

Figure 26: Influence de la TSA sur la voie classique d'activation du NF-κB et la dégradation associée de IκBα induites par le TNFα, l'IL-1β et le PMA. Les cellules HeLa ont été traitées, durant des temps croissants, avec du TNFα (a), de l'IL-1β (b) ou du PMA (c) en présence/absence de TSA. La translocation nucléaire du NF-κB a été mesurée par EMSA avec une sonde correspondant au site κB du LTR du HIV (gel du haut). La dégradation d'IκBα a été analysée par western blot sur les extraits cytoplasmiques (gel du bas). NT, cellules HeLa non traitées.

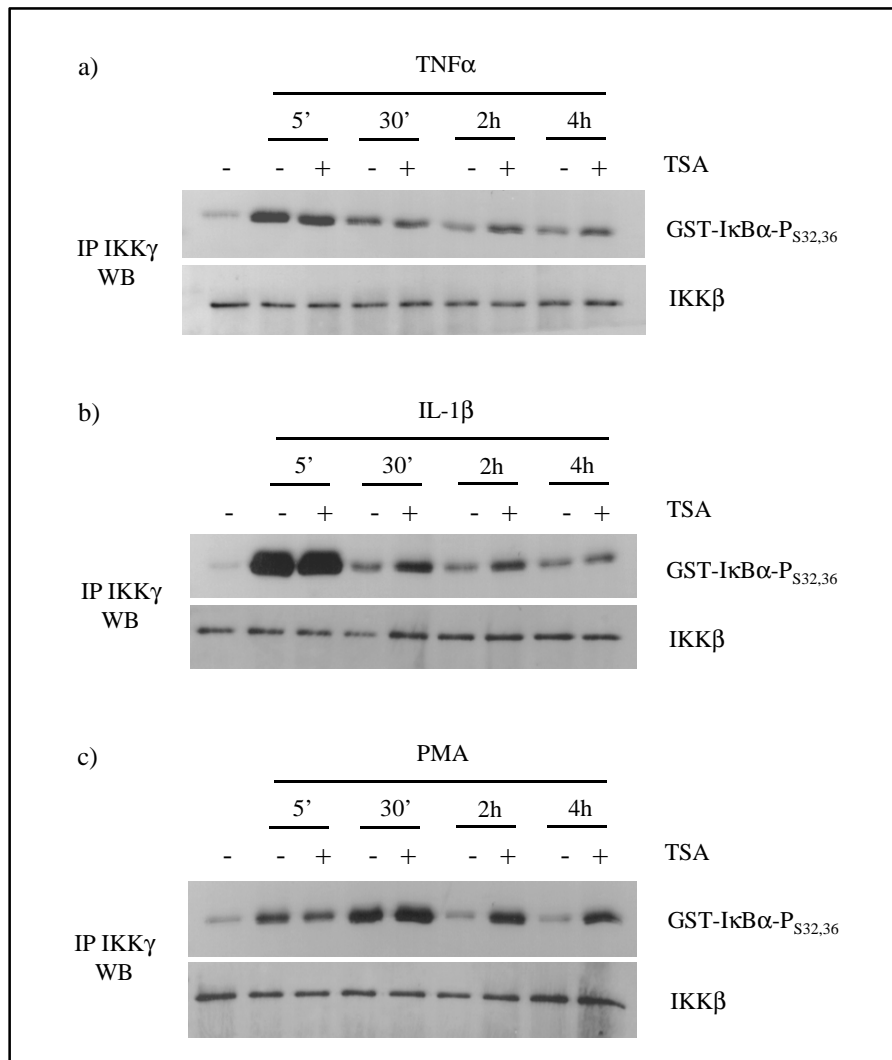


Figure 27 : Prolongement de l'activité du complexe IKK par l'ajout de TSA à une stimulation par le TNF α , l'IL-1 β ou le PMA. Les cellules HeLa ont été traitées, durant des temps croissants, avec du TNF α (a), de l'IL-1 β (b) ou du PMA (c) en présence/absence de TSA. Après immunoprécipitation du complexe IKK, l'activité kinase associée a été déterminée *in vitro* en présence du substrat purifié GST-I κ B α ₁₋₅₄. Un western blot a été réalisé avec un anticorps spécifique de la forme phosphorylée d'I κ B α sur les résidus Ser32 et 36 (gel du haut). Le témoin de charge a été déterminé par western blot grâce à l'anticorps dirigé contre IKK β (gel du bas).

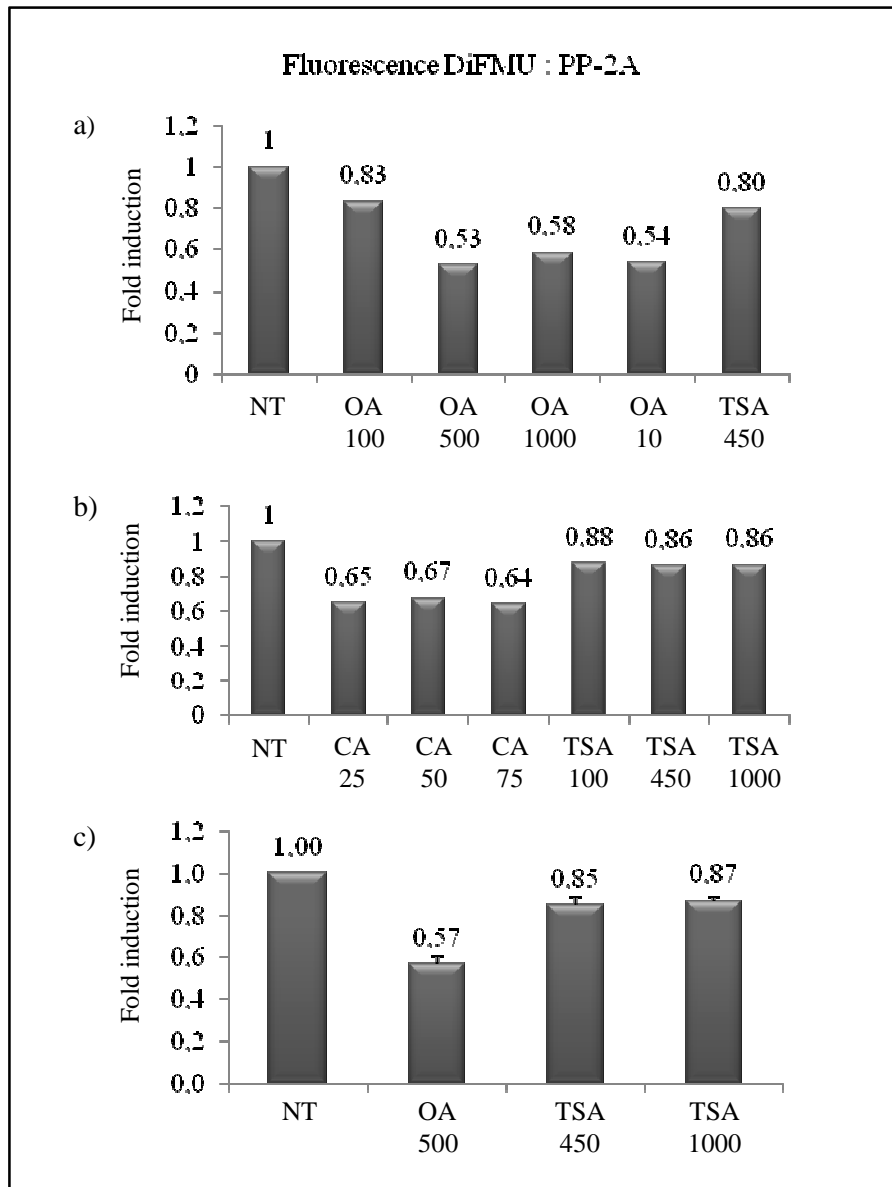


Figure 28 : Détermination l'activité phosphatase de PP-2A. Les cellules HeLa ont subi différents traitements : TSA *in vivo* (100-450-1000nM), acide okadaïque (OA) *in vivo* (100-500-1000nM) et *in vitro* (10nM) ou calyculin A (CA) *in vitro* (25-50-75nM). Les traitements *in vivo* ont durés 1 heure. L'activité phosphatase de PP-2A a été mesurée grâce à la fluorescence du DiFMU sur 2,5 µg d'extraits cytoplasmiques. Les résultats représentés sur le graphe c sont une moyenne de trois expériences indépendantes. NT, cellules HeLa non traitées.

