



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Régulation de la transcription du gène HIF1A sous hypoxie: rôle de AP-1

Barbieux, Amélie

Award date:
2000

[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.



**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des Sciences

**Régulation de la transcription du gène HIF1A sous hypoxie :
rôle de AP-1**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques**

Amélie BARBIEUX

Juin 2000

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
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>

Régulation de la transcription du gène HIF1A sous hypoxie : rôle de AP-1

BARBIEUX Amélie

Résumé

Toute diminution de l'apport en oxygène est perçue par la cellule. Celle-ci réagit par une série de mécanismes en vue de maintenir son homéostasie. L'activation du facteur de transcription HIF-1 en hypoxie joue un rôle essentiel dans l'adaptation des cellules à l'hypoxie.

Dans ce mémoire, nous avons étudié l'implication du facteur de transcription AP-1 dans l'activation du gène codant pour la sous-unité HIF-1 α en réponse à l'hypoxie dans les cellules HepG2. A cette fin, nous avons successivement étudié l'activation de AP-1 par l'hypoxie et la fonctionnalité du site potentiel AP-1 du promoteur de HIF1A. Afin de tester cette dernière, nous avons d'abord étudié la liaison de AP-1 à ce site par EMSA, ensuite nous avons vérifié l'activité de ce même site en utilisant un système rapporteur. Enfin, nous avons entrepris l'étude de la voie d'activation de AP-1 par l'hypoxie et de la nature des complexes AP-1 formés consécutivement à cette activation.

L'ensemble des résultats obtenus étaye l'hypothèse du rôle activateur de AP-1 et de son élément *cis* dans l'augmentation de la transcription de HIF1A en réponse à l'hypoxie, et d'une manière générale, permet d'approfondir les connaissances concernant les voies d'activation induites par l'hypoxie.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 2000

Promoteur: C. Michiels

AU TERME DE CE TRAVAIL, JE SOUHAITERAIS ADRESSER CES CHALEUREUX REMERCIEMENTS.

EN PREMIER LIEU, JE TIENS À REMERCIER MADAME CARINE MICHIELS POUR SA DISPONIBILITÉ ET SON DÉVOUEMENT CONSTANTS. SON SUIVI, SES CONSEILS ET SES CORRECTIONS FURENT UN PRÉCIEUX GUIDE DURANT LA RÉALISATION DE CE MÉMOIRE.

J'AIMERAI ICI REMERCIER TOUT PARTICULIÈREMENT MANU POUR SA SUPERVISION DE TOUS LES INSTANTS. SON EXPÉRIENCE PRATIQUE, SA COMPÉTENCE, SA GENTILLESSE ET ... SON HUMOUR FURENT TRÈS APPRÉCIÉS.

MERCI ÉGALEMENT À TOUTE L'ÉQUIPE HIF (DENIS, GAËTAN, ...) POUR SA BONNE HUMEUR ET SA SERVIABILITÉ AINSI QU'À TOUS LES MEMBRES DU LABO POUR LEUR ACCUEIL ET LEUR SYMPATHIE.

UN GRAND MERCI À NOËLLE POUR SON AIDE EN MICROSCOPIE CONFOCALE ET AU LABORATOIRE DE PHYSIOLOGIE ET DE PHYSIOPATHOLOGIE HUMAINE DU PROFESSEUR ANDRÉ GOFFINET POUR LES SÉQUENÇAGES RÉALISÉS DANS LES PLUS BREFS DÉLAIS.

MERCI AUX AUTRES MÉMORANTS (MARIELLE, STÉPHANIE, PATRICIA ET SÉBASTIEN) POUR LES MOMENTS ET L'AMITIÉ PARTAGÉS AU COURS DE CES DERNIERS MOIS.

ENFIN, MERCI AU PROFESSEUR JOSÉ REMACLE DE M'AVOIR ACCUEILLIE AU SEIN DE SON LABORATOIRE.

