M., Page S., Jilg N., Plenag K., Peus D., Grubmüller C., Wein gärtner M., Fischer C., Neumeier D. and Brand K. 2004. Detection of IKK β -IKK γ subcomplexes in monocytic cells and characterization of associated signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, **279**, 37452-37460.

Quivy V. and Van Lint C. 2004. Regulation at multiple levels of NF- κ B-mediated transactivation by protein acetylation. *Biochemical Pharmacology*, **68**, 1221-1229.

Quivy V., Adam E., Collette Y., Demonte D., Chariot A., Vanhulle C., Berkhout B., Castellano R., de Launoit Y., Burny A., Piette J., Bours V. and Van Lint C. 2002. Synergistic activation of human immunodeficiency virus type 1 promoter activity by NF- κ B and inhibitors of deacetylases: potential perspectives for the development of therapeutic strategies. *Journal of Virology*, **76**, 11091-11103.

R

- Ran R., Lu A., Zhang L., Tang Y., Zhu H., Xu H., Feng Y., Han C., Zhou G., Rigby A. C. and Sharp F. R.** 2004. Hsp70 promotes TNF-mediated apoptosis by binding IKK γ and impairing NF- κ B survival signaling. *Genes & Development*, **18**, 1466-1481.
- Rasclé A., Johnston J. A. and Amati B.** 2003. Deacetylase Activity Is Required for Recruitment of the Basal Transcription Machinery and Transactivation by STAT5. *Molecular and Cellular Biology*, **23**, 4162-4173.
- Richon V. M., Sandhoff T. W., Rifkind R. A. and Marks P. A.** 2000. Histone deacetylase inhibitor selectively induces p21^{WAF1} expression and gene-associated histone acetylation. *PNAS*, **97**, 10014-10019.
- Riester D., Hildmann C. and Schwienhorst A.** 2007. Histone deacetylase inhibitors—turning epigenetic mechanisms of gene regulation into tools of therapeutic intervention in malignant and other diseases. *Appl. Microbiol Biotechnol.*, **75**, 499-514.
- Rodriguez M. S., Wright J., Thompson J., Thomas D., Baleux F., Virelizier J-L., Hay R. T. and Arenzana-Seisdedos F.** 1996. Identification of lysine residues required for signal-induced ubiquitination and degradation of I κ B- α in vivo. *Oncogene*, **12**, 2425-2435.

S

- Saccani S., Marazzi I., Beg A. A. and Natoli G.** 2004. Degradation of promoter-bound p65/RelA is essential for the prompt termination of the nuclear factor κ B response. *The Rockefeller University Press*, **200**, 107-113.
- Saccani S., Pantano S. and Natoli G.** 2002. p38-Dependent marking of inflammatory genes for increased NF- κ B recruitment. *Nature Immunology*, **3**, 69-75.
- Saccani S., Pantano S. and Natoli G.** 2005. Two waves of nuclear factor κ B recruitment to target promoters. *J. Exp. Med.*, **193**, 1351-1359.
- Saitoh T., Nakano H., Yamamoto N. and Yamaoka S.** 2002. Lymphotoxin- β receptor mediates NEMO-independent NF- κ B activation. *FEBS Letters*, **532**, 45-51.
- Saitoh T., Nakayama M., Nakano H., Yagita H., Yamamoto N. and Yamaoka S.** 2003. TWEAK induces NF- κ B2 p100 processing and long lasting NF- κ B activation. *The Journal of Biological Chemistry*, **278**, 36005-36012.
- Sakurai H., Chiba H., Miyoshi H., Sugita T. and Toriumi W.** 1999. I κ B kinases phosphorylate NF- κ B p65 subunit on serine 536 in the transactivation domain. *The Journal of Biological Chemistry*, **274**, 30353-30356.
- Sakurai H., Suzuki S., Kawasaki N., Nakano H., Okzaki T., Chino A., Doi T. and Saiki I.** 2003. Tumor necrosis factor- α -induced IKK phosphorylation of NF- κ B p65 on serine 536 is mediated through the TRAF2, TRAF5, and TAK1 signaling pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, **278**, 36916-36923.
- Sambucetti L. C., Fischer D. D., Zabudoff S., Kwon P. O., Chamberlin H., Trogani N., Xu H. and Cohen D.** 1999. Histone Deacetylase Inhibition Selectively Alters the Activity

and Expression of Vell Cycle Proteins Leading to Specific Chromatin Acetylation and Antiproliferative Effects. *The Journal of Biological Chemistry*, **274**, 34940-34947.

Saunders L. R. and Verdin E. 2007. Sirtuins : critical regulators at the crossroads between cancer and aging. *Oncogene*, **26**, 5489-5504.

Scheidereit C. 2006. I κ B kinase complexes: gateways to NF- κ B activation and transcription. *Oncogene*, **25**, 6685-6705.

Schmitz M. L., Bacher S. and Kracht M. 2001. I κ B-independent control of NF- κ B activity by modulatory phosphorylations. *TRENDS in Biochemical Sciences*, **26**, 186-190.

Schönthal A. H. 1998. Role of PP2A in intracellular signal transduction pathways. *Frontiers in Bioscience*, **3**, 1262-1273.

Schoonbroodt S., Ferreira V., Best-Belpomme M., Boelart J. R., Legrand-Poels S., Korner M. and Piette J. 2000. Crucial role of the amino-terminal tyrosine residue 42 and the carboxyl-terminal PEST domain of I κ B α in NF- κ B activation by an oxidative stress. *The Journal of Immunology*, **164**, 4292-4300.

Sebban H., Yamaoka S. and Courtois G. 2006. Posttranslational modifications of NEMO and its partners in NF- κ B signaling. *Trends Cell Biol.*, **16**, 569-577.

Sen R. and Baltimore D. 1986. Inducibility of κ immunoglobulin enhancer-binding protein NF- κ B by a posttranslational mechanism. *Cell*, **47**, 921-928.

Senftleben U., Cao Y., Xiao G., Greten F. R., Krähn G., Bonizzi G., Chen Y., Hu Y., Fong A., Sun S-C. and Karin M. 2001. Activation by IKK α of a second, evolutionary conserved, NF- κ B signaling pathway. *Science*, **293**, 1495-1499.

Sengupta N. and Seto E. 2004. Regulation of Histone Deacetylase Activities. *Journal of Cellular Biochemistry*, **93**, 57-67.

Seo J. S., Cho N. Y., Kim H. R., Tsurumi T., Jang Y. S., Lee W. K., Lee S.K. 2008. Cell cycle arrest and lytic induction of EBV-transformed B lymphoblastoid cells by a histone deacetylase inhibitor, Trichostatin A. *Oncol Rep.*, **19**, 93-98.

Sethi G., Ahn K. S., Chaturvedi M. M. and Aggarwal B. B. 2007. Epidermal growth factor (EGF) activates nuclear factor- κ B through I κ B α kinase-independent but EGF receptor-kinase dependent tyrosine 42 phosphorylation of I κ B α . *Oncogene*, **26**, 7324-7332.

Shahbazian M. D. and Grunstein M. 2007. Functions of Site-Specific Histone Acetylation and Deacetylation. *Annu. Rev. Biochem.*, **76**, 75-100.

Shambharkar P. B., Blonska M., Pappu B. P., Li H., You Y., Sakurai H., Darnay B. G., Hara H., Penninger J. and Lin X. 2007. Phosphorylation and ubiquitination of the I κ B kinase complex by two distinct signaling pathways. *The EMBO Journal*, **26**, 1794-1805.

Shen H-M. and Pervaiz S. 2006. TNF receptor superfamily-induced cell death : redox-dependent execution. *FASEB J.*, **20**, 1589-1598.

Sheppard K-A., Rose D. W., Haque Z. K., Kurokawa R., McInerney E., Westin S., Thanos D., Rosenfeld M. G., Glass C. K. and Collins T. 1999. Transcriptional activation by NF- κ B requires multiple coactivators. *Molecular and Cellular Biology*, **19**, 6367-6378.

- Shifera A. S. and Horwitz M. S.** 2008. Mutations in the zinc finger domain of IKK γ block the activation of NF- κ B and the induction of IL-2 in stimulated T lymphocytes. *Molecular Immunology*, Epub ahead of print.
- Siegmund D., Hausser A., Peters N., Scheurich P. and Wajant H.** 2001. Tumor necrosis factor (TNF) and phorbol ester induce TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) under critical involvement of NF- κ B essential modulator (NEMO)/IKK γ . *The Journal of Biological Chemistry*, **276**, 43708-43712.
- Sil A. K., Maeda S., Sano Y., Roop D. R. and Karin M.** 2004. I κ B kinase- α acts in the epidermidis to control skeletal and craniofacial morphogenesis. *Nature*, **428**, 660-664.
- Solan N. J., Miyoshi H., Carmona E. M., Bren G. D. and Paya C. V.** 2002. RelB cellular regulation and transcriptional activity are regulated by p100. *The Journal of Biological Chemistry*, **277**, 1405-1418.
- Soloaga A., Thomson S., Wiggin G. R., Rumpersaud N., Dyson M. H., Hazzalin C. A., Mahadevan L. C. and Arthur J. S. C.** 2003. MSK1 and MSK2 mediated the mitogen- and stress-induced phosphorylation of histone H3 and HMG-14. *The EMBO Journal*, **22**, 2788-2797.
- Somoza J. R., Skene R. J. Katz B. A., Mol C., Ho J. D. Jennings A. J., Luong C., Arvai A., Buggy J. J., Chi E., Tang J., Sang B-C., Verner E., Wynands R., Leahy E. M., Dougan D. R., Snell G., Navre M., Knuth M. W., Swanson R. V. McRee D. E. and Tari L. W.** 2004. Structural Snapshots of Human HDAC8 Provide Insights into the Class I Histone Deacetylases. *Structure*, **12**, 1325-1334.
- Srivastava A. K. and Mehdi M. Z.** 2004. Insulino-mimetic and anti-diabetic effects of vanadium compounds. *Diabetic Medicine*, **22**, 2-13.
- Steffan N. M., Bren G. D., Frantz B., Tocci M. J., O'Neill E. A. and Paya C. V.** 1995. Regulation of I κ B α Phosphorylation by PKC- and Ca²⁺- Dependent Signal Transduction Pathways. *The Journal of Immunology*, **155**, 4685-4691.
- Sterner D. E. and Berger S. L.** 2000. Acetylation of Histones and Transcription-Related Factors. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **64**, 435-459.
- Storz P. and Toker A.** 2003. Protein kinase D mediates a stress-induced NF- κ B activation and survival pathway. *The EMBO Journal*, **22**, 109-120.
- Storz P., Döppler H. and Toker A.** 2004. Protein kinase C δ selectively regulates protein kinase D-dependent activation of NF- κ B in oxidative stress signaling. *Molecular and Cellular Biology*, **24**, 2614-2626.
- Strahl B. D. and Allis C. D.** 2000. The language of covalent histone modifications. *Nature*, **403**, 41-45.
- Strelkov H. S. and Davie J. R.** 2002. Ser-10 phosphorylation of histone H3 and immediate early gene expression in oncogene-transformed mouse fibroblasts. *Cancer Research*, **62**, 75-78.
- Su B., Jacinto E., Hibi M., Kallunki T., Karin M. and Ben-Neriah Y.** 1994. JNK Is Involved in Signal Integration during Costimulation of T Lymphocytes. *Cell*, **77**, 727-736.

Subramanian C., Opipari A. W., Bian X., Castle V. P. and Kwok R. P. S. 2005. Ku70 acetylation mediates neuroblastoma cell death induced by histone deacetylase inhibitors. *PNAS*, **102**, 4842-4847.

T

Takada Y., Mukhopadhyay A., Kundu G. C., Mahabeleshwar G. H., Singh S. and Aggarwal B. B. 2003. Hydrogen peroxide activates NF- κ B through tyrosine phosphorylation of I κ B α and serine phosphorylation of p65: evidence for the involvement of I κ B α kinase and Syk protein-tyrosine kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, **278**, 24233-24241.

Tang E. D., Inohara N., Wang C-Y., Nunez G. and Guan K-L. 2003. Roles for homotypic interactions and transautophosphorylation in I κ B kinase β (IKK β) activation. *The Journal of Biological Chemistry*, **278**, 38566-38570.

Tang E. D., Wang C-Y., Xiong Y. and Guan K-L. 2003. A role for NF- κ B essential modifier/I κ B kinase- γ (NEMO/IKK γ) ubiquitination in the activation of the I κ B kinase complex by tumor necrosis factor- α . *The Journal of Biological Chemistry*, **278**, 37297-37305.

Tegethoff S., Behlke J. and Sheidereit C. 2003. Tetrameric Oligomerisation of I κ B Kinase γ (IKK γ) Is Obligatory for IKK Complex Activity and NF- κ B Activation. *Molecular and Cellular Biology*, **23**, 2029-2041.

Tergaonkar V. and Perkins N. D. 2007. p53 and NF- κ B Crosstalk : IKK α Tips the Balance. *Molecular Cell*, **26**, 158-159.

Thiagalingam S., Cheng K-H., Lee H. J., Mineva N., Thiagalingam A. and Ponte J. F. 2003. Histone Deacetylases : Unique Players in Shaping the Epigenetic Histone Code. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **983**, 84-100.

Traenckner E. B., Pahl H. L., Henkel T., Schmidt K. N., Wilk S. and Baeuerle P. A. 1995. Phosphorylation of human I κ B- α on serines 32 and 36 controls I κ B- α proteolysis and NF- κ B activation in response to diverse stimuli. *EMBO*, **14**, 2876-2883.

Tran A. D-A., Marmo T. P., Salam A. A., Che S., Finkelstein E., Kabarriti R., Xenias H. S., Mazitschek R., Hubbert C., Kawaguchi Y., Sheetz M. P., Yao T-P. and Bulinski J. C. 2007. HDAC6 deacetylation of tubulin modulates dynamics of cellular adhesions. *Journal of Cell Science*, **120**, 1469-1479.

Tsiani E., Bogdanovic E., Sorisky A., Nagy L. and Fantus I. G. 1998. Tyrosine phosphatase inhibitors, vanadate and pervanadate, stimulate glucose transport and GLUT translocation in muscle cells by a mechanism independent of phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase C. *Diabetes*, **47**, 1676-1686.

U

Ungerstedt J. S., Sowa Y., Xu W-S., Shao Y., Dokmanovic M., Perz G., Ngo L., Holmgren A., Jiang X. and Marks P. A. 2004. Role of thioredoxin in the response of normal and transformed cells to histone deacetylase inhibitors. *PNAS*, **102**, 673-678.

V

- Van Lint C., Emiliani S. and Verdin E.** 1996. The Expression of a Small Fraction of Cellular Genes Is Changed in Response to Histone Hyperacetylation. *Gene Expression*, **5**, 245-253.
- Vanden Berghe W., De Bosscher K., Boone E., Plaisance S. and Haegeman G.** 1999. The Nuclear Factor- κ B Engages CBP/p300 and Histone Acetyltransferase Activity for Transcriptional Activation of the Interleukin-6 Promoter. *The Journal of Biological Chemistry*, **274**, 32091-32098.
- Vandergeeten C., Quivy V., Moutschen M., Van Lint C., Piette J. and Legrand-Poels S.** 2007. HIV-1 protease inhibitors do not interfere with provirus transcription and host cell apoptosis induced by combined treatment TNF- α + TSA. *Biochemical Pharmacology*, **73**, 1738-1748.
- Vannini A., Volpari C., Filocamo G., Casavola E. C., Brunetti M., Renzoni D., Chakravarty P., Paolini C., De Francesco R., Gallinari P., Steinkühler C. and Di Marco S.** 2004. Crystal structure of a eukaryotic zinc-dependent histone deacetylase, human HDAC8, complexed with a hydroxamic acid inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA*, **101**, 15064-15069.
- Verdin E., Dequiedt F. and Kasler H. G.** 2003. Class II histone deacetylases : versatile regulators. *Trends in Genetics*, **19**, 286-293.
- Verma U. N., Yamamoto Y., Prajapati S. and Gaynor R. B.** 2004. Nuclear role of I κ B Kinase- γ /NF- κ B essential modulator (IKK γ /NEMO) in NF- κ B-dependent gene expression. *The Journal of Biological Chemistry*, **279**, 3509-3515.
- Vermeulen L., De Wilde G., Notebaert S., Vanden Berghe W. and Haegeman G.** 2002. Regulation of the transcriptional activity of the nuclear factor-kappaB p65 subunit. *Biochemical Pharmacology*, **64**, 963-970.
- Vermeulen L., De Wilde G., Van Damme P., Vanden Berghe W. and Haegeman G.** 2003. Transcriptional activation of the NF- κ B p65 subunit by mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1). *The EMBO Journal*, **22**, 1313-1324.
- Verreault A.** 2008. De novo nucleosome assembly : new pieces in an old puzzle. *Genes and development*, **14**, 1430-1438.
- Viatour P., Legrand-Poels S., Van Lint C., Warnier M., Merville M-P., Gielen J., Piette J., Bours V. and Chariot A.** 2003. Cytoplasmic I κ B α Increases NF- κ B-independent Transcription through Binding to Histone Deacetylase (HDAC) 1 and HDAC3. *The Journal of Biological Chemistry*, **278**, 46541-46548.
- Vogelauer M., Wu J., Suka N. and Grunstein M.** 2000. Global histone acetylation and deacetylation in yeast. *Nature*, **408**, 495-498.
- Volanti C., Matroule J-Y and Piette J.** 2002. Involvement of oxidative stress in NF- κ B activation in endothelial cells treated by photodynamic therapy. *Photochemistry and Photobiology*, **75**, 36-45.
- Voraberger G., Schäfer R. and Stratowa C.** 1991. Cloning of the human gene for

intercellular adhesion molecule 1 and analysis of its 5'-regulatory region. Induction by cytokines and phorbol ester. *The Journal of Immunology*, **147**, 2777-2786.

W

Wang D., Westerheide S. D., Hanson J. L. and Baldwin Jr. A. S. 2000. Tumor necrosis factor α -induced phosphorylation of RelA/p65 on Ser⁵²⁹ is controlled by casein kinase II. *The Journal of Biological Chemistry*, **275**, 32592-32597.

Wang L. G. Ossowski L. and Ferrari A. C. 2004. Androgen receptor level controlled by a suppressor complex lost in an androgen-independent prostate cancer cell line. *Oncogene*, **23**, 5175-5184.

Wang X., Wang Q., Hu W. and Evers B. M. 2004. Regulation of phorbol ester-mediated TRAF1 induction in human colon cancer cells through a PKC/RAF/ERK/NF- κ B-dependent pathway. *Oncogene*, **23**, 1885-1895.

Warrener R., Beamish H., Burgess A., Waterhouse N. J., Giles N., Fairlie D. P. and Gabrielli B. 2003. Tumor cell-specific cytotoxicity by targeting cell cycle checkpoints. *The FASEB Journal*, **17(11)**, 1550-1552.

Wen Y-D., Perissi V., Staszewski L. M., Yang W-M., Kronen A., Glass C. K., Rosenfeld M. G. and Seto E. 2000. The histone deacetylase-3 complex contains nuclear receptor corepressors. *PNAS*, **97**, 7202-7207.

Wu Z-H., Shi Y., Tibbetts R. S. and Miyamoto S. 2006. Molecular linkage between the kinase ATM and NF- κ B signaling in response to genotoxic stimuli. *Science*, **311**, 1141-1146.

X

Xu W. S., Parmigiani R. B. and Marks P. A. 2007. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene*, **26**, 5541-5552.

Xu W., Ngo L., Perez G., Dokmanovic M. and Marks P. A. 2006. Intrinsic apoptotic and thioredoxin pathways in human prostate cancer cell response to histone deacetylase inhibitor. *PNAS*, **103**, 15540-15545.

Y

Yakovlev V. A., Barani I. J., Rabender C. S., Black S. M., Leach J. K., Graves P. R., Kellog G. E. and Mikkelsen R. B. 2007. Tyrosine nitration of I κ B α : a novel mechanism for NF- κ B activation. *Biochemistry*, **46**, 11671-11683.

Yamamoto Y., Verma U. N., Prajapati S., Kwak Y-T. and Gaynor R. B. 2003. Histone H3 phosphorylation by IKK- α is critical for cytokine-induced gene expression. *Nature*, **423**, 655-659.

Yamamoto Y., Yin M-J. and Gaynor R. B. 2000. I κ B Kinase α (IKK α) Regulation of IKK β

Kinase Activity. *Molecular and Cellular Biology*, **20**, 3655-3666.

Yamaoka S., Courtois G., Bessia C., Whiteside S. T., Weil R., Agou F., Kirk H. E., Kay R. J. and Israël A. 1998. Complementation cloning of NEMO, a component of the I κ B kinase complex essential for NF- κ B activation. *Cell*, **93**, 1231-1240.

Yang J., Fan G-H., Wadzinski B. E., Sakurai H. and Richmond A. 2001. Protein phosphatase 2A interacts with and directly dephosphorylates RelA. *The Journal of Biological Chemistry*, **276**, 47828-47833.

Yang X-J. and Seto E. 2007. HATs and HDACs: from structure, function and regulation to novel strategies for therapy and prevention. *Oncogene*, **26**, 5310-5318.

Yoshida M., Kijima M., Akita M. and Beppu T. 1990. Potent and Specific Inhibition of Mammalian Histone Deacetylase Both in Vivo and in Vitro by Trichostatin A. *The Journal of Biological Chemistry*, **265**, 17174-17179.

Z

Zhang X. D., Gillespie S. K., Borrow J. M. and Hersey P. 2004. The histone deacetylase inhibitor suberis bishydroxamate regulates the expression of multiple apoptotic mediators and induces mitochondria-dependent apoptosis of melanoma cells. *Mol Cancer Ther.*, **3(4)**, 425-435.

Zhang Y., Li N., Caron C., Matthias G., Hess D., Khochbin S. and Matthias P. 2003. HDAC-6 interacts with and deacetylates tubulin and microtubules in vivo. *The EMBO Journal*, **22**, 1168-1179.

Zhao Z., Tan Z., Diltz C. D., You M. and Fischer E. H. 1996. Activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase pathway by pervanadate, a potent inhibitor of tyrosine phosphatases. *The Journal of Biological Chemistry*, **271**, 22251-22255.

Zhong H., May M. J., Jimi E. and Ghosh S. 2002. The phosphorylation status of nuclear NF- κ B determines its association with CBP/p300 or HDAC-1. *Molecular Cell*, **9**, 625-636.

Zhong H., SuYuang H., Erdjument-Bromage H., Tempst P. and Ghosh S. 1997. The transcriptional activity of NF- κ B is regulated by the I κ B-associated PKAc subunit through a cyclic AMP-independent mechanism. *Cell*, **89**, 413-424.

Zhong H., Voll R. E. and Ghosh S. 1998. Phosphorylation of NF- κ B p65 by PKA stimulates transcriptional activity by promoting a novel bivalent interaction with the coactivator CBP/p300. *Molecular Cell*, **1**, 661-671.

Zhong S., Jansen C., She Q-B., Goto H., Inagaki M., Bode A. M., Ma W-Y. and Dong Z. 2001. Ultraviolet B-induced phosphorylation of histone H3 at serine 28 is mediated by MSK1. *The Journal of Biological Chemistry*, **276**, 33213-33219.

ANNEXES :

AUTRES PUBLICATIONS

Publication n°1 :

« Withaferin a strongly elicits IkappaB kinase beta hyperphosphorylation concomitant with potent inhibition of its kinase activity ».

Mary Kaileh, Wim Vanden Berghe, Arne Heyerick, Julie Horion, Jacques Piette, Claude Libert, Denis De Keukeleire, Tamer Essawi and Guy Haegeman.

J Biol Chem. 2007 Feb 16;282(7):4253-64. Epub 2006 Dec 6.

Publication n°2 :

« Promoter-dependent effect of IKKalpha on NF-kappaB/p65 DNA binding ».

Geoffrey Gloire, Julie Horion, Nadia El Mjiyad, Françoise Bex, Alain Chariot, Emmanuel Dejardin and Jacques Piette.

J Biol Chem. 2007 Jul 20;282(29):21308-18. Epub 2007 May 30.

Publication n°3 :

« Varicella-zoster virus modulates NF-kappaB recruitment on selected cellular promoters ».

Nadia El Mjiyad, Sébastien Bontems, Geoffrey Gloire, Julie Horion, Patricia Vandevenne, Emmanuel Dejardin, Jacques Piette and Catherine Sadzot-Delvaux.

J Virol. 2007 Dec;81(23):13092-104. Epub 2007 Sep 12.

Publication n°4 :

« Actin disruption up-regulates LPS- and TNF α - induced il-8 expression in monocyte-like cells through different mechanisms ».

Gaëlle Kustermans, Nadia El Mjiyad, Julie Horion, Nathalie Jacobs, Jacques Piette and Sylvie Legrand-Poels.

Soumis.