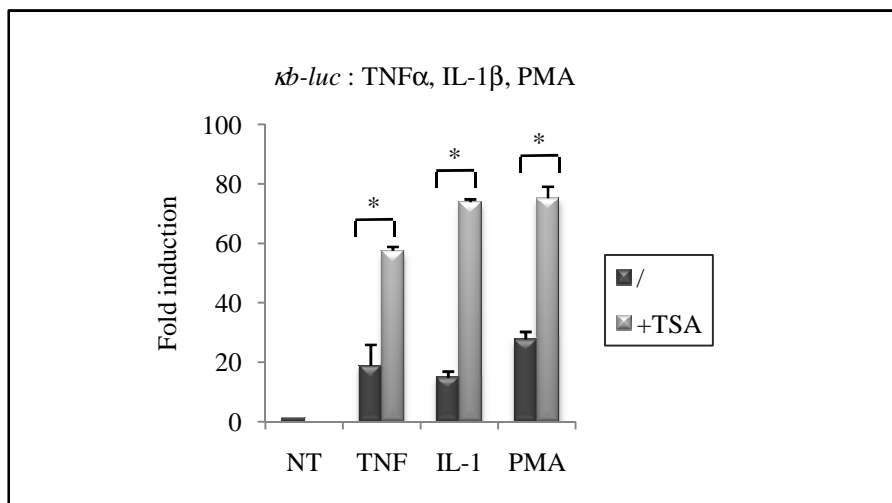


Figure 29 : Augmentation de l'activité transcriptionnelle du NF- κ B par l'ajout de TSA lors d'une induction par le TNF α , l'IL-1 β et le PMA. Des transfections transitoires ont été réalisées avec un gène rapporteur luciférase sous le contrôle d'un promoteur artificiel contenant cinq sites κ B. Vingt heures après transfection, les cellules HeLa ont été traitées avec du TNF α , de l'IL-1 β ou du PMA en présence/absence de TSA pendant 8h et ensuite lysée. L'activité luciférase détectée a été rapportée à la quantité de protéines. *, significativement différent (p value < 0,05). Les résultats représentés sur les graphes sont une moyenne de trois expériences indépendantes. NT, cellules HeLa non traitées.

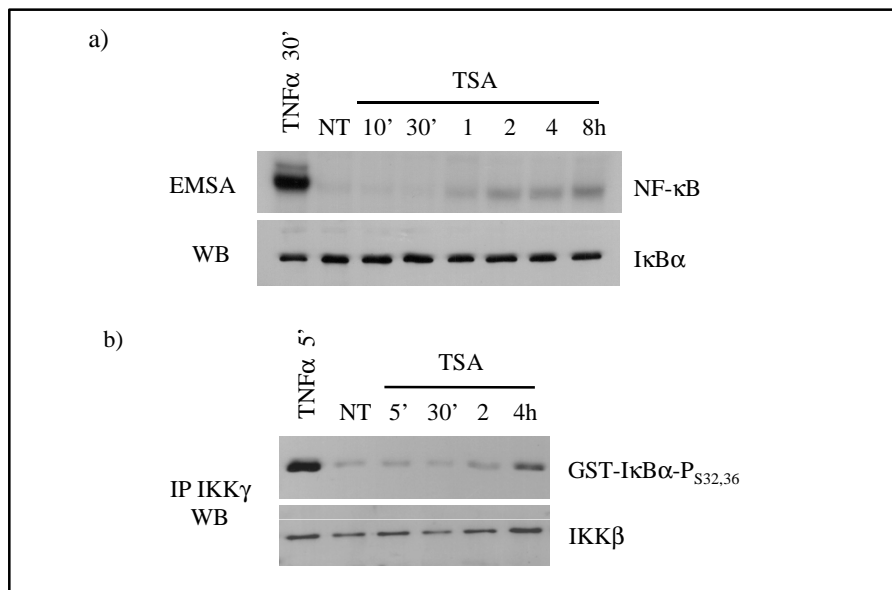


Figure 30 : Impact de la TSA seule sur la voie classique d'activation du NF-κB, la dégradation associée d'IκBα et l'activité du complexe IKK. Les cellules HeLa ont été traitées, durant des temps croissants, avec de la TSA. Des cellules HeLa traitées au TNFα représentent le contrôle positif. (a) La translocation nucléaire du NF-κB a été mesurée par EMSA avec une sonde correspondant au site κB du LTR du HIV (gel du haut). La dégradation d'IκBα a été analysée par western blot sur les extraits cytoplasmiques (gel du bas). (b) Après immunoprécipitation du complexe IKK, l'activité kinase associée a été déterminée *in vitro* en présence du substrat purifié GST-IκBα₁₋₅₄. Un western blot a été réalisé avec un anticorps spécifique de la forme phosphorylée d'IκBα sur les résidus Ser32 et 36 (gel du haut). Le témoin de charge a été déterminé par western blot grâce à l'anticorps dirigé contre IKKβ (gel du bas). NT, cellules HeLa non traitées.

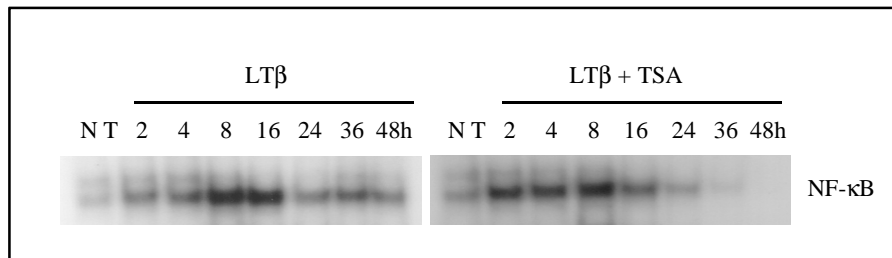


Figure 31 : Effet de la TSA sur la voie alternative d'activation du NF- κ B induite par la LT β . Les cellules MEF IKK γ ^{-/-} ont été traitées, durant des temps croissants, avec la LT β en présence/absence de TSA. La translocation nucléaire du NF- κ B a été mesurée par EMSA avec une sonde correspondant au site p52/RelB du promoteur des immunoglobulines. NT, cellules MEF IKK γ ^{-/-} non traitées.

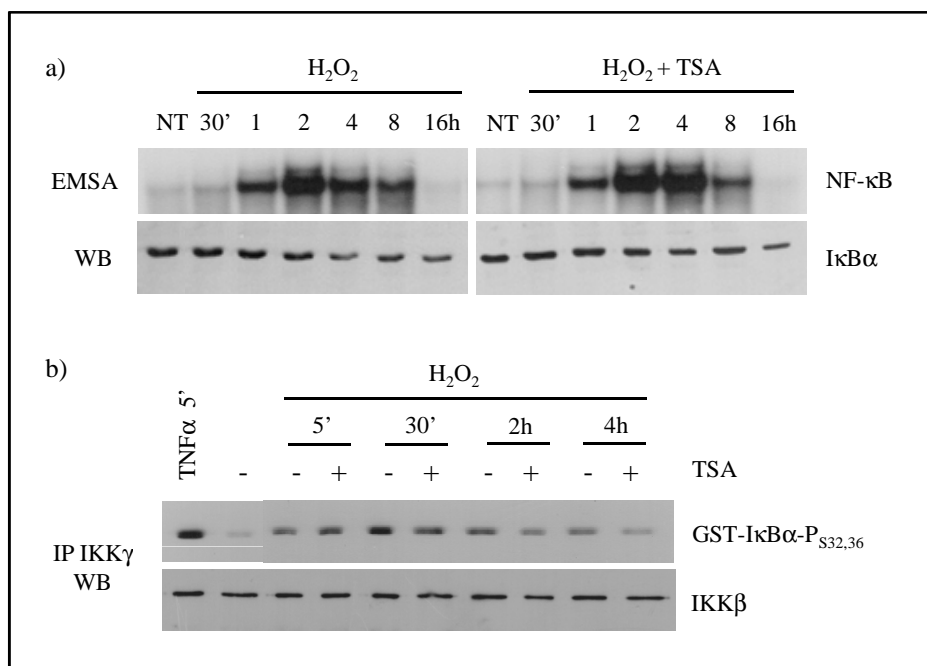


Figure 32 : Influence de la TSA sur la voie alternative d'activation du NF-κB induite par le H_2O_2 , la dégradation associée d'IκBα et l'activité du complexe IKK. Les cellules HeLa ont été traitées, durant des temps croissants, avec du H_2O_2 en présence/absence de TSA. Des cellules HeLa traitées au TNFα représentent le contrôle positif. (a) La translocation nucléaire du NF-κB a été mesurée par EMSA avec une sonde correspondant au site κB du LTR du HIV (schéma du haut). La dégradation d'IκBα a été analysée par western blot sur les extraits cytoplasmiques (schéma du bas). (b) Après immunoprécipitation du complexe IKK, l'activité kinase associée a été déterminée *in vitro* en présence du substrat purifié GST-IκBα₁₋₅₄. Un western blot a été réalisé avec un anticorps spécifique de la forme phosphorylée d'IκBα sur les résidus Ser32 et 36 (geldu haut). La présence de quantités équivalentes de IKKβ dans chaque échantillon a été confirmée par western blot (geldu bas). NT, cellules HeLa non traitées.

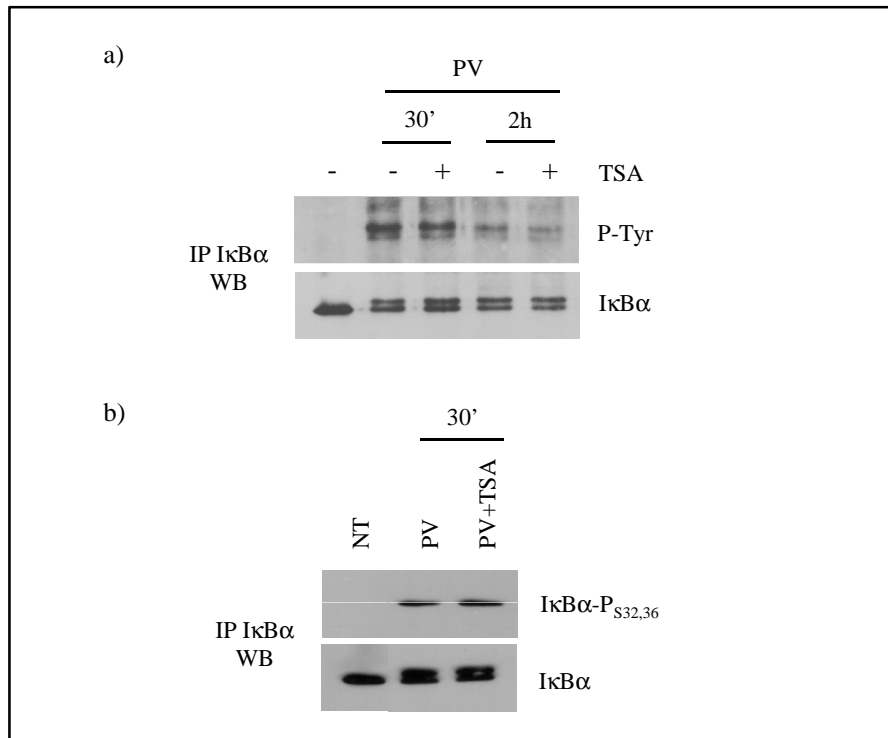


Figure 34 : Effet de la TSA sur la phosphorylation d'IκBα sur les résidus tyrosine et sérine induite par le PV. Les cellules HeLa ont été traitées, durant des temps croissants, avec du PV en présence/absence de TSA. Après immunoprécipitation d'IκBα, la phosphorylation sur les résidus tyrosine (a) ou sur sérine (b) a été déterminée par western blot (gel du haut). La présence de quantités équivalentes d'IκBα dans chaque échantillon a été confirmée par western blot (gel du bas). De l'ALLN a été utilisé pour éviter la dégradation de la forme phosphorylée d'IκBα. NT, cellules HeLa non traitées.

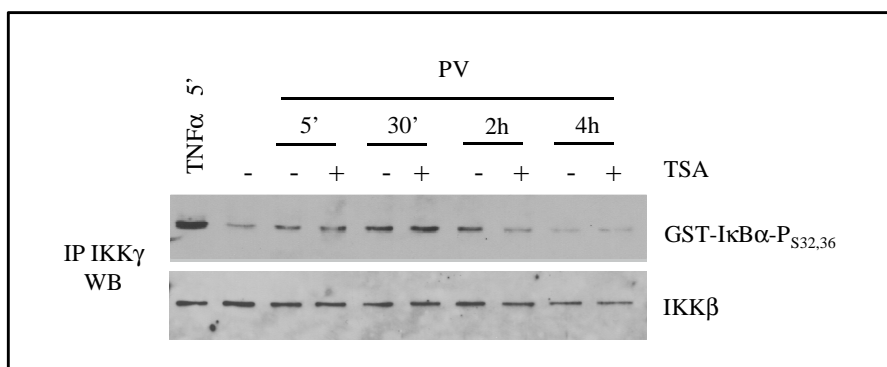


Figure 35 : Impact de la TSA sur l'activité du complexe IKK induite par le PV. Les cellules HeLa ont été traitées, durant des temps croissants, avec du PV en présence/absence de TSA. Après immunoprécipitation du complexe IKK, l'activité kinase associée a été déterminée *in vitro* en présence du substrat purifié GST-I κ B α ₁₋₅₄. Un western blot a été réalisé avec un anticorps spécifique de la forme phosphorylée d'I κ B α sur les résidus Ser32 et 36 (gel du haut). Le témoin de charge a été déterminé par western blot grâce à un anticorps dirigé contre IKK β (gel du bas).

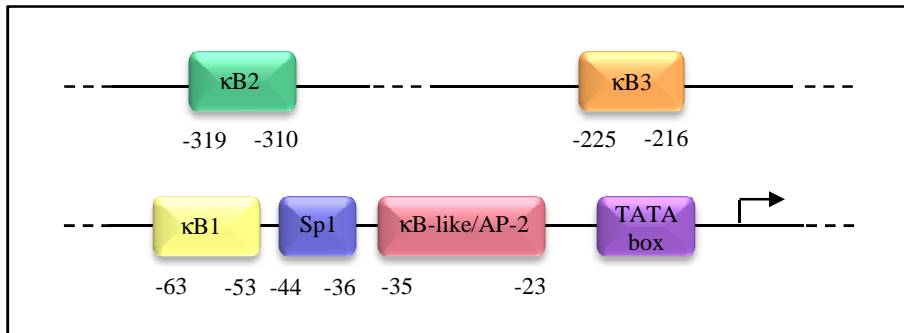


Figure 36 : Schéma du promoteur *ikbα* Il comporte notamment trois sites κ B, un site Sp1 et un site κ B-like chevauchant un site AP-2.

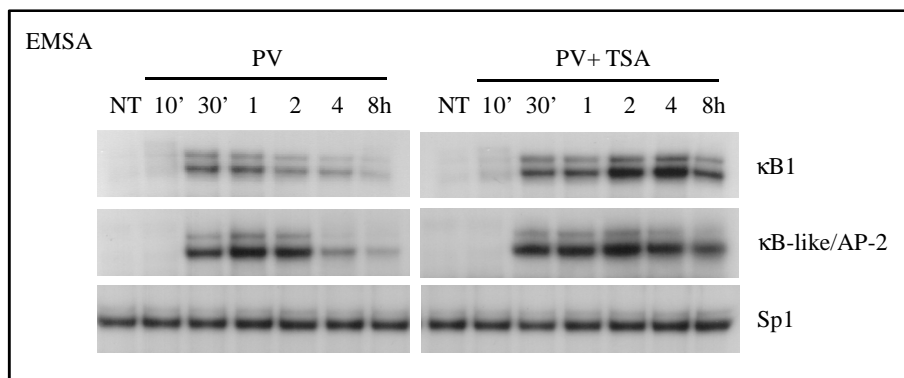


Figure 37: Modulation par la TSA de l'accrochage du NF- κ B induit par le PV sur des sondes correspondant à trois sites du promoteur *ikbα* Les cellules HeLa ont été traitées, durant des temps croissants, avec du PV en présence/absence de TSA. La translocation nucléaire du NF- κ B a été mesurée sur les extraits nucléaires par EMSA avec trois sondes correspondant aux sites κ B1, κ B-like/AP-2 et Sp1 du promoteur *ikbα*. NT, cellules HeLa non traitées.

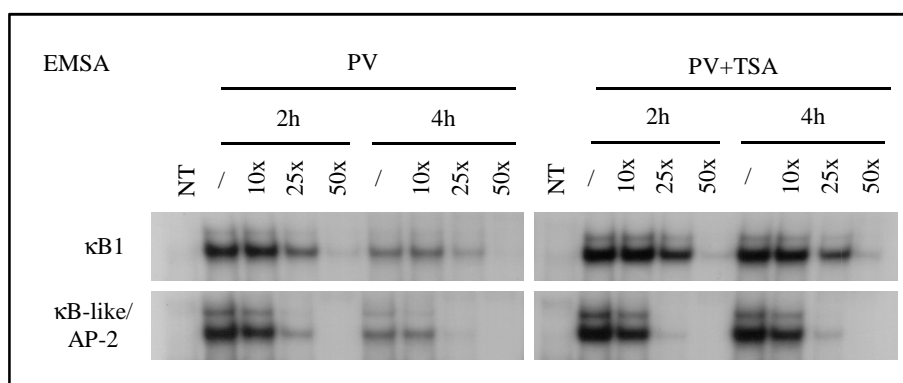


Figure 38 : Compétition entre les sondes correspondant aux sites κB1 et κB-like/AP-2 du promoteur *ikbα*. Les cellules HeLa ont été traitées, durant des temps croissants, avec du PV en présence/absence de TSA. La translocation nucléaire du NF-κB a été mesurée par EMSA avec les sondes correspondant aux sites κB1, κB-like/AP-2 du promoteur *ikbα*. Un excès de sonde froide (de 10x, 25x ou 50x) correspondant au site κB-like/AP-2 a été ajouté au mélange de sonde chaude correspondant au site κB1 (gel du haut). Un excès de sonde froide (de 10x, 25x ou 50x) correspondant au site κB1 a été ajouté au mélange de sonde chaude correspondant au site κB-like/AP-2 (gel du bas). NT, cellules HeLa non traitées.

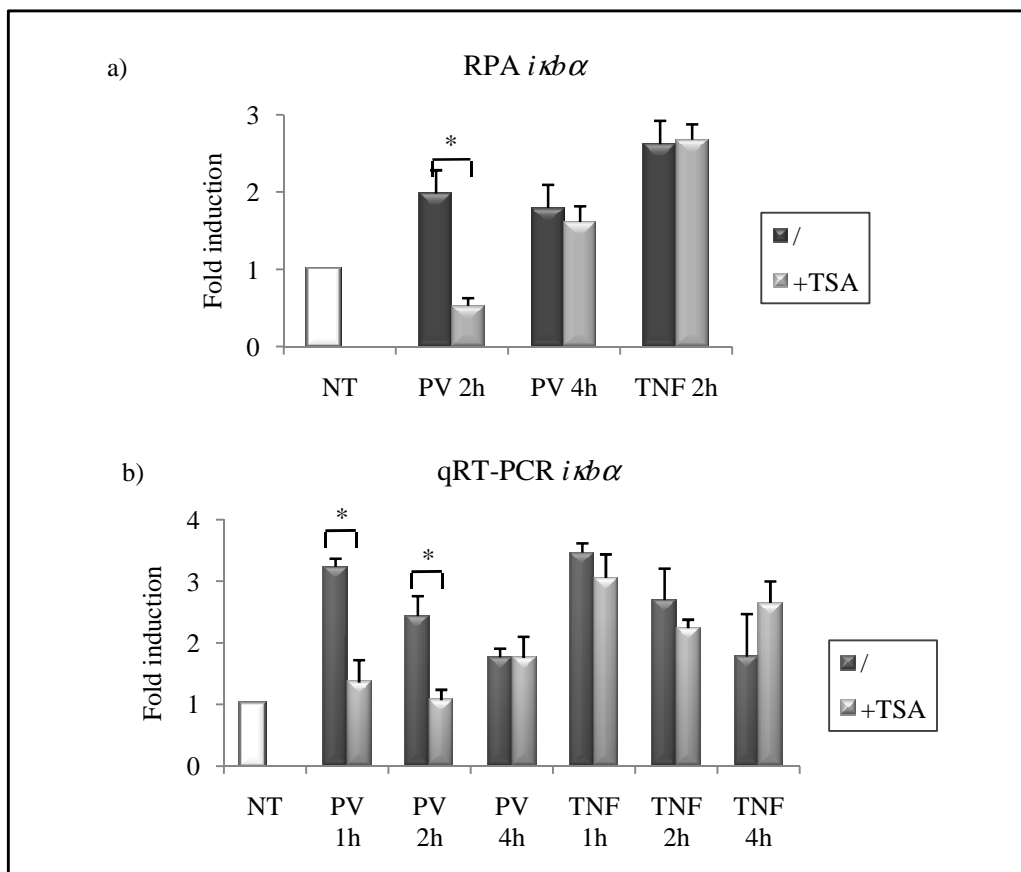


Figure 39: Modulation par la TSA de la synthèse de l'ARNm d'IκBα induite par le PV ou le TNFα. Les cellules HeLa ont été traitées, durant des temps croissants, avec du PV ou du TNFα en présence/absence de TSA et les ARN totaux ont été extraits. (a) La technique de RPA a permis d'isoler les ARNm d'IκBα grâce leur hybridation à une sonde radioactive. La normalisation a été réalisée avec le transcrite de la GAPDH. (b) Les ARN totaux ont été soumis à une RT-PCR quantitative en temps réel afin d'analyser le niveau d'expression de l'ARNm d'IκBα. Les résultats ont été normalisés avec le transcrite de la β2-microglobuline. *, significativement différent (p value < 0,05). Les résultats représentés sur les graphes sont une moyenne de trois expériences indépendantes. NT, cellules HeLa non traitées.

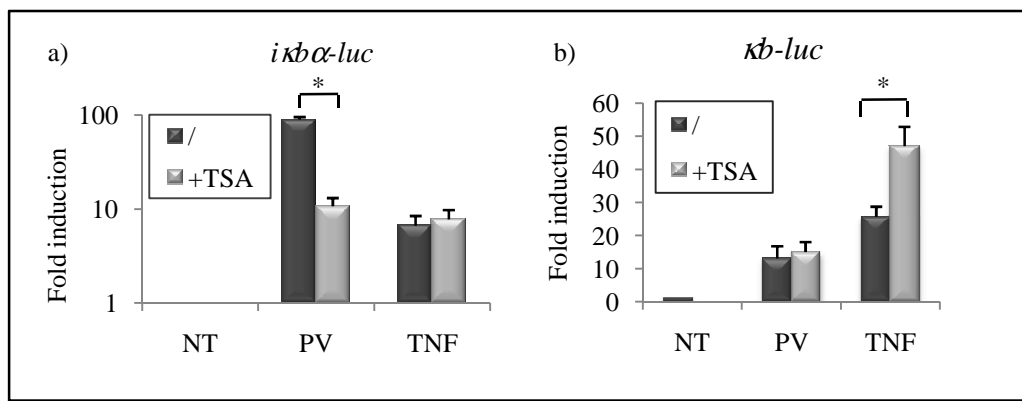


Figure 40 : Effet de la TSA sur l'activité transcriptionnelle du NF- κ B induite par le PV ou le TNF α . Des transfections transitoires ont été réalisées avec un gène rapporteur luciférase sous la dépendance du promoteur *iκbα* (a) ou d'un promoteur artificiel contenant cinq sites κ B (b). Vingt heures après transfection, les cellules HeLa ont été traitées avec du PV ou du 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. *, significativement différent (p value < 0,05). Les résultats représentés sur les graphes sont une moyenne de trois expériences indépendantes. NT, cellules HeLa non traitées.

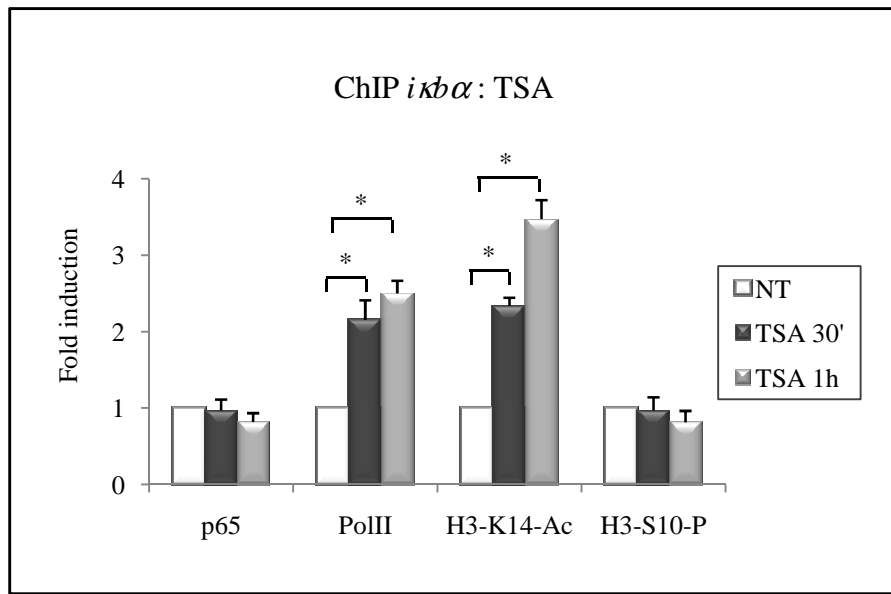


Figure 42 : Effet de la TSA seule le promoteur *ikbα*. Les cellules HeLa ont été traitées à la TSA seule. Les expériences de ChIP ont été réalisées avec différents anticorps pour l'immunoprécipitation : p65, ARN Pol II, histone H3 acétylé sur la Lys14 et histone H3 phosphorylé sur la Ser10. La chromatine immunoprécipitée a été soumise à une PCR quantitative en temps réel en utilisant des amorces spécifiques du site $\kappa B1$ du promoteur de *ikbα*. Les résultats ont été normalisés avec la chromatine totale. *, significativement différent (p value < 0,05). Les résultats représentés sur les graphes sont une moyenne de trois expériences indépendantes. NT, cellules HeLa non traitées.

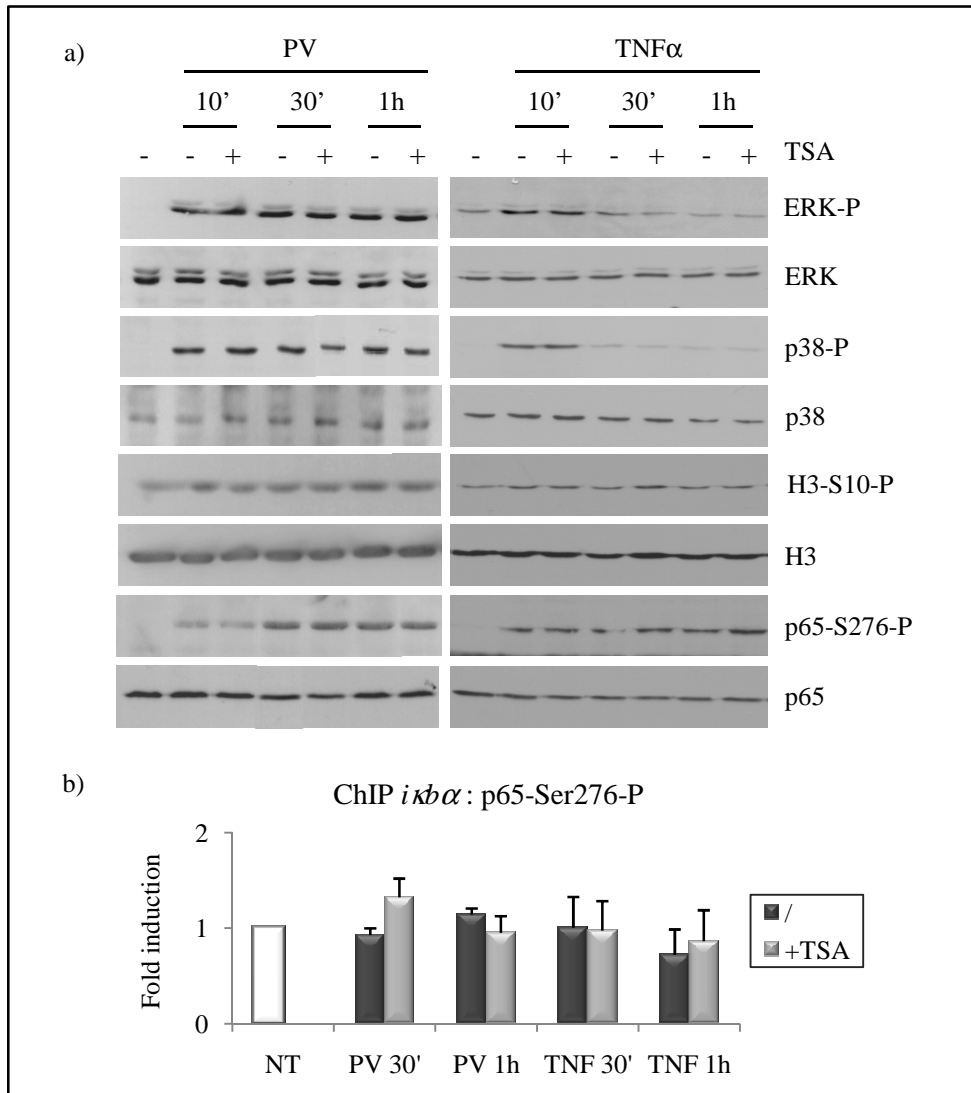


Figure 43 : Statut de phosphorylation des MAPK ERK et p38, des cibles de MSK1 (histone H3 et p65) après addition de la TSA à une stimulation par le PV ou le TNF α . Les cellules HeLa ont été traitées avec du PV ou du TNF α en présence/absence de TSA. (a) Les protéines totales ont été rapidement extraites dans un tampon de lyse au SDS. Des expériences western blot ont été réalisés avec différents anticorps reconnaissant les formes phosphorylées ou non de ERK, p38, histone H3 et p65. (b) La chromatine immunoprécipitée avec l'anticorps anti-p65-Ser276-P a été soumise à une PCR quantitative en temps réel en utilisant des amorces spécifiques du site κ B1 du promoteur *ikb α* . *, significativement différent (p value < 0,05). Les résultats représentés sur les graphes sont une moyenne de trois expériences indépendantes. NT, cellules HeLa non traitées.

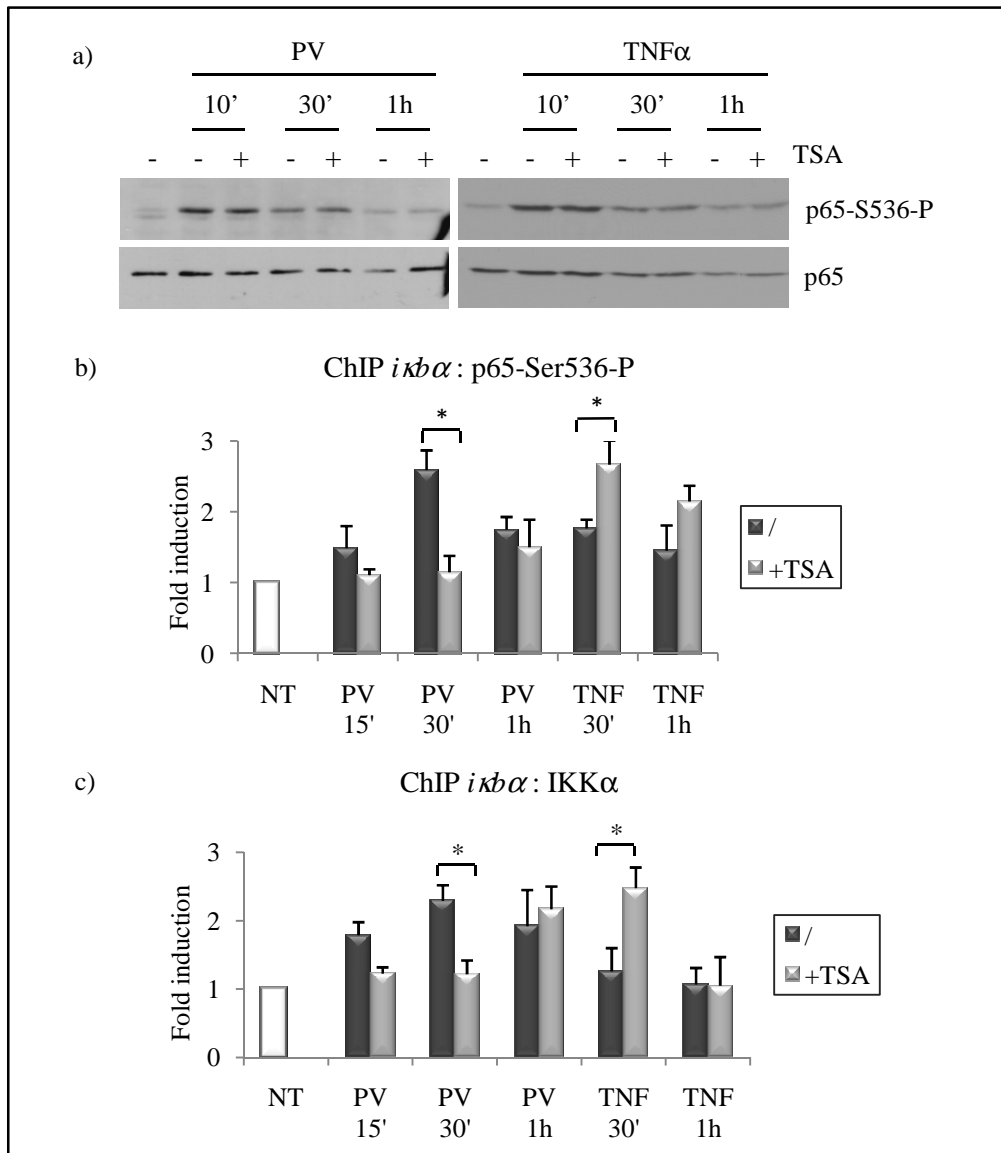


Figure 44 : Influence de la TSA sur le potentiel transactivateur de p65 induit par le PV ou le TNF α . Les cellules HeLa ont été traitées avec du PV ou du TNF α en présence/absence de TSA. (a) Les protéines totales ont été rapidement extraites dans un tampon de lyse au SDS. Des expériences western blot ont été réalisés avec des anticorps reconnaissant les formes phosphorylées ou non p65 sur la Ser536. (b) La chromatine immunoprécipitée avec les anticorps anti-p65-Ser536-P et anti-IKK α a été soumise à une PCR quantitative en temps réel en utilisant des amorces spécifiques du site κ B1 du promoteur *ikb α* . *, significativement différent (p value < 0,05). Les résultats représentés sur les graphes sont une moyenne de trois expériences indépendantes. NT, cellules HeLa non traitées.

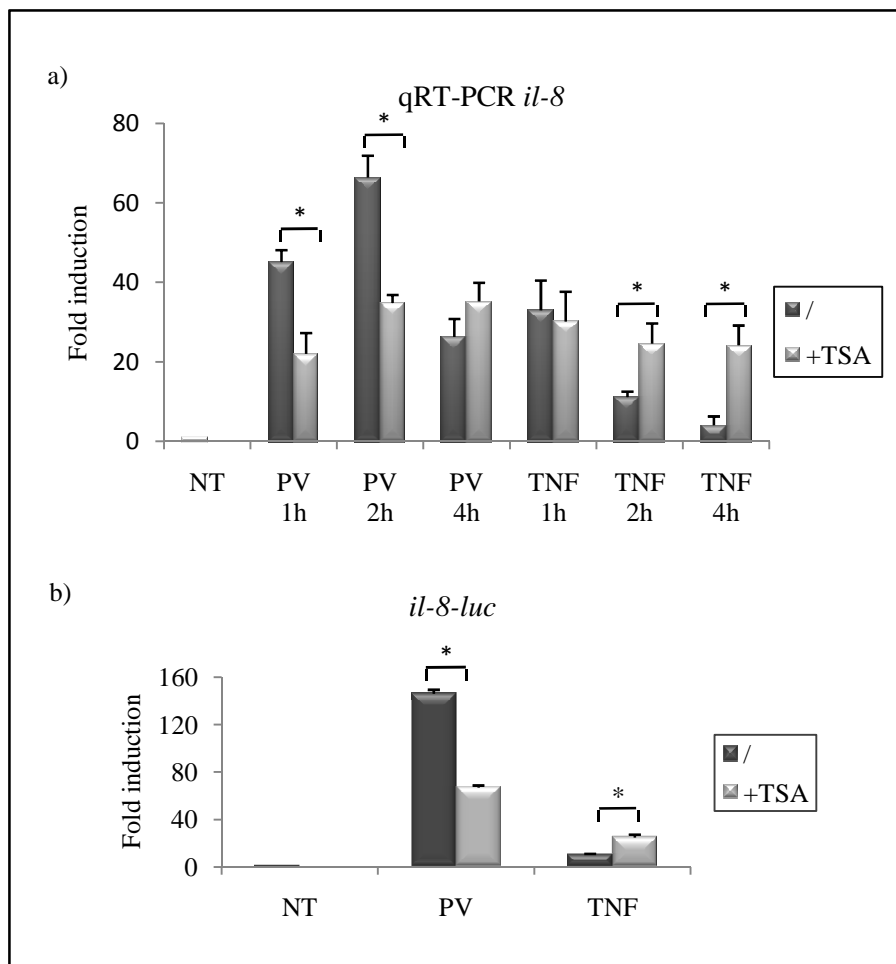


Figure 45 : Modulation par la TSA de la synthèse de l'ARNm de l'IL-8 induite par le PV ou le TNF α . (a) Les cellules HeLa ont été traitées au PV ou au TNF α en présence/absence de TSA. Les ARN totaux ont été extraits et soumis à une RT-PCR quantitative en temps réel afin d'analyser le niveau d'expression de l'ARNm de l'IL-8. Les résultats ont été normalisés avec le transcrite de la β 2-microglobuline. (b) Des transfections transitoires ont été réalisées avec un gène rapporteur luciférase sous la dépendance du promoteur *il-8*. Vingt heures après transfection, les cellules HeLa ont été traitées avec du PV ou du 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. *, significativement différent (p value < 0,05). Les résultats représentés sur les graphes sont une moyenne de trois expériences indépendantes. NT, cellules HeLa non traitées.

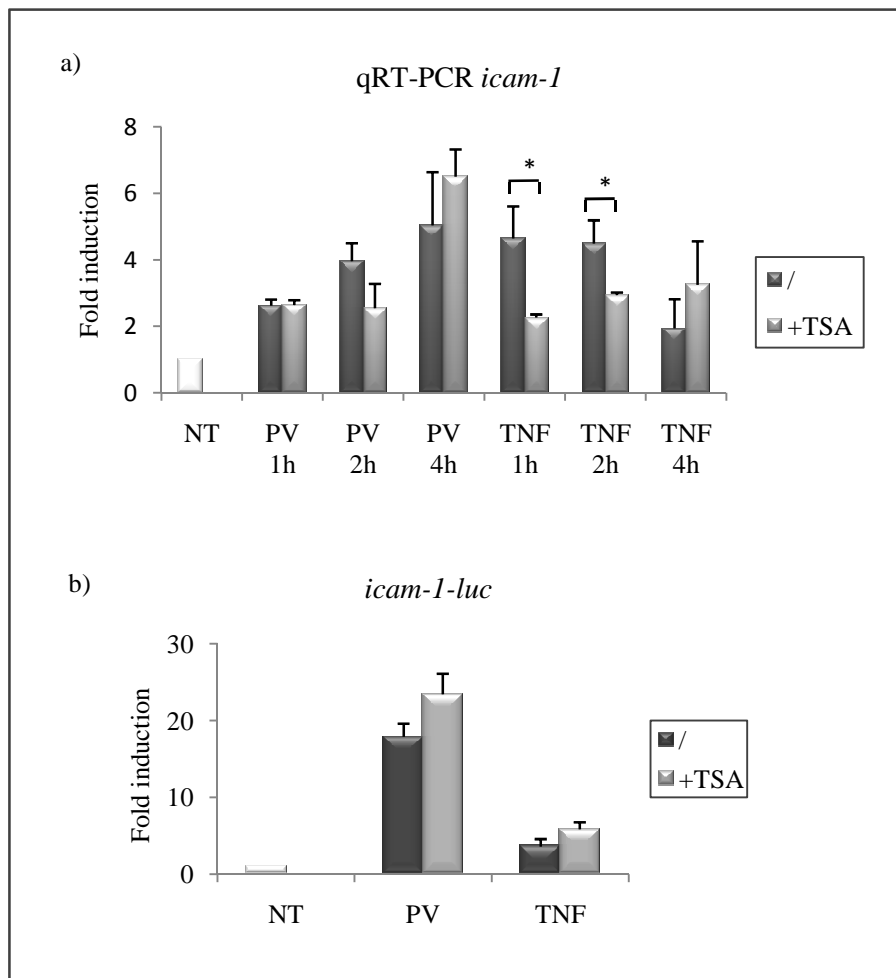


Figure 46 : Modulation par la TSA de la synthèse de l'ARNm d'ICAM-1 induite par le PV ou le TNF α . (a) Les cellules HeLa ont été traitées avec du PV ou du TNF α en présence/absence de TSA. Les ARN totaux ont été extraits et soumis à une RT-PCR quantitative en temps réel afin d'analyser le niveau d'expression de l'ARNm d'ICAM-1. Les résultats ont été normalisés avec le transcrite de la β 2-microglobuline. (b) Des transfections transitoires ont été réalisées avec un gène rapporteur luciférase sous la dépendance du promoteur *icam-1*. Vingt heures après transfection, les cellules HeLa ont été traitées avec du PV ou du 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. *, significativement différent (p value < 0,05). Les résultats représentés sur les graphes sont une moyenne de trois expériences indépendantes. NT, cellules HeLa non traitées.

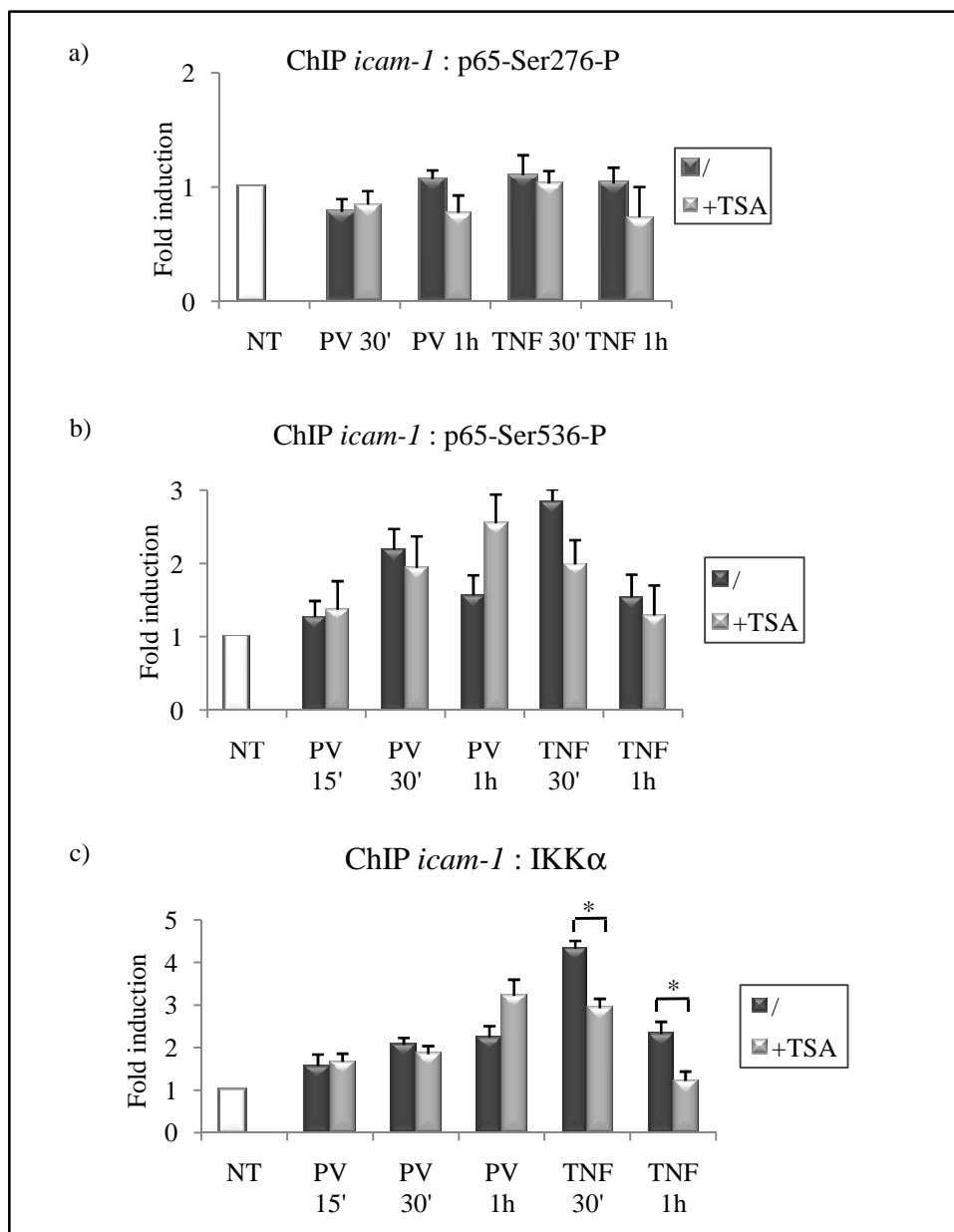


Figure 48 : Influence de la TSA sur le potentiel transactivateur de p65 induit par le PV ou le TNF α . Les cellules HeLa ont été traitées, durant des temps croissants, avec du PV ou du TNF α en présence/absence de TSA. La chromatine immunoprécipitée avec les anticorps anti-p65-Ser276, anti-p65-Ser536-P et anti-IKK α a été soumise à une PCR quantitative en temps réel en utilisant des amorces spécifiques du promoteur *icam-1*. *, significativement différent (p value < 0,05). Les résultats représentés sur les graphes sont une moyenne de trois expériences indépendantes. NT, cellules HeLa non traitées.

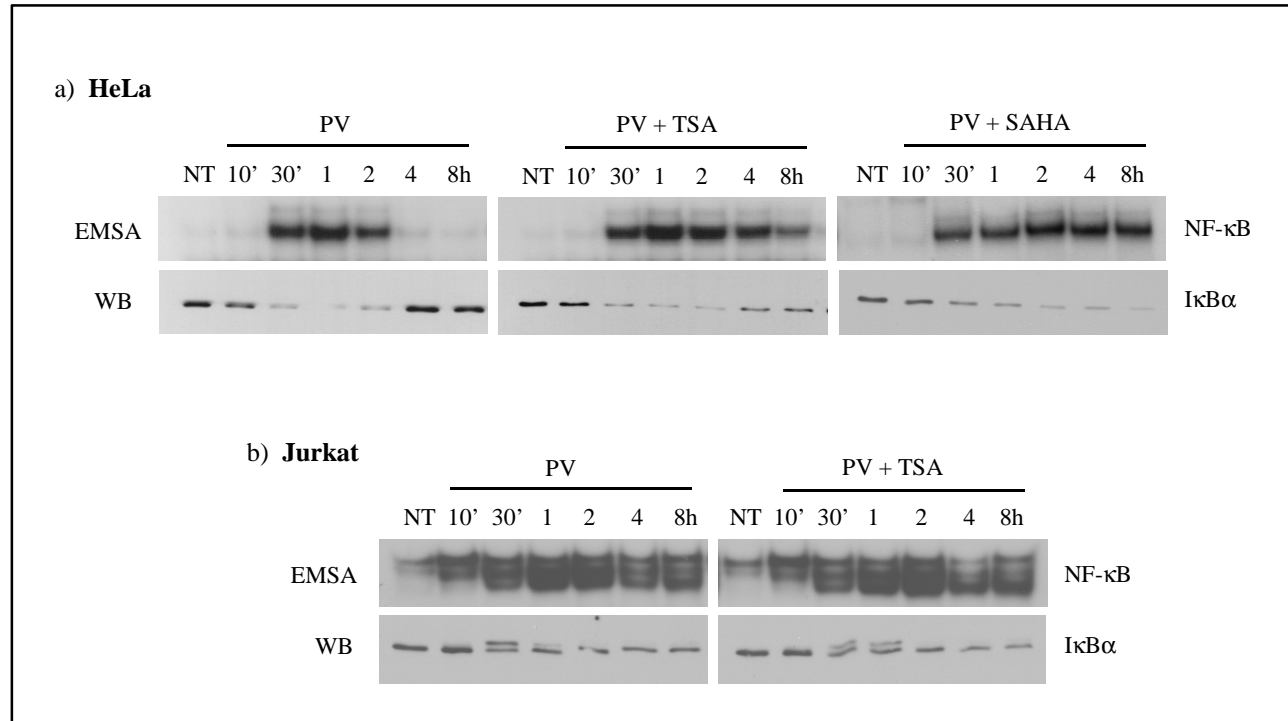


Figure 33 : Modulation par un inhibiteur de HDAC de la voie atypique d'activation du NF-κB induite par le PV et la dégradation associée d'IκBα dans deux types cellulaires distincts. Les cellules HeLa (a) et les cellules T Jurkat (b) ont été traitées, durant des temps croissants, avec le PV en présence/absence de TSA ou de SAHA. La translocation nucléaire du NF-κB a été mesurée par EMSA avec une sonde correspondant au site κB du LTR du HIV (gel du haut). La dégradation d'IκBα a été analysée par western blot sur les extraits cytoplasmiques (gel du bas). Les expériences ont été réalisées en l'absence d'inhibiteur du protéasome. NT, cellules HeLa non traitées.

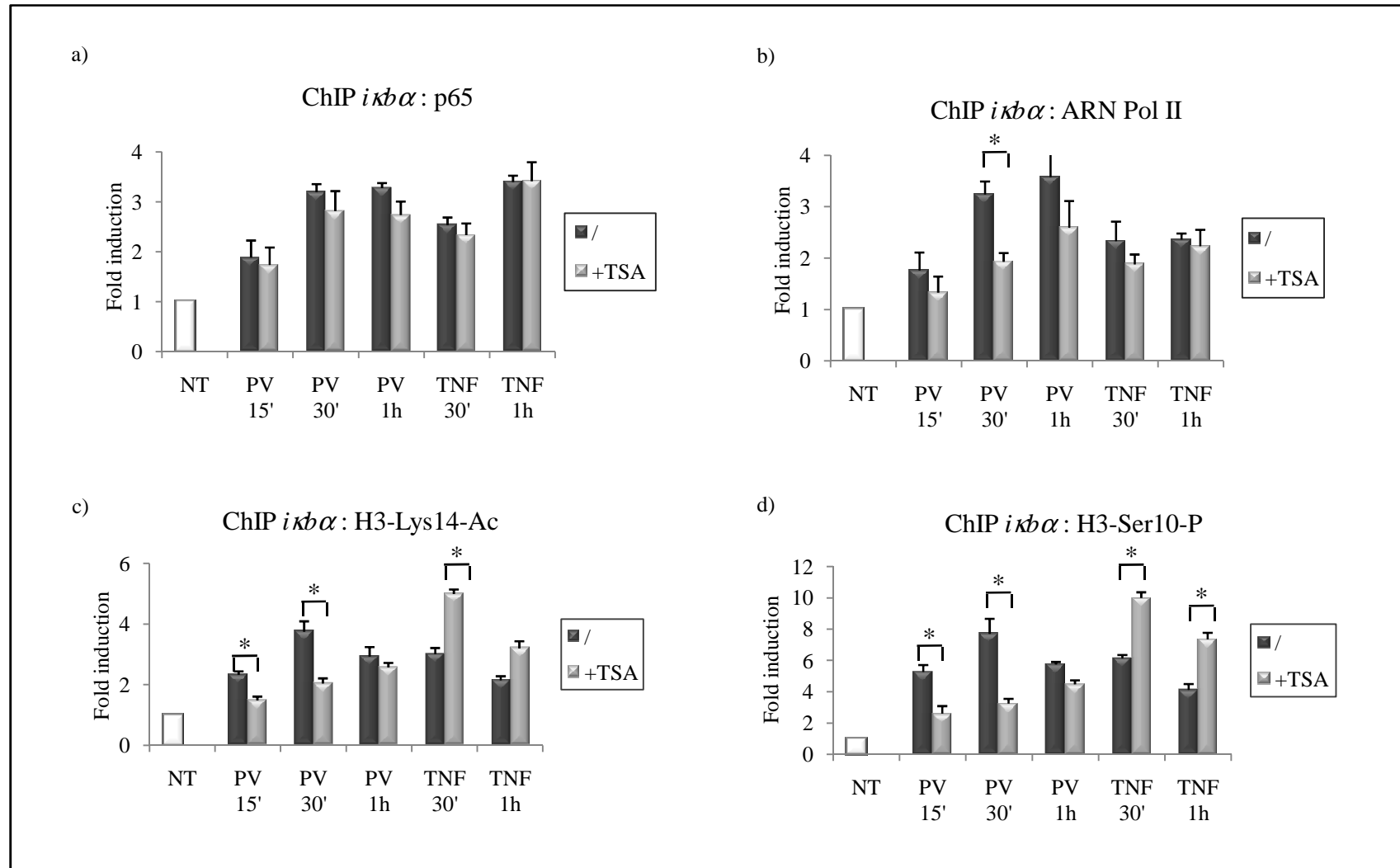


Figure 41 : Impact de la TSA sur le recrutement de p65, de l'ARN Pol II et sur les modifications de l'histone H3 au niveau du promoteur *ikbα* après une induction au PV ou au TNF α . Les cellules HeLa ont été traitées au PV ou TNF α en présence/absence de TSA. Les expériences de ChIP ont été réalisées avec différents anticorps pour l'immunoprécipitation : p65 (a), ARN Pol II (b), histone H3 acétylé sur la Lys14 (c) et histone H3 phosphorylé sur la Ser10 (d). La chromatine immunoprécipitée a été soumise à une PCR quantitative en temps réel en utilisant des amorces spécifiques du site κ B1 du promoteur *ikbα*. Les résultats ont été normalisés avec la chromatine totale. *, significativement différent (p value < 0,05). Les résultats représentés sur les graphes sont une moyenne de trois expériences indépendantes. NT, cellules HeLa non traitées.

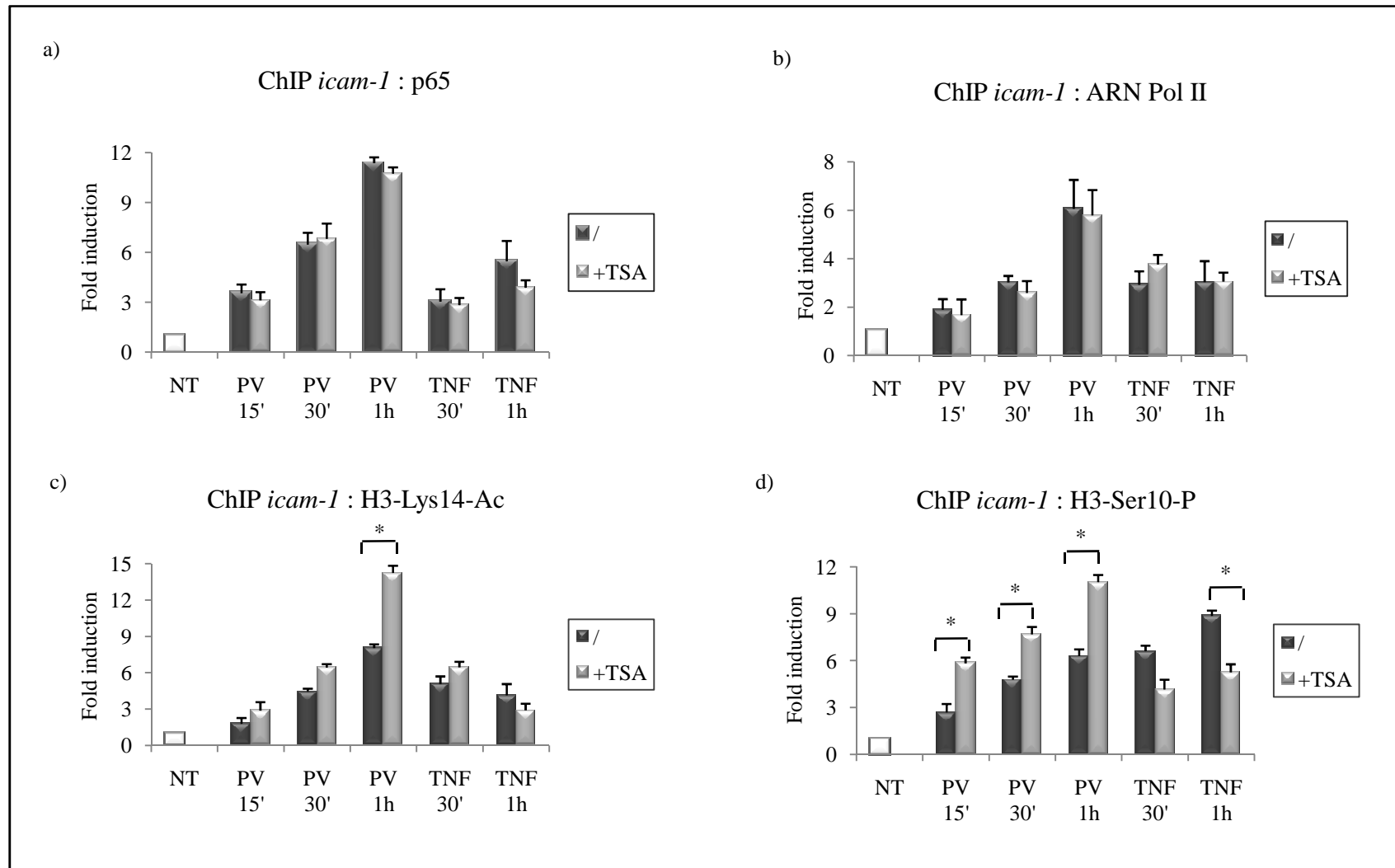


Figure 47 : Impact de la TSA sur le recrutement de p65, de l'ARN Pol II et sur les modifications de l'histone H3 au niveau du promoteur *icam-1* après une induction au PV ou au TNF α . Les cellules HeLa ont été traitées au PV ou TNF α en présence/absence de TSA. Les expériences de ChIP ont été réalisées avec différents anticorps pour l'immunoprécipitation : p65 (a), ARN Pol II (b), histone H3 acétylé sur la Lys14 (c) et histone H3 phosphorylé sur la Ser10 (d). La chromatine immunoprécipitée a été soumise à une PCR quantitative en temps réel en utilisant des amorces spécifiques du promoteur *icam-1*. Les résultats ont été normalisés avec la chromatine totale. *, significativement différent (p value < 0,05). Les résultats représentés sur les graphes sont une moyenne de trois expériences indépendantes. NT, cellules HeLa non traitées.