MON DERNIER REMERCIEMENT MAIS NON LE MOINDRE VA À MA CHÈRE MAMAN, POUR SON SOUTIEN PERMANENT ET Ô COMBIEN VITAL AU LONG DE CES QUATRE ANNÉES D'ÉTUDE, DE MÊME QU'À TOUS MES PROCHES POUR LEURS VIFS ENCOURAGEMENTS.

Liste des abréviations

Ac	Anticorps
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ADP	Adénosine diphosphate
Ag	Antigène
Ahr	Aryl hydrocarbon receptor
AP-1	Activator protein-1
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARNT	Aryl Receptor Nuclear Translocator
ATF	Activated Transcription Factor
ATP	Adénosine triphosphate
BAEC	Bovine Arterial Endothelial Cells
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
bHLH	basic Helix Loop Helix
BSA	Bovine Serum Albumin
bZIP	basic Leucine Zipper
CBP	CREB Binding Protein
CREB	cAMP Response Element Binding Protein
CTL	contrôle
D.O.	Densité Optique
DBD	DNA Binding Domain
DEPC	DiEthyl PyroCarbonate
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
dNTPs	déoxynucléotides triphosphate
DPI	Diphénylène Iodonium
DTT	Dithiothréitol
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Acide éthylènediaminetétraacétique
EGF	Endothelial Growth Factor
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
EPO	Erythropoïétine
ERK	Extracellular Regulated protein Kinase
GDP	Guanosine diphosphate
GEF	GDP Exchange Factor
GLUT-1	Glucose transporter-1
Grb-2	Growth factor binding protein-2
GTP	Guanosine triphosphate

Hepes	hydroxyethyl piperazine-ethane sulfonic acid
HIF-1	Hypoxia Inducible Factor-1
HIF-1 α	Hypoxia Inducible Factor-1 α
HMEC-1	Human microvascular endothelial cells-1
HRE	Hypoxia Responsive Element
Hsp90	Heat shock protein 90
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
IgG	Immunoglobuline G
IL-1	Interleukine-1
Inr	Initiator
JNK	jun N-terminal kinase
kb	Kilobases
kDa	KiloDalton
LB	Luria bertani
MAP	Mitogen Activated Protein
MCS	Site multiple de clonage
MEK	MAP/ERK Kinase
MKK	MAP kinase kinase
MKKK	MAP kinase kinase kinase
MOPS	Acide 3-morpholino-propanesulfonique
NADPH oxydase	Nicotinamide Adénosine Diphosphate oxydase
NF-1	Nuclear Factor-1
NLS	Site de localisation nucléaire
nt	nucléotide
ODD	Oxygen-dependent Degradation
PAS	Per Ahr/ARNT Sim
pb	paire de bases
PBS	Phosphate Buffer Saline
PC 12	Phéochromocytome 12
PCR	Polymérase Chain Reaction
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PDTC	Pyrrolidine DiThioCarbonate
PER	Period
PEST	Proline-Glutamate-Sérine-Thréonine
PFA	Paraformaldéhyde
PIPES	Piperazine-N,N'-bis 2-ethane sulfonic acid
PKC	Protéine Kinase C
PLB	Passive Lysis Buffer
PMA	Phorbol 12-Myristate 13-Acetate
PVDU	Polyvylidine Diofluorure
pwt	promoter wild type

ref-1	reduction factor-1
RF/R	Ratio Firefly/Renilla
RLU	Relative Light Unit
rpm	rotation par minute
SAP	Stress-Activated Protein
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-PAGE	Sodium dodecylsulfate/polyacrylamide gel
electrophoresis	
SIM	Simple minded
Sos	son of sevenless
Sp1	Specific protein-1
SRE	Serum Responsive Element
SRF	Serum Response Factor
SSC	sodium salt citrate
TA	Domaine de transactivation
TAD-C	Domaine de transactivation C-terminal
TAD-N	Domaine de transactivation N-terminal
TAF	TBP-associated factors
TBE	Tris-Borate EDTA
TBP	TATA-binding protein
TBS	Tris Buffer Saline
TCF	Ternary Complex Factors
TEMED	N,N,N'-Tetra-méthyl-éthylènediamine
TF II	Transcription Factor II
TGF	Tumor Growth Factor
TH	Tyrosine Hydroxylase
TIMP	Tissue Inhibitor of Metallo Proteinase
TNF	Tumor Necrosis Factor
TPA	12-tetradecanoyl phorbol 13-acetate
TRE	TPA Responsive Element
UTR	Untranslated Region
UV	Ultra Violet
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VHL	von Hippel-Lindau
X-gal	5-bromo, 4-chloro, 3-indolyl- β -D-galactoside

Table des matières

I. Introduction

I.1 Hypoxie et adaptation des cellules	1
I.1.1 Effets à court terme	2
I.1.2 Effets à long terme	3
I.2 Hypoxia Inducible Factor-1 (HIF-1)	3
I.2.1 Etude de l'expression du gène de l'EPO et découverte de HIF-1	4
I.2.2 Structure de HIF-1	5
I.2.3 Gènes cibles régulés par HIF-1 et leur rôle dans la physiologie cellulaire	6
I.2.3.1 VEGF (<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>)	7
I.2.3.2 <i>Les enzymes impliquées dans le métabolisme du glucose</i>	7
I.2.4 Régulation de HIF-1	9
I.2.4.1 <i>Transduction du signal de la réponse hypoxique</i>	9
I.2.4.2 <i>Voies d'activation de HIF-1α</i>	12
I.2.4.2.1 Régulation post traductionnelle de HIF-1 α	12
I.2.4.2.2 Régulation transcriptionnelle de HIF-1 α	18
I.3. Le facteur de transcription AP-1 (Activator protein-1)	21
I.3.1 Généralités sur la transcription	21
I.3.2 Le facteur de transcription AP-1 (Activator protein-1)	23
I.3.2.1 <i>Structure et propriétés biochimiques importantes de AP-1</i>	23
I.3.2.1.1 Liaison à l'ADN	23
I.3.2.1.2 Activité transcriptionnelle	24
I.3.2.2 <i>Grandes voies d'activation du facteur de transcription AP-1</i>	25
I.3.2.2.1 Transduction du signal induite par des facteurs de croissance	25
mitogéniques via la voie des ERK, une sous-famille des MAP kinases	
I.3.2.2.2 Transduction du signal induite par les rayonnements UV via la voie	27
des JNK	
I.3.3 AP-1 et l'hypoxie	29
I.4 But du mémoire	32

II. Matériel et Méthodes

II.1 Aspect moléculaire	34
--------------------------------------	----

II.1.1 Souche bactérienne, plasmides et oligonucléotides	34
II.1.1.1 Souche bactérienne	34
II.1.1.2 Plasmides	35
II.1.1.3 Oligonucléotides	36
II.1.2 Préparation de bactéries CaCl₂ compétentes et transformation	36
II.1.2.1 Bactéries CaCl ₂ compétentes	36
II.1.2.2 Méthode : choc thermique	37
II.1.3 Préparation des milieux de culture	37
II.1.3.1 Le milieu Luria Bertani (LB).....	37
II.1.3.2 Les additifs	38
II.1.4 Extraction d'ADN plasmidique	38
II.1.4.1 Mini-préparation d'ADN plasmidique	38
II.1.4.2 Midi-préparation d'ADN plasmidique	40
II.1.5 Purification d'ADN	42
II.1.5.1 Extraction d'ADN au phénol/chloroforme et précipitation alcoolique.....	42
II.1.5.2 Purification d'ADN par colonne échangeuse d'ions.....	42
II.1.6 Restriction d'ADN	43
II.1.7 Electrophorèse en gel d'agarose	44
II.1.8 Réaction de ligation	45
II.1.8.1 Traitement à la phosphatase alcaline.....	45
II.1.8.2 Ligation	45
II.1.9 Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR)	46
II.1.9.1 Préparation du mélange réactionnel	46
II.1.9.2 Programmation des cycles PCR.....	47
II.1.9.3 Vérification de la production PCR.....	47
II.1.9.4 Purification de la production PCR	47
II.1.9.5 Dosage de l'ADN purifié	47
II.1.10 Le séquençage	47
II.1.10.1 Préparation du mix d'élongation.....	48
II.1.10.2 Préparation des échantillons pour l'analyse sur gel.....	48
II.2 Aspect cellulaire	49
II.2.1 Culture cellulaire	49
II.2.1.1 Culture des cellules HepG2	49
II.2.2 Incubation sous hypoxie ou en présence de PMA	50
II.2.3 Northern blot	51
II.2.3.1 Extraction d'ARN total	51
II.2.3.2 Electrophorèse	53

II.2.3.3 Transfert	54
II.2.3.4 Marquage et purification des sondes.....	55
II.2.3.5 Préhybridation, hybridation et lavage des membranes	56
II.2.3.6 Quantification et révélation	57
II.2.4 Western blot	58
II.2.4.1 Préparation des extraits cellulaires totaux	58
II.2.4.2 Electrophorèse	59
II.2.4.3 Transfert	60
II.2.4.4 Traitement et révélation.....	61
II.2.4.5 Révélation du film.....	63
II.2.5 Dosage de protéines par la méthode de Bradford.....	64
II.2.6 Immunofluorescence	64
II.2.7 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)	66
II.2.7.1 Préparation des extraits nucléaires.....	66
II.2.7.2 Hybridation de la sonde.....	68
II.2.7.3 Marquage et purification de la sonde	68
II.2.7.4 Liaison sonde –protéine.....	69
II.2.7.5 Supershift.....	70
II.2.7.6 Compétition entre sondes froide et marquée	70
II.2.7.7 Electrophorèse	71
II.2.7.8 Révélation de l'autoradiographie.....	72
II.2.8 Transfections.....	72
II.2.8.1 Transfection des cellules HepG2 par le DOTAP.....	72
II.2.8.2 Système Dual-luciférase.....	73

III. Résultats et Discussion

III.1 Augmentation de l'ARNm de HIF1A en hypoxie	76
III.2 Activation de AP-1 par l'hypoxie	78
III.2.1 Détection de c-jun, P-c-jun et HIF-1 par Western blot	78
III.2.2 Localisation subcellulaire de c-jun et P-c-jun par immunofluorescence	80
III.2.3 Détection de l'activation de AP-1 et de HIF-1 par système rapporteur	82
<i>III.2.3.1 Activation de AP-1 par l'hypoxie et par le PMA</i>	<i>82</i>
<i>III.2.3.2 Activation de HIF-1 par l'hypoxie</i>	<i>83</i>
III.3 Fonctionnalité du site potentiel AP-1 pwt	84
III.3.1 Liaison de AP-1 au site AP-1 potentiel pwt	84
<i>III.3.1.1 EMSA.....</i>	<i>85</i>
<i>III.3.1.2 Détection de c-jun par supershift.....</i>	<i>86</i>
<i>III.3.1.3 Compétition entre sondes froide et marquée pour la liaison</i>	<i>88</i>
<i>de AP-1 sur son élément cis</i>	

<i>III.3.1.4 Identification du partenaire de c-jun par supershift</i>	88
III.3.2 Activité de l'élément <i>cis</i> AP-1 du promoteur de HIF1A.....	90
<i>III.3.2.1 Localisation d'un élément cis activateur dans le promoteur de HIF1A</i>	90
<i>III.3.2.2 Clonage de l'élément cis AP-1 du promoteur de HIF1A dans le plasmide pGL3-SV40</i>	92
III.3.2.2.1 Première stratégie.....	92
III.3.2.2.2 Deuxième stratégie	95
III.3.2.2.3 Troisième stratégie	96
<i>III.3.2.3 Etude fonctionnelle de l'élément cis AP-1 par système rapporteur</i>	98
III.4 Etude préliminaire de la voie d'activation de AP-1 par	99
l'hypoxie	
III.4.1 Les ERK	99
III.4.2 La p38 MAP kinase.....	100
III.4.3 Les JNK	101
 Conclusion et perspectives	 102

Annexe

Bibliographie

Introduction

I. INTRODUCTION

Chez les mammifères, les systèmes cardiovasculaire, hématopoïétique et respiratoire permettent à l'organisme de prélever l'O₂ de l'environnement et de le distribuer à chaque cellule du corps. En tant qu'accepteur final d'électrons lors de la respiration mitochondriale, l'O₂ permet à la cellule de réaliser la phosphorylation oxydative c'est-à-dire de synthétiser de l'ATP, source d'énergie indispensable pour sa survie. Ce rôle essentiel de l'O₂ explique l'existence, depuis les bactéries jusqu'aux eucaryotes supérieurs, de nombreux mécanismes de maintien de l'homéostasie en O₂.

I.1 Hypoxie et adaptation des cellules

Suite à un arrêt local ou à un ralentissement de la circulation sanguine, les cellules du tissu ou de l'organe concerné se retrouvent en condition d'ischémie c'est-à-dire une situation où un tissu subit à la fois une diminution des apports nutritionnels et de l'approvisionnement en O₂, aussi appelée hypoxie.

En réponse à cette hypoxie, ces cellules vont développer une série d'adaptations physiologiques, avec à court terme, une réorientation du métabolisme énergétique vers la glycolyse et une augmentation du transport de glucose vers l'intérieur de la cellule. A plus long terme, l'apport d'O₂ au sein du tissu sera à nouveau assuré grâce à la néo-angiogenèse.

Dans ce chapitre, nous allons aborder les mécanismes biochimiques adaptatifs développés par les cellules subissant un stress hypoxique.

I.1.1 Effets à court terme

En condition d'hypoxie, le taux d'ATP intracellulaire chute suite au ralentissement des phosphorylations oxydatives au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale, lui-même dû au manque d'O₂ (Arnould *et al.*, 1992).

Face à ce changement métabolique, la cellule, quelque soit son type, réagit par divers mécanismes d'adaptation.

D'une part, la cellule augmente son activité glycolytique

-via une augmentation de l'activité des enzymes glycolytiques, par régulation allostérique ainsi que par une augmentation de la transcription des gènes codant pour les enzymes de la glycolyse (Czyzyk-Krzeska, 1997).

-via une augmentation du transport du glucose vers le cytoplasme, elle-même médiée par l'activité accrue du transporteur GLUT-1(Czyzyk-Krzeska, 1997).

Par ailleurs, la synthèse protéique est partiellement inhibée et plus particulièrement, l'expression des enzymes de la respiration mitochondriale ainsi que celle des enzymes consommant beaucoup d'ATP.

D'autre part, certains types cellulaires (cellules endothéliales, hépatocytes,...) vont synthétiser et libérer des facteurs de croissance tels que l'EPO (érythropoïétine) et le VEGF (Vascular Endothelial Growth factor) en réponse à l'hypoxie. Ces hormones régulent respectivement l'érythropoïèse et l'angiogenèse. Cependant la réponse physiologique médiée par ces facteurs intervient à plus long terme et est décrite brièvement ci-dessous.

I.1.2 Effets à long terme

Sous l'action de l'érythropoïétine, le taux d'hématocrite va progressivement s'accroître, permettant au sang de se charger avec davantage d'oxygène et de pallier en partie ou entièrement à la situation hypoxique tissulaire. De son côté, le VEGF va induire la formation de nouveaux capillaires au sein du tissu hypoxique. L'apparition de ces nouveaux vaisseaux mettra fin à la situation d'ischémie tissulaire.

Ces différentes réponses nécessitent l'activation d'un facteur de transcription spécifique, le facteur HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor-1).

I.2 Hypoxia Inducible Factor-1 (HIF-1)

A l'heure actuelle, il a largement été démontré que le facteur de transcription HIF-1 joue un rôle majeur dans les réponses adaptatives des cellules et des tissus à l'hypoxie (Figure I.1). De plus, il joue un rôle central dans le développement embryonnaire mais aussi dans la néovascularisation des nodules tumoraux (Semenza, 1998 a).

Dans les points suivants, nous allons décrire le facteur de transcription HIF-1. Nous aborderons successivement l'historique de sa découverte, sa structure, les gènes dont il régule la transcription et enfin, les différentes hypothèses concernant la régulation de son expression et de son activité.

I.2.1 Etude de l'expression du gène de l'EPO et découverte de HIF-1

Lors d'une diminution de l'approvisionnement en O₂, le taux de production des érythrocytes augmente, permettant ainsi un accroissement de la capacité de transport en O₂. Cette réponse dépend d'une glycoprotéine d'environ 30 kDa : l'érythropoïétine (EPO). Cette dernière est synthétisée principalement dans les reins et dans une moindre mesure dans le foie. Le stimulus majeur responsable de la production d'EPO est l'hypoxie (Wang et Semenza, 1993 a).

Dans le cadre de l'étude de la régulation transcriptionnelle du gène codant pour l'EPO, Semenza et Wang (1992) ont identifié un élément activateur de 50 nucléotides, inductible par l'hypoxie et localisé à l'extrémité 3' du gène de l'EPO.

Dans cette séquence, les éléments suivants ont été identifiés :

-site1 (nt 4-12)

-site2 (nt19-24)

-site3 (nt26-48)

Les sites 1 et 2 sont absolument nécessaires pour l'induction hypoxique. Le facteur se liant sur le site 2 est présent en normoxie comme en hypoxie alors que le facteur se liant au site 1 n'est présent qu'en hypoxie. Le site 3 est un site de liaison potentiel à un récepteur à hormones stéroïdiennes qui interviendrait dans l'amplification du signal d'induction (Figure I.2).

Par la suite, Wang et Semenza (1993 a) ont caractérisé le facteur de transcription se fixant spécifiquement au site1 en condition d'hypoxie. Ils appelèrent ce facteur de transcription HIF-1 pour " Hypoxia Inducible Factor-1 ”.

Dans la lignée hépatocytaire HepG3, la liaison de HIF-1 à la séquence enhancer du gène de l'EPO est détectable après 15 minutes d'hypoxie et atteint un maximum après 4 heures. Cette liaison est inhibée par la cycloheximide (un inhibiteur de synthèse protéique), témoignant de la synthèse *de novo* de HIF-1 en hypoxie. Lors du retour en condition normoxique, HIF-1 quitte très rapidement sa séquence cible (Wang et Semenza, 1993 a).

Enfin, Wang et Semenza (1995) ont également démontré que HIF-1 était activé en situation hypoxique dans des cellules ne produisant pas d'EPO telles que les cellules HeLa, suggérant l'implication de HIF-1 dans l'activation transcriptionnelle d'autres gènes en réponse à l'hypoxie (voir point 2.3.).

I.2.2 Structure de HIF-1

HIF-1 est un facteur de transcription hétérodimérique constitué des deux sous-unités suivantes : -HIF-1 α 120 kDa

-ARNT (aryl receptor nuclear translocator) : de 91 à 94 kDa

(Figure I.3)

Des alignements de séquence ont permis de démontrer que les deux sous-unités de HIF-1 appartiennent à la famille des facteurs trans bHLH-PAS (basic Helix Loop Helix-Per Ahr/ARNT Sim). La famille des bHLH-PAS regroupe entre autre les protéines PER (period) et SIM (simple minded), impliquées respectivement dans le rythme circadien et dans le développement neuronal de la drosophile. Les études préalables menées sur ces différentes protéines ont permis de caractériser les fonctions des régions comprenant les domaines bHLH et PAS.

Le domaine bHLH intervient d'une part dans l'hétérodimérisation des monomères via la partie HLH, et d'autre part dans la liaison à l'ADN via la partie basique. La séquence nucléotidique correspondant au site de liaison de HIF-1 à l'ADN est la suivante: 5' (G/C/T - ACGTGC -G/T) 3'. Cette séquence consensus est appelée HRE pour Hypoxia Responsive Element.

Le domaine PAS est impliqué dans la dimérisation et l'interaction avec la protéine chaperonne Hsp90. Ce domaine contient 2 répétitions directes A et B de 50 à 60 acides aminés (Figure I.4).

Par ailleurs, la sous-unité ARNT était une protéine déjà connue avant la découverte de HIF-1. En effet, ARNT avait été caractérisée comme partenaire de la protéine Ahr (aryl hydrocarbon receptor), un autre facteur de transcription appartenant à la famille des bHLH-PAS. L'hétérodimère Ahr-ARNT régule entre autres l'expression du gène du cytochrome P450 CYP1A1, impliqué dans la détoxification de substances xénobiotiques.

Enfin, la partie carboxy-terminale de HIF-1 contient le domaine de transactivation. Nous aborderons celui-ci plus en détail dans le point consacré à la régulation post-traductionnelle de HIF-1 α .

I.2.3 Gènes cibles régulés par HIF-1 et leur rôle dans la physiologie cellulaire

Outre le gène codant pour l'EPO, HIF-1, activé par l'hypoxie, augmente le taux de transcription de nombreux gènes dont, entre autres, celui du VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) et plusieurs gènes codant pour des protéines impliquées dans la glycolyse (Figures I.5 et I.6).

I.2.3.1 VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)

Le VEGF est un puissant mitogène, spécifique pour les cellules endothéliales, favorisant ainsi l'angiogenèse et la néo-vascularisation. Dans de nombreux types cellulaires, son expression est fortement induite par de faibles tensions en O₂ (Shweiki *et al.*, 1992).

De par son activité, le VEGF est fortement impliqué dans la croissance des tumeurs. En effet, en tant que facteur angiogénique, le VEGF favorise la vascularisation des tumeurs et la génération des métastases.

Liu *et al.* (1995) ont identifié un élément activateur ou enhancer de 28 pb à l'extrémité 5' du promoteur du gène du VEGF. La présence d'une séquence cis HRE au sein de cet enhancer est nécessaire mais pas suffisante pour l'induction hypoxique de la transcription du gène du VEGF. En fait, les facteurs de transcription AP-1 et Sp1 coopèrent avec HIF-1 au niveau du promoteur du gène du VEGF pour induire une expression maximale de celui-ci en réponse à l'hypoxie (Damert *et al.*, 1997). Enfin, on observe également une stabilisation de son ARNm en conditions d'hypoxie (Levy *et al.*, 1998).

I.2.3.2 Les enzymes impliquées dans le métabolisme du glucose

En normoxie, la cellule produit la majorité de son énergie par la respiration aérobie au cours de laquelle l'O₂ est réduit en H₂O. En hypoxie, seule la glycolyse produit encore de l'ATP : 2 molécules d'ATP pour une molécule de glucose, soit 18 fois moins que par la respiration mitochondriale.

Afin de compenser cette perte, la cellule réagit par différents mécanismes.

D'une part, la cellule augmente son activité glycolytique. En effet, dans les cellules hypoxiques, HIF-1 active la transcription de gènes codant pour des protéines spécifiques de cette voie métabolique à savoir des transporteurs de glucose et des enzymes glycolytiques.

D'autre part, la cellule réduit les dépenses énergétiques notamment en diminuant l'expression d'enzymes grandes consommatrices d'ATP telles que la phosphoénolpyruvate carboxykinