Institutional Repository - Research Portal
Dépôt Institutionnel - Portail de la Recherche
researchportal.unamur.be
University of Namur

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Etude du rôle de la GSK3B dans la régulation de l'activité du facteur de transcription HIF-1 en hypoxie

Dumont, Valéry

Award date:
2002

Link to publication

General rights
Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy
If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Download date: 26. Apr. 2024

1.1.1.1

2

3 FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX

3.1.1.1 NAMUR

3.1.1.2 ***Faculté des Sciences***

Etude du rôle de la GSK3 dans la régulation de l'activité du facteur de transcription HIF-1 en hypoxie

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de

licencié en Sciences biologiques

Valéry Dumont

Juin 2002

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix

4 FACULTE DES SCIENCES

Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - http://www.fundp.ac.be/fundp.html

Etude du rôle de la GSK3β dans la régulation de l'activité du facteur de transcription HIF-1 en hypoxie

Dumont Valéry

Résumé

Les maladies cardio-vasculaires engendrent des troubles circulatoires qui placent les cellules en conditions d'hypoxie. Lors de ce manque d'oxygène, les cellules s'adaptent pour survivre en mettant en place des mécanismes de compensation. Un facteur de transcription est spécifiquement activé par l'hypoxie : HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor-1). Ce facteur de transcription est composé de deux sous-unités, HIF-1β et ARNT, toutes deux appartenant à la famille des facteurs *trans* bHLH-PAS. Il joue un rôle essentiel dans la régulation de l'expression de certains gènes permettant aux cellules et aux tissus de s'adapter au manque d'oxygène.
La stabilisation de la sous-unité HIF-1α est un des mécanismes principaux conduisant à l'activation de HIF-1 en hypoxie. Cependant d'autres mécanismes sont également nécessaires. C'est notamment le cas des phosphorylations. Parmi les kinases qui pourraient être impliquées, la GSK3β a été décrite dans la littérature comme pouvant phosphoryler directement le domaine ODD (Oxygen-dependent degradation domain) de HIF-1α. Cependant, son rôle n'est pas encore connu. Le but du mémoire était donc d'étudier le rôle de la GSK3β dans la régulation de l'activité de HIF-1.
Dans la première partie de ce mémoire, nous avons recherché des sites potentiels de phosphorylation par la GSK3β dans le domaine ODD de HIF-1α, dans le but de les muter. Nous avons ensuite étudié l'effet de ces mutations sur deux niveaux de régulation de HIF-1 : la stabilisation de la sous-unité HIF-1α et l'activité transcriptionnelle du facteur de transcription HIF-1. Les résultats obtenus ne permettent pas de mettre en évidence une variation du comportement de la protéine HIF-1α muté par rapport à la protéine HIF-1α sauvage.
Dans la seconde partie du travail, l'effet de l'hypoxie sur l'activité de la GSK3β et sur les mécanismes possibles de sa régulation a été étudié en utilisant des modulateurs pharmacologiques. Ensuite, l'effet de ces modulateurs sur la stabilité de HIF-1α et sur l'activité transcriptionnelle de HIF-1 a été testé. Les résultats semblent indiquer que la GSK3β jouerait un rôle dans la régulation de l'activité transcriptionnelle de HIF-1 tandis que Akt stabiliserait la sous-unité HIF-1α. La PI3K serait impliquée dans la régulation de l'activité de ces deux kinases.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 2002

Promoteur: C. Michiels

INTRODUCTION.....1

1 HYPOXIE.....1

1.1 IMPLICATION AU NIVEAU PHYSIOLOGIQUE.....1
1.2 CONSÉQUENCES AU NIVEAU CELLULAIRE.....1
1.2.1 Les conséquences biochimiques.....2
1.2.2 La réponse moléculaire.....3

2 HIF-1.....5

2.1 ORIGINE ET L'ÉLÉMENT HRE (HYPOXIA RESPONSIVE ELEMENT).....5
2.2 CARACTÉRISTIQUES DE HIF-1.....5

3 RÉGULATION DE L'ACTIVITÉ DE HIF-1.....7

3.1 RÉGULATION AU NIVEAU POST-TRADUCTIONNEL.....7
3.1.1 Stabilité et dégradation de HIF-1.....7
3.1.2 Le senseur à oxygène.....8
3.1.2.1 La NADPH-oxydase.....8
3.1.2.2 La mitochondrie.....9
3.1.2.3 La HIF- Prolyl-Hydroxylase (HIF-PH).....10
3.1.3 Translocation nucléaire de HIF-1.....11
3.1.4 Régulation par la voie PI3K/Akt.....11
3.2 RÉGULATION AU NIVEAU DE L'ACTIVITÉ TRANSCRIPTIONNELLE DE HIF-1.....13
3.3 CONCLUSION.....14

4 GSK3.....15

4.1 RÉGULATION DE GSK3.....15
4.1.1 Activation de la GSK3 via la phosphorylation de tyrosine (Y216).....15
4.1.2 Inactivation de la GSK3 via la phosphorylation de sérine (S9).....16
4.1.3 Régulation de la GSK3 via la formation de complexes protéiques et par sa localisation subcellulaire.....17
4.1.4 Régulation de la GSK3 par des produits pharmaceutiques.....18
4.2 SUBSTRATS DE LA GSK3.....18
4.3 VOIES RÉGULÉES PAR LA GSK3.....19
4.3.1 Les protéines du signaling et du métabolisme.....19
4.3.2 Les protéines structurales.....20
4.3.3 Les facteurs de transcription.....20
4.3.3.1 AP-1 (Activator Protein-1).....21
4.3.3.2 HSF-1 (Heat Shock Factor-1).....21
4.3.3.3 Myc.....22
4.3.3.4 NF-B.....22
4.4 CONCLUSION.....23

5 BUT DU MÉMOIRE.....24

MATERIEL ET METHODES.....25

1 ASPECT MOLECULAIRE 25

1.1 SOUCHES BACTÉRIENNES ET PLASMIDES.....25
1.1.1 Souche bactérienne 25
1.1.2 Plasmides.....26
1.2 PRÉPARATION DES MILIEUX DE CULTURE 27
1.2.1 Le milieu Luria Bertani (LB) 27
1.3 TRANSFORMATION BACTÉRIENNE PAR CHOC THERMIQUE 28
1.4 EXTRACTION D'ADN PLASMIDIQUE 29
1.4.1 Mini-préparation d'ADN plasmidique 29
1.4.2 Maxi-préparation d'ADN plasmidique.....31
1.5 RESTRICTION D'ADN 33
1.6 ELECTROPHORÈSE EN GEL D'AGAROSE 34
1.6.1 Matériel.....34
1.6.2 Méthode 35
1.7 MUTAGENÈSE DIRIGÉE DE HIF-1 PAR PCR 35
1.7.1 Réaction de polymérisation en chaînes (PCR).....36
1.7.1.1 Préparation du mélange réactionnel.....36
1.7.1.2 Programmation des cycles PCR.....37
1.7.2 Digestion des plasmides parents 37
1.7.3 Transformation des bactéries 37
1.8 LE SÉQUENÇAGE 38
1.8.1 Préparation du mix d'élongation.....38
1.8.1.1 Matériel 38
1.8.1.2 Méthode 39
1.8.2 Préparation des échantillons pour l'analyse sur gel 39
1.8.2.1 Matériel 39
1.8.2.2 Méthode 39
1.9 PROGRAMMES INFORMATIQUES UTILISÉS 40

2 ASPECT CELLULAIRE 41

2.1 CULTURE CELLULAIRE.....41
2.1.1 Culture des cellules HepG2 41
2.2 TRANSFECTIONS.....42
2.2.1 Transfection des cellules HepG2 par le DOTAP 42
2.2.1.1 Matériel 43
2.2.1.2 Méthode 43
2.3 INCUBATION SOUS HYPOXIE 45
2.3.1 Matériel.....45
2.3.2 Méthode 45
2.4 WESTERN BLOT 45
2.4.1 Lyse des cellules 46
2.4.1.1 Matériel 46
2.4.1.2 Méthode 46
2.4.2 Quantification des protéines par la méthode de Bradford 47
2.4.2.1 Matériel 47
2.4.2.2 Méthode 47
2.4.3 Préparation des échantillons pour le gel d'électrophorèse 47
2.4.4 Electrophorèse en gel de polyacrylamide–SDS 48

2.4.4.1 Matériel 48
2.4.4.2 Méthode 49
2.4.5 Transfert 50
2.4.5.1 Matériel 50
2.4.5.2 Méthode 51
2.4.6 Traitement de la membrane 51
2.4.6.1 Matériel 51
2.4.6.2 Méthode 52
2.4.7 Révélation 53
2.4.7.1 Matériel 53
2.4.7.2 Méthode 53
2.5 SYSTÈME DUAL-LUCIFERASE 54
2.5.1 Matériel 54
2.5.2 Méthode 54
2.6 DOSAGE DU VEGF 55
2.6.1 Principe 55
2.6.2 Matériel 55
2.6.3 Méthode 56
2.6.4 Dosage des protéines par la méthode de Folin 57
2.6.4.1 Matériel 57
2.6.4.2 Méthode 57
2.7 IMMUNOFLUORESCENCE 58
2.7.1 Matériel 58
2.7.2 Méthode 58
2.8 REAL-TIME PCR 59
2.8.1 Principe 60
2.8.2 Extraction d'ARN 61
2.8.2.1 Matériel 61
2.8.2.2 Méthode 61
2.8.3 Rétro-transcription 62
2.8.3.1 Matériel 62
2.8.3.2 Méthode 62
2.8.4 Real-time PCR 63
2.8.4.1 Choix des amorces 63
2.8.4.2 Détermination de la courbe de dilution 63
2.8.4.3 Détermination des concentrations en amorces 64
2.8.4.4 Quantification de l'ARNm de l'Aldolase A 64

RESULTATS ET DISCUSSION 65

1 MUTATION DE HIF-1 65

1.1 GÉNÉRATION DE MUTANTS DE HIF-1 65
1.1.1 Choix des mutants 65
1.1.2 Mutagenèse dirigée de HIF-1 par PCR 66
1.2 EXPRESSION DES MUTANTS 67
1.3 ACTIVITÉ TRANSCRIPTIONNELLE DES MUTANTS 68
1.4 CONCLUSION 69

2 EFFET DE L'HYPOXIE SUR LA GSK3 70

2.1 EFFET DE L'HYPOXIE SUR L'ÉTAT DE PHOSPHORYLATION DE LA GSK3 70
2.2 EFFET DE L'HYPOXIE SUR LA LOCALISATION DE GSK3 71
2.3 EFFET DE L'HYPOXIE SUR AKT, UNE KINASE RÉGULATRICE DE GSK3 72
2.4 EFFET DU LICL SUR LES FORMES PHOSPHORYLÉES DE LA GSK3 72
2.5 EFFET D'UN INHIBITEUR DE LA PI3K SUR LES KINASES AKT ET GSK3 ET SUR LES FORMES PHOSPHORYLÉES DE LA GSK3 74

3 EFFET DE LA MODULATION DE L'ACTIVITÉ DE LA GSK3β SUR LA PROTÉINE HIF-1 75

3.1 EFFET DU LICL SUR LE NIVEAU D'EXPRESSION DE HIF-1α 75
3.2 EFFET DU LICL SUR L'ACTIVITÉ TRANSCRIPTIONNELLE DE HIF-1 76
3.3 EFFET DU LICL SUR L'ACTIVITÉ PHYSIOLOGIQUE DE HIF-1 77
3.3.1 Le dosage du VEGF 78
3.3.2 Quantification de l'ARNm de l'aldolase A 79

4 EFFET DE L'INHIBITION DE LA PI3K SUR LA RÉGULATION DE HIF-1 81

4.1 EFFET DU LY294002 SUR LE NIVEAU D'EXPRESSION DE HIF-1α 81
4.2 EFFET DU LY294002 SUR L'ACTIVITÉ TRANSCRIPTIONNELLE DE HIF-1 82
4.3 EFFET DU LY294002 SUR LA QUANTITÉ D'ARNM DE L'ALDOLASE A 82

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 83

ANNEXES 90

BIBLIOGRAPHIE 93

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ADP	Adénosine phosphate
Ahr	Aryl hydrocarbon receptor
AMP	Adénosine monophosphate
Amp	Ampicilline
Ampho	Amphotéricine
AMPK	AMP-activated protein kinase
AP-1	Activator protein
APC	Adenomatous polyposis coli gene product
APS	Ammonium persulfate
Arg	Arginine
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messager
ARNT-1	Aryl/hydrocarbon receptor nuclear translocator-1
ATP	Adénosine triphosphate
Axile	Axin-related protein
bHLH	Basic helix-loop-helix
BSA	Bovine serum albumin
bZIP	basic leucine zipper
CBP	CREB binding protein
CO	Monoxyde de carbone
CREB	cAMP responsive element binding protein
DFO	desferroxiamine
DMEM	Dulbecco Modified Eagle's Medium
dNTP	déoxynucléotide triphosphate
EDTA	Acide éthylènedinitrilotétraacétique
EGF	Epidermal growth factor
eIF2B	Eukaryotic initiation factor 2B
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
EPO	Erythropoïétine

ERK	Extracellular regulated kinase
GBP	GSK3β binding protein
GDP	Guanosine diphosphate
GS	Glycogène synthase
GSK3β	Glycogène synthase kinase 3 beta
GTP	Guanosine triphosphate
H_2O_2	Peroxyde d'hydrogène
Hepes	Hydroxyethyl piperazine-ethane sulfonic acid
HIF-1	Hypoxia inducible factor-1
HIF-1α	Hypoxia inducible factor-1alpha
HIF-PH	HIF-α prolyl hydroxylase
HO-1	Hème oxygénase-1
HRE	Hypoxia responsive element
HRP	Horseradish peroxidase
HSF-1	Heat shock factor-1
HSP	Heat shock protein
Hsp90	Heat shock protein 90
ID	Inhibitory domain
IGF-1	Insulin-like growth factor
IgG	Immunoglobuline G
ILK	Integrin-linked kinase
i-NOS	Inducible nitric oxide synthase
IRS	Insulin receptor substrate
kDa	kiloDalton
LB	Luria bertani
LiCl	Chlorure de lithium
mA	milli Ampère
MAP	Microtubule associated protein
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MCS	Site multiple de clonage
MEK	MAP/ERK kinase
MOPS	Acide 3-morpholino-propanesulfonique
NADPH	Nicotinamide adénosine diphosphate

NF-□B	Nuclear factor-kappa B
NGF	Nerve growth factor
NLS	Nuclear localization signal
NO	Monoxyde d'azote
ODD	Oxygen-dependent degradation domain
PAS	Per Ahr/ARNT Sim
PBS	Phosphate Buffer Saline
PC12	Phéochromocytome 12
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDK	Phosphoinositide-dependent kinase
Pen	Pénicilline
PEST	Proline-Glutamate-Sérine-Thréonine
PFA	Paraformaldéhyde
PFK	Phosphofructokinase
PFK-2	6-phosphofructo-2 kinase/fructose-2,6-biphosphatase
PH	Pleckstrin homology
PI3K	Phosphatidyl inositol-3 kinase
PIP3	Phosphatidyl inositol-3,4,5-triphosphate
PKA	Protéine kinase A ou cyclic AMP-dependent protein kinase
PKB	Protéine kinase B
PKC	Protéine kinase C
PLB	Passive Lysis Buffer
PNPP	Phospho-nitrophényl phosphate
PP1	Protéine phosphatase-1
PVDF	Poly vinylidiène difluoride
pVHL	Protéine Von Hippel Lindau
Ref-1	Reduction factor-1
ROS	Reactive Oxygen Species
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
Ser	Sérine
Strep	Streptomycine
TAD-C	Transactivation domain C-terminal
TAD-N	Transactivation domain N-terminal

TBE	Tris-Borate EDTA
TEMED	N,N,N'-Tétra-methyl-ethylènediamine
Thr	Thréonine
TNF-α	Tumor necrosis factor-alpha
TRX	Thiorédoxine
Tyr	Tyrosine
U.V.	Ultra Violet
UDP	Uridine diphosphate
V	Volt
VEGF	Vascular endothelial growth factor
X-gal	5-bromo, 4-chloro, 3-indolyl-β-D-galactoside

5 HYPOXIE

5.1 Implication au niveau physiologique

La vie en aérobie n'est possible que dans une gamme précise de concentrations en oxygène. Chez les mammifères, les systèmes cardio-vasculaire et respiratoire permettent le «□aptage□» de l'oxygène dans l'air et sa redistribution aux cellules de l'organisme. Il servira principalement de substrat dans les phosphorylations oxydatives de la respiration cellulaire.

Un arrêt local ou un ralentissement de la circulation sanguine peut se produire suite à des accidents athérosclérotiques comme l'infarctus, la thrombose mais aussi au niveau des tissus cicatriciels et de nodules tumoraux. Il en résulte une ischémie caractérisée par une diminution de l'apport nutritionnel et de l'apport en oxygène ainsi qu'une non-élimination des déchets métaboliques qui, si elle se prolonge, conduira à la mort cellulaire. Les cellules développent des mécanismes de compensation pour s'adapter à cette déficience et maintenir leur homéostasie. Dans ce mémoire, nous allons nous focaliser sur l'hypoxie□'est-à-dire la diminution de l'apport en oxygène dans les tissus de l'organisme.

5.2 Conséquences au niveau cellulaire

Les cellules sont capables de percevoir les changements dans la tension en oxygène et de s'adapter aux conditions hypoxiques. Les conséquences biochimiques ainsi que certains éléments de la réponse moléculaire de cette adaptation sont bien connus.

5.2.1 Les conséquences biochimiques

En absence d'oxygène, les phosphorylations oxydatives ralentissent, ce qui entraîne une incapacité partielle à générer de l'ATP (Arnould *et al.*, 1992). Or l'ATP est essentiel pour maintenir la viabilité cellulaire. En effet, la cellule meurt lorsque la production d'ATP ne suffit plus à maintenir l'équilibre ionique et osmotique.

Deux voies sont responsables de la production d'ATP□ la glycolyse et la chaîne de transport d'électrons au niveau de la mitochondrie. En hypoxie, le métabolisme glycolytique va être fortement augmenté puisque les phosphorylations oxydatives diminuent (Janssens *et al.*, 1995). Différents mécanismes vont être mis en place par la cellule pour orienter la production d'ATP vers cette voie indépendante de l'oxygène.

Tout d'abord, la phosphofructokinase (PFK), une enzyme clé dans la régulation de la glycolyse, va être activée. En effet, elle est activée de manière allostérique par l'ADP et l'AMP et est inhibée par l'ATP. Cependant, un activateur allostérique plus important est le fructose-2,6-biphosphate. La synthèse et la dégradation de celui-ci sont régulées par une seule enzyme, la 6-phosphofructo-2 kinase/fructose-2,6-biphosphatase (PFK-2). Celle-ci est régulée par phosphorylation par l'AMPK (AMP-activated protein kinase) (Figure 1).

Suite à la diminution en oxygène, l'AMPK est activée et phosphoryle la PFK-2 augmentant ainsi son activité. Il en résulte une augmentation de la concentration en fructose-2,6-biphosphate activant de manière allostérique la PFK induisant ainsi l'augmentation de la voie glycolytique.

Un autre moyen d'augmenter la glycolyse est d'augmenter la concentration du substrat, le glucose. En fait, l'hypoxie active certains transporteurs dont le symport Na^+/glucose. Il va en résulter une augmentation de la concentration intracellulaire en glucose. De plus, l'AMPK stimule la translocation du transporteur de glucose Glut-4, des vésicules de stockage vers la membrane plasmique.

En plus de cette compensation vis-à-vis de la chute de la production en ATP, la consommation de celui-ci est réorientée vers les fonctions vitales notamment les pompes ioniques, en diminuant par exemple la synthèse d'ARN et de protéines.

L'ensemble de ces processus permet de réorienter le métabolisme cellulaire afin de maintenir la viabilité des cellules en dépit du manque d'oxygène.

5.2.2 La réponse moléculaire

Bien qu'en général, on observe une inhibition globale de la synthèse protéique suite à la diminution de la concentration en ATP, certaines protéines sont surexprimées de manière spécifique en hypoxie. Cette surexpression implique l'activation de facteurs de transcription tels que AP-1, NF-□B et p53 qui vont intervenir dans la modulation de l'expression de gènes impliqués dans la réponse adaptatrice à l'hypoxie. Ces facteurs sont cependant également activés dans d'autres conditions de stress cellulaire.

Un facteur de transcription est spécifiquement activé lors de la diminution de la concentration en oxygène intracellulaire. Ce facteur de transcription est nommé HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor-1) (Semenza et Wang, 1992).

De nombreux gènes ont été identifiés comme gènes cibles d'HIF-1 (Figure 2). HIF-1 régule l'expression des gènes codant pour les enzymes glycolytiques□aldolase A, hexokinase, phosphofructokinase L, pyruvate kinase, etc. Les gènes codant pour les transporteurs de glucose, Glut-1 et Glut-3, sont également surexprimés. Cela permet d'augmenter l'activité de la glycolyse et de maintenir une production minimale d'ATP et ce, de façon indépendante des phosphorylations oxydatives.

Les phénomènes hypoxiques se produisent également au niveau de tissus cicatriciels ou au niveau de nodules tumoraux. Ces «□ouveaux□ tissus ne sont pas irrigués et nécessitent donc une néo-vascularisation pour permettre un apport plus important d'oxygène et de nutriments. Ce mécanisme est médié par un puissant mitogène et chémoattractant spécifique des cellules endothéliales, le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). HIF-1 est nécessaire à l'induction transcriptionnelle du VEGF sous hypoxie, mais il n'est pas nécessaire lors de l'induction du VEGF dans d'autres conditions. En effet, d'autres facteurs de transcription comme AP-1 interviennent dans la surexpression du VEGF dans des conditions inflammatoires par exemple.

L'organisme compense aussi les phénomènes hypoxiques en augmentant la production d'érythrocytes conduisant à une élévation de la capacité de transport en oxygène. Cette réponse est médiée par une hormone glycoprotéique synthétisée au niveau du foie et des reins, l'EPO (Erythropoïétine). Son expression est également régulée par HIF-1. En fait, c'est l'analyse de la régulation de l'expression de celle-ci en hypoxie qui a permis de mettre en évidence le facteur de transcription HIF-1 (voir 2.1).

L'expression d'autres gènes est également sous la dépendance d'HIF-1⊡ la tyrosine hydroxylase qui est une enzyme clé dans la régulation du rythme respiratoire, l'i-NOS (inducible Nitric Oxide Synthase) et HO-1 (Hème Oxygénase 1) qui donnent respectivement lieu à la synthèse des vasodilatateurs monoxyde d'azote (NO) et monoxyde de carbone (CO) (Gothié et Pouysségur, 2002).

6 HIF-1

6.1 Origine et l'élément HRE (Hypoxia Responsive Element)

HIF-1 fut à l'origine identifié comme une protéine nucléaire spécifiquement induite par l'hypoxie et capable de se lier à un élément enhancer situé en 3' de la séquence codante du gène de l'EPO (Semenza et Wang, 1992). Cet élément a une longueur de 50 nucléotides et possède trois sites de liaison pour trois facteurs de transcription.

Un des sites a été identifié comme étant l'élément *cis* pour la liaison du facteur HIF-1. En effet, une sonde nucléotidique correspondant à ce site a été utilisé dans des expériences de retard sur gel par électrophorèse et a permis de déterminer qu'une protéine s'y liait spécifiquement en hypoxie mais pas en normoxie. La protéine, induite en hypoxie, a été nommé HIF-1 pour Hypoxia Inducible Factor-1. La séquence *cis* de cette protéine est ACGTG et elle est nommé HRE (Hypoxia Responsive Element).

Afin de déterminer si HIF-1 était un facteur de transcription, la séquence HRE a été clonée en amont d'un promoteur au sein d'un plasmide rapporteur. Semenza *et al.* (1992) démontrèrent ainsi que HIF-1 était capable d'induire la transcription du gène rapporteur.

Les deux autres sites sont les sites de liaison de deux autres facteurs de transcription□ l'un se lie de manière constitutive et l'autre appartient à la famille des récepteurs à hormones nucléaires et modulerait l'activité enhancer.

6.2 Caractéristiques de HIF-1

HIF-1 est actif sous forme hétérodimérique (Figure 3). Les deux sous-unités, HIF-1□ et ARNT-1 (Aryl/hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator-1), ont respectivement un poids moléculaire de 120 kDa et 94 kDa pour une longueur de 826 acides aminés et 789 acides aminés (Wang et Semenza, 1995). ARNT-1 avait précédemment été identifié en tant que protéine partenaire de AhR (Aryl hydrocarbon Receptor), un autre facteur de transcription impliqué dans la transcription du gène codant le cytochrome p450 intervenant dans la détoxification des xénobiotiques (Whitlock, 1996). ARNT-1 est une protéine constitutivement

exprimée au niveau nucléaire et ne constitue donc pas la sous-unité régulable du complexe HIF-1α/ARNT-1.

Ces deux sous-unités appartiennent à la famille des facteurs *trans* bHLH (basic Helix-Loop-Helix) –PAS (Per AhR/ARNT Sim) (Wang *et al.*, 1995). Le domaine basique intervient dans la liaison à l'ADN et dans la reconnaissance spécifique de l'élément *cis* HRE. Le domaine HLH permet l'hétérodimérisation des deux sous-unités et la juxtaposition des domaines basiques dans le grand sillon de l'ADN. Le domaine PAS constitue un second motif de dimérisation, mais il participe également à la liaison et à l'interaction avec d'autres protéines impliquées la régulation de HIF-1 comme la protéine chaperonne Hsp90 (Minet *et al.*, 1999).

D'autres domaines ont été cartographiés sur la protéine HIF-1α (Figure 4). Le domaine ODD (Oxygen-dependent Degradation Domain), s'étalant du résidu 401 au résidu 603, intervient dans le processus de dégradation de la sous-unité HIF-1α. La protéine pVHL (Von Hippel Lindau), associée à d'autres protéines, interagit avec ce domaine et régule le mécanisme de dégradation par le protéasome 26S (Cockman *et al.*, 2000). Son interaction est médiée par l'activation d'une Prolyl-Hydroxylase en normoxie (voir point 3.1.2.3). Au niveau de ce domaine ODD se trouve également un domaine de transactivation, TAD-N (Transactivation Domain N-terminal) compris entre les résidus 531 et 575. Un second domaine de transactivation, TAD-C (Transactivation Domain C-terminal), se situant entre le résidu 786 et 826, est responsable de l'activité transcriptionnelle du facteur de transcription. Entre ces deux domaines de transactivation se situe un domaine peu connu communément appelé Inhibitory Domain (ID) (Jiang *et al.*, 1997).

Deux sites de localisation nucléaire, NLS (Nuclear Localization Signal), interagissant avec les importines-β, ont été localisés d'une part du côté de l'extrémité carboxy-terminale au niveau des résidus 718 à 721 et d'autre part à l'extrémité amino-terminale dans le domaine bHLH au niveau des résidus 17 à 33 de la protéine HIF-1α (Gothié et Pouysségur, 2002).

7 Régulation de l'activité de HIF-1

HIF-1 détermine l'activité de HIF-1 puisqu'il est la sous-unité régulatrice du facteur de transcription. En effet, en normoxie, HIF-1 est dégradé continuellement tandis qu'en hypoxie, il est stabilisé. Il peut alors hétérodimériser avec la sous-unité ARNT, pour former le facteur de transcription actif. Certains mécanismes de sa régulation sont bien connus et sont présentés ci-dessous. Il faut cependant noter qu'il reste encore beaucoup de zones d'ombre dans la connaissance et la compréhension de ces mécanismes.

7.1 Régulation au niveau post-traductionnel

7.1.1 Stabilité et dégradation de HIF-1

Le temps de demi-vie de la protéine HIF-1 en normoxie est de l'ordre de 5 minutes si bien qu'on ne peut mettre en évidence la présence de celle-ci dans des cellules normoxiques. En hypoxie, cette sous-unité HIF-1 est stabilisée et s'accumule dans le noyau des cellules.

Huang *et al*. (1998) ont démontré qu'en normoxie HIF-1 était rapidement dégradé par un complexe enzymatique de type protéasome 26S. En effet, une incubation des cellules en présence d'inhibiteurs du protéasome engendrait une accumulation de HIF-1. Kallio *et al*. (1999) ont par ailleurs démontré l'ubiquitinylation de HIF-1 en normoxie (Figure 5).

Le protéasome 26S dégrade spécifiquement les protéines polyubiquitinylées (pour une revue, Hochstrasser, 1996). Ce protéasome 26S se compose de 3 parties 2 sous-unités 19S et une sous-unité 20S (pour une revue, Weissman, 1997). La sous-unité 20S est un complexe de protéases et les sous-unités 19S se fixant de chaque côté de cette sous-unité reconnaissent les substrats polyubiquitinylés et les acheminent vers le complexe 20S.

La présence de séquences PEST (séquences enrichies en résidus Proline, Glutamate, Sérine et Thréonine entourées d'acides aminés basiques) au niveau de l'ID (Inhibitory Domain) de HIF-1 pourrait constituer des signaux potentiels responsables de la déstabilisation et de la dégradation de cette protéine par le protéasome 26S en normoxie. En effet, le rôle décrit de ces séquences PEST est de catalyser la liaison de chaînes d'ubiquitine

sur des lysines de la protéine à dégrader. Cette fixation est médiée par des ubiquitine ligases (pour une revue, Hochstrasser, 1995). La phosphorylation de ces séquences PEST serait un signal orientant la protéine vers sa dégradation par le protéasome 26S ou à l'inverse inhiberait l'ubiquitinylation et donc la dégradation de la protéine par le protéasome 26S.

Cependant, les résultats expérimentaux ne semblent pas indiquer que les séquences PEST de HIF-1 soient le régulateur principal de la stabilité de la protéine.

Par ailleurs, la protéine pVHL (protéine Von Hippel Lindau) a été identifiée comme médiant l'ubiquitinylation de HIF-1 et induisant ainsi sa dégradation en normoxie. Des expériences de co-immunoprécipitation ont permis de déterminer que pVHL et HIF-1 interagissent directement (Lonergan *et al.*, 1998). pVHL se fixe via son domaine ß au niveau des résidus 530 à 572 de HIF-1 correspondant au domaine de transactivation TAD-N. La régulation de cette interaction et les conséquences de celle-ci seront présentées au point 3.1.2.3.

7.1.2 Le senseur à oxygène

En conditions hypoxiques, HIF-1 mais aussi d'autres facteurs de transcription sont spécifiquement activés, ce qui laisse supposer que la cellule est capable de percevoir les variations de la tension en oxygène. Des complexes protéiques jouant le rôle de senseur à oxygène pourraient initier une cascade de transduction du signal permettant de réguler l'activité de ces différents facteurs de transcription.

Trois hypothèses existent à l'heure actuelle concernant la nature du senseur à oxygène (Figure 6): un senseur du type NADPH-oxydase, la mitochondrie et la HIF- Prolyl-hydroxylase (HIF-PH). Ces trois hypothèses sont décrites ci-dessous.

7.1.2.1 La NADPH-oxydase

Le premier modèle propose que le senseur à oxygène en aval de HIF-1 soit une protéine à groupement hémique fixant un ion ferrique et qui serait capable d'interagir avec l'oxygène de façon similaire à l'hémoglobine ou à une protéine de type NADPH-oxydase. En présence d'oxygène, le groupement hémique est sous forme oxy. En hypoxie, il passe sous forme

déoxy (Goldberg *et al.*, 1994). Cette hypothèse est basée sur les données obtenues entre autres avec la lignée hépatocytaire Hep3B□

- Le cobalt active HIF-1. Les ions cobalt substituent les ions ferriques au niveau des centres hémiques les bloquant en conformation déoxy (Wang et Semenza, 1993). On utilise le cobalt pour réaliser une hypoxie chimique.
- La desferroxamine (DFO), un chélateur du fer active aussi HIF-1, probablement en retirant le fer du senseur. Le centre hémique du senseur ne pouvant plus complexer l'oxygène, est sous forme déoxy (Ehleben *et al.*, 1997).
- Par contre, les monoxydes de carbone et d'azote inhibent l'activité de HIF-1 en hypoxie en mimant l'effet de l'oxygène (hème en conformation oxy) (Sogawa *et al.*, 1998).

La fonction primaire des NADPH-oxydase est de produire du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). En normoxie, le senseur à oxygène de type NADPH-oxydase disposant d'oxygène produirait une quantité modérée de radicaux libres et de peroxydes, qui par activation d'une voie de transduction du signal inconnue, induiraient la dégradation de HIF-1□ par le protéasome 26S.

En hypoxie, la production de peroxydes diminuerait, ce qui entraînerait l'inhibition de sa dégradation et donc l'activation de HIF-1. Si on observe effectivement une diminution de la production de H_2O_2 en hypoxie, certaines données s'opposent cependant à ce modèle. En effet, HIF-1 est toujours bien activé en hypoxie chez des lignées cellulaires déficientes en l'une ou l'autre des sous-unités du complexe NADPH-oxydase (Archer *et al.*, 1999). De plus, dans d'autres lignées cellulaires dont les cellules Hep3B, l'ajout d'H_2O_2 exogène en normoxie peut conduire à l'activation de HIF-1 (Wang et Semenza, 1995).

D'autres hypothèses ont alors été envisagées.

7.1.2.2 La mitochondrie

Le deuxième modèle propose la mitochondrie comme senseur à l'oxygène puisque c'est elle qui utilise l'oxygène pour réaliser les phosphorylations oxydatives. Bien qu'en contradiction avec les études citées ci-dessus, la production de peroxyde d'hydrogène mitochondrial semble augmenter en hypoxie par rapport à la normoxie et cet H_2O_2 pourrait être à l'origine de l'activation de HIF-1 en hypoxie (Chandel *et al.*, 1998, Chandel *et al.*, 2000). Cette observation n'a cependant pu être réalisée que dans un nombre restreint de types

cellulaires. Il faut également noter que l'observation d'une activation normale de HIF-1 par l'hypoxie dans des cellules □°, c'est-à-dire déficientes pour la chaîne respiratoire, est en contradiction avec cette hypothèse.

Dans les deux premiers modèles, les espèces réactives dérivées de l'oxygène ou ROS (Reactive Oxygen Species) interviendraient pour réguler la stabilisation ou la dégradation de HIF-1□. Différentes observations ont suggéré qu'ils pourraient activer la voie de la PI3K (Phosphatidyl Inositol-3 Kinase) (Mazure *et al.*, 1997). Cette voie de transduction du signal serait donc le lien entre les senseurs putatifs à l'oxygène et HIF-1. La voie PI3K sera détaillée au point 3.1.4..

Cependant, aucune des deux hypothèses ne peut expliquer l'ensemble des observations.

7.1.2.3 La HIF-□ Prolyl-Hydroxylase (HIF-PH)

Le dernier modèle a été récemment proposé suite aux travaux des équipes de Ratcliffe (2001) et Kaelin (2001) montrant que le mécanisme d'activation de HIF-1 implique une activité hydroxylase dépendante du fer et de l'oxygène. Ils ont en effet observé qu'en normoxie, HIF-1□ est hydroxylé sur la proline en position 564 par une enzyme dénommée HIF-PH pour *HIF-□ prolyl-hydroxylase*. Cette proline hydroxylée est directement impliquée dans la dégradation de HIF-1□ puisqu'elle fournit le site de reconnaissance pour la protéine pVHL (Von-Hippel-Lindau).

Ainsi, pVHL s'associant à HIF-1□, forme avec les élongines B et C et la culline-2 un complexe qui présente une activité E3 ubiquitine ligase (Cockman *et al.*, 2000). Ce complexe permet l'ubiquitinylation de la lysine en position 532 d'HIF-1□ et la dégradation par le protéasome 26S (Tanimoto *et al.*, 2000).

L'hypoxie entraîne la stabilisation de HIF-1□. En effet, en absence d'oxygène, la HIF-PH n'est plus active et n'est plus capable d'hydroxyler la proline 564 de HIF-1□. L'interaction entre HIF-1□ et pVHL est levée et le mécanisme d'ubiquitinylation/dégradation est ainsi inhibé. La sous-unité HIF-1□ stabilisée peut alors transloquer vers le noyau.

7.1.3 Translocation nucléaire de HIF-1

En se basant sur les mécanismes de translocation nucléaire du récepteur Ahr (Aryl hydrocarbon receptor) qui est un autre partenaire de la sous-unité ARNT, le mécanisme de translocation nucléaire de HIF-1 a pu être étudié.

En absence de ligand, Ahr se trouve dans le cytoplasme associé à la protéine Hsp90 (Heat shock protein 90), une chaperonne impliquée dans le repliement des protéines dénaturées et/ou mal repliées (Whitelaw *et al.*, 1993). Suite à la liaison avec son ligand, Ahr se dissocie de Hsp90 démasquant les sites de dimérisation et de localisation nucléaire de Ahr. Celui-ci transloque alors dans le noyau où il peut s'associer à ARNT.

Les travaux réalisés par Minet *et al.* (1999) au sein du laboratoire ont mis en évidence que le mécanisme de translocation nucléaire de HIF-1 était également régulé par Hsp90.

En effet, en normoxie, HIF-1 interagit via son domaine bHLH-PAS avec la protéine Hsp90. L'association de ces deux protéines engendrerait une conformation de la protéine HIF-1 de telle façon que les sites de localisation nucléaire N-terminal et C-terminal identifiés soient masqués et non accessibles aux importines responsables de la translocation nucléaire.

L'hypoxie dissocie Hsp90 de HIF-1 démasquant les sites de localisation nucléaire de HIF-1 et permettant ainsi sa translocation dans le noyau (Figure 7).

7.1.4 Régulation par la voie PI3K/Akt

Les phosphorylations sont des mécanismes importants dans la régulation des voies de transduction du signal. Plusieurs kinases dont celles de la famille des MAPKinases (Mitogen Activated Protein Kinases), ont déjà été mises en évidence pour avoir un rôle dans la régulation de l'activation de HIF-1 (voir point 3.2.).

La PI3K (Phosphatidyl Inositol 3 Kinase) serait également une kinase impliquée dans la régulation de HIF-1. En effet, dans certains types cellulaires, la wortmannine, un inhibiteur de la PI3K, est capable d'inhiber la transcription du gène du VEGF en hypoxie. La sur-expression de dominants négatifs pour la PI3K ou pour la kinase Akt, une kinase en aval de la PI3K, inhibe également la surexpression du VEGF induite par l'hypoxie (Mazure *et al.*, 1997).

De plus, Zhong *et al.* (2000) ont montré par Western blot que l'inactivation de la PI3K est capable d'inhiber la stabilisation de la sous-unité HIF-1 dans des cellules Hep3B en

hypoxie. Cela suggère que la voie PI3K/Akt est impliquée dans la régulation de HIF-1, probablement en régulant sa stabilité.

Akt (aussi nommé protéine kinase B ou PKB) est une sérine/thréonine kinase cytosolique jouant un rôle important dans la survie cellulaire dans différentes conditions (pour une revue, Datta *et al.*, 1999). Dans le domaine amino-terminal, Akt possède un domaine PH (Pleckstrin Homology) qui va reconnaître des lipides phosphorylés (ex: Phosphatidyl Inositol-3,4,5-triphosphate, PIP_3) et médier des interactions lipide/protéine et/ou protéine/protéine.

La PI3K active catalyse la formation de PIP_3 ; ce qui induit la translocation de Akt du cytosol vers le feuillet interne de la membrane plasmique pour se lier via son domaine PH aux PIP_3. Akt adopte alors une conformation telle qu'elle peut se faire phosphoryler par la PDK (Phosphoinositide-Dependent Kinase) sur sa sérine en position 473 et sur sa thréonine en position 308, ceci résulte en l'activation de la kinase (Figure 8). Akt activée peut alors phosphoryler différents substrats tels que des facteurs de transcription comme CREB (cAMP Responsive Element Binding Protein) et d'autres protéines régulatrices comme la serine/thréonine kinase GSK3 (Glycogène Synthase Kinase 3).

Beitner-Johnson *et al*. (2001) ont observé qu'en hypoxie la phosphorylation de Akt augmentait fortement dans les cellules PC12 (phéochromocytome 12). Ils ont également observé un effet similaire sur la GSK3. La phosphorylation de la GSK3 par Akt induit son inactivation. L'hypoxie active donc la voie PI3K-Akt-GSK3, ce qui induit la stabilisation de HIF-1□, comme cela a été démontré dans les cellules PC12 ainsi que dans les cellules Hep3B (Zhong *et al*., 2000).

Cependant, les mécanismes d'activation de la PI3K par l'hypoxie restent inconnus. Une hypothèse possible serait que la production d'espèces réactives dérivées de l'oxygène (ROS) soit augmentée en condition hypoxique et que ces espèces activent la voie PI3K/Akt (Chandel *et al*., 2000).

Une seconde hypothèse serait que la PI3K serait un effecteur de Ras, une petite protéine G, située en amont de la voie des MAPKinases (Mazure *et al*., 1997). Ras adopterait une conformation particulière en hypoxie, induisant l'interaction avec PI3K pour l'activer. La PI3K fournirait les PIP_3 permettant la translocation de Akt et par la suite sa phosphorylation.

Arsham *et al*. (2002) ont également montré que lors de transfections transitoires avec une forme constitutivement active de Akt (myristoylée), celle-ci était capable d'augmenter la transcription dépendante de HIF-1□ dans des cellules de glioblastome mais pas dans des cellules d'hépatome. Cela suggère qu'il existe des différences entre ces deux lignées

cellulaires quant à la réponse médiée par l'activation de Akt. Ils ont également montré dans des lymphocytes pro-B que même à un niveau élevé d'activité d'Akt, le niveau d'expression de HIF-1α est très peu affecté indiquant que dans ces cellules, l'activité de Akt n'est pas suffisante pour stimuler la transcription des gènes cibles de HIF-1. Par ailleurs, l'inhibition de la voie PI3K/Akt par du LY294002 chez des cellules musculaires lisses vasculaires n'empêche pas l'inhibition de la stabilisation de HIF-1α (Richard *et al.*, 2000).

La voie PI3K/Akt pourrait donc être impliquée dans la régulation de HIF-1, probablement au niveau de sa stabilisation. Cependant, cette régulation pourrait être différente selon le type cellulaire. Le mécanisme exact par lequel cette régulation se passe reste donc encore à être déterminé.

7.2 Régulation au niveau de l'activité transcriptionnelle de HIF-1α

Lorsque HIF-1α est transloqué dans le noyau, il subit encore diverses régulations pour permettre son hétérodimérisation, son activation et son interaction avec des co-activateurs transcriptionnels. Deux mécanismes semblent être primordiaux. Il s'agit de la régulation de l'activité transcriptionnelle par les MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) ERK (Extracellular Regulated Kinases) et de l'interaction du facteur avec deux co-activateurs transcriptionnels, p300 et CBP (CREB Binding Protein).

- *Les MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) ERK (Extracellular Regulated Kinases)*

La phosphorylation des ERKs par les MAPK kinase MEK 1 (MAP/ERK Kinase 1) conduit à leur activation et leur translocation dans le noyau où elles phosphorylent différents substrats (Woodgett, 1994).

Minet *et al*. (2000) ont montré que les kinases ERK 1 et ERK 2 sont activées en hypoxie et sont requises pour l'activation de HIF-1. En effet, l'inhibition de ces deux kinases engendre une inhibition de l'activité transcriptionnelle de HIF-1 en condition d'hypoxie mais n'exerce aucun effet ni sur la stabilité de HIF-1α, ni sur la capacité de liaison de HIF-1 à l'ADN. L'utilisation de dominants négatifs de ERK 1 et de ERK 2 a permis de mettre en évidence que seule ERK 1 régule l'activité de HIF-1. Par ailleurs, un kinase assay *in vitro* a montré que ERK 1 phosphoryle HIF-1α au niveau de son domaine carboxy-terminal en hypoxie. ERK 1 semble donc réguler l'activité transcriptionnelle de HIF-1.

Bien que l'augmentation de la production des ROS en hypoxie soit encore discutable, il a été démontré que la voie des ERKs MAPK pouvait être activée par les ROS (Zhang *et al.*, 1998). Ceux-ci pourraient donc être des activateurs possibles de la voie menant à la phosphorylation de HIF-1 par ERK 1 en hypoxie.

Une augmentation de la concentration cytosolique en calcium est également observée en hypoxie et de récents travaux au laboratoire montrent que ce calcium pourrait être responsable de l'activation des ERKs en hypoxie (Mottet *et al.*, soumis).

- *CBP et p300*

Le domaine de transactivation C-terminal (TAD-C) de HIF-1 interagit avec des co-activateurs transcriptionnels (Lando *et al.*, 2000). L'interaction avec le domaine de transactivation N-terminal n'est toujours qu'une hypothèse à l'heure actuelle. Les co-activateurs transcriptionnels participent d'une part au recrutement de la machinerie basale de transcription et d'autre part, ils possèdent une activité histone acétyltransférase qui permet de modifier la superstructure de l'ADN pour favoriser la transcription.

Deux co-activateurs ont été découverts comme interagissant directement avec HIF-1 : CBP (CREB Binding Protein) et p300. L'interaction de p300 avec HIF-1 est régulée par la réduction d'un groupement sulfhydryl d'un résidu cystéine localisé dans le domaine C-terminal de HIF-1 (Ema *et al.*, 1999). Cette régulation redox fait intervenir deux protéines dont l'activité est régulée par le potentiel rédox, TRX (thiorédoxine) et Ref-1 (Reduction factor-1) (Figure 9).

7.3 Conclusion

Les mécanismes d'activation de HIF-1 sont très complexes. Ils impliquent plusieurs étapes, faisant intervenir différents partenaires dont tous ne sont probablement pas encore connus. La nécessité, l'ordre et le rôle de ces différentes étapes dans différents types cellulaires restent également à être élucidés (Figure 10).

8 GSK3

La GSK3 (Glycogen Synthase Kinase 3) est une enzyme clé impliquée dans la régulation de différents processus cellulaires tels que certaines voies métaboliques, la prolifération, la différenciation, le développement et l'apoptose (pour une revue, Grimes et Jope, 2001).

Cette kinase a été découverte pour la première fois pour son action inhibitrice sur la glycogène synthase. Toutefois, elle a été également remarquée comme un élément régulateur important intervenant dans des systèmes couplés aux récepteurs à l'insuline, à des facteurs de croissance et à l'activation de certains facteurs de transcription.

Chez les mammifères, GSK3 existe sous deux formes homologues GSK3 et GSK3 (Woodgett, 1990). Elles partagent 97% de similarité de séquences dans leur domaine catalytique. GSK3 possède un poids moléculaire de +/- 51 kDa. GSK3, quant à elle, est constituée de 482 acides aminés avec un poids moléculaire de +/- 46 kDa. Elle est largement exprimée dans tous les tissus mais elle est particulièrement abondante dans le cerveau.

Nous allons aborder successivement les mécanismes de la régulation de la GSK3, ses substrats potentiels et les voies qu'elle régule.

8.1 Régulation de GSK3

Il existe différents mécanismes de régulation de la GSK3 la formation de complexes protéiques, sa localisation intracellulaire, sa stabilisation via des produits pharmaceutiques et le plus étudié, son mécanisme de phosphorylation/déphosphorylation responsable de son état d'activation/désactivation.

8.1.1 Activation de la GSK3 via la phosphorylation de tyrosine (Y216)

La phosphorylation de la tyrosine en position 216 de la GSK3 est nécessaire à son activité. Cependant, on ne sait pas si cette tyrosine est un site d'autophosphorylation ou si une tyrosine kinase phosphoryle ce site pour activer la GSK3 (Shaw *et al.*, 1997).

En effet, certaines recherches portant sur l'expression de la GSK3β mammalienne en bactéries, ont mis en évidence que la GSK3β est capable de s'autophosphoryler sur des résidus tyrosines ainsi que sur des résidus sérines et thréonines (pour une revue, Frame et Cohen, 2001). Mais cela n'a jamais été démontré *in vivo*.

L'état de phosphorylation de la GSK3β est régulée par des systèmes de signaling intracellulaire (Figure 11). La Fyn, un membre de la famille des src tyrosines kinases, est capable de phosphoryler la tyrosine 216 de la GSK3β. Il a aussi été découvert que la phosphorylation sur la Tyr-216 augmentait suite à une élévation de la concentration en calcium intracellulaire et suite à certains stimuli proapoptotiques. Cependant, le mécanisme exact responsable de la phosphorylation activatrice de la tyrosine 216 de la GSK3β reste inconnu.

D'autres sites de phosphorylation ont été mis en évidence sur cette kinase, dont la sérine en position 9 qui intervient dans l'inactivation de la GSK3β.

8.1.2 Inactivation de la GSK3β via la phosphorylation de sérine (S9)

La phosphorylation du résidu sérine en position 9 de la GSK3β diminue son activité (Plyte *et al.*, 1992). Différentes kinases sont ainsi capables d'inhiber cette kinase (Figure 11). La plupart de ces kinases sont couplées à un processus de signaling dépendant d'un récepteur. Par exemple, la reconnaissance de l'insuline par son récepteur active une voie menant à l'inactivation de la GSK3β et ce, via un processus impliquant les kinases PI3K et Akt (Cross *et al.,* 1995) (Figure 12). Le mécanisme est le suivant : la liaison de l'insuline à son récepteur induit la dimérisation de deux récepteurs couplés à leur molécule d'insuline. Une transphosphorylation s'opère alors c'est-à-dire que les récepteurs se phosphorylent l'un l'autre sur des résidus tyrosines (Y). Ensuite, une protéine appelée IRS (Insulin Receptor Substrate), se fait elle-même phosphoryler par le récepteur. Elle peut alors être reconnue par le domaine SH2 de la PI3K (Phosphatidylinositol 3-Kinase). Lorsque cette dernière est active, elle catalyse la formation de PIP_3 (Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate). Celui-ci va activer de manière allostérique la PDK (Phosphoinositide-Dependent Kinase) qui, associée à d'autres kinases dont l'ILK (Integrin-Linked Kinase), vont ensemble activer Akt en la phosphorylant sur la Ser-473 et la Thr-308. L'Akt activée phosphoryle la GSK3β sur sa Ser-9 et l'inactive.

Il a également été démontré que des chocs thermiques et des stress oxydatifs de même que des stimuli tels que l'IGF-1 (Insuline-like Growth Factor), le NGF (Nerve Growth Factor), l'Endothéline et l'EGF (Epidermal Growth Factor) inhibaient l'activité de la GSK3 et ce, également en activant la kinase Akt via la PI3K.

Par ailleurs, certains facteurs de croissance sont capables d'inactiver la GSK3 en activant d'autres kinases en amont à savoir la p90Rsk, certaines isoformes de la PKC (protéine kinase C , , , , mais pas) ou la PKA (protéine kinase A ou cyclic AMP-dependent protein kinase).

Toutes ces observations montrent qu'il existe de multiples mécanismes qui peuvent réguler l'inactivation de la GSK3 via la phosphorylation de la Ser-9.

8.1.3 Régulation de la GSK3 via la formation de complexes protéiques et par sa localisation subcellulaire

GSK3 peut former des complexes avec d'autres protéines telles que la GBP (GSK3 Binding Protein), l'axine et ses protéines apparentées du type axile (axin-related protein) et la conductine. La formation d'un complexe entre ces protéines est un mécanisme induisant soit l'inhibition de l'activité de la GSK3, soit l'augmentation de son activité (Farr *et al.*, 2000) (Figure 13).

La -caténine, une protéine importante lors du développement embryonnaire de l'axe dorso-ventral, est régulée par la GSK3. Dans les cellules formant l'axe ventral, la -caténine est séquestrée dans un complexe comprenant la GSK3, l'axine et l'APC (Adenomatous polyposis coli gene product). L'axine et l'APC phosphorylées par la GSK3, fonctionnent comme des protéines de soutien qui lient directement GSK3 et son substrat la -caténine, augmentant ainsi la capacité de la GSK3 de phosphoryler la -caténine conduisant à sa dégradation. Dans les cellules formant l'axe dorsal, la GSK3 s'associant à la GBP, ne sait plus former de complexe avec l'axine et l'APC. La GBP empêche la GSK3 de phosphoryler ses substrats en bloquant l'accès au site actif. La -caténine s'accumule alors dans le cytosol et peut activer la transcription de gènes spécifiques au côté dorsal.

La chaîne complète des événements moléculaires impliquant l'enrichissement dorsal en -caténine doit encore être déterminée. Il est cependant intéressant d'observer qu'en plus des phosphorylations de sérine et de tyrosine causant respectivement, l'inhibition ou l'activation de la GSK3, la liaison de GSK3 aux membres de la famille des GBP et de la famille des

axines induit aussi respectivement, l'inhibition ou l'activation de la GSK3β. Des investigations futures devraient révéler comment ces mécanismes de régulation sont intégrés pour permettre un contrôle précis de l'activité de la GSK3β.

Un autre mécanisme de régulation est la localisation subcellulaire de la GSK3β. Certains substrats de la GSK3β sont cytosoliques tels que la protéine de structure Tau alors que d'autres, comme les facteurs de transcription, sont nucléaires. Il est donc évident que la GSK3β doit se trouver dans les deux compartiments. Il a d'ailleurs été observé que la localisation intracellulaire de la GSK3β variait en fonction du cycle cellulaire : la proportion de GSK3β nucléaire augmente en phase S dans les cellules NIH3T3. Un choc thermique ainsi que l'endothéline-1 induisent aussi l'augmentation de la proportion de GSK3β dans le noyau (pour une revue, Grimes et Jope, 2001).

Néanmoins, il reste encore beaucoup de questions à élucider quant au mode de régulation de l'activité de la GSK3β par sa translocation : les kinases et les phosphatases présentes dans chaque compartiment, les éléments impliqués dans le transport, etc…

8.1.4 Régulation de la GSK3β par des produits pharmaceutiques

Le lithium est utilisé comme un inhibiteur allostérique de la GSK3. Le lithium n'entre pas en compétition avec le substrat mais il est compétitif pour le site de liaison de l'ATP (ATP complexé au magnésium). Des recherches sont en cours pour trouver des inhibiteurs plus spécifiques de la GSK3β afin de discriminer les effets propres à celle-ci de ceux impliqués par des effets non spécifiques.

8.2 Substrats de la GSK3β

Le motif consensus général de phosphorylation sur les substrats de la GSK3β est le suivant :

–S/T-X-X-X-S/T(P)-.

Le premier résidu sérine ou thréonine est celui qui est phosphorylé. Ce site de phosphorylation de la GSK3 nécessite une pré-phosphorylation induite par une kinase différente (Fiol *et al.*, 1987). C'est le cas par exemple de la glycogène synthase qui doit être

préalablement phosphorylée par la caséine kinase II pour être reconnue comme substrat par la GSK3β. Par ailleurs, dans une étude récente, un site d'attachement pour une séquence phosphorylée a été identifié sur la GSK3β (Frame *et al*., 2001). Des études de modélisation moléculaire et de mutagenèse dirigée ont permis d'identifier, dans le petit lobe du domaine catalytique de la GSK3β, un résidu arginine en position 96 important pour l'interaction avec le premier phosphate du substrat. Des chercheurs ont suggéré que le résidu sérine 9 phosphorylé, induisant l'inhibition de la GSK3β, interagit avec cette Arg-96, ce qui entraîne une compétition pour le site d'attachement et donc une incapacité de la GSK3β à phosphoryler ses substrats.

Cependant, tous les substrats de la GSK3β ne nécessitent pas une première phosphorylation pour être reconnus. Cette catégorie de substrats contient alors de multiples résidus acides qui sont reconnus par la GSK3β sans doute en mimant la charge négative du phosphate (Fiol *et al*., 1988).

8.3 Voies régulées par la GSK3β

La GSK3β phosphoryle différents groupes de substrats : des protéines du métabolisme, des protéines du signaling, des protéines de structure et des facteurs de transcription (Figure 14). Les trois premiers groupes vont être décrits de manière générale tandis que les facteurs de transcription seront développés plus en détail.

8.3.1 Les protéines du signaling et du métabolisme

La glycogène synthase (GS) a été la première enzyme découverte étant inhibée par la GSK3β (Embi *et al*., 1980). En condition normale, GSK3ß est active et inhibe la synthèse de glycogène en inactivant la GS par phosphorylation (Figure 15). Suite à une stimulation par l'insuline, la GSK3ß est inactivée par la voie PI3K/Akt tel que décrit au point 4.1.2. et la GS est déphosphorylée par la PP1 (protéine phosphatase-1), ce qui la rétablit sous sa forme active (Cohen, 1999). Elle peut alors catalyser la réaction de transfert de résidus glucoses, à partir de l'UDP-glucose sur l'extrémité non réductrice des chaînes de glycogène.

La voie insuline-PI3K-Akt-GSK3β régule aussi l'activité de l'eIF2B (Eukaryotic Initiation Factor 2B), un facteur multimérique qui facilite la conversion du facteur eIF2-GDP inactif en eIF2-GTP actif. Cette étape est très importante lors du processus d'initiation de la

traduction de l'ARNm en protéine. GSK3β phosphoryle eIF2B et l'inactive. Donc, suite à une stimulation par l'insuline, GSK3β est inhibée, ce qui permet la synthèse de glycogène et l'augmentation de la synthèse protéique.

Depuis, d'autres protéines se sont ajoutées à la liste, et notamment des protéines intervenant dans les voies de transduction du signal – l'IRS-1 dont l'effet consiste en l'atténuation du signal par le récepteur à l'insuline (Eldar-Finkelman et Krebs, 1997), la cycline D1 pour laquelle la phosphorylation par la GSK3β régule sa localisation intracellulaire et son temps de demi-vie (Diehl *et al.*, 1998), etc… Mais d'autres protéines intervenant dans les voies métaboliques ont aussi été trouvées telle que la pyruvate déshydrogénase (Hoshi *et al.*, 1996) qui joue un rôle clé dans le cycle de Krebs et qui est inhibée suite à sa phosphorylation par la GSK3β.

8.3.2 Les protéines structurales

Les protéines de structure les plus étudiées comme substrats de la GSK3β sont – les MAPs (Microtubule Associated Proteins) dont les sous-types MAP-1 et MAP-2 et Tau. Les microtubules sont des éléments importants dans la composition du cytosquelette. Leur stabilité et leur dynamique sont régulées entre autres par les MAPs qui sont elles-mêmes régulées par des mécanismes de phosphorylation/déphosphorylation.

Tau permet la nucléation et l'assemblage des microtubules et contribue également à leur stabilité en s'associant à ceux-ci quand elle est déphosphorylée (Hartigan et Jonson, 1999). GSK3β phosphoryle Tau (Sun *et al.*, 2002) et contribue ainsi à la régulation de la plasticité du cytosquelette, qui est importante par exemple pour établir la morphologie et maintenir le fonctionnement des neurones. En effet, un dysfonctionnement dans l'activité de la GSK3β peut avoir un impact important sur la structure et la plasticité neuronales notamment dans des neuropathologies telles que la maladie d'Alzheimer.

8.3.3 Les facteurs de transcription

L'activité d'un grand nombre de facteurs de transcription est régulée directement ou indirectement par la GSK3β. Quelques-uns de ces facteurs de transcription ainsi que le mécanisme de leur régulation par la GSK3β seront abordés ci-dessous.

8.3.3.1 AP-1 (Activator Protein-1)

AP-1 est un dimère comprenant des partenaires de la famille protéique appartenant au groupe des facteurs *trans* bZIP (basic leucine Zipper). AP-1 peut se présenter sous forme homodimérique et se compose dans ce cas de deux sous-unités identiques d'un membre de la famille JUN. Il peut également se présenter sous forme hétérodimérique jun/fos. Jun peut aussi hétérodimériser avec des partenaires différents à savoir CREB ou ATF,… L'activité d'AP-1 est influencée par une large variété de stimuli tels que l'activation de récepteurs aux facteurs de croissance, des stimuli toxiques et d'autres processus de signaling. AP-1 régule l'expression d'un grand nombre de gènes impliqués dans la croissance cellulaire, la prolifération et la mort cellulaire (Karin *et al*., 1997). Etant donné la large gamme des fonctions cellulaires impliquées, AP-1 est strictement régulé tant au niveau transcriptionnel qu'au niveau post-transcriptionnel. Un des mécanismes modulant son activité est la phosphorylation par la GSK3□. Celle-ci phosphoryle c-Jun sur trois résidus (Thr-239, Ser-243 et Ser249) dans la région proximale du domaine de liaison à l'ADN et diminue ainsi sa capacité de liaison à l'ADN (Boyle *et al*., 1991). La GSK3□ doit donc être inhibée pour permettre l'activation de AP-1.

8.3.3.2 HSF-1 (Heat Shock Factor-1)

HSF-1 est un facteur de transcription activé en réponse à différents stress potentiellement létaux dont les stress oxydatifs et les chocs thermiques. Il contrôle l'expression de gènes codant pour les HSP (Heat Shock Proteins) qui sont des chaperonnes impliquées dans le reploiement des protéines dénaturées. GSK3□ a été mise en évidence comme ayant un effet inhibiteur sur l'activité de HSF-1. Chu *et al*. (1996) ont découvert que l'inactivation de HSF-1 pourrait résulter d'une phosphorylation hiérarchique□ les ERK kinases (Extracellular Regulated Kinase) grefferaient le premier phosphate sur la sérine en position 307 de HSF-1 en fournissant ainsi le site de reconnaissance nécessaire à la GSK3□ pour qu'elle phosphoryle la sérine en position 303 de HSF-1.

Suite aux différents stress, la kinase Akt est activée et inhibe la GSK3□ en la phosphorylant sur sa Ser-9. La GSK3□ inactive ne peut donc plus phosphoryler HSF-1 qui, actif, augmente la transcription de ses gènes cibles.

8.3.3.3 Myc

Le facteur de transcription Myc est connu pour jouer un rôle dans la régulation de la prolifération cellulaire, la différenciation et l'apoptose. Il possède dans sa région C-terminale, un domaine bHLH (basic Helix-Loop-Helix) et un domaine leucine zipper impliqués dans la liaison à l'ADN et la dimérisation. Il possède également un domaine de transactivation en position N-terminale responsable de la régulation de son activité transcriptionnelle.

Différentes kinases telles que les JNK, les ERKs et la GSK3□, interviennent dans la régulation de ce facteur de transcription. GSK3□ phosphoryle Myc sur la Thr-58 après que la MAP kinase ERK2 l'ait phosphorylé sur la Ser-62 (Sears *et al.*, 2000). Il a été suggéré que la phosphorylation de la Thr-58 pourrait cibler Myc vers le protéasome 26S pour être dégradé. L'inhibition de la GSK3□ est nécessaire à l'activation de Myc en induisant sa stabilisation, mais n'est cependant pas suffisante. D'autres mécanismes agissent de manière complémentaire.

8.3.3.4 NF-□B

NF-□B est un facteur de transcription qui régule l'expression de gènes impliqués entre autres dans les réponses immunitaire et inflammatoire (Baeuerle et Henkel, 1994). Il se lie à l'ADN de façon homodimérique ou hétérodimérique. La combinaison la plus fréquente est p50/p65. Son activité est régulée par l'interaction avec une protéine inhibitrice I□B. En conditions normales, NF-□B associé à I□B, est localisé dans le cytoplasme. En effet, I□B masque le NLS (Site de Localisation Nucléaire) de NF-□B et empêche son importation dans le noyau. Suite à certains stimuli, I□B est phosphorylé et dégradé par le système de protéolyse du protéasome 26S. NF-□B est ainsi libéré et peut transloquer dans le noyau (Beg *et al.*, 1993). Plusieurs I□B kinases ont été identifiées mais les mécanismes de régulation en amont et en aval de celles-ci restent encore obscurs.

Deux hypothèses contradictoires ont été proposées quant à l'implication de la GSK3ß dans la régulation de NF-□B. Hoeflich *et al.* (2000) ont trouvé que des souris GSK3□$^{-/-}$ montraient une sensibilité supérieure à la toxicité causée par le TNF-□ (Tumor Necrosis Factor-□) et que la liaison de NF-□B à l'ADN causée par une stimulation au TNF-□ dans des fibroblastes embryonnaires GSK3□$^{-/-}$ était significativement diminuée par rapport aux cellules wild-type. Ces résultats suggèrent que GSK3□ serait nécessaire à l'activité transcriptionnelle

de NF-□B. Ils ont aussi observé que GSK3□ jouait son rôle dans une étape postérieure à la phosphorylation d'I□B et à la translocation de NF-□B dans le noyau. Cependant, le mécanisme de cette régulation reste inconnu.

Par contre, une autre étude a montré un effet inhibiteur de la GSK3□ sur NF-□B (Bournat *et al.*, 2000). L'utilisation du dominant négatif de la GSK3□ dans les cellules PC12 augmente l'activité de NF-□B induite par la transduction du signal déclenchée par Wnt-1. Cette observation laisse supposer que la GSK3□ induirait une régulation négative de l'activité de NF-□B□, ce qui serait en opposition avec les données observées par Hoeflich *et al.*. Des recherches supplémentaires sont donc nécessaires pour éclaircir ces observations contradictoires.

8.4 Conclusion

La GSK3□ est une kinase importante dans la régulation d'une multitude de voies de transduction du signal. Certains mécanismes de sa régulation commencent à être bien compris, mais il reste encore beaucoup d'éléments à découvrir et à comprendre pour permettre l'intégration de tous les processus dans lesquels la GSK3□ est impliquée.

9 But du mémoire

L'activation du facteur de transcription HIF-1 est un mécanisme essentiel dans l'adaptation des cellules en conditions d'hypoxie. Cette activation est un processus nécessitant plusieurs étapes impliquant notamment la stabilisation de la sous-unité HIF-1α et l'activation de l'activité transcriptionnelle du facteur HIF-1. La première de ces étapes, la stabilisation, est régulée principalement par la HIF-α prolyl hydroxylase mais certaines données de la littérature montrent que la voie de la kinase Akt pourrait également jouer un rôle. De même, des phénomènes de phosphorylation sont impliqués dans l'activation de HIF-1. ERK-1 est une des kinases nécessaires à cette activation. Cependant, bien que ces étapes soient de mieux en mieux décrites, certains éléments restent obscurs. C'est notamment le cas du rôle d'autres kinases.

Parmi les kinases qui pourraient potentiellement moduler l'activité de HIF-1, la GSK3β nous a particulièrement intéressés. Elle est en effet directement régulée par Akt. De plus, Sodhi *et al.* (2001) ont montré que la GSK3β pourrait directement phosphoryler le domaine ODD de HIF-1α. Cependant, le rôle que cette phosphorylation pourrait avoir, n'a jamais été étudié. L'objectif de ce mémoire a donc été d'étudier le rôle de la GSK3β dans la régulation de l'activité de HIF-1. Deux approches complémentaires ont été utilisées.

Dans un premier temps, nous avons recherché des sites potentiels de phosphorylation par la GSK3β dans le domaine ODD de HIF-1α. Nous les avons ensuite mutés et avons étudié l'influence de ces mutations sur la stabilité de la sous-unité HIF-1α en normoxie et en hypoxie et sur l'activité transcriptionnelle du facteur HIF-1.

Dans un deuxième temps, nous avons utilisé une approche sans *a priori* et utilisé des inhibiteurs ou des activateurs chimiques de la GSK3β mais aussi des deux kinases principales situées en amont de celle-ci, c'est-à-dire Akt et la PI3Kinase. L'effet de ces modulateurs pharmacologiques a d'abord été étudié au niveau de la kinase GSK3β. Ensuite, leurs effets au niveau de la stabilité de HIF-1α et de l'activité de HIF-1 ont été investigués dans le but de corréler leurs effets sur la GSK3β avec ceux observés sur HIF-1.

Les résultats de ces expériences devraient nous permettre de déterminer comment la voie Akt-GSK3β intervient dans la régulation de l'activité du facteur de transcription HIF-1.

1 ASPECT MOLECULAIRE

1.1 Souches bactériennes et plasmides

1.1.1 Souche bactérienne

E. coli SURE (Stratagene, La Jolla, USA)

Génotype :
end A1,lac, thi-1, rec B, rec J, umuC : : Tn 5 (F' *pro*AB, *lac*I^q Z□DM15, *Tn10(Tet ^{r}))*.

Cette souche bactérienne possède quelques particularités intéressantes :

- Elle est particulière pour son génotype Rec B et Rec J permettant d'avoir un taux de recombinaison quasiment nul et beaucoup plus faible que chez XL-1 Blue. Elle est surtout utilisée pour cloner des fragments d'ADN à forte tendance recombinatoire comme ceux présentant des séquences microsatellites ou des répétitions inversées.
- Tn 5□ transposon portant le gène de résistance à la kanamycine.
- *end* A1□diminue le taux d'endonucléases, ce qui améliore le rendement et la qualité des mini-préparations d'ADN plasmidique.
- *lac*□la souche *E. coli* SURE étant délétée au niveau de l'opéron lactose, elle est incapable de métaboliser le lactose.
- Épisome F' codant pour les pili sexuels présents en surface de la bactérie et portant les caractères suivants□

• *Lac* I^q□mutation augmentant d'environ 10 fois la force du promoteur du gène codant pour le répresseur de l'opéron lactose.*lac* Z□M15□permet la sélection des colonies contenant un plasmide recombinant par coloration blanc-bleu. Le gène de la ß-galactosidase est délété, produisant une protéine inactive. Ce fragment du gène *lac* Z donne, par complémentation intragénique, avec un plasmide portant un autre fragment du gène lac Z (*lac* Z'), une coloration bleue à une colonie en présence du chromogène X-gal. Si le

plasmide comprend le fragment *lac* Z' disrupté (plasmide recombinant), la colonie sera blanche en présence de X-gal.

- *Tn 10* : transposon portant le gène de résistance à la tétracycline.

1.1.2 Plasmides

a) pGL3-SV40, pGL3-SV40/6HRE et pGL3-SV40/VEGF

Ces plasmides sont des vecteurs utilisant le gène de la « firefly luciferase » comme gène rapporteur. Ils expriment une forme modifiée du gène luciférase (luc+), qui en dégradant son substrat (luciférine) émet de la lumière, signal quantifiable de l'expression du gène rapporteur. Ils possèdent tous les trois un promoteur faible SV40 localisé en amont du gène luc+ ainsi que pour le pGL3-SV40/6HRE, 6 copies de l'élément HRE (Hypoxia Responsive Element) en aval du gène fonctionnant en tant que enhancer et permettant un taux élevé de la transcription du gène luc+ lorsque HIF-1 est activé.

Le plasmide pGL3-SV40/VEGF possède le gène codant pour la firefly luciférase mais dont l'expression est sous la dépendance du promoteur authentique du VEGF humain (position : -1172/54). Ce promoteur contient le site de liaison de différents facteurs de transcription régulant l'expression du VEGF. En position –975, se situe l'élément HRE de liaison à l'ADN pour HIF-1.

b) pRL-SV40

Le plasmide pRL-SV40 (Promega, Madison, USA) est un vecteur rapporteur contenant l'ADNc encodant la Renilla luciférase d'un organisme marin (*Renilla reniformis)*.

Il contient un enhancer et un promoteur SV40 permettant une expression constitutive élevée de cette luciférase. Une boîte de signal poly(A) est présente en aval du gène Rluc qui a pour rôle d'augmenter la stabilité du messager issu du gène rapporteur.

Ce plasmide servira de contrôle pour la normalisation des expériences de transfections (voir matériel et méthodes point 2.5.).

c) pCMV-Myc/HIF-1α et pCMV-Myc

pCMV-Myc (Clontech, Palo Alto, USA) est un vecteur d'expression contenant un promoteur fort CMV en amont d'un épitope de 13 acides aminés de type c-Myc (Figure 1). Ce plasmide sera utilisé en tant que contrôle négatif lors des expériences de transfections transitoires.

Le vecteur d'expression pCMV-Myc/HIF-1α contient l'ADNc de HIF-1α (Annexe 1) cloné en phase de lecture avec l'épitope c-Myc. Ce clonage a été réalisé via les sites de restriction Sfi I et Kpn I présents dans le site multiple de clonage (MCS) du vecteur pCMV-Myc. Ce plasmide sera utilisé en tant que plasmide matrice lors de la construction de mutants de HIF-1α par mutagenèse dirigée (voir matériel et méthodes point 1.7.) mais également en tant que contrôle positif lors des expériences de transfections transitoires.

1.2 Préparation des milieux de culture

1.2.1 Le milieu Luria Bertani (LB)

a) Composition :

Solution aqueuse contenant :

- Hydrolysat de caséine (peptone) (Gibco, Paisley, Grande-Bretagne) : 1 %
- NaCl (Merck, Darmstadt, Allemagne) : 0,5 %
- Extrait de levure (Difco, Detroit, USA) : 0,5 %

b) Méthode

- Autoclaver 25 minutes à 120°C.
- Laisser refroidir et ajouter les antibiotiques éventuels.
- Stocker le milieu LB (+ antibiotiques) à 4°C.

Le milieu LB solide est de même composition mais auquel on a ajouté 1,5 % d'agar (Difco, Detroit, USA).

- Autoclaver également 25 minutes à 120°C et puis laisser refroidir dans un bain à 55°C.
- Ajouter ensuite les additifs désirés (antibiotiques,…).
- Couler rapidement sur boîte de Pétri et laisser solidifier.
- Une fois le milieu bien solide, stocker les boîtes à 4°C.
- Laisser sécher les boîtes de Pétri 30 minutes sous hotte avant leur utilisation.

Additif	Abréviation	Concentration Stock	Concentration Finale
Ampicilline	Amp	500 mg/ml	100 μg/ml

Ampicilline (Sigma, St Louis, USA).

1.3 Transformation bactérienne par choc thermique

Méthode

- Dégeler sur glace les aliquots de 100 μl de bactéries $CaCl_2$ compétentes.
- Ajouter toute la préparation plasmidique aux bactéries.
- Laisser reposer 10 minutes sur glace.
- Placer 2 minutes dans un bain à 42°C pour réaliser le choc thermique.
- Ajouter 300 à 500 μl de milieu LB froid complémenté ou non d'antibiotiques à la suspension bactérienne.
- Incuber 1 heure à 37°C.
- Etaler sur un milieu solide sélectif et incuber pendant une nuit à 37°C.

1.4 Extraction d'ADN plasmidique

1.4.1 Mini-préparation d'ADN plasmidique

Les principales étapes de cette technique sont les suivantes :

- La lyse alcaline des bactéries.
- La précipitation des protéines et des débris cellulaires.
- L'extraction de l'ADN plasmidique au phénol/chloroforme.
- La précipitation alcoolique de l'ADN plasmidique.
- Le lavage de l'ADN plasmidique.
- La resuspension de l'ADN plasmidique.

a) Solutions et tampons

Solutions du Kit Qiagen plasmid purification (Qiagen, Hilden, Allemagne).

- Tampon P1⊡(tampon de resuspension)
  RNase A 100 μg/ml
  Tris-HCl 50 mM
  EDTA 10 mM
  (conservation à 4°C après avoir ajouter la RNAse)

- Tampon P2⊡(tampon de lyse)
  NaOH 200 mM
  SDS 1 %
  (conservation à température ambiante)

  Tampon P3⊡(tampon de neutralisation)
  KAc 3,0 M, pH 5,5
  (conservation à température ambiante)

- Ethanol 70 % (Merck, Darmstadt, Allemagne) conservé à température ambiante.

- Ethanol Absolu (Merck, Darmstadt, Allemagne) conservé à température ambiante.

- Phénol□Chloroforme□alcool isoamylique 25□24□1 (Sigma, St Louis, USA) conservé à 4°C.

b) Méthode□

- Ensemencer 2 à 3 ml de milieu liquide (LB + antibiotiques) avec une colonie isolée issue d'une culture en milieu solide.
- Incuber la culture liquide une nuit à 37°C sous une agitation de 250 rpm (Innova™ 4300, New Brunswick Scientific).
- Centrifuger 1 ml de la culture 5 minutes à 15000 rpm à 4°C (Heraeus Sepatech, Biofuge 17 RS, rotor 1379) et éliminer le surnageant.
- Resuspendre le culot dans 200 μl de P1 (avec RNase A).
- Lyser les cellules dans 200 μl de P2, mélanger doucement et incuber 5 minutes à température ambiante.
- Ajouter 200 μl de P3 pour arrêter la lyse, mélanger doucement et incuber 15 minutes sur glace pour précipiter le SDS.
- Centrifuger 15 minutes à 15000 rpm à 4°C (Heraeus Sepatech, Biofuge 17RS, rotor 1379) et récupérer le surnageant (550 □l).
- Précipiter l'ADN en ajoutant un volume de phénol-chloroforme-alcool isoamylique (550 □l) (Sigma, St Louis, USA).
- Homogénéiser en agitant lentement.
- Centrifuger pendant 10 minutes à 13000 rpm à température ambiante.
- Reprendre 500 □l de la phase aqueuse, ajouter 2 volumes d'éthanol absolu (1000 □l) (Merck, Darmstadt, Allemagne) et incuber 5 minutes à température ambiante.
- Centrifuger 10 minutes à 15000 rpm à 4°C (Heraeus Sepatech, Biofuge 17RS, rotor 1379) et éliminer le surnageant.
- Laver l'ADN en ajoutant 300 μl d'éthanol 70 % (Merck, Darmstadt, Allemagne) et centrifuger pendant 10 minutes à 15000 rpm à 4°C (Heraeus Sepatech, Biofuge 17RS, rotor 1379).
- Eliminer l'éthanol et sécher le culot au speedvac (Hetevac VR-1, Analis, Namur, Belgique).

- Resuspendre dans 20 μl d'H_2O distillée stérile.

1.4.2 Maxi-préparation d'ADN plasmidique

La maxi-préparation permet de purifier de grandes quantités d'ADN plasmidique. Cette technique utilise une colonne échangeuse d'anions sur laquelle s'adsorbe l'ADN plasmidique, ce qui permet de le séparer des protéines, des débris cellulaires, de l'ARN et de l'ADN génomique.

a) Solutions et tampons□

Kit Qiagen plasmid purification (Qiagen, Hilden, Allemagne).

- Tampon P1⊡(tampon de resuspension)
  50 mM Tris-HCl pH 8,0
  10 mM EDTA
  100 μg/ml RNase A
  (conservation à 4°C après avoir ajouté la RNase A)

- Tampon P2⊡(tampon de lyse)
  200 mM NaOH, 1 % SDS
  (conservation à température ambiante)

- Tampon P3⊡(tampon de neutralisation)
  3 M KAc
  (conservation à température ambiante)

- Tampon QBT⊡(tampon d'équilibrage des colonnes)
  750 mM NaCl
  50 mM MOPS, pH 7,0
  15 % d'isopropanol
  0,15 % Triton X-100

- Tampon QC⊡(tampon de lavage)
  1 M NaCl
  50 mM MOPS, pH 7,0
  15 % d'isopropanol

- Tampon QF⊡(tampon d'élution)
  1,25 M NaCl
  50 mM Tris, Tris-HCl, pH 8,5
  15 % d'isopropanol

- Isopropanol (Merck, Darmstadt, Allemagne) conservé à température ambiante.
- Ethanol 70 % (Merck, Darmstadt, Allemagne) conservé à température ambiante.

b) Méthode□

- Ensemencer 200 ml de milieu liquide (LB + antibiotique(s)) avec 100 μl d'une culture liquide issue d'une mini-culture.
- Incuber la culture liquide une nuit à 37°C sous une agitation de 250 rpm (Innova™ 4300, New Brunswick Scientific).
- Centrifuger la culture à 6000 g pendant 15 minutes à 4°C (Beckman Avanti J-25, rotor JLA-16.250) et éliminer le surnageant.
- Resuspendre le culot dans 10 ml de tampon P1.
- Lyser les cellules avec 10 ml de tampon P2 et mélanger doucement puis laisser 5 minutes à température ambiante.
- Neutraliser la lyse alcaline en ajoutant 10 ml de tampon P3 et agiter doucement puis laisser 30 minutes sur glace.
- Centrifuger 30 minutes à 4°C à 20000 g (Beckman Avanti J-25, rotor JA-20) et récupérer le surnageant.
- Re-centrifuger le surnageant 10 minutes à 20000 g à 4°C si les débris cellulaires, le SDS,… ne sont pas bien précipités.
- Equilibrer les colonnes Qiagen-Tip 500 avec 10 ml de tampon QBT et laisser la colonne se vider par gravité.
- Déposer le surnageant sur la colonne et laisser pénétrer.
- Laver la colonne avec 2 x 30 ml de tampon QC.

- Eluer l'ADN plasmidique avec 15 ml de tampon QF et récupérer l'éluat dans des tubes COREX.
- Précipiter l'ADN avec 0,7 volume d'isopropanol (10,5 ml).
- Centrifuger 30 minutes à 15000 g à 4°C (Beckman Avanti J-25, rotor JA-20) et éliminer le surnageant.
- Laver le culot avec 5 ml d'éthanol 70 %.
- Centrifuger 10 minutes à 15000 g à 4°C (Beckman Avanti J-25, rotor JA-20).
- Décanter le surnageant délicatement.
- Sécher le culot au speedvac (Hetevac VR-1, Analis, Namur, Belgique).
- Resuspendre le culot dans 500 μl d'H_2O distillée stérile.
- Conserver à –20°C.

1.5 Restriction d'ADN

Le clivage de l'ADN bicaténaire s'effectue par des enzymes de restriction qui coupent au niveau de courtes séquences d'ADN palindromiques appelées sites de restriction. On dispose à présent d'une batterie d'enzymes capables de scinder l'ADN en fragments de tailles différentes en fonction du site reconnu par chacun des enzymes. Deux enzymes ont été utlisées dans ce mémoire⊡

Enzyme	Site de reconnaissance	Optimum de température
EcoR I	5'-G/AATTC-3'	37°C
Dpn 1	5'-GmeA/TC-3'	37°C

Mélange de restriction

- x μl d'ADN.
- Tampon de restriction 10X⊡ 1/10 du volume final du mélange de restriction (tampon commercial spécifique de l'enzyme).
- Enzyme de restriction⊡entre 2 et 10 unités d'enzyme par μg d'ADN.
- Incuber le mélange de restriction 1 à 2 heures à la température optimale recommandée par le fournisseur.

1.6 Electrophorèse en gel d'agarose

Cette technique consiste à séparer des molécules d'ADN selon leur taille sous l'action d'un champ électrique constant appliqué sur un gel d'agarose. Le pourcentage en agarose peut être modifié en fonction des tailles respectives des fragments à séparer. Des gels de haut pourcentage permettent de séparer des fragments d'ADN de petite taille et inversément. La taille des différents fragments d'ADN est estimée en faisant co-migrer des marqueurs de poids moléculaires. Ces marqueurs sont constitués d'ADN restreint par une enzyme de restriction générant des fragments d'ADN de taille connue. Pour visualiser les fragments dans le gel, on ajoute une solution de bromure d'éthidium, molécule fluorescente qui s'intercale entre les bases appariées. L'ADN ainsi marqué est visualisé sous illumination U.V.

1.6.1 Matériel

- Cuve d'électrophorèse (Horizon 11-14, Gibco, Paisley, Grande-Bretagne).
- Générateur EPS 500/400 (Pharmacia, Uppsala, Suède).
- Lampe UV (Vulber-Lourmat, France).
- Appareil photo Kaiser KA1 (Allemagne).
- Film K65HM (Mitsubishi, Japon).
- Imprimante P91 (Mitsubishi, Japon).
- TBE 1X (Tris-borate 0,9 M□EDTA 0,002M), pour 1 litre□
    - 54 g de Tris (Merck, Darmctadt, Allemagne)
    - 27,5 g d'acide borique (Merck, Darmstadt, Allemagne)
    - 20 ml d'EDTA 0,5 M (pH 8,0) (Merck, Darmstadt, Allemagne)
- Bromure d'éthidium, solution stock de 500 □g/ml (Sigma, St Louis, USA).
- Agarose (Ultra Pure Grade Agarose, Bio-Rad, Richmond, USA).
- Tampon d'échantillon□
    - Glycérol 50 % (Merck, Darmstadt, Allemagne)
    - EDTA 100 mM (Merck, Darmstadt, Allemagne)
    - SDS 1 % (Merck, Darmstadt, Allemagne)
    - Bleu de bromophénol 0,1 % (Janssen Chimica, Beerse, Belgique).
- Marqueur ADN de poids moléculaire utilisé□ Smart Ladder (Eurogentec, Seraing, Belgique)□

Fragments à 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 800, 600, 400, 200 pb.

1.6.2 Méthode

- Porter à ébulition un volume approprié de tampon TBE 1X additionné d'agarose jusqu'à obtenir une solution limpide.
- Ajouter le bromure d'éthidium à cette solution.
- Couler sur le support *ad hoc* muni de peigne(s) et laisser polymériser.
- Immerger le gel dans la cuve d'électrophorèse remplie de tampon TBE 1X.
- Déposer dans les puits du gel les échantillons auxquels on a préalablement ajouté le tampon d'échantillon.
- Faire migrer à un voltage compris entre 80V et 120V. Les fragments d'ADN, chargés négativement, migre vers l'anode, alors que le bromure d'éthidium non lié, chargé positivement se déplacent vers la cathode.
- Stopper l'électrophorèse et visualiser les différents fragments dans le gel sous une illumination U.V.
- Photographier le gel.

1.7 Mutagenèse dirigée de HIF-1α par PCR

QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, CedarCreek, USA)

Cette technique est utilisée pour générer des mutations ponctuelles, des délétions ou des incorporations simples ou multiples d'acides aminés.

Le principe est basé sur la réalisation d'une amplification PCR classique sur un plasmide parental double brin comprenant un insert d'intérêt et ce, grâce à deux amorces oligonucléotidiques synthétiques contenant la mutation désirée (Figure 2).

Ces paires d'amorces synthétiques répondent à un ensemble de critères stricts tels que⊡

- La mutation au centre d'une amorce d'une longueur comprise entre 25 et 45 pb.
- Une température de melting de +/- 78°C.
- Un rapport de GC de +/- 40%.

- Un ou plusieurs G ou C à l'extrémité des amorces

L'amplification PCR génère au cours des différents cycles un plasmide muté qui diffère du plasmide parental par l'absence de site méthylé.

Ce plasmide parental est alors digéré par l'endonucléase DpnI et seul le plasmide muté peut alors être incorporé dans les bactéries SURE $CaCl_2$ compétentes.

Une extraction de l'ADN plasmidique suivie d'un séquençage permettra de déterminer la présence de la mutation au niveau de l'acide aminé d'intérêt.

1.7.1 Réaction de polymérisation en chaînes (PCR)

Cette technique d'amplification enzymatique consiste à amplifier spécifiquement un fragment d'ADN (matrice) grâce à deux séquences oligonucléotidiques anticomplémentaires connues. Ces deux amorces, possédant la mutation désirée, vont amplifier durant les cycles PCR le plasmide matrice et ce, grâce à l'activité d'une ADN polymérase de haute fidélité. Il en résulte, au fur et à mesure des cycles, l'apparition de plasmides mutés.

1.7.1.1 Préparation du mélange réactionnel

- 1,25 □l (125 ng) Amorce sens (100 ng/□l) (Eurogentec, Verviers, Belgique).
- 1,25 □l (125 ng) Amorce anti-sens (100 ng/□l) (Eurogentec, Verviers, Belgique).
- 1 □l dNTP mix.
- 5 □l Tampon de la polymérase concentré 10X.
- 1 □l de plasmide Matrice (pCMV-Myc/HIF-1□) à deux concentrations (40 ng/□l et 25 ng/□l).
- 1 □l Pfu Turbo DNA polymerase (2,5 U/□l) (Stratagene, CedarCreek, USA).
- Ajouter de l'eau stérile pour atteindre un volume final de 50 □l.

1.7.1.2 Programmation des cycles PCR

L'appareil utilisé est le Gene Amp PCR System 9600 (Perkin Elmer, Branchburg, USA).

La réaction PCR se compose d'une□

- Dénaturation de 30 secondes à 95°C.
- Série de cycles (16 cycles)□
  - Dénaturation 30 secondes à 95°C.
  - Hybridation 1 minute à 58°C.
  - Elongation 12 minutes à 68°C.

  Le nombre de cycles varie en fonction du type de mutation à apporter.
- Elongation finale de 5 minutes à 68°C.

Les produits PCR sont conservés à –20°C.

1.7.2 Digestion des plasmides parents

- Ajouter 1□l de l'enzyme de restriction Dpn I (10 U/□l) aux produits PCR.
- Incuber 1 heure à 37°C.

1.7.3 Transformation des bactéries

- Dégeler sur glace les aliquots de 100 □l de bactéries $CaCl_2$ compétentes.
- Ajouter à la suspension bactérienne, 1 □l du mix plasmide traité à la Dpn I.
- Incuber 30 minutes sur glace.
- Placer 1 minute à 42°C et puis 2 minutes sur glace.
- Ajouter 500 □l de LB.
- Incuber 1 heure à 37°C.
- Etaler sur un milieu solide complémenté d'antibiotiques et incuber une nuit à 37°C.

1.8 Le séquençage

La réaction de séquençage utilisée est un séquençage à fluorescence basé sur l'incorporation de nucléotides fluorescents par "PCR" (réaction d'élongation). Cette technique utilise le système ABI.PRISM Dye terminator cycle sequencing reaction kit (Perkin-Elmer, Branchburg, USA).

Un fragment à séquencer est incubé dans des conditions "PCR" en présence d'une seule amorce, ne permettant d'amplifier qu'un seul des deux brins. Le mélange PCR contient un ratio adéquat de nucléotides marqués par un agent fluorescent (un type de fluorochrome par type de nucléotide) arrêtant l'élongation du brin et des nucléotides non marqués permettant l'élongation.

La réaction d'élongation produit une population d'amplicons de taille variable, terminés par un nucléotide couplé à un fluorochrome. Cette population d'amplicons est déposée sur un gel de polyacrylamide résolutif à la base près. Les fragments migrent alors suivant leur taille. Sur le profil de migration, passe un laser d'une certaine longueur d'onde qui excite les marqueurs fluorescents. Ceux-ci émettent alors de la lumière sous une longueur d'onde qui leur est spécifique. La succession des quatre types de rayonnements émis est analysée, ce qui donne la séquence du fragment.

1.8.1 Préparation du mix d'élongation

1.8.1.1 Matériel

- Appareil PCR utilisé□Gene Amp PCR System 9600 (Perkin Elmer, Branchburg, USA).
- Tubes PCR (Biozym, Landgraaf, Hollande).
- Terminator Ready Reaction Mix (Perkin-Helmer, Branchburg, USA) contenant□
    - L'ADN polymérase
    - Les dNTPs
    - Les dNTPs terminateurs fluorescents
    - Le tampon PCR

1.8.1.2 Méthode

- Déposer dans un tube PCR 100-200 ng de matrice double brin (0,1 μg/μl).
- Ajouter l'amorce (3,2 pm).
- Ajouter de l'eau pour que le volume final soit de 10 μl.
- Mettre 4 μl de Terminator Ready Reaction mix.

Les conditions PCR sont les suivantes:

- Dénaturation à 96°C pendant 10 sec.
- Hybridation à 55°C pendant 5 sec.
- Élongation à 60°C pendant 4 min.

25 cycles sont réalisés et les produits PCR sont conservés à 4°C à l'abri de la lumière.

1.8.2 Préparation des échantillons pour l'analyse sur gel

1.8.2.1 Matériel

- Ethanol 95 % (Merck, Darmstadt, Allemagne).
- Ethanol 70 % (Merck, Darmstadt, Allemagne).

1.8.2.2 Méthode

- Pour chaque échantillon de séquençage, préparer un eppendorf de 1,5 ml dans lequel on place :
  - 10 μl de la réaction de PCR de séquençage.
  - 8 μl d'eau distillée stérile.
  - 32 μl d'éthanol 95 %.
- Vortexer brièvement les tubes.
- Laisser 15 min à température ambiante pour précipiter les produits d'extension.
- Centrifuger 20 min à 16000 rpm à 4°C (Heraeus Sepatech,Biofuge 17RS, rotor 1.379).
- Éliminer le surnageant.
- Ajouter 250 μl d'éthanol 70 % et vortexer.

- Centrifuger 10 min à 16000 rpm à 4°C (Heraeus Sepatech,Biofuge 17RS, rotor 1.379).
- Éliminer le surnageant.
- Sécher le culot au speedvac (Hetevac VR-1, Analis, Namur, Belgique).
- Déposer les échantillons sur un gel de polyacrylamide 4 %, la lecture de la séquence étant effectuée de manière automatique par l'appareil ABI.PRISM (Perkin-Helmer, Branchburg, USA).

1.9 Programmes informatiques utilisés

Voici la liste des principaux programmes informatiques utilisés pour ce mémoire⊡

- Blast NCBI⊡permet des alignements de séquence d'ADN sur différents types de banque de séquence. (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST).
- PEST find⊡programme d'analyse de séquences PEST. (http//genome.imb-jena.de).
- NetPhos 2.0 (http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos): programme de prédiction de site de phosphorylation sur une séquence par différentes kinases.
- CBS (Center for Biological Sequence Analysis) (http://www.cbs.dtu.dk): programme de prédiction de site de phosphorylation sur une séquence par différentes kinases.
- PhosphoBase v 2.0 (http://www.cbs.dtu.dk/databases/PhosphoBase): programme de prédiction de site de phosphorylation sur une séquence par différentes kinases.
- Prosite (http://us.expasy.org/prosite).
- ClustalW Multiple Sequence Alignment (http://searchlauncher.bcm.tmc.edu): programme d'alignement multiple de séquence.

2 ASPECT CELLULAIRE

2.1 Culture cellulaire

2.1.1 Culture des cellules HepG2

a) Caractéristiques de la lignée HepG2

La lignée cellulaire HepG2 est une lignée de cellules d'hépatome humain.

b) Milieux de culture et solutions

- Milieu DMEM + sérum⊡ milieu DMEM (Dulbecco Modified Eagle's Medium) enrichi par 10 % de sérum de veau foetal (Gibco, Paisley, Grande-Bretagne).
- Anti-fongiques (optionnel)⊡ Amphotéricine B 250 μg/ml (Gibco, Paisley, Grande-Bretagne).
- Antibiotiques (optionnel)⊡
    - Pénicilline G⊡50 U/ml (BioWhittaker Europe, Verviers, Belgique).
    - Streptomycine⊡50 □g/ml (BioWhittaker Europe, Verviers, Belgique).
- Trypsine-EDTA⊡ solution de trypsine à 0,5 g/l et EDTA à 0,2 g/l préparée dans une solution de Puck (Gibco, Paisley, Grande-Bretagne).

c) Repiquage des cellules HepG2

Les milieux utilisés sont préchauffés à 37°C. Les HepG2 sont cultivées dans des boîtes de culture de 75 cm^2 (T75, Costar, Corning, New York, USA). Lorsqu'elles sont confluentes, elles sont repiquées en 2 ou en 3 ou à une densité définie selon le type d'expérience à réaliser.

Le milieu de culture est décanté et les cellules sont rincées avec 5 ml de milieu de rinçage. Ensuite, les cellules sont détachées au moyen de 2 ml de trypsine + EDTA (chélateur

de cations et notamment de Ca^{++}) que l'on laisse agir quelques minutes jusqu'au détachement des cellules.

Lorsque les cellules se détachent, la réaction est arrêtée au moyen de 8 ml de DMEM + 10 % sérum. Ensuite, la suspension cellulaire est transvasée dans un tube stérile de 10 ml (Sterilin, Feltham, Grande-Bretagne) et centrifugée pendant 5 minutes à 1000 rpm (Centrifugeuse Universal, Hettich, Allemagne).

Le surnageant est décanté et le culot de cellules est resuspendu dans 10 ml de milieu DMEM + 10 % sérum et les cellules sont réparties après comptage à la densité désirée dans les boîtes de culture ou les plaques multi-puits. Les boîtes sont alors placées dans une étuve à 37°C (95 % d'air humide et 5 % CO_2). Lorsqu'elles sont à nouveau confluentes, elles sont repiquées selon le même procédé.

2.2 Transfections

Les méthodes de transfection permettent d'introduire de l'ADN dans les cellules d'eucaryotes et d'étudier notamment la modulation de l'expression d'un gène rapporteur lié à la présence d'un fragment d'ADN étudié. Les expériences de transfection ont été réalisées en présence de l'agent lipofectant DOTAP (Roche, Mannheim, Allemagne).

2.2.1 Transfection des cellules HepG2 par le DOTAP

Les agents lipofectants tels que le DOTAP peuvent former des complexes avec l'ADN et interagir avec les membranes cellulaires de manière à délivrer directement le matériel recombinant dans le cytoplasme.

2.2.1.1 Matériel

- Plaque multi-puits de 24 puits (Costar, Corning, New York, USA).
- Boîtes T75 (Costar, Corning, New York, USA).
- Boîtes T25 (Costar, Corning, New York, USA).
- DMEM, Strep, Pen G, SANS sérum (Gibco, Paisley, Grande-Bretagne).
- DMEM, Strep, Pen G + 10 % sérum (Gibco, Paisley, Grande-Bretagne).
- Hepes 20 mM filtré pH 7,4 (Acros, New Jersey, USA).
- DOTAP Liposomal Transfection Reagent (Roche, Mannheim, Allemagne).

2.2.1.2 Méthode

- Ensemencer les boîtes de culture à la confluence de cellules désirée□
  - Pour une plaque multi-puits (24 puits), ensemencer 60000 cellules par puits dans 1 ml de milieu DMEM + 10 % sérum.
  - Pour une T25, ensemencer 500.000 cellules dans 5 ml.
  - Pour une T75, ensemencer 2.000.000 cellules dans 15 ml.
- Incuber 24 heures à 37°C (95 % d'air humide et 5 % CO_2).
- Juste avant la transfection, décanter le milieu et ajouter le volume désirée de DMEM sans sérum selon l'expérience réalisée.
- Préparer les mix ADN et les mix DOTAP selon le tableau ci-dessous□

Boîte de culture		**Multipuits**	**T25**	**T75**
MIX ADN	- pRL - p6HRE/pVEGF - pTest⊡ Volume d'Hepes	100 ng 200 ng 1 µg x µl pour arriver à 25 µl volume final	7,5 µg x µl pour arriver à 75 µl volume final	12,5 µg x µl pour arriver à 125 µl volume final
MIX DOTAP	Volume de DOTAP Volume Hepes	15 µl 35 µl	45 µl 95 µl	75 µl 175 µl
Volume total		75 µl	215 µl	375 µl
Volume de transfection		1 ml de DMEM sans sérum	3 ml de DMEM sans sérum	5 ml de DMEM sans sérum

pRL = pRL-SV40 (Promega, Madison, USA)
p6HRE = pGL3-SV40 6HRE
pVEGF = pGL3-SV40 VEGF

- Rassembler les mix DOTAP/ADN et incuber 10 minutes à température ambiante.
- Ajouter le volume adéquat du mix DOTAP/ADN au milieu DMEM sans sérum.
- Incuber 24 heures dans une étuve à 37°C (95 % d'air humide et 5 % CO_2).
- Eliminer le milieu de transfection et incuber selon les conditions voulues.

2.3 Incubation sous hypoxie

2.3.1 Matériel

- Milieu modifié□le milieu employé lors des incubations sous hypoxie est du milieu CO_2 indépendant (Gibco, Paisley, Grande-Bretagne) auquel on a ajouté 7,3 mg de glutamine pour 100 ml ainsi que des antibiotiques (Pen (50 U/ml)/Strep (50 □g/ml)) et des antifongiques (Ampho (250 μg/ml)). Ce milieu ne contient pas de sérum.

2.3.2 Méthode

Pour les incubations sous hypoxie, le milieu des cellules est décanté et les cellules sont couvertes de milieu CO_2 indépendant. Le volume correspond à 2 ml pour les puits des plaques à 24 puits, 5 ml pour les T25 et 10 ml pour les T75. Les boîtes sont ensuite ouvertes et placées dans un incubateur à 37°C où règne une atmosphère composée à 99 % d'azote (créée par un flux de 2 minutes) et à 1 % d'O_2. Des boîtes contrôles sont incubées dans les mêmes conditions mais dans une atmosphère normale ou normoxie.

2.4 Western Blot

Cette technique permet de mettre en évidence, dans un extrait cellulaire, le niveau d'expression de protéines d'intérêt selon les conditions testées. Elle se déroule en plusieurs étapes□

- Séparation des protéines selon leur poids moléculaire par une électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS (Sodium Dodécyl Sulfate).
- Transfert des protéines sur une membrane PVDF (PolyVinylidiène DiFluoride).
- Détection de la protéine d'intérêt par un système de double marquage impliquant un anticorps primaire reconnaissant la protéine et un anticorps secondaire couplé à un système de révélation (une peroxydase par exemple).
- Révélation par chémiluminescence.

La préparation des échantillons pour le Western Blot nécessite plusieurs étapes à savoir la lyse cellulaire, le dosage des protéines et la préparation des échantillons pour les déposer sur le gel d'électrophorèse.

2.4.1 Lyse des cellules

2.4.1.1 Matériel

Tampon de lyse□

- Tris 20 mM pH 7,5 (Merck, Darmstadt, Allemagne)
- KCl 150 mM (Merck, Darmstadt, Allemagne)
- EDTA 1 mM (Merck, Darmstadt, Allemagne)
- Triton X-100 1 % (Sigma, St Louis, USA)
- Inhibiteurs de protéases 1x (Complete protease inhibitor cocktail tablets 25x, Roche, Mannheim, Allemagne)
- Inhibiteurs de phosphatases 1x à partir d'un stock 25x :
  - * $NaVO_3$ 25 mM (Sigma, St Louis, USA)
  - * PNPP (phospho-nitophényl phosphate) 250 mM
  - * □-glycérophosphate 250 mM (Sigma, St Louis, USA)
  - * NaF 125 mM (Merck, Darmstadt, Allemagne)

2.4.1.2 Méthode

Après incubation, les boîtes sont placées sur glace, décantées et rincées avec du PBS froid. Un volume de tampon de lyse adéquat est ajouté à chaque boîte et les cellules sont raclées dans le fond de la boîte. Le lysat cellulaire est ensuite récupéré et transféré dans des eppendorfs puis incubé à 4°C pendant 30 minutes. Les échantillons sont centrifugés 15 minutes à 15000 rpm à 4°C (Heraeus Sepatech, Biofuge 17RS, rotor 1379). Le surnageant est alors récupéré et placé dans de nouveaux eppendorfs. Les échantillons sont conservés à –20°C. 20 □l sont prélevés pour la quantification des protéines par la méthode Bradford.

2.4.2 Quantification des protéines par la méthode de Bradford

2.4.2.1 Matériel

- Colorant Bio-Rad Protein Assay 5X (Bio-Rad, Richmond, USA).
- Etalon BSA (Bovine Serum Albumin) (1,39 µg/µl).

2.4.2.2 Méthode

- Diluer le colorant 5X dans de l'eau distillée.
- Mettre 1 ml de colorant/test.
- Ajouter 3,6 µl d'échantillon, de blanc ou d'étalon toutes les 30 secondes.
- Laisser agir 5 minutes et doser au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 595 nm (Uvikon 930, Kontron instruments, Suisse).
- Formule utilisée pour estimer la concentration en protéines :

$$\frac{(\text{moyenne test} - \text{moyenne blanc}) / (\text{moyenne étalon} - \text{moyenne blanc étalon})) \times 5}{\text{Volume d'échantillon (3,6 µl)}} \quad (\mu g/\mu l)$$

2.4.3 Préparation des échantillons pour le gel d'électrophorèse

- Prélever le volume adéquat de manière à déposer une quantité équivalente de protéines par puits.
- Ajouter du tampon d'échantillon 5X concentré.
- Porter tous les échantillons au volume désiré avec de l'eau distillée.
- Faire bouillir 3 à 4 minutes les échantillons pour dénaturer les protéines puis centrifuger brièvement.

Tampon d'échantillon 5X concentré :

- 10 ml de « spacer gel buffer » (voir point 2.4.4.1.)
- 10 ml SDS (20 % solution finale) (ICN Biomedicals, Ohio, USA)

- 5 ml ß-mercaptoéthanol (4 % solution finale) (Flukachemie AG, Buchs, Suisse)
- 10 ml Glycérol (20 % solution finale) (Merck, Darmstad, Allemagne)
- 17,5 ml bleu de bromophénol (1 % solution finale) (Janssen Chimica, Beerse, Belgique)

2.4.4 Electrophorèse en gel de polyacrylamide–SDS

2.4.4.1 Matériel

L'électrophorèse s'effectue en deux temps. D'une part, la concentration des protéines à travers un gel concentrateur et d'autre part, leur séparation selon leur poids moléculaire à travers un gel séparateur.

- Le gel séparateur

Préparation d'un « gel buffer » : SDS 0,4 % (ICN Biomedicals, Ohio, USA) et TRIS 18,15 % (ICN Biomedicals, Ohio, USA) à pH 8,9.

Préparation d'un « gel mix » : Le pourcentage en polyacrylamide peut être modifié en fonction du poids moléculaire des protéines à séparer. Des gels de haut pourcentage permettent de séparer des protéines de faible poids moléculaire et inversément. Lors de ce mémoire, seuls des gels à 10 % ont été utilisés.

Gel Mix	**10 %**
Gel buffer	60 ml
Acryl/bis	83 ml
H_2O	107 ml

Acryl/Bis (30/0,8) (Bio-Rad, Richmond, USA)

Préparation du gel séparateur□

- 35 ml du «□gel mix□»
- 175 □l APS 25% solution stock (Ammonium persulfate, Pharmacia Biotech, Uppsala, Suède)
- 10,5 □l de TEMED (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suède)

- Le gel concentrateur

Préparation d'un «□spacer gel buffer□» : SDS 0,4 % et TRIS 5,1 % à un pH 6,8

Préparation d'un «□spacer gel mix□» :

- 60 ml de «□spacer gel buffer□»
- 40 ml d'Acryl/bis (30/0,8)
- 140 ml d'H_2O

Préparation du gel concentrateur□

- 10 ml du spacer «□gel mix□»
- 50 □l APS 25 % solution stock
- 3 □l de TEMED

- Tampon de migration 10X

Pour un litre: *63,2 g de TRIS (0,5 M solution finale)
*40 g de glycine (3,8 M solution finale) (Merck, Darmstadt, Allemagne)
*10 g SDS (1 % solution finale)

- Etalon□Full Range Rainbow□protéines dont les tailles sont de 10 kDa, 15 kDa, 25 kDa, 30 kDa, 35 kDa, 50 kDa, 75 kDa, 105 kDa, 160 kDa et 250 kDa (Amersham International, Buckinghamshire, Grande-Bretagne).

2.4.4.2 Méthode

- Monter les plaques et couler le gel séparateur entre les plaques.
- Déposer 1 ml d'isobutanol au-dessus et mettre le montage bien à l'horizontal.

- Laisser polymériser.
- Eliminer l'isobutanol et rincer abondament à l'eau distillée.
- Eliminer l'eau avec un papier Whatman.
- Couler le gel concentrateur jusqu'au bord des plaques et glisser le peigne entre celles-ci.
- Laisser polymériser.
- Retirer le peigne et monter le gel dans la cuve d'électrophorèse (modèle V15-17, Life technologies, GibcoBRL, Gaithersburg, USA).
- Ajouter du tampon de migration 1X.
- Rincer les puits et chasser les bulles d'air au bas du montage à l'aide d'une seringue.
- Déposer les échantillons et l'étalon Full Range Rainbow dans les puits.
- Faire migrer□à travers le gel concentrateur à 35 mA puis à travers le gel séparateur à 45 mA.

2.4.5 Transfert

Le transfert consiste à faire migrer les protéines hors du gel via un champ électrique et de les récupérer sur un support solide en l'occurrence une membrane PVDF.

2.4.5.1 Matériel

- Membrane PVDF (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Grande-Bretagne).
- Papiers Whatman (Macherey-Nagel, Allemagne).
- Eponge.
- Méthanol 100% (Merck, Darmstadt, Allemagne).
- Tampon de tranfert□

  pour 5 litres□
  * 24 g TRIS (0,04 M)
  * 115 g Glycine (0,3 M)
  * 1 litre méthanol

- Appareil de transfert□ Hoefer Semiphor (Amersham Biosciences, Minnesota, San Francisco, USA).

2.4.5.2 Méthode

a) préparation de la membrane :

- Réhydrater la membrane dans du méthanol 100% pendant 1 minute.
- Equilibrer la membrane dans du tampon de transfert pendant 5 minutes.

b) préparation du système « sandwich » :

- Arrêter l'électrophorèse lorsque le front de migration, visualisé par le bleu de bromophénol, se trouve à environ 1 cm du bas du gel.
- Démouler le gel, enlever le gel concentrateur et éventuellement l'excès de gel séparateur à l'aide d'un scalpel.
- Immerger les papiers Whatman dans du tampon de transfert.
- Le système « sandwich » se constitue de plusieurs couches :

  (en partant du côté de l'anode)

  - Une éponge
  - Deux papiers Whatman
  - La membrane
  - Le gel
  - Deux papiers Whatman
  - Une éponge
- Le transfert se fait toute la nuit à 30 mA. Les protéines, chargées négativement, vont migrer du gel vers la membrane.

2.4.6 Traitement de la membrane

2.4.6.1 Matériel

- Solution stock de TBS 10x

pour 1 litre :
- 24,22 g TRIS (0,2 M) (ICN Biomedicals, Ohio, USA)
- 80,06 g NaCl (1,37 M) (Merck, Darmstadt, Allemagne)
- pH 7,6

(Conserver à température ambiante)

- Solution TBS + Tween20 (0,1 %) (Sigma, St Louis, USA) à préparer le jour même.
- Solution TBS-Tween20 0,1 % + Gloria (5 %) (Nestlé, Bruxelles, Belgique).
- Solution TBS-Tween20 0,1 % + 0,1 % Gloria.
- Solution TBS-Tween20 0,07 %.
- Solution TBS-Tween20 0,07 % + 5 % Gloria + 5 % BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma, St Louis, USA).
- Solution TBS-Tween20 0,05 %.
- Solution TBS-Tween20 0,05 % + 3 % Gloria + 3 % BSA.
- Anticorps primaires□
    - Anticorps de souris anti-HIF-1□ (BD Biosciences Transduction Laboratories, USA) dilué 1000x
    - Anticorps de souris anti-GSK3□ (BD Biosciences Transduction Laboratories, USA) dilué 1000x
    - Anticorps de lapin anti Phospho-GSK3□/□ Ser21/9 (Cell Signaling Technology, Beverly, USA) dilué 1000x
    - Anticorps de souris anti-Phospho-GSK3□/□ Tyr279/216 (Upstate biotechnology, Veenendaal, Pays-Bas) dilué 1000x
    - Anticorps de lapin anti-Akt (Cell Signaling Technology, Beverly, USA) dilué 1000x
    - Anticorps de lapin anti-Phospho-Akt Ser473 (Cell Signaling Technology, Beverly, USA) dilué 1000x
    - Anticorps de souris anti-□-Tubuline (InnoGenex, San Ramon, USA) dilué 1000x
- Anticorps secondaires□
    - Anticorps anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Grande-Bretagne) dilué 2000x
    - Anticorps anti-IgG de souris couplé à la peroxydase (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Grande-Bretagne) dilué 2000x

2.4.6.2 Méthode

Le traitement de la membrane permet de diminuer les liaisons non spécifiques des anticorps par saturation de la membrane avec des protéines du lait ou de la BSA. La

membrane est ensuite incubée avec l'anticorps spécifique dirigé contre la protéine d'intérêt. La détection se fait de manière indirecte puisqu'un anticorps reconnaissant le premier anticorps et couplé à une HRP (Horseradish peroxydase) va être utilisé.

- Démouler le « sandwich » et découper les excès de membrane.
- Placer celle-ci dans une bouteille en plastique avec le côté des protéines vers l'intérieur.
- Effectuer les différentes étapes de la révélation selon la protéine d'intérêt à détecter (voir tableau 1).

2.4.7 Révélation

2.4.7.1 Matériel

- Système de révélation :
    - Western Lightening NEN, Perkin Elmer Life Sciences, Boston, USA
    - Pierce, Rockford, USA

- Film d'exposition : film photos ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Buckingamshire, Grande-Bretagne).
- Révélateur dilué 5x (Ilford Imaging, Victoria, Grande-Bretagne).
- Fixateur dilué 5x (Ilford Imaging, Victoria, Grande-Bretagne).

2.4.7.2 Méthode

L'anticorps secondaire est couplé à une peroxydase qui va catalyser la réaction de décomposition de l'H_2O_2 en H_2O et en O_2^-. O_2^- est alors révélé par chémoluminescence en présence de luminol. Celui-ci oxydé peut retourner à son état fondamental en émettant de la lumière qui sera détectée sur un film.

La membrane est incubée 5 minutes dans la solution de révélation, puis placée dans une cassette d'autoradiographie. En chambre noire, un film est déposé sur la membrane et est exposé une minute. Le film est alors plongé dans du révélateur pendant quelques minutes, puis il est rincé dans de l'eau de ville et plongé dans du fixateur. Après quelques minutes de fixation, le film est rincé à l'eau de ville et séché à l'air libre. Le temps d'exposition est

adapté en fonction de l'intensité du signal. La membrane peut être scellée entre deux transparents et conservée à –20 °C.

2.5 Système Dual-luciferase

Kit Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega, Madison, USA).

Cette technique permet d'étudier l'activité transcriptionnelle de facteurs de transcription. Le terme "dual-reporter" se réfère à l'expression simultanée de deux types de rapporteurs pouvant être révélés au sein de la même expérience. En effet, ce système utilise deux luciférases d'organismes différents utilisant des substrats distincts et permettant ainsi une quantification mais aussi une normalisation des tests□ firefly (*Photinus pyralis*) et renilla (*Renilla renformis*). L'activité de ces deux luciférases est mesurée séquentiellement à partir du même échantillon. L'activité de la firefly luciférase rapportant l'activité du facteur de transcription est mesurée après l'addition du premier substrat (Luciferase Assay Reagent) qui génère une première émission de lumière. Après ce premier signal, on ajoute le deuxième substrat (Stop&Glo) qui inhibe la firefly et qui initie la réaction enzymatique de la renilla luciférase, engendrant le deuxième signal lumineux. La renilla luciférase est constitutivement exprimée et va permettre de normaliser la variabilité d'efficience de transfection de puits à puits (Figure 3).

Les cellules sont préalablement lysées en présence de PLB, un tampon spécifique qui garantit une stabilité optimale des activités des deux luciférases.

2.5.1 Matériel

- PLB (Passive Lysis Buffer) (Promega, Madison, USA).
- Luminomètre : Biocounter, M2010, Lumac, USA.

2.5.2 Méthode

- Décanter le milieu CO_2 indépendant.
- Ajouter 100 □l de PLB dans chaque puits pour lyser les cellules.

- Placer la plaque multipuits sur un agitateur mécanique pendant 15 minutes à température ambiante pour permettre un recouvrement optimal du tapis cellulaire.
- Ajouter 20 µl de lysat cellulaire à 100 µl de firefly substrate.
- Effectuer la première lecture au luminomètre pendant 10 secondes.
- Ajouter 100 µl de solution Stop & Glo Reagent 1X.
- Effectuer la deuxième lecture au luminomètre pendant 10 secondes.

2.6 Dosage du VEGF

Kit Quantikine human VEGF (R&D Systems, Minneapolis, USA).

Le dosage du VEGF sécrété par les cellules se fait à l'aide d'un ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) (Figure 4).

2.6.1 Principe

Des microplaques précoatées avec un anticorps monoclonal anti-VEGF sont incubées en présence d'échantillons tests ou d'échantillon standard. Le VEGF sécrété dans le milieu extracellulaire va se lier aux anticorps fixés au fond du puits. Après le lavage des substances non spécifiques, un anticorps polyclonal anti-VEGF couplé à une peroxydase est ajouté dans les puits. Le substrat enzymatique fait alors apparaître une coloration proportionnelle à la quantité de VEGF fixé préalablement. L'intensité de la coloration est alors mesurée au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 450 nm.

2.6.2 Matériel

- Microplaque VEGF□ Microplaque 96 puits en polystyrène coatée avec un anticorps monoclonal de souris anti VEGF.
- Conjugué anti VEGF□ Anticorps polyclonal anti VEGF conjugué à la HRP (Horseradish Peroxydase).
- Standard VEGF : VEGF recombinant humain.
- Assay Diluent RD1W.
- Calibrator Diluent RD5K.

- Tampon de lavage (25X).
- Solution de coloration A□Peroxyde d'hydrogène stabilisé.
- Solution de coloration B□Chromogène stabilisé (tétraméthylbenzidine).
- Solution Stop□acide sulfurique 2N.
- Lecteur de plaques multipuits (Ultramark, Microplate Imaging System, Biorad, Munich, Allemagne).

2.6.3 Méthode

- Préparer les réactifs□
    - Tampon de lavage
    - Standard VEGF□ resuspendre le substrat lyophilisé dans 1 ml de Calibrator Diluent RD5K pour avoir une solution de 2000 pg/ml. Préparer des tubes de dilution de 2 en 2 pour avoir les concentrations de 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.2, 15.6 et 0 (le RD5K servira de blanc).
- Ajouter 50 µl de Assay Diluent RD1W à chaque puits.
- Ajouter 200 µl de Standard ou d'échantillon par puits.
- Incuber 2 heures à température ambiante.
- Décanter et laver avec 3 X 400 µl de tampon de lavage.
- Ajouter 200 µl de Conjugué anti-VEGF dans chaque puits.
- Incuber 2 heures à température ambiante.
- Décanter et laver avec 3 X 400 µl de tampon de lavage.
- Préparer la solution de coloration en mélangeant volume/volume de la solution A et de la solution B.
- Ajouter 200 µl de cette solution de coloration mixée par puits.
- Incuber 20 minutes à température ambiante à l'abri de la lumière.
- Stopper la réaction en ajoutant 50 µl de solution Stop.
- Déterminer la densité optique au lecteur de plaque à une longueur d'onde de 450 nm.

2.6.4 Dosage des protéines par la méthode de Folin

La quantité de VEGF sécrété par les cellules est rapportée à la quantité de cellules par puits, estimée par un dosage des protéines.

2.6.4.1 Matériel

- Solution A□
    - 100 ml Na_2CO_3 2 % solution stock (Sigma Aldrich, Grande-Bretagne)
    - 1 ml tartrate 2 % solution stock (Sigma Aldrich, Grande-Bretagne)
    - 1 ml $CuSO_4$ 1 % solution stock (Sigma Aldrich, Grande-Bretagne)
- Solution de Folin□à dilué 2 X dans de l'eau distillée.
- Etalon□BSA à 200 □g/ml.
- NaOH 0,5 N et 1 N.

2.6.4.2 Méthode

- Lyser les cellules dans 1 ml de NaOH 0,5 N.
- Préparer la solution A.
- Préparer les blancs et les étalons□ajouter 200 □l de NaOH 1N à 200 □l d'eau (blanc étalon) et à 200 □l d'étalon.
- Ajouter 1 ml de solution A à 100 □l de lysat cellulaire dans un tube.
- Laisser agir 15 minutes.
- Ajouter 100 □l de Folin toutes les 30 secondes.
- Lire l'absorbance après 30 minutes à 660 nm (Uvikon 930, Kontron instruments, Suisse).

Formule permettant l'estimation de la concentration en protéines□

$$\frac{(\text{DO échantillon} - \text{DO blanc échantillon}) \times 200\ \mu g/ml}{(\text{DO étalon} - \text{DO blanc étalon})}$$

2.7 Immunofluorescence

L'immunofluorescence est une technique qui permet de localiser une protéine d'intérêt au sein des cellules grâce à l'utilisation d'anticorps spécifiques dirigés contre la protéine recherchée. Ces anticorps sont ensuite détectés au moyen d'anticorps anti-immunoglobuline qui sont par ailleurs couplés chimiquement à des fluorochromes comme la rhodamine qui émet une lumière rouge quand on l'irradie à la longueur d'onde d'excitation appropriée.

2.7.1 Matériel

- Plaques 24 puits (Costar, Corning, New York, USA).
- Lamelles couvre-objet de 13 mm de diamètre (Vel, Knittel Glaser, Allemagne).
- Lames porte-objet de 2,6 x 7,6 cm (Vel, Knittel Glaser, Allemagne).
- PBS (150 mM).
- PBS + BSA 2 %.
- PBS + Triton x-100 1 %.
- PBS + 4 % PFA (Paraformaldéhyde) (Merck, Darmstadt, Allemagne).
- Anticorps primaire dilué dans du PBS + BSA 2 % :
    - HIF-1 (BD Biosciences Transduction Laboratories, USA) dilué 100x.
    - GSK3 (Santa Cruz, USA) dilué 100x.
- Anticorps secondaire : Anticorps anti-IgG de souris ou de lapin marqué au fluorochrome Alexa 488, dilué 500x dans du PBS + BSA 2 % (Molecular Probes, USA).
- Mowiol (Sigma-Aldrich, Allemagne-Angleterre) : milieu de montage.

2.7.2 Méthode

Après avoir été repiquées dans des plaques 24 puits à raison de 60.000 cellules par puits contenant une lamelle couvre-objet, les cellules HepG2 sont incubées 24 heures dans du milieu DMEM avec sérum à 37°C sous une atmosphère de 95 % d'air humide et 5 % de CO_2. Elles sont ensuite incubées 16 heures en hypoxie ou en normoxie en présence ou non d'inhibiteurs.

A la fin de l'incubation, les cellules sont rincées avec du PBS préchauffé à 37°C en faisant attention de ne pas détacher les cellules. Ensuite, les cellules sont fixées sur les

lamelles avec du PBS + 4 % PFA pendant 10 minutes avant d'être à nouveau rincées 3x avec du PBS. Leurs membranes sont alors perméabilisées à l'aide de PBS + Triton x-100 1 % pendant 5 minutes. La perméabilisation permet aux anticorps d'accéder à l'intérieur des cellules.

Après avoir réalisé 3 rinçages de 10 minutes chacun avec du PBS + BSA 2 %, le marquage est alors réalisé en incubant les cellules en présence des anticorps primaires spécifiques pendant 2 heures à température ambiante et en chambre humide. Le système de la chambre humide permet d'utiliser moins d'anticorps. Il s'agit en fait d'une grande boîte de Pétri au fond de laquelle on place un filtre humide. On met sur ce filtre autant de morceaux de parafilms qu'il y a de tests. On y dépose une goutte de la solution d'anticorps puis on recouvre d'une lamelle en veillant à ce que les cellules soient du côté de l'anticorps. La boîte de Pétri est alors fermée hermétiquement pour éviter toute évaporation.

Les lamelles sont replacées dans les puits où les cellules sont rincées 3 fois avec du PBS + BSA 2 % pendant 10 minutes. Les lamelles sont de nouveau sorties des puits et incubées pendant 1 heure à température ambiante en chambre humide et à l'abri de la lumière pour conserver le fluorochrome, avec les anticorps secondaires.

Les lamelles sont à nouveau rincées 3 fois avec du PBS + BSA 2 %.

Après le troisième rinçage, un marquage nucléaire est réalisé par un marqueur spécifique, le TOPRO-3. Ce dernier est dilué 80x dans la RNase (2 mg/ml PBS) et incubé avec les cellules pendant 35 minutes. Les lamelles sont encore une fois rincées avec du PBS, puis montées délicatement sur les lames porte-objet sur lesquelles il y a déjà une goutte de mowiol. Le tout est placé dans l'obscurité pendant 24 heures pour permettre la polymérisation du mowiol.

Les lames peuvent alors être observées au microscope confocal (Leica, Heidelberg, Allemagne).

2.8 Real-Time PCR

Nous avons utilisé la PCR en temps réel (Real-Time PCR) pour mesurer la quantité d'ARNm d'un gène cible de HIF-1, l'aldolase A, dans des cellules incubées en normoxie ou en hypoxie en présence ou non d'inhibiteur.

2.8.1 Principe

La première étape consiste en l'extraction de l'ARN total des cellules incubées dans les différentes conditions et sa rétro-transcription en ADNc.

La deuxième étape est la PCR proprement dite. L'ADN cible est amplifié de manière exponentielle au cours des cycles PCR. Le syber green, un agent intercalant fluorescent, s'intercalant entre des amplicons double brin, émet un signal fluorescent permettant de visualiser la phase d'amplification exponentielle.

L'appareil utilisé (ABI Prim 7000, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) permet une quantification de la fluorescence en plaque de 96 puits. La fluorescence est induite par un laser à 497 nm et détectée à 520 nm par fibres optiques.

En fin de PCR, une courbe de dissociation est effectuée permettant de vérifier qu'un seul amplicon a été généré. En effet, en augmentant la température, l'appareil peut détecter la dissociation des brins d'ADN amplifiés et la libération concomitante du syber green. Pour vérifier la taille des produits amplifiés, ceux-ci peuvent également être chargés sur un gel d'agarose en fin de PCR.

L'analyse des résultats se déroule en deux étapes. Tout d'abord, il faut déterminer le seuil de détection. On place celui-ci dans la zone de linéarité de la phase d'amplification et au dessus d'une intensité de fluorescence significativement différente du bruit de fond (qui correspond à un signal aspécifique). Le Ct (cycle seuil ou « threshold cycle », cycle auquel la courbe d'amplification croise le seuil de détection) est inversément proportionnel à la quantité d'ADNc cible de départ, elle-même proportionnelle à la quantité d'ARNm de départ (Figure 5). L'analyse nécessite de passer par une normalisation par rapport à un « house keeping gene ». Il s'agit d'un gène de référence dont on sait que le niveau de transcription reste stable quelles que soient les conditions étudiées. Dans notre cas, nous avons utilisé le gène de la tubuline-β.

2.8.2 Extraction d'ARN

(RNAgents Total RNA Isolation System – Promega, Madison, USA)

2.8.2.1 Matériel

Provenant du kit□

- Solution de dénaturation.
- Acétate de sodium 2 M pH 4,0.
- Phénol/chloroforme/isoamyl alcohol (125□24□1) pH 4,7.
- Nuclease-free water.

A préparer□

- PBS stérile.
- Isopropanol (Merck, Darmstadt, Allemagne).
- EtOH 75 % (Merck, Darmstadt, Allemagne).

2.8.2.2 Méthode

- Décanter le milieu des cellules et les laisser sur glace.
- Rincer 1 x avec 10 ml de PBS (préalablement refroidi sur glace).
- Décanter complètement.
- Ajouter 600 μl de solution de dénaturation et répartir cette solution sur toute la boîte en agitant doucement.
- Racler la boîte et transférer le lysat dans un eppendorf.
- Ajouter 60 μl d' acétate de sodium 2 M (pH 4,0) et mélanger en inversant les tubes 4-5 fois.
- Ajouter 600 μl de phénol/chlorophorme/isoamyl alcohol (phase inférieure de la bouteille).
- Mélanger 4 à 5 fois par inversion et vortexer.
- Laisser incuber sur glace 15 min.
- Centrifuger 15 min. à 10000 g à 4°C (Heraeus Sepatech, Biofuge 17 RS, rotor 1379).
- Récupérer délicatement la phase supérieure et la transférer dans un nouvel eppendorf.
- Ajouter un volume égal d'isopropanol (600 □l) et incuber à - 20°C pendant ± 30 minutes.
- Centrifuger 10 min à 13000 rpm à 4°C (Heraeus Sepatech, Biofuge 17 RS, rotor 1379).
- Laver le culot avec 1 ml d'EtOH 75 % refroidi sur glace et mélanger.
- Cenrifuger 10 min. à 13000 rpm à 4°C (Heraeus Sepatech, Biofuge 17 RS, rotor 1379).
- Laisser sécher l'ARN à l'air libre 5 à 10 min.

- Resuspendre l'ARN dans 30 μl d'H_2O RNAse-free.
- Prélever 2 μl pour le dosage au spectrophotomètre et stocker le reste à -70°C.

2.8.3 Rétro-transcription

2.8.3.1 Matériel

- ARN extrait.
- Oligo-dT (Invitrogen, Carlsbad, USA).
- Buffer RT (Invitrogen, Carlsbad, USA).
- DTT 0,1 M(Invitrogen, Carlsbad, USA).
- RNAsin Ribonuclease Inhibitor (40 U/□l) (Promega, Madison, USA).
- dNTP mix (Eurogentec, Seraing, Belgique).
- SuperScriptII (200 U/□l) (Invitrogen, Carlsbad, USA).
- RNAse H (2 U/□l) (Invitrogen, Carlsbad, USA).

2.8.3.2 Méthode

- Mélanger l'ARN à l'oligo-dT et spinner□
  - 2 □l oligo-dT (500 ng/□l)
  - 2 □g d'ARN total
  - x □l ddH_2O Rnase free pour avoir un volume final de 9,5 □l
- Incuber 10 min à 70°C et spinner (Biofuge pico, Heraeus, Allemagne).
- Mettre immédiatement sur glace et incuber 5 min.
- Ajouter 9 □l de reaction mix et spinner□
  - 4 □l Buffer RT (5X)
  - 2 □l DTT 0,1 M
  - 1 □l RNAsin (40 U/□l)
  - 2 □l dNTP mix
- Incuber 5 min à température ambiante.
- Ajouter 1,5 □l de SuperScriptII (200 U/l).
- Incuber 1h30 à 42°C.

- Incuber 15 min à 70°C.
- Ajouter 1 µl RNAse H (2 U/µl).
- Incuber 20 min à 37°C.
- Stocker immédiatement à -20°C.

2.8.4 Real-time PCR

Afin d'obtenir des résultats optimaux, certains paramètres avaient été au préalable mis au point tels que le choix des amorces, la concentration adéquate en ADNc de départ, ainsi que la concentration pour chaque primer.

2.8.4.1 Choix des amorces

Le programme « primer express » propose pour un gène donné une série de paires d'amorces ainsi que leurs caractéristiques. Parmi celles-ci, on retrouve la température d'annealing, la proportion en G-C (doit représenter 20 à 70 %), la longueur du fragment amplifié (doit se situer entre 50 et 150 bp) et celle des amorces (entre 15 et 30 bp). Le couple d'amorces est choisi de façon à ce que les température d'hybridation (se trouvant entre 58°C et 60°C) ne diffèrent pas plus de 1°C ou 2°C. On choisira d'amplifier un fragment situé plutôt du côté 3' puisque l'efficience de la rétro-transcription de l'ARNm diminue plus la polymérase s'éloigne de l'amorce Oligo-dT. De plus, le fragment amplifié devra chevaucher deux exons pour permettre de différencier l'amplification possible de l'ADN génomique, de l'amplification de l'ADNc d'intérêt. Enfin, les amorces ne doivent pas contenir plus de deux G ou C à l'extrémité 3' pour éviter la formation de dimères de primers.

2.8.4.2 Détermination de la courbe de dilution

Différentes concentrations en ADNc ont été testées afin de déterminer l'efficacité de la PCR. A partir des Ct obtenus pour chaque dilution en ADNc de départ, une droite de régression a été tracée, la pente correspondant à l'efficience. Les efficiences de PCR du gène d'intérêt et du gène de référence doivent être semblable pour permettre une normalisation des résultats.

2.8.4.3 Détermination des concentrations en amorces

Trois couples de concentrations en amorces (sens et anti-sens) ont été testées (50 nM, 300 nM, 900 nM). Le couple de concentrations a été choisi en fonction de deux critères□ne pas avoir d'amplification des blancs (sans ADNc) et un Ct le plus bas possible.

2.8.4.4 Quantification de l'ARNm de l'Aldolase A

Cette quantification est effectuée en utilisant les amorces à une concentration de 300 nM et l'ADNc à une dilution 100 X. En parallèle, le gène de référence (tubuline-□) est quantifié dans les même conditions.

Matériel

- SYBR Green PCR Master Mix (syber green, amplitaq gold polymérase, dNTP, buffer 2x) (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).
- Amorces forward et reverse (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Méthode

- Préparation du master mix□
    - 12,5 □l SYBR Green PCR Master Mix
    - 2,5 □l Amorce sens (300 nM)
    - 2,5 □l Amorce anti-sens (300 nM)
    - 5 □l ADNc matrice à la dilution 100X
    - 2,5 □l H_2O distillée
- Centrifuger quelques secondes à 13.000 rpm pour éliminer les bulles qui pourraient gêner la lecture optique de la fluorescence.
- Conditions PCR□
    - 50°C durant 2 min
    - 40 cycles□ * 95°C durant 10 min
        * 95°C durant 15 sec
        * 60°C durant 1min

1 Mutation de HIF-1α

Comme nous l'avons vu dans l'Introduction, l'activité du facteur de transcription HIF-1 est régulée à plusieurs niveaux. Une des étapes majeures consiste en la stabilisation de la sous-unité HIF-1α. Si la dégradation de HIF-1α en normoxie est principalement régulée par son hydroxylation via la HIF-α prolyl-hydroxylase, de nombreuses données semblent indiquer qu'une voie dépendante de la kinase Akt pourrait moduler l'action de cette voie principale. Cependant, l'analyse du domaine ODD a révélé qu'il ne contenait pas de séquence consensus de phosphorylation de Akt, suggérant que la voie PI3K/Akt régulerait l'activité d'une protéine, elle-même régulant la stabilisation de HIF-1α (Sodhi *et al*., 2001). GSK3β est un candidat potentiel puisque cette kinase est phosphorylée par Akt dans de nombreuses situations. De plus, elle est impliquée dans la régulation de la dégradation d'autres protéines telles que la β-Caténine.

C'est sur base de ces observations que nous avons voulu rechercher dans la protéine HIF-1α un ou des sites potentiels de phosphorylation par la GSK3β dans le but de le(s) muter. Les éventuels effets de cette mutation sur la stabilisation de HIF-1α et sur l'activité transcriptionnelle de HIF-1 ont été ensuite étudiés.

1.1 Génération de mutants de HIF-1α

1.1.1 Choix des mutants

Afin de déterminer les mutants que nous allions générer, nous avons utilisé différents programmes informatiques qui permettent de trouver des sites potentiels de phosphorylation par la GSK3β sur base de la séquence consensus de phosphorylation connue pour cette kinase.

La recherche des sites potentiels s'est effectuée sur la séquence du domaine ODD de HIF-1α comprise entre les résidus 401 et 603 puisque c'est ce domaine qui régule la dégradation de HIF-1α. Cinq sites potentiels ont été proposés dont deux sont repris par différents programmes: le résidu phosphorylé dans chacun de ces deux sites est la thréonine en position 498 et la sérine en position 505. L'alignement des séquences de HIF-1α de différentes espèces nous a en plus montré que le résidu Ser-505 était conservé dans les espèces suivantes : *Homo sapiens sapiens, Mus musculus, Rattus norvegiticus*. Le degré de

conservation de cet acide aminé nous suggère qu'il pourrait être potentiellement phosphorylé et de ce fait jouer un rôle non négligeable dans la régulation de la fonction de HIF-1α. Par contre, le résidu en position 498 est conservé chez différentes espèces sauf chez *Homo sapiens sapiens*. Pour les autres espèces, le résidu 498 est une proline alors que pour *Homo sapiens sapiens*, le résidu est une thréonine. Ce résidu phosphorylable, bien que spécifique à l'espèce *Homo sapiens sapiens*, pourrait avoir un rôle potentiel dans la régulation de HIF-1 chez l'humain.

Enfin, ces deux acides aminés se situent dans des séquences PEST. Comme mentionné au point 3.1.1., la présence de séquences PEST pourrait constituer des signaux potentiels responsables de la déstabilisation et de la dégradation de HIF-1α par le protéasome 26S en normoxie. En outre, il est décrit que l'addition de phosphates aux résidus sérine et thréonine, inhibe ou favorise l'ubiquitinylation et donc la dégradation de la protéine par le protéasome 26S. Il était donc intéressant d'étudier le rôle de ces deux acides aminés dans la régulation de l'activité de HIF-1.

1.1.2 Mutagenèse dirigée de HIF-1α par PCR

Comme décrit dans le chapitre "matériel et méthodes", la technique que nous avons utilisée nous a permis de générer des mutations ponctuelles des deux acides aminés T498 et S505 potentiellement phosphorylables par la GSK3β. Le principe est basé sur la réalisation d'une amplification PCR classique sur le plasmide parental pCMV-Myc/HIF-1α, grâce à deux amorces oligonucléotidiques synthétiques contenant la mutation désirée. Le choix des paires d'amorces a été fait de telle manière que les deux acides aminés soient mutés soit en acide glutamique (E) (acide aminé acide pouvant mimer la charge négative d'un phosphate), soit en alanine (A) (acide aminé non polaire ne pouvant pas être phosphorylé). Au total, quatre mutants ont donc été générés (Figure 1 et Annexe 2) et nommés :

TA498 : la thréonine 498 mutée en alanine.

TE498 : la thréonine 498 mutée en glutamate.

SA505 : la sérine 505 mutée en alanine.

SE505 : la sérine 505 mutée en glutamate.

L'amplification PCR a généré, au cours des différents cycles, des plasmides mutés qui différaient du plasmide parental par l'absence du site méthylé. Les plasmides parentaux ont

été ensuite restreints par une endonucléase Dpn I (Stratagene, CedarCreek, USA) reconnaissant un site de restriction méthylé.

Après une transformation de bactéries SURE $CaCl_2$ compétentes par les plasmides mutés, l'ADN plasmidique a été extrait. Une restriction diagnostique par EcoR I (Figure 2) a permis de vérifier qu'il s'agissait bien du plasmide pCMV-Myc/HIF-1α. Un séquençage et un alignement de séquence avec la séquence de la protéine HIF-1α sauvage (WT) ont permis de confirmer la présence de la mutation désirée au niveau de l'acide aminé d'intérêt. Les plasmides ont ensuite été purifiés pour être utilisés dans la suite du travail.

1.2 Expression des mutants

Avant d'étudier les effets de la mutation de la thréonine 498 et de la sérine 505, nous avons vérifié que les protéines HIF-1α mutées étaient bien exprimées dans les cellules HepG2 et ce, à un niveau équivalent à celui de la protéine sauvage.

Pour ce faire, les plasmides encodant la protéine sauvage ou mutée ont été transfectés dans des cellules d'hépatomes humains HepG2 pendant 24 heures. Ensuite, les cellules ont été incubées 16 heures en normoxie ou en hypoxie. Les cellules ont été lysées après cette incubation et les protéines récupérées pour réaliser un Western blot anti-HIF-1α (Figure 3).

Résultats et discussion

Pour les cellules contrôles ne surexprimant pas HIF-1α, on ne détecte pas, comme attendu, de HIF-1α en normoxie. Par contre, HIF-1α est bien stabilisé en hypoxie. Lorsque les cellules sont transfectées avec un plasmide d'expression de la protéine HIF-1α sauvage («WT»), on observe une nette expression de cette protéine en normoxie : expression qui augmente en hypoxie, suite à la stabilisation de la protéine. En normoxie, les différents mutants semblent être exprimés en quantité similaire à HIF-1α sauvage, si ce n'est peut-être le mutant SA505. De même, en hypoxie, les mutants TA498, SA505 et SE505 sont correctement surexprimés. Cependant, le mutant TE498 semble être moins abondant.

Il faut noter que l'intensité de la bande observée en hypoxie correspond à l'addition de la détection de HIF-1α endogène et de HIF-1α surexprimé. Il est donc possible que le mutant TE498 ne soit pas exprimé dans la cellule en hypoxie. Cela implique que la mutation de la

thréonine 498 en glutamate modifierait la stabilité de HIF-1α en hypoxie. Cette hypothèse devra être vérifiée en étudiant par exemple l'activité transcriptionnelle des mutants.

1.3 Activité transcriptionnelle des mutants

Afin de mesurer l'activité transcriptionnelle des mutants, nous avons utilisé un système rapporteur possédant six éléments de réponse à l'hypoxie (HRE) régulant l'expression d'un gène rapporteur codant pour la luciférase.

En pratique, les cellules ont été transfectées avec le système rapporteur et un vecteur d'expression encodant la protéine sauvage ou mutée. Le vecteur pCMV-Myc a servi de contrôle négatif. L'activité luciférase a été mesurée dans les cellules transfectées après 16 heures d'incubation en normoxie ou en hypoxie.

Résultats et discussion

La Figure 4 montre les résultats exprimés en niveau d'induction par rapport à l'activité transcriptionnelle mesurée dans les cellules contrôles en normoxie. Nous observons que l'activité transcriptionnelle de HIF-1 endogène (CTL) est nettement plus élevée en hypoxie par rapport à la normoxie.

L'activité transcriptionnelle de la protéine HIF-1 suite à la surexpression de la sous-unité HIF-1α, en normoxie, est plus élevée que l'activité transcriptionnelle de HIF-1 endogène mais reste plus faible que l'activité transcriptionnelle de HIF-1 endogène induite en hypoxie. En hypoxie, la surexpression de HIF-1α augmente nettement l'activité de HIF-1.

En ce qui concerne les différents mutants, nous n'observons pas de différence nette quant à leur niveau d'activité par rapport à la protéine sauvage tant en normoxie qu'en hypoxie. Cette expérience a été réalisée deux fois avec des résultats comparables. La mutation de l'un ou de l'autre des deux acides aminés de HIF-1α n'aurait donc pas d'influence sur l'activité transcriptionnelle de HIF-1.

1.4 Conclusion

L'hypothèse que le mutant TE498 ne soit pas exprimé dans les cellules en hypoxie, n'est pas possible. En effet, la probabilité que la diminution du niveau d'expression soit compensée par une augmentation équivalente de l'activité transcriptionnelle de la protéine, est très faible. Il aurait été intéressant de faire un Western blot anti-épitope Myc pour vérifier le niveau d'expression des mutants indépendamment de la protéine HIF-1 endogène. De plus, l'expression légèrement inférieure du mutant SA505 en normoxie, aurait pu être également vérifiée mais nous n'avons pas observé de variation dans l'activité transcriptionnelle de celui-ci par rapport à la protéine sauvage.

En conclusion, les résultats obtenus avec les mutants ne nous ont pas permis de mettre en évidence de variation du comportement de HIF-1 muté par rapport au HIF-1 sauvage. Les deux sites de mutation choisis ne sont donc probablement pas sujet à une modification par phosphorylation et ne semblent pas intervenir dans la régulation de l'activité de HIF-1.

2 Effet de l'hypoxie sur la GSK3β

Puisque les deux sites potentiels de phosphorylation par la GSK3β, situés dans le domaine ODD de HIF-1α, ne semblent pas jouer un rôle dans la régulation de l'activité de HIF-1, nous avons alors choisi d'utiliser une autre approche consistant à étudier sans *a priori* concernant le site de phosphorylation, dans un premier temps, l'effet de l'hypoxie sur la GSK3β et ensuite, l'effet de la modulation de l'activité de cette kinase sur la stabilisation de HIF-1α et sur l'activité transcriptionnelle de HIF-1.

2.1 Effet de l'hypoxie sur l'état de phosphorylation de la GSK3β

Comme expliqué dans l'introduction, la GSK3β est régulée par différents mécanismes. Parmi ceux-ci, les mécanismes de phosphorylation/déphosphorylation semblent jouer un rôle crucial. Lorsqu'elle est phosphorylée sur la sérine en position 9, la GSK3β est inactive. Par contre, la phosphorylation de la tyrosine en position 216 de la kinase est nécessaire à son activation. Il était donc intéressant d'observer l'influence de l'hypoxie sur l'état de phosphorylation de la GSK3β.

Comme le montre la Figure 5, le niveau d'expression de la GSK3β ne varie pas entre l'hypoxie et la normoxie après 16 heures d'incubation. Par contre, nous pouvons observer deux bandes présentant sur le gel un poids moléculaire apparent un peu plus élevé et pouvant peut-être correspondre aux deux formes phosphorylées de la GSK3β (la sérine 9 et la tyrosine 216). En effet, la migration des protéines dans un gel d'électrophorèse au SDS ne se fait pas toujours exactement selon leur poids moléculaire. La présence d'un phosphate (+/- 80 Da) change la charge totale de la protéine et peut affecter la quantité de SDS complexant la protéine dénaturée. Il est donc possible de séparer les formes phosphorylées des formes non phosphorylées.

Pour la première bande (1) au-dessus de celle correspondant à GSK3β, nous pouvons observer un niveau d'expression plus élevé en normoxie par rapport à l'hypoxie. La deuxième bande (2) a, au contraire, une intensité plus importante en hypoxie qu'en normoxie. Ces résultats suggèrent que l'état de phosphorylation de la GSK3β change en hypoxie.

Il était donc intéressant de mieux caractériser les formes phosphorylées de la GSK3. Pour ce faire, des anticorps spécifiques de chacune des deux formes phosphorylées de la GSK3 c'est-à-dire sur la sérine-9 et sur la tyrosine-216 ont été utilisés.

La Figure 6 présente le Western blot anti-phospho GSK3 (Ser-9) réalisé suite à une incubation des cellules en normoxie ou en hypoxie pendant 16 heures. Ce Western blot permet de mettre en évidence que la GSK3 est phosphorylée sur la sérine 9 en normoxie mais pas en hypoxie. Cela correspond aux résultats obtenus pour la Figure 5 pour la bande n°1 : celle-ci coïnciderait donc avec la forme phospho-sérine-9 de la GSK3.

Nous avons également utilisé un anticorps anti-phospho GSK3/ (Y279/216) pour tenter de mettre en évidence une variation du niveau d'expression de la forme phospho-tyrosine-216 de la GSK3. Malheureusement, le manque de spécificité de l'anticorps ne nous a pas permis d'obtenir des résultats concluants.

Néanmoins, nous pouvons émettre l'hypothèse que la bande n°2 de la Figure 5 correspondrait à la forme phospho-tyrosine-216 de la GSK3 : ce qui suggère que si la forme inactive de la GSK3 (phospho-ser-9) est présente en normoxie, alors la forme active (phospho-tyr-216) le serait en hypoxie. Cette hypothèse concernant la forme phospho-tyr-216 de la GSK3 reste cependant à être confirmée.

2.2 Effet de l'hypoxie sur la localisation de GSK3

Afin de confirmer que l'hypoxie ne modifie pas la quantité totale de GSK3, nous avons utilisé la technique d'immunofluorescence. De plus, cette technique permet de mettre en évidence la localisation subcellulaire de la protéine étudiée.

Le marquage de la GSK3 (Figure 7) dans les cellules incubées 16 heures en normoxie ou en hypoxie, confirme les résultats obtenus dans le Western blot présentés à la Figure 5. En effet, la quantité totale de la GSK3 ne semble pas varier en hypoxie par rapport à la normoxie. De plus, nous n'observons pas de changement de la localisation subcellulaire de la GSK3 quelles que soient les conditions.

2.3 Effet de l'hypoxie sur Akt, une kinase régulatrice de GSK3□

Comme un changement de l'état de phosphorylation de la GSK3□ est observé en hypoxie par rapport à la normoxie, nous avons recherché quelles sont les kinases qui pourraient être impliquées dans la régulation de l'état de phosphorylation de la GSK3□. Selon la littérature, la sérine/thréonine protéine kinase Akt peut phosphoryler GSK3□ sur la sérine 9. Nous avons donc décidé d'étudier l'influence de l'hypoxie sur le niveau d'expression de Akt.

Le Western blot présenté à la Figure 8 montre que le niveau d'expression de Akt est supérieur en normoxie par rapport à l'hypoxie. Nous pouvons corréler ce résultat avec celui de la Figure 6. En effet, en normoxie, le niveau d'expression de Akt coïncide avec un niveau élevé de la forme phospho-ser-9 de la GSK3□. Par contre, en hypoxie, une diminution du niveau d'expression de Akt s'accompagne d'une absence de phosphorylation de la GSK3□ sur la sérine 9.

Cependant, le Western blot anti-Akt révèle l'abondance de l'ensemble des formes de Akt. Or pour être active, Akt doit être phosphorylée sur la thréonine 308 et sur la sérine 473. Un Western blot anti-phospho Akt (Ser473) a été réalisé, mais l'anticorps n'était pas suffisamment spécifique pour nous permettre d'estimer la quantité de la forme active de Akt.

2.4 Effet du LiCl sur les formes phosphorylées de la GSK3□

Les résultats précédents montrent que l'hypoxie module la quantité de la kinase Akt. Cependant, nous n'avons pas de renseignement quant à son activité.

Une autre approche a donc été entreprise pour vérifier l'implication de Akt dans la régulation de GSK3□. Cette approche consiste à utiliser un activateur de Akt, le lithium. En effet, selon la littérature, le lithium active Akt en la bloquant sous sa forme phosphorylée, ce qui a pour conséquence la phosphorylation de la GSK3□ sur la sérine 9 et l'inactivation de celle-ci (Chalecka-Franaszek et Chuang, 1999).

La Figure 9, présentant un Western blot anti-GSK3□, réalisé sur des extraits protéiques des cellules incubées en normoxie ou en hypoxie en présence de différentes concentrations en lithium, nous indique que le lithium n'influence pas le niveau d'expression global de la GSK3□, ni en normoxie ni en hypoxie. Par contre, nous pouvons observer que l'intensité de la bande n°1, pouvant peut-être être attribuée à la forme phospho-sérine-9 de la GSK3□, ainsi que l'intensité de la bande n°2, pouvant peut-être être attribuée à la forme phospho-tyrosine-

216 de la GSK3β, varient en présence de lithium : le lithium augmente la quantité de la protéine phosphorylée présente dans la bande n°1, que nous avons attribuée à la forme phospho-sérine-9 de la GSK3β.

Un Western blot anti-phospho GSK3β Ser-9 (Figure 10) confirme ces effets. En normoxie, la présence de lithium augmente le niveau d'expression de la forme GSK3β phosphorylée sur la sérine 9. En hypoxie, nous pouvons également observer une augmentation du niveau d'expression de la forme phospho-ser-9 de la GSK3β mais seulement à une concentration en LiCl de 100 mM. Il est très intéressant de noter que la variation du niveau d'expression de la phospho-ser-9 GSK3β avec différentes concentrations en LiCl en normoxie ou en hypoxie, est très bien corrélée avec la variation du niveau d'expression de Akt en normoxie et en hypoxie et en présence de concentrations croissantes en lithium (Figure 11).

En ce qui concerne la bande n°2 correspondant probablement à la forme phospho-tyrosine-216 de la GSK3β, nous pouvons observer que, tant en hypoxie qu'en normoxie, l'ajout de LiCl à une concentration suffisante (100 mM) engendre une diminution de l'intensité de la bande. Ces résultats laissent supposer qu'il existerait une balance entre les deux formes phosphorylées et que si l'ajout de LiCl augmente l'expression de la forme phospho-ser-9 de la GSK3β, cela se ferait au détriment de la forme phospho-tyrosine-216.

Conclusion

La Figure 12 présente un schéma résumant l'ensemble des résultats obtenus jusqu'à présent. Akt serait active en normoxie et phosphorylerait la sérine 9 de la GSK3β conduisant à son inactivation. Le lithium aurait un effet additif à la normoxie en augmentant l'activité de Akt. En hypoxie, Akt serait inhibée permettant à la GSK3β de ne plus être inactivée. La forme active de la GSK3β serait alors présnte. Le lithium aurait un effet opposé à l'hypoxie et à une concentration suffisante (100 mM), il contrebalancerait l'effet de l'hypoxie en réactivant Akt avec pour conséquence d'inhiber la GSK3β activée par l'hypoxie.

2.5 Effet d'un inhibiteur de la PI3K sur les kinases Akt et GSK3β et sur les formes phosphorylées de la GSK3β

Si Akt régule l'activité de la GSK3β en hypoxie et/ou en normoxie, comment est-elle elle-même régulée ? La PI3K est souvent impliquée dans la régulation de l'activité de Akt (voir point 3.1.4 de l'Introduction). Il était donc intéressant de déterminer si la PI3K est impliquée dans la régulation de Akt en hypoxie.

Nous avons pour cela utilisé un inhibiteur compétitif de la liaison de l'ATP à la PI3K et étudié son effet sur les kinases Akt et GSK3β. Celui-ci est le LY294002, un dérivé synthétique des flavonoïdes.

La Figure 13 présente la superposition des Western blots anti-Akt, anti-GSK3β et anti-phospho-ser-9 GSK3β réalisés sur des extraits protéiques totaux de cellules incubées 16 heures en normoxie ou en hypoxie en absence ou en présence de LY294002 . Nous pouvons observer que l'ajout de LY294002 n'a pas d'influence sur le niveau d'expression de la GSK3β ni sur la forme phospho-ser-9 de la GSK3β. Par contre, il semblerait que tant en normoxie qu'en hypoxie, l'ajout de LY294002 augmenterait le niveau d'expression de Akt.

Ces résultats suggèrent que les effets de l'hypoxie sur les changements d'état de phosphorylation de GSK3β ne sont pas dépendants de l'activité de la PI3K puisque le LY294002 n'influence pas l'effet de l'hypoxie sur la diminution de la quantité de la forme phospho-ser-9 de celle-ci.

3 Effet de la modulation de l'activité de la GSK3β sur la protéine HIF-1

Les résultats décrits jusqu'à présent mettent en évidence une variation de l'état de phosphorylation de la GSK3β en hypoxie qui semble dépendante de Akt mais indépendante de la PI3K. La GSK3β étant une sérine/thréonine protéine kinase, elle pourrait phosphoryler HIF-1β et moduler ainsi sa stabilité mais aussi la régulation de l'activité du facteur de transcription HIF-1.

Afin d'étudier cette hypothèse, nous allons observer l'effet du LiCl sur les différents niveaux de régulation de HIF-1. Comme décrit précédemment, le lithium est un activateur de Akt. Il faut également noter que le lithium est aussi un inhibiteur de la GSK3β (voir point 4.1.4 de l'Introduction).

3.1 Effet du LiCl sur le niveau d'expression de HIF-1β

Deux approches ont été envisagées afin d'étudier les effets du lithium sur le niveau d'expression de HIF-1β. Pour ce faire, les cellules HepG2 ont été incubées 16 heures en normoxie ou en hypoxie en présence ou non de concentrations croissantes en lithium et la quantité de HIF-1β a été révélée par un Western blot et par une immunofluorescence.

Dans un premier temps, un Western blot anti-HIF-1β (Figure 14) a été réalisé sur des extraits protéiques totaux de cellules incubées 16 heures en normoxie ou en hypoxie en présence ou non de LiCl. Nous pouvons observer qu'en normoxie, HIF-1β n'est pas présent dans les cellules et que le lithium n'induit pas de stabilisation de HIF-1β. Par contre, en hypoxie, HIF-1β est stabilisé et son niveau d'expression augmente encore en présence de LiCl et ce, de manière dépendante de la concentration.

Le lithium a donc un effet sur la stabilisation de HIF-1β en hypoxie mais il ne suffit pas à lui seul à stabiliser la protéine en normoxie.

D'autre part, une immunofluorescence permettant de localiser HIF-1β a été réalisée (Figure 15). Des résultats similaires à ceux obtenus dans le Western blot ont été observés. En effet, en normoxie et en présence ou non de lithium, la protéine HIF-1β n'est pas présente dans les cellules. Par contre, en hypoxie, le niveau d'expression de cette sous-unité augmente.

La protéine est présente de manière abondante dans le noyau des cellules. De plus, son expression semble encore augmenter en présence de lithium. Un effet de la concentration en lithium est observé comme pour le Western blot présenté à la Figure 14.

Ces résultats montrent que le lithium qui active Akt et qui lève l'inhibition de Akt induite par l'hypoxie, conduit à une augmentation de l'expression de HIF-1. Cette observation n'est observée qu'en hypoxie, probablement parce qu'en normoxie, l'action de la HIF- prolyl hydroxylase est prépondérante et conduit à la dégradation de HIF-1. Le lithium inactive aussi directement la GSK3, ce qui s'additionne à son action au niveau de Akt. En effet, en activant Akt, le lithium conduit à la phosphorylation de la GSK3 sur la sérine 9 par Akt et donc à son inactivation. L'activation de Akt et/ou l'inactivation de GSK3 conduit donc à une augmentation de l'expression de HIF-1.

3.2 Effet du LiCl sur l'activité transcriptionnelle de HIF-1

Nous avons observé une augmentation du niveau d'expression de HIF-1 en présence de lithium en hypoxie. Mais cet effet est-il corrélé avec une augmentation de l'activité transcriptionnelle de HIF-1 ?

Pour répondre à cette question, nous avons tout d'abord suivi l'activité transcriptionnelle de HIF-1 à l'aide d'un système rapporteur utilisant les plasmides pGL3-SV40/6HRE et pRL-SV40. Le plasmide pGL3-SV40/6HRE possède 6 copies de l'élément HRE en aval du gène luciférase, fonctionnant en tant que enhancer et permettant un taux élevé de la transcription du gène rapporteur lorsque HIF-1 est activé. En pratique, nous avons transfecté des cellules HepG2 pendant 24 heures avec les deux plasmides du système rapporteur, puis incubé celles-ci pendant 16 heures en normoxie ou en hypoxie en présence ou non de concentrations croissantes en LiCl. L'activité de la luciférase a ensuite été mesurée.

La Figure 16 présente les résultats obtenus dans deux expériences différentes. Ces résultats sont similaires pour les deux expériences attestant de la reproductibilité de l'effet du lithium. Les cellules contrôles permettent de vérifier l'augmentation de l'activité transcriptionnelle de HIF-1 par l'hypoxie en absence de lithium. En normoxie, l'ajout de LiCl induit une diminution de l'activité transcriptionnelle de HIF-1. Cependant, pour une concentration en LiCl de 100 mM, nous observons une ré-augmentation de l'activité transcriptionnelle. Bien que ce résultat soit reproductible, nous n'avons d'explication à cette

observation. En hypoxie, l'activité transcriptionnelle de HIF-1 augmente fortement. Celle-ci diminue en présence de lithium de manière dépendante de la concentration.

Ces résultats indiquent que le lithium a un effet inhibiteur sur l'activité transcriptionnelle de HIF-1. Ces résultats sont différents de ceux obtenus précédemment puisque nous avions observé que le lithium augmentait la quantité de protéine HIF-1 en hypoxie (Figures 14 et 15). Cela implique que le lithium pourrait avoir deux effets différents dans la régulation de HIF-1 : d'une part il aurait un rôle positif sur la stabilisation de HIF-1 et d'autre part il modulerait négativement l'activité transcriptionnelle de HIF-1. Ces deux mécanismes étant localisés dans des compartiments cellulaires distincts, respectivement le cytosol et le noyau, ils pourraient impliquer des enzymes différentes régulées différemment par le lithium. De plus, nous pouvons constater que l'effet du lithium sur l'activité transcriptionnelle est prédominant par rapport à l'effet sur la stabilisation de la sous-unité puisque celle-ci est inhibée alors qu'il y a plus de protéines HIF-1.

Travaillant avec un système artificiel (6 boîtes HRE), nous avons voulu nous rapprocher d'un système plus physiologique en utilisant le plasmide pGL3-SV40/VEGF. Celui-ci possède également le gène codant pour la « firefly luciférase » mais son expression est sous la dépendance du promoteur authentique du VEGF humain. Ce promoteur contient une boîte HRE mais également d'autres sites consensus d'autres facteurs de transcription comme AP-1 et Sp-1. La Figure 17 présente les résultats exprimés en niveau d'induction par rapport à la normoxie en absence de lithium. En normoxie, on sait que l'expression du gène rapporteur est indépendante de HIF-1 et nous observons que le lithium n'influence pas cette expression. En hypoxie, l'activité transcriptionnelle de HIF-1 augmente et nous observons une augmentation importante de l'activité luciférase. Cette augmentation est inhibée par le lithium de manière dépendante de la concentration.

Ce résultat confirme l'effet inhibiteur du lithium observé sur l'activité transcriptionnelle de HIF-1 obtenu avec le système rapporteur dépendant uniquement des boîtes HRE.

3.3 Effet du LiCl sur l'activité physiologique de HIF-1

Qu'en est-il vraiment de l'effet du lithium sur la réponse d'adaptation des cellules à l'hypoxie médiée par HIF-1 ? En effet, le système rapporteur est la méthode de choix permettant de mesurer l'activité transcriptionnelle d'un facteur de transcription dans la

cellule. Cette méthode reste cependant artificielle puisqu'il faut transfecter les cellules et que l'accès de HIF-1 aux promoteurs endogènes n'est peut-être pas régulé de la même façon que la liaison de HIF-1 aux boîtes HRE situé sur le plasmide. Nous avons donc voulu caractériser l'effet du lithium sur l'activité physiologique de HIF-1. Nous avons choisi de mesurer la sécrétion du VEGF et la quantité d'ARNm de l'aldolase A. Le VEGF et l'aldolase A sont deux gènes cibles de HIF-1.

3.3.1 Le dosage du VEGF

Le VEGF est un facteur mitogène et chémoattractant spécifique des cellules endothéliales. En hypoxie, HIF-1 est nécessaire à l'augmentation de la transcription du gène du VEGF mais d'autres facteurs tels que AP-1 interviennent également. Cette augmentation de la transcription du gène du VEGF conduit à l'augmentation de la sécrétion de la protéine.

Nous avons mesuré la quantité de VEGF sécrétée par les cellules par un ELISA. Les cellules ont été incubées 16 heures en normoxie ou en hypoxie en présence ou non de concentrations croissantes en LiCl. Le milieu extracellulaire a été récupéré pour le dosage.

La Figure 18 présente un graphique reprenant les résultats d'une des deux expériences différentes que nous avons réalisées. Des résultats similaires ont été obtenus dans les deux cas. Les cellules secrètent du VEGF de manière constitutive. Cette sécrétion est augmentée de 2,5 fois en hypoxie. L'ajout de LiCl en normoxie augmente la quantité de VEGF sécrété. Cependant, pour une concentration en LiCl de 100 mM, nous observons une chute importante de la sécrétion du VEGF. En hypoxie, l'ajout de lithium à une faible concentration favorise la sécrétion du VEGF. En revanche, en augmentant la concentration de lithium, nous pouvons constater une nette diminution de la sécrétion du facteur.

On observe donc un effet biphasique de l'effet du lithium sur l'expression du VEGF pour lequel de faibles concentrations en lithium augmentent la sécrétion du VEGF alors qu'une inhibition est observée à 100 mM. Cet effet du lithium n'est pas en corrélation avec celui observé sur l'activité transcriptionnelle de HIF-1 mesurée par système rapporteur.

Il faut rappeler que HIF-1 n'est pas le seul facteur impliqué dans la transcription du gène codant pour le VEGF. Cependant, le lithium avait un effet parallèle sur l'expression de la luciférase dans le système rapporteur dépendant du promoteur du VEGF à celui observé en utilisant le système rapporteur dépendant uniquement des boîtes HRE. Ce qui suggère que le lithium aurait un effet différent en aval de la transcription du gène. Il faut noter que

l'augmentation de l'expression du VEGF en hypoxie dépend d'une augmentation de la transcription du gène encodant le VEGF mais aussi d'une augmentation de la stabilité de l'ARNm du VEGF (Levy *et al.*, 1998□Dibbens *et al.*, 1999). Le lithium pourrait influencer ce processus de manière différente de son effet sur l'activité de HIF-1. De plus, le lithium pourrait aussi avoir un effet sur les mécanismes impliqués dans la sécrétion du VEGF.

Nous n'avons cependant pas investigué plus loin l'effet de ces différents processus. Néanmoins, il est intéressant d'observer que, pour une forte concentration en LiCl, une inhibition de la sécrétion du VEGF est observée. Il pourrait dès lors être intéressant de rechercher le mécanisme de cette inhibition médié par le lithium et surtout de voir si cette inhibition est due à l'inhibition de l'activité transcriptionnelle de HIF-1.

3.3.2 Quantification de l'ARNm de l'aldolase A

Puisque l'effet du lithium sur la sécrétion du VEGF est difficile à interpréter probablement parce que d'autres processus que l'augmentation de la transcription du gène encodant le VEGF par HIF-1 en hypoxie interviennent également, nous avons décidé de suivre l'expression d'un autre gène dont l'expression en hypoxie est médiée par HIF-1. De plus, nous avons quantifié l'ARNm et non plus la protéine pour avoir une idée plus précise de la régulation de la transcription du gène. En effet, l'ARNm de l'aldolase A ne semble pas être stabilisé en hypoxie comme l'est celui du VEGF (Semenza *et al.*, 1996).

L'aldolase A est une enzyme intervenant dans la glycolyse en formant du phosphodihydroxyacétone et du phosphoglycéraldéhyde à partir de fructose-1,6-diphosphate. Nous avons utilisé la technique de la real-time PCR (PCR en temps réel) pour quantifier l'ARNm de l'aldolase A.

Les cellules ont été incubées 16 heures en normoxie ou en hypoxie en présence ou non de LiCl. Nous avons ensuite lysé les cellules et extrait leur ARN total. Une rétro-transcription a permis d'obtenir de l'ADNc à partir des ARNm pour réaliser la PCR qui va amplifier l'ADNc d'intérêt en présence d'amorces spécifiques. Le syber green, un agent intercalant fluorescent, permet de visualiser la phase d'amplification exponentielle de l'ADNc cible en s'intercalant entre les amplicons double brin. Le cycle auquel la courbe d'amplification croise le seuil de détection est inversement proportionnel à la quantité d'ADNc cible de départ, elle-même proportionnelle à la quantité d'ARNm de départ. Les résultats sont normalisés par rapport au nombre de cellules, estimé par la quantité d'ARNm d'un gène de référence dont on

sait que le niveau de transcription reste stable dans les conditions étudiées. Dans notre cas, nous avons utilisé le gène de la tubuline-β.

La Figure 19 présente le niveau d'induction de la quantité d'ARNm de l'aldolase A en fonction des différentes conditions, par rapport à la normoxie en absence de LiCl. En normoxie, une diminution de la quantité de l'ARNm de l'aldolase A est observée en présence de LiCl 20mM. Une ré-augmentation pour une concentration en LiCl de 100 mM est constatée. L'hypoxie augmente de 1,6 fois la quantité d'ARNm de l'aldolase. Le lithium inhibe cette augmentation de manière dépendante de la concentration.

Ces résultats coïncident tout à fait avec ceux obtenus pour le système rapporteur et confirment donc que le lithium aurait deux effets : d'une part, il augmenterait la stabilisation de HIF-1α en hypoxie et d'autre part, il inhibe l'activité transcriptionnelle de HIF-1. On observe une prédominance de l'effet sur l'activité transcriptionnelle par rapport à son effet sur la stabilisation de HIF-1α.

4 Effet de l'inhibition de la PI3K sur la régulation de HIF-1

Les résultats précédents suggèrent que la régulation de l'activité de HIF-1 peut parfois être dissociée de la régulation de la stabilisation de la sous-unité HIF-1α. Zhong *et al*. (2000) ont montré que la PI3Kinase pourrait moduler la stabilisation de HIF-1α par une voie dépendante de la kinase Akt alors que Arsham *et al*. (2002) montre que l'inhibition de la PI3K n'influence pas l'activité de HIF-1. Une manière de réconcilier ces observations serait de considérer que les deux processus ne sont pas toujours liés, comme le démontrent les résultats que nous avons obtenus en présence de lithium. Nous avons donc réalisé une étude similaire à celle réalisée avec le lithium, en utilisant un inhibiteur de la PI3K, le LY294002, et étudié son influence sur la stabilisation de HIF-1α et sur l'activité transcriptionnelle de HIF-1.

4.1 Effet du LY294002 sur le niveau d'expression de HIF-1α

Le niveau d'expression de la protéine HIF-1α a été suivie par Western blot. Les cellules ont été incubées 16 heures en normoxie ou en hypoxie en présence ou non de LY294002 et un Western blot anti-HIF-1α a été réalisé (Figure 20). Nous pouvons observer que HIF-1α n'est pas présent en normoxie et que le LY294002 n'induit pas la stabilisation de HIF-1α à lui seul. En hypoxie, le niveau d'expression de HIF-1α est élevé et il diminue en présence du LY294002. Cette observation laisse supposer que la PI3K est active en hypoxie et qu'elle intervient dans la stabilisation de HIF-1α puisque son inhibition inhibe cette stabilisation. Nous avons montré que le LY294002 ne semblait pas avoir d'influence sur le niveau d'expression de GSK3β ni sur l'état de phosphorylation de la kinase : ceci suggère qu'il existe une autre voie activée par la PI3K qui jouerait un rôle dans la stabilisation de HIF-1α. Cette voie pourrait néanmoins passer par Akt puisque nous avons observé un augmentation de son niveau d'expression en présence de LY294002.

4.2 Effet du LY294002 sur l'activité transcriptionnelle de HIF-1

Etant donné qu'en hypoxie et en présence de LY294002, nous observons une diminution du niveau d'expression de HIF-1□, nous avons étudié si l'activité transcriptionnelle de HIF-1 était influencée de la même façon. Nous avons utilisé le système rapporteur avec le plasmide pGL3-SV40/6HRE pour suivre cette activité. Les cellules ont été transfectées avec le système rapporteur et puis elles ont été incubées 16 heures en normoxie ou en hypoxie en présence ou non de LY294002 et l'activité de la luciférase a été quantifiée.

Les résultats présentés en niveau d'induction par rapport à la normoxie en absence de LY294002, indiquent que tant en normoxie qu'en hypoxie, la présence de LY294002, diminue l'activité transcriptionnelle de HIF-1 (Figure 21). Cette diminution peut probablement être attribuée à la diminution de l'abondance de HIF-1□ en présence de LY294002, bien qu'un autre effet au niveau de la régulation de l'activité transcriptionnelle puisse également intervenir de manière additive.

4.3 Effet du LY294002 sur la quantité d'ARNm de l'aldolase A

De manière similaire à l'étude réalisée concernant l'effet du lithium, nous avons voulu vérifier si l'effet observé en présence du LY294002 sur le système rapporteur, s'observe également en suivant la réponse physiologique endogène de HIF-1.

L'effet du LY294002 sur la quantité d'ARNm de l'aldolase A, un gène cible de HIF-1 a été suivi, et ce en utilisant la real-time PCR.

La Figure 22 présente les résultats exprimés en niveau d'induction par rapport à la normoxie sans LY294002 suite à une incubation de 16 heures. Nous pouvons observer que le LY294002 n'influence pas la quantité d'ARNm de l'aldolase A en normoxie. Par contre, en hypoxie, la présence de LY294002 provoque une diminution de la quantité d'ARNm de l'aldolase A.

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus en suivant l'expression du gène luciférase dans le système rapporteur et indiquent que l'activité PI3K est importante pour la stabilisation de HIF-1□ et l'activation de HIF-1 en hypoxie.

Les accidents cardio-vasculaires et les cancers sont les causes majeures de décès dans nos pays développés. Une meilleure compréhension des mécanismes déclenchant ces pathologies permettrait peut-être d'élaborer des moyens plus efficaces pour soigner les patients atteints de ces maladies.

Une des conséquences communes de ces deux maladies est le manque d'oxygène pour les cellules endothéliales suite aux troubles circulatoires engendrés par les accidents cardio-vasculaires et pour les cellules cancéreuses au sein du nodule tumoral qui se situent au-delà de la limite de diffusion de l'oxygène.

Soumise à des conditions hypoxiques, la cellule développe des mécanismes de compensation lui permettant de s'adapter à cette déficience en oxygène et de survivre.

En hypoxie, la cellule oriente son métabolisme énergétique vers la voie de la glycolyse suite à la diminution des phosphorylations oxydatives (Janssens *et al.*, 1995). De plus, l'oxygénation des tissus et des cellules est favorisée par néo-vascularisation et en stimulant l'érythropoïèse. HIF-1 (Hypoxia inducible factor-1) est un facteur de transcription qui a été identifié par Wang et Semenza (1994) comme étant spécifiquement activé par l'hypoxie. HIF-1 joue un rôle essentiel dans l'expression de différents gènes tels que l'érythropoïétine, le VEGF et diverses enzymes de la glycolyse (aldolase A, énolase, phosphoglycérate kinase-1). Tous ces gènes jouent un rôle crucial dans l'adaptation des cellules et des tissus au manque d'oxygène.

A ce jour, tous les mécanismes de régulation du facteur de transcription HIF-1 ne sont pas encore connus. La stabilisation de la sous-unité HIF-1□ est un des mécanismes principaux conduisant à l'activation de HIF-1 en hypoxie. D'autres mécanismes sont également nécessaires. C'est notamment le cas des phosphorylations. Parmi les kinases qui pourraient être impliquées, la GSK3□ a été décrite dans la littérature comme pouvant phosphoryler HIF-1□.

Le but du mémoire était donc d'étudier la régulation de l'activation de HIF-1 et plus spécifiquement le rôle de la GSK3□ sur la régulation de l'activité du facteur de transcription.

En effet, la littérature montre que l'activation de la voie PI3K-Akt-GSK3□ par l'hypoxie peut induire la stabilisation de HIF-1□ (Zhong *et al.*, 2000; Sodhi *et al.*, 2001). Nous avons donc voulu rechercher dans la protéine HIF-1□ des sites potentiels de phosphorylation par la GSK3□ dans le but de les muter. Différents programmes informatiques nous ont permis, sur base de la séquence consensus de phosphorylation connue pour la GSK3□, de déterminer deux résidus potentiellement phosphorylables par la GSK3□ dans le domaine ODD (Oxygen-

dependent Degradation Domain) de la protéine HIF-1□: la thréonine en position 498 et la sérine en position 505. La technique de mutagenèse dirigée par PCR nous a permis de générer des mutations ponctuelles de ces deux acides aminés soit en acide glutamique (E) (acide aminé acide pouvant mimer un phosphate par sa charge négative) soit en alanine (A) (acide aminé neutre ne pouvant pas être phosphorylé). Au total, quatre mutants ont donc été générés à savoir les mutants TE498, TA498, SE505 et SA505.

La première étape a été de vérifier l'expression de ces mutants. Un western blot anti-HIF-1□ a donc été réalisé et a mis en évidence qu'en normoxie, les différents mutants semblent être exprimés en quantité similaire à la protéine HIF-1□ sauvage. En hypoxie, excepté peut-être pour le mutant TE498, les mutants sont également correctement surexprimés. Il aurait néanmoins été intéressant de faire un Western blot anti-épitope Myc pour vérifier le niveau d'expression des mutants indépendamment de la protéine HIF-1□ endogène.

La deuxième étape a été d'observer l'effet de la mutation sur l'activité transcriptionnelle de HIF-1. Nous n'avons cependant pas observé de différence nette quant au niveau d'activité des mutants par rapport à la protéine sauvage tant en normoxie qu'en hypoxie.

En conclusion, nous n'avons pas pu mettre en évidence une variation du comportement de la protéine HIF-1□ mutée par rapport à la protéine HIF-1□ sauvage. Les deux sites de mutations choisis ne semblent donc pas jouer un rôle dans la régulation de l'activité de HIF-1.

Une autre approche a ensuite été envisagée pour étudier le rôle de la GSK3□ sur la régulation de HIF-1. Dans un premier temps, il convenait d'étudier l'effet de l'hypoxie sur l'activité de la GSK3□ dans les cellules HepG2 et ensuite, de vérifier si la modulation de l'activité de cette kinase avait un impact sur la stabilisation de HIF-1□ et sur l'activité transcriptionnelle de HIF-1.

Nous avons pu mettre en évidence par Western blot que la quantité totale de la GSK3□ ne variait pas en hypoxie. Par contre, la forme phospho-ser-9 de la GSK3□ et la kinase Akt, une sérine/thréonine protéine kinase capable de phosphoryler la GSK3□ sur la sérine 9, sont toutes deux présentes en quantité abondante en normoxie mais en quantité moindre en hypoxie. Akt serait donc active en normoxie et phosphorylerait la sérine 9 de la GSK3□ conduisant à son inactivation. En hypoxie, Akt serait inhibée permettant à la GSK3□ de ne plus être inactivée. Ces résultats ont été confirmés en utilisant un activateur de Akt, le LiCl. Le lithium aurait alors un effet additif à la normoxie et un effet opposé à l'hypoxie.

Il est souvent décrit dans la littérature que la PI3K active la voie Akt-GSK3□. Nous avons donc utilisé un inhibiteur de la PI3K, le LY294002, pour déterminer si cette kinase est impliquée dans la régulation de Akt. Les résultats ont révélé que bien qu'une légère augmentation du niveau d'expression de Akt soit observée en présence de LY294002, cet inhibiteur n'a pas d'effet sur le niveau d'expression de la GSK3□ ni sur la quantité de la forme phospho-ser-9 de la GSK3□. Nous en avons donc conclu que l'état de phosphorylation de la GSK3□ variait en hypoxie et qu'il semblait dépendre de Akt mais pas de la PI3K. En normoxie, Akt inactiverait la GSK3□ et en hypoxie, puisque Akt serait inhibée, la GSK3□ retrouverait sa forme active.

Cette hypothèse nécessite quelques expériences complémentaires pour être confirmée. Akt, pour être active, nécessite d'être phosphorylée. Les résultats présentés à la Figure 8 (Résultats et Discussion) montrent que la quantité totale d'Akt diminue en hypoxie mais ne donnent pas de renseignements quant à l'activité de cette kinase. Il faudrait donc réaliser un Western blot anti-phospho Akt pour mettre en évidence que la forme phosphorylée active de Akt est bien présente en normoxie et absente en hypoxie. Un kinase assay *in vitro* mesurant directement l'activité d'Akt pourrait également être réalisé. Nous avons également des informations quant à l'état de phosphorylation de la GSK3□ mais elles devraient être complètées. Par exemple un Western blot anti-phospho-Tyr-216 de la GSK3□ permettrait de déterminer si la kinase GSK3□ est présente sous sa forme active en hypoxie. De plus, une mesure de l'activité kinasique de la GSK3□ par un kinase assay permettrait de mesurer l'activité de la kinase en normoxie et en hypoxie. Finalement, il faudrait encore déterminer les mécanismes régulant l'activité de Akt en hypoxie.

La GSK3□ étant une sérine/thréonine kinase pouvant phosphoryler des facteurs de transcription, nous avons voulu étudier si la modulation de son activité avait une influence sur la stabilisation de HIF-1□ et sur l'activité du facteur de transcription HIF-1. Pour ce faire, nous avons utilisé le LiCl qui est à la fois un activateur de Akt et un inhibiteur de la GSK3□.

Deux approches ont été choisies pour étudier les effets du lithium sur le niveau d'expression de HIF-1□ : un Western blot anti-HIF-1□ et une immunofluorescence. Des résultats similaires ont été obtenus dans les deux cas. HIF-1□ n'est pas stabilisé en normoxie, même en présence de lithium alors qu'en hypoxie, son niveau d'expression augmente de manière dépendante de la concentration en lithium. La Figure 1 présente l'effet putatif du LiCl sur l'expression de HIF-1□ en hypoxie. Une des hypothèses serait que Akt aurait une action

stabilisante sur HIF-1 en hypoxie. Le fait de l'activer par le lithium augmenterait son effet sur la protéine et on observerait alors une augmentation du niveau d'expression de HIF-1. Cette augmentation n'est observée qu'en hypoxie, probablement parce qu'en normoxie, l'action de la HIF- prolyl hydroxylase est prépondérante et conduit à la dégradation de HIF-1.

L'utilisation d'un dominant négatif et d'une forme constitutivement active de Akt permettrait de déterminer si Akt est nécessaire à la régulation de la stabilité de HIF-1 en hypoxie.

L'activité transcriptionnelle de HIF-1 est le deuxième niveau de régulation de l'activité de HIF-1 étudié. Deux systèmes rapporteurs ont été utilisés pour suivre l'activité transcriptionnelle de HIF-1 dans les différentes conditions étudiées : dans un premier temps, un système artificiel spécifique au facteur de transcription HIF-1 (pGL3-SV40/6HRE) et ensuite, un promoteur authentique contenant un site HRE mais également d'autres sites consensus d'autres facteurs de transcription (pGL3-SV40/VEGF).

Les résultats obtenus montrent que le lithium induit une diminution de l'activité transcriptionnelle de HIF-1 en normoxie et en hypoxie. Cela implique que le lithium pourrait avoir deux effets différents dans la régulation de HIF-1: il aurait un rôle stabilisant sur HIF-1 mais il diminuerait l'activité transcriptionnelle de HIF-1.

Deux approches plus physiologiques ont été testées pour confirmer cette diminution de l'activité transcriptionnelle de HIF-1 en présence de lithium : le dosage du VEGF sécrété et la quantification de l'ARNm de l'aldolase A.

Les résultats concernant la sécrétion du VEGF diffèrent de ceux obtenus avec le système rapporteur. En effet, tant en normoxie qu'en hypoxie, l'ajout de LiCl à faibles concentrations favorise la sécrétion du VEGF. Par contre, pour une concentration élevée, la quantité de VEGF sécrété diminue fortement. Cet effet du lithium ne coïncide pas avec celui observé dans le système rapporteur. Cela suggère que d'autres mécanismes impliqués dans la stabilisation de l'ARNm du VEGF et/ou dans la sécrétion du VEGF sont régulés par le lithium.

Néanmoins, il faut noter qu'une forte concentration en LiCl inhibe la sécrétion du VEGF. Il pourrait donc être intéressant de rechercher le mécanisme d'inhibition médié par le lithium en sachant que la néo-vascularisation des tumeurs est un problème majeur dans le développement des cancers.

Les résultats de la quantification de l'ARNm de l'aldolase A coïncident tout à fait avec ceux obtenus pour le système rapporteur et confirment l'effet inhibiteur du lithium sur l'activité transcriptionnelle de HIF-1. Cet effet est prédominant sur l'effet du lithium au niveau de la stabilisation de HIF-1 puisqu'on observe une inhibition de l'activité de HIF-1 alors qu'il y a une augmentation de la quantité de HIF-1.

La Figure 2 présente une hypothèse permettant d'intégrer l'effet du lithium sur les kinases étudiées et sur l'activité transcriptionnelle de HIF-1. En hypoxie, Akt serait inactive et ne pourrait donc pas phosphoryler la GSK3 sur la sérine 9. La GSK3 s'activant par autophosphorylation ou par un autre mécanisme inconnu, pourrait phosphoryler HIF-1 sur son domaine de transactivation et rendre ainsi HIF-1 transcriptionnellement actif. L'ajout de lithium en hypoxie réactiverait Akt qui phosphorylerait la sérine 9 de la GSK3, l'inhibant. De plus le lithium inhibe directement la GSK3. Il en résulterait une incapacité de la GSK3 à phosphoryler HIF-1. HIF-1 ne serait alors plus transcriptionnellement actif.

L'utilisation d'un inhibiteur plus spécifique de la GSK3 ou d'un dominant négatif de la kinase permettra de confirmer cette hypothèse. A plus long terme, la technique du double hybride permettrait aussi de vérifier si les deux protéines interagissent et un test de phosphorylation *in vitro* pourrait confirmer la phosphorylation de HIF-1 par la GSK3.

La dernière partie du travail consistait à vérifier l'implication de la PI3K dans la régulation de HIF-1. Nous avons d'abord testé l'effet du LY294002 sur le niveau d'expression de HIF-1. L'ajout du LY294002 n'induit pas la stabilisation de HIF-1 en normoxie. En hypoxie, le niveau d'expression de HIF-1 diminue en présence de LY294002.

L'activité transcriptionnelle de HIF-1 a ensuite été mesurée. Les résultats montrent une diminution de l'activité transcriptionnelle de HIF-1 en présence de LY294002 tant en normoxie qu'en hypoxie. Cette diminution peut probablement être attribuée à la diminution de l'abondance de HIF-1 en présence de LY294002. La quantité d'ARNm de l'aldolase A a également été mesurée. En normoxie, le LY294002 n'influence pas la quantité d'ARNm de l'enzyme alors qu'en hypoxie, il induit une diminution de cette quantité. Ces résultats coïncident avec ceux obtenus pour le système rapporteur et indiquent que l'activité de la PI3K est requise pour la stabilisation de HIF-1 et pour l'activation subséquente de HIF-1 en hypoxie.

L'ensemble des résultats obtenus concernant l'effet du LY294002 peut peut-être coïncider avec une des hypothèses précédentes si on considère que la PI3K influence l'activité

de Akt. La PI3K serait active en hypoxie et produirait des PIP3 (phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate). Akt serait alors activée et induirait la stabilisation de HIF-1. Le LY294002 en inhibant la PI3K, inactiverait Akt qui ne pourrait plus stabiliser HIF-1. La diminution du niveau d'expression de HIF-1 se répercuterait sur le niveau d'activité de transcription de HIF-1.

Cependant, cette hypothèse est en contradiction avec celle concernant la régulation des kinases par l'hypoxie. En effet, nous avions suggéré que Akt était inactive en hypoxie puisque nous n'observions pas la forme phospho-ser-9 de la GSK3. Il se pourrait en fait que les événements se passent en deux temps (Figure 3). Akt serait activée au début de l'hypoxie par la PI3K et stabiliserait HIF-1. Ensuite, Akt sous sa forme active serait dégradée, ce qui permettrait à la GSK3 de s'activer et de phosphoryler HIF-1 stabilisé. HIF-1 serait alors transcriptionnellement actif. Pour confirmer cette hypothèse « intégrative », il serait nécessaire d'observer les différentes formes actives et inactives des kinases Akt et GSK3 au cours du temps d'incubation en hypoxie. Un Western blot préliminaire anti-phospho-Ser-9 de la GSK3 réalisé sur des extraits de cellules incubées 5 heures en normoxie et en hypoxie en présence ou en absence de LiCl 20 et 100 mM et de LY294002, montre en effet que les formes phosphorylées de la GSK3 ne varie pas de la normoxie à l'hypoxie, suggérant hypothétiquement que Akt reste active au début de l'hypoxie et continue à phosphoryler la GSK3 sur sa sérine 9. Le LiCl n'affecte pas la forme ser-9 de la GSK3 quelles que soient les conditions alors que le LY294002 diminue considérablement le niveau de phosphorylation de la sérine 9 de la GSK3 probablement en agissant rapidement sur la PI3K et sur Akt. Toutefois, des expériences supplémentaires doivent être réalisées de façon à confirmer ou infirmer ces premiers résultats et l'idée de cette hypothèse « intégrative ». De plus, il faudrait déterminer le mécanisme impliqué dans la stabilisation de HIF-1 médié par Akt. Enfin, si la GSK3 peut phosphoryler HIF-1 et conduire à l'activation du facteur HIF-1, il serait intéressant de chercher des sites potentiels de phosphorylation par cette kinase dans les domaines de transactivation de la protéine HIF-1 et non plus dans le domaine ODD. On pourrait ensuite muter ces résidus et vérifier si ces mutations ont un effet sur l'activité transcriptionnelle de HIF-1 sans affecter la stabilisation de HIF-1.

Pour conclure, les mécanismes de régulation de l'activité de HIF-1 commencent à être de mieux en mieux compris mais il ne faut pas oublier qu'ils peuvent être dépendants du type cellulaire et de l'espèce. C'est pourquoi il conviendrait d'effectuer un maximum d'expériences

sur les cellules endothéliales humaines en utilisant les données obtenues sur les autres modèles cellulaires. Les cellules endothéliales sont en effet les premières à souffrir d'une déficience de l'apport en oxygène *in vivo* suite aux accidents cardio-vasculaires par exemple.

Annexe 1: **A:** Séquence protéique de HIF-1□.
B: Séquence codante de HIF-1□.

A

MEGAGGANDK KKISSERRKE KSRDAARSRR SKESEVFYEL AHQLPLPHNV SSHLDKASVM
RLTISYLRVR KLLDAGDLDI EDDMKAQMNC FYLKALDGFV MVLTDDGDMI YISDNVNKYM
GLTQFELTGH SVFDFTHPCD HEEMREMLTH RNGLVKKGKE QNTQRSFFLR MKCTLTSRGR
TMNIKSATWK VLHCTGHIHV YDTNSNQPQC GYKKPPMTCL VLICEPIPHP SNIEIPLDSK
TFLSRHSLDM KFSYCDERIT ELMGYEPEEL LGRSIYEYYH ALDSDHLTKT HHDMFTKGQV
TTGQYRMLAK RGGYVWVETQ ATVIYNTKNS QPQCIVCVNY VVSGIIQHDL IFSLQQTECV
LKPVESSDMK MTQLFTKVES EDTSSLFDKL KKEPDALTLL APAAGDTIIS LDFGSNDTET
DDQQLEEVPL YNDVMLPSPN EKLQNINLAM SPLPTAETPK PLRSSADPAL NQEVALKLEP
NPESLELSFT MPQIQDQTPS PSDGSTRQSS PEPNSPSEYC FYVDSDMVNE FKLELVEKLF
AEDTEAKNPF STQDTDLDLE MLAPYIPMDD DFQLRSFDQL SPLESSSASP ESASPQSTVT
VFQQTQIQEP TANATTTTAT TDELKTVTKD RMEDIKILIA SPSPTHIHKE TTSATSSPYR
DTQSRTASPN RAGKGVIEQT EKSHPRSPNV LSVALSQRTT VPEEELNPKI LALQNAQRKR
KMEHDGSLFQ AVGIGTLLQQ PDDHAATTSL SWKRVKGCKS SEQNGMEQKT IILIPSDLAC
RLLGQSMDES GLPQLTSYDC EVNAPIQGSR NLLQGEELLR ALDQVN

B

atggagggcgccggcggcgcgaacgacaagaaaaagataagttctgaacgtcgaaaagaaaagtctcgagatgcagccag
atctcggcgaagtaaagaatctgaagtttttatgagcttgctcatcagttgccacttccacataatgtgagttcgcatc
ttgataaggcctctgtgatgaggcttaccatcagctatttgcgtgtgaggaaacttctggatgctggtgatttggatatt
gaagatgacatgaaagcacagatgaattgcttttatttgaaagccttggatggttttgttatggttctcacagatgatgg
tgacatgatttacatttctgataatgtgaacaaatacatgggattaactcagtttgaactaactggacacagtgtgtttg
attttactcatccatgtgaccatgaggaaatgagagaaatgcttacacacagaaatggccttgtgaaaaagggtaaagaa
caaaacacacagcgaagctttttttctcagaatgaagtgtaccctaactagccgaggaagaactatgaacataaagtctgc
aacatggaaggtattgcactgcacaggccacattcacgtatatgataccaacagtaaccaacctcagtgtgggtataaga
aaccacctatgacctgcttggtgctgatttgtgaacccattcctcacccatcaaatattgaaattcctttagatagcaag
actttcctcagtcgacacagcctggatatgaaattttcttattgtgatgaaagaattaccgaattgatgggatatgagcc
agaagaacttttaggccgctcaatttatgaatattatcatgctttggactctgatcatctgaccaaaactcatcatgata
tgtttactaaaggacaagtcaccacaggacagtacaggatgcttgccaaaagaggtggatatgtctgggttgaaactcaa
gcaactgtcatatataacaccaagaattctcaaccacagtgcattgtatgtgtgaattacgttgtgagtggtattattca
gcacgacttgattttctcccttcaacaaacagaatgtgtccttaaaccggttgaatcttcagatatgaaaatgactcagc
tattcaccaaagttgaatcagaagatacaagtagcctctttgacaaacttaagaaggaacctgatgctttaactttgctg
gccccagccgctggagacacaatcatatctttagattttggcagcaacgacacagaaactgatgaccagcaacttgagga
agtaccattatataatgatgtaatgctcccctcacccaacgaaaaattacagaatataaatttggcaatgtctccattac
ccaccgctgaaacgccaaagccacttcgaagtagtgctgaccctgcactcaatcaagaagttgcattaaaattagaacca
aatccagagtcactggaactttcttttaccatgccccagattcaggatcagacacctagtccttccgatggaagcactag
acaaagttcacctgagcctaatagtcccagtgaatattgttttttatgtggatagtgatatggtcaatgaattcaagttgg
aattggtagaaaaactttttgctgaagacacagaagcaaagaacccattttctactcaggacacagatttagacttggag
atgttagctccctatatcccaatggatgatgacttccagttacgttccttcgatcagttgtcaccattagaaagcagttc
cgcaagccctgaaagcgcaagtcctcaaagcacagttacagtattccagcagactcaaatacaagaacctactgctaatg
ccaccactaccactgccaccactgatgaattaaaaacagtgacaaaagaccgtatggaagacattaaaatattgattgca
tctccatctcctacccacatacataaagaaactactagtgccacatcatcaccatatagagatactcaaagtcggacagc
ctcaccaaacagagcaggaaaaggagtcatagaacagacagaaaaatctcatccaagaagccctaacgtgttatctgtcg
ctttgagtcaaagaactacagttcctgaggaagaactaaatccaaagatactagctttgcagaatgctcagagaaagcga
aaaatggaacatgatggttcacttttcaagcagtaggaattggaacattattacagcagccagacgatcatgcagctac
tacatcactttcttggaaacgtgtaaaaggatgcaaatctagtgaacagaatggaatggagcaaaagacaattattttaa
taccctctgatttagcatgtagactgctggggcaatcaatggatgaaagtggattaccacagctgaccagttatgattgt
gaagttaatgctcctatacaaggcagcagaaacctactgcagggtgaagaattactcagagctttggatcaagttaac

Annexe 2: Liste des primers utilisés pour la mutagenèse dirigée par PCR.

5'T498A	5’-GAT-TCA-GGA-TCA-GGC-TCC-TAG-TCC-TTC-3’
3'T498A	5’-GAA-GGA-CTA-GGA-GCC-TGA-TCC-TGA-ATC-3’
5'T498E	5’-GAT-TCA-GGA-TCA-GGA-GCC-TAG-TCC-TTC-3’
3'T498E	5’-GAA-GGA-CTA-GGC-TCC-TGA-TCC-TGA-ATC 3’
5'S505A	5’-CCT-TCC-GAT-GGA-GCT-ACT-AGA-CAA-AG-3’
3'S505A	5’-CTT-TGT-CTA-GTA-GCT-CCA-TCG-GAA-GG-3’
5'S505E	5’-CCT-TCC-GAT-GGA-GAG-ACT-AGA-CAA-AG-3’
3'S505E	5’-CTT-TGT-CTA-GTC-TCT-CCA-TCG-GAA-GG-3’

- Archer S. L., H. L. Reeve, E. Michelakis, L. Puttagunta, R. Waite, D. P. Nelson, M. C. Dinauer and E. K. Weir, *O2 sensing is preserved in mice lacking the gp91 phox subunit of NADPH oxidase*, Proc Natl Acad Sci U S A, 96, 7944-9., 1999.
- Arnould T., C. Michiels, I. Alexandre and J. Remacle, *Effect of hypoxia upon intracellular calcium concentration of human endothelial cells*, J Cell Physiol, 152, 215-21, 1992.
- Arsham A. M., D. R. Plas, C. B. Thompson and M. C. Simon, *PI3K/Akt signaling is neither required for hypoxic stabilization of HIF- 1alpha nor sufficient for HIF-1-dependent target gene transcription*, J Biol Chem, 2002.
- Baeuerle P. A. and T. Henkel, *Function and activation of NF-kappa B in the immune system*, Annu Rev Immunol, 12, 141-79, 1994.
- Beg A. A., T. S. Finco, P. V. Nantermet and A. S. Baldwin, Jr., *Tumor necrosis factor and interleukin-1 lead to phosphorylation and loss of I kappa B alpha: a mechanism for NF-kappa B activation*, Mol Cell Biol, 13, 3301-10., 1993.
- Beitner-Johnson D., R. T. Rust, T. C. Hsieh and D. E. Millhorn, *Hypoxia activates Akt and induces phosphorylation of GSK-3 in PC12 cells*, Cell Signal, 13, 23-7, 2001.
- Bournat J. C., A. M. Brown and A. P. Soler, *Wnt-1 dependent activation of the survival factor NF-kappaB in PC12 cells*, J Neurosci Res, 61, 21-32., 2000.
- Boyle W. J., T. Smeal, L. H. Defize, P. Angel, J. R. Woodgett, M. Karin and T. Hunter, *Activation of protein kinase C decreases phosphorylation of c-Jun at sites that negatively regulate its DNA-binding activity*, Cell, 64, 573-84., 1991.
- Chalecka-Franaszek E. and D. M. Chuang, *Lithium activates the serine/threonine kinase Akt-1 and suppresses glutamate-induced inhibition of Akt-1 activity in neurons*, Proc Natl Acad Sci U S A, 96, 8745-50., 1999.
- Chandel N. S., E. Maltepe, E. Goldwasser, C. E. Mathieu, M. C. Simon and P. T. Schumacker, *Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription*, Proc Natl Acad Sci U S A, 95, 11715-20., 1998.
- Chandel N. S., D. S. McClintock, C. E. Feliciano, T. M. Wood, J. A. Melendez, A. M. Rodriguez and P. T. Schumacker, *Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1alpha during hypoxia: a mechanism of O2 sensing*, J Biol Chem, 275, 25130-8., 2000.
- Chu B., F. Soncin, B. D. Price, M. A. Stevenson and S. K. Calderwood, *Sequential phosphorylation by mitogen-activated protein kinase and glycogen synthase kinase 3 represses transcriptional activation by heat shock factor-1*, J Biol Chem, 271, 30847-57., 1996.

- Cockman M. E., N. Masson, D. R. Mole, P. Jaakkola, G. W. Chang, S. C. Clifford, E. R. Maher, C. W. Pugh, P. J. Ratcliffe and P. H. Maxwell, *Hypoxia inducible factor-alpha binding and ubiquitylation by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein*, J Biol Chem, 275, 25733-41., 2000.

- Cohen P., *The Croonian Lecture 1998. Identification of a protein kinase cascade of major importance in insulin signal transduction*, Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 354, 485-95., 1999.

- Cross D. A., D. R. Alessi, P. Cohen, M. Andjelkovich and B. A. Hemmings, *Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B*, Nature, 378, 785-9., 1995.

- Datta S. R., A. Brunet and M. E. Greenberg, *Cellular survival: a play in three Akts*, Genes Dev, 13, 2905-27, 1999.

- Dibbens J. A., D. L. Miller, A. Damert, W. Risau, M. A. Vadas and G. J. Goodall, *Hypoxic regulation of vascular endothelial growth factor mRNA stability requires the cooperation of multiple RNA elements*, Mol Biol Cell, 10, 907-19, 1999.

- Diehl J. A., M. Cheng, M. F. Roussel and C. J. Sherr, *Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization*, Genes Dev, 12, 3499-511., 1998.

- Ehleben W., T. Porwol, J. Fandrey, W. Kummer and H. Acker, *Cobalt and desferrioxamine reveal crucial members of the oxygen sensing pathway in HepG2 cells*, Kidney Int, 51, 483-91., 1997.

- Eldar-Finkelman H. and E. G. Krebs, *Phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by glycogen synthase kinase 3 impairs insulin action*, Proc Natl Acad Sci U S A, 94, 9660-4., 1997.

- Ema M., K. Hirota, J. Mimura, H. Abe, J. Yodoi, K. Sogawa, L. Poellinger and Y. Fujii-Kuriyama, *Molecular mechanisms of transcription activation by HLF and HIF1alpha in response to hypoxia: their stabilization and redox signal-induced interaction with CBP/p300*, Embo J, 18, 1905-14, 1999.

- Embi N., D. B. Rylatt and P. Cohen, *Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase*, Eur J Biochem, 107, 519-27., 1980.

- Farr G. H., 3rd, D. M. Ferkey, C. Yost, S. B. Pierce, C. Weaver and D. Kimelman, *Interaction among GSK-3, GBP, axin, and APC in Xenopus axis specification*, J Cell Biol, 148, 691-702., 2000.

- Fiol C. J., J. H. Haseman, Y. H. Wang, P. J. Roach, R. W. Roeske, M. Kowalczuk and A. A. DePaoli-Roach, *Phosphoserine as a recognition determinant for glycogen synthase kinase- 3: phosphorylation of a synthetic peptide based on the G-component of protein phosphatase-1*, Arch Biochem Biophys, 267, 797-802., 1988.
- Fiol C. J., A. M. Mahrenholz, Y. Wang, R. W. Roeske and P. J. Roach, *Formation of protein kinase recognition sites by covalent modification of the substrate. Molecular mechanism for the synergistic action of casein kinase II and glycogen synthase kinase 3*, J Biol Chem, 262, 14042-8., 1987.
- Frame S. and P. Cohen, *GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery*, Biochem J, 359, 1-16., 2001a.
- Frame S., P. Cohen and R. M. Biondi, *A common phosphate binding site explains the unique substrate specificity of GSK3 and its inactivation by phosphorylation*, Mol Cell, 7, 1321-7., 2001b.
- Goldberg M. A. and T. J. Schneider, *Similarities between the oxygen-sensing mechanisms regulating the expression of vascular endothelial growth factor and erythropoietin*, J Biol Chem, 269, 4355-9., 1994.
- Gothié and Pouysségur, *HIF-1 : régulateur central de l'hypoxie*, Medecine/Sciences, 18, 70-78., 2002.
- Grimes C. A. and R. S. Jope, *The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3beta in cellular signaling*, Prog Neurobiol, 65, 391-426., 2001.
- Guillemin K. and M. A. Krasnow, *The hypoxic response: huffing and HIFing*, Cell, 89, 9-12., 1997.
- Hartigan J. A. and G. V. Johnson, *Transient increases in intracellular calcium result in prolonged site- selective increases in Tau phosphorylation through a glycogen synthase kinase 3beta-dependent pathway*, J Biol Chem, 274, 21395-401., 1999.
- Hochstrasser M., *Ubiquitin, proteasomes, and the regulation of intracellular protein degradation*, Curr Opin Cell Biol, 7, 215-23., 1995.
- Hochstrasser M., *Ubiquitin-dependent protein degradation*, Annu Rev Genet, 30, 405-39, 1996.
- Hoeflich K. P., J. Luo, E. A. Rubie, M. S. Tsao, O. Jin and J. R. Woodgett, *Requirement for glycogen synthase kinase-3beta in cell survival and NF- kappaB activation*, Nature, 406, 86-90., 2000.
- Hoshi M., A. Takashima, K. Noguchi, M. Murayama, M. Sato, S. Kondo, Y. Saitoh, K. Ishiguro, T. Hoshino and K. Imahori, *Regulation of mitochondrial pyruvate dehydrogenase*

activity by tau protein kinase I/glycogen synthase kinase 3beta in brain, Proc Natl Acad Sci U S A, 93, 2719-23., 1996.

- Huang L. E., J. Gu, M. Schau and H. F. Bunn, *Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O2- dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway*, Proc Natl Acad Sci U S A, 95, 7987-92., 1998.

- Ivan M., K. Kondo, H. Yang, W. Kim, J. Valiando, M. Ohh, A. Salic, J. M. Asara, W. S. Lane and W. G. Kaelin, Jr., *HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O2 sensing*, Science, 292, 464-8., 2001.

- Jaakkola P., D. R. Mole, Y. M. Tian, M. I. Wilson, J. Gielbert, S. J. Gaskell, A. Kriegsheim, H. F. Hebestreit, M. Mukherji, C. J. Schofield, P. H. Maxwell, C. W. Pugh and P. J. Ratcliffe, *Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation*, Science, 292, 468-72., 2001.

- Janssens D., C. Michiels, E. Delaive, F. Eliaers, K. Drieu and J. Remacle, *Protection of hypoxia-induced ATP decrease in endothelial cells by ginkgo biloba extract and bilobalide*, Biochem Pharmacol, 50, 991-9, 1995.

- Jiang B. H., J. Z. Zheng, S. W. Leung, R. Roe and G. L. Semenza, *Transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor 1alpha. Modulation of transcriptional activity by oxygen tension*, J Biol Chem, 272, 19253-60., 1997.

- Kallio P. J., K. Okamoto, S. O'Brien, P. Carrero, Y. Makino, H. Tanaka and L. Poellinger, *Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1alpha*, Embo J, 17, 6573-86, 1998.

- Kallio P. J., W. J. Wilson, S. O'Brien, Y. Makino and L. Poellinger, *Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1alpha by the ubiquitin-proteasome pathway*, J Biol Chem, 274, 6519-25., 1999.

- Karin M., Z. Liu and E. Zandi, *AP-1 function and regulation*, Curr Opin Cell Biol, 9, 240-6., 1997.

- Lando D., I. Pongratz, L. Poellinger and M. L. Whitelaw, *A redox mechanism controls differential DNA binding activities of hypoxia-inducible factor (HIF) 1alpha and the HIF-like factor*, J Biol Chem, 275, 4618-27., 2000.

- Levy N. S., S. Chung, H. Furneaux and A. P. Levy, *Hypoxic stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by the RNA-binding protein HuR*, J Biol Chem, 273, 6417-23, 1998.

- Lonergan K. M., O. Iliopoulos, M. Ohh, T. Kamura, R. C. Conaway, J. W. Conaway and W. G. Kaelin, Jr., *Regulation of hypoxia-inducible mRNAs by the von Hippel-Lindau tumor*

suppressor protein requires binding to complexes containing elongins B/C and Cul2, Mol Cell Biol, 18, 732-41., 1998.

- Mazure N. M., E. Y. Chen, K. R. Laderoute and A. J. Giaccia, *Induction of vascular endothelial growth factor by hypoxia is modulated by a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway in Ha-ras- transformed cells through a hypoxia inducible factor-1 transcriptional element*, Blood, 90, 3322-31., 1997.

- Minet E., T. Arnould, G. Michel, I. Roland, D. Mottet, M. Raes, J. Remacle and C. Michiels, *ERK activation upon hypoxia: involvement in HIF-1 activation*, FEBS Lett, 468, 53-8, 2000.

- Minet E., D. Mottet, G. Michel, I. Roland, M. Raes, J. Remacle and C. Michiels, *Hypoxia-induced activation of HIF-1: role of HIF-1alpha-Hsp90 interaction*, FEBS Lett, 460, 251-6, 1999.

- Orena S. J., A. J. Torchia and R. S. Garofalo, *Inhibition of glycogen-synthase kinase 3 stimulates glycogen synthase and glucose transport by distinct mechanisms in 3T3-L1 adipocytes*, J Biol Chem, 275, 15765-72., 2000.

- Phiel C. J. and P. S. Klein, *Molecular targets of lithium action*, Annu Rev Pharmacol Toxicol, 41, 789-813, 2001.

- Plyte S. E., K. Hughes, E. Nikolakaki, B. J. Pulverer and J. R. Woodgett, *Glycogen synthase kinase-3: functions in oncogenesis and development*, Biochim Biophys Acta, 1114, 147-62., 1992.

- Richard D. E., E. Berra and J. Pouyssegur, *Nonhypoxic pathway mediates the induction of hypoxia-inducible factor 1alpha in vascular smooth muscle cells*, J Biol Chem, 275, 26765-71, 2000.

- Sears R., F. Nuckolls, E. Haura, Y. Taya, K. Tamai and J. R. Nevins, *Multiple Ras-dependent phosphorylation pathways regulate Myc protein stability*, Genes Dev, 14, 2501-14., 2000.

- Semenza G. L., B. H. Jiang, S. W. Leung, R. Passantino, J. P. Concordet, P. Maire and A. Giallongo, *Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1*, J Biol Chem, 271, 32529-37, 1996.

- Semenza G. L. and G. L. Wang, *A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation*, Mol Cell Biol, 12, 5447-54, 1992.

- Shaldubina A., G. Agam and R. H. Belmaker, *The mechanism of lithium action: state of the art, ten years later*, Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 25, 855-66., 2001.

- Shaw M., P. Cohen and D. R. Alessi, *Further evidence that the inhibition of glycogen synthase kinase-3beta by IGF-1 is mediated by PDK1/PKB-induced phosphorylation of Ser-9 and not by dephosphorylation of Tyr-216*, FEBS Lett, 416, 307-11., 1997.
- Sodhi A., S. Montaner, H. Miyazaki and J. S. Gutkind, *MAPK and Akt act cooperatively but independently on hypoxia inducible factor-1alpha in rasV12 upregulation of VEGF*, Biochem Biophys Res Commun, 287, 292-300, 2001.
- Sogawa K., K. Numayama-Tsuruta, M. Ema, M. Abe, H. Abe and Y. Fujii-Kuriyama, *Inhibition of hypoxia-inducible factor 1 activity by nitric oxide donors in hypoxia*, Proc Natl Acad Sci U S A, 95, 7368-73., 1998.
- Sun W., H. Y. Qureshi, P. W. Cafferty, K. Sobue, A. Agarwal-Mawal, K. D. Neufield and H. K. Paudel, *Glycogen synthase kinase-3beta is complexed with tau protein in brain microtubules*, J Biol Chem, 277, 11933-40., 2002.
- Tanimoto K., Y. Makino, T. Pereira and L. Poellinger, *Mechanism of regulation of the hypoxia-inducible factor-1 alpha by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein*, Embo J, 19, 4298-309., 2000.
- Wang G. L., B. H. Jiang, E. A. Rue and G. L. Semenza, *Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O2 tension*, Proc Natl Acad Sci U S A, 92, 5510-4, 1995a.
- Wang G. L., B. H. Jiang and G. L. Semenza, *Effect of altered redox states on expression and DNA-binding activity of hypoxia-inducible factor 1*, Biochem Biophys Res Commun, 212, 550-6., 1995b.
- Wang G. L. and G. L. Semenza, *Desferrioxamine induces erythropoietin gene expression and hypoxia- inducible factor 1 DNA-binding activity: implications for models of hypoxia signal transduction*, Blood, 82, 3610-5., 1993.
- Wang G. L. and G. L. Semenza, *Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1*, J Biol Chem, 270, 1230-7, 1995c.
- Weissman A. M., *Regulating protein degradation by ubiquitination*, Immunol Today, 18, 189-98., 1997.
- Whitelaw M. L., M. Gottlicher, J. A. Gustafsson and L. Poellinger, *Definition of a novel ligand binding domain of a nuclear bHLH receptor: co-localization of ligand and hsp90 binding activities within the regulable inactivation domain of the dioxin receptor*, Embo J, 12, 4169-79, 1993.

- Whitlock J. P., Jr., S. T. Okino, L. Dong, H. P. Ko, R. Clarke-Katzenberg, Q. Ma and H. Li, *Cytochromes P450 5: induction of cytochrome P4501A1: a model for analyzing mammalian gene transcription*, Faseb J, 10, 809-18., 1996.
- Woodgett J., *Protein kinases.*, 1994.
- Woodgett J. R., *Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A*, Embo J, 9, 2431-8., 1990.
- Zhang J., N. Jin, Y. Liu and R. A. Rhoades, *Hydrogen peroxide stimulates extracellular signal-regulated protein kinases in pulmonary arterial smooth muscle cells*, Am J Respir Cell Mol Biol, 19, 324-32., 1998.
- Zhong H., K. Chiles, D. Feldser, E. Laughner, C. Hanrahan, M. M. Georgescu, J. W. Simons and G. L. Semenza, *Modulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics*, Cancer Res, 60, 1541-5, 2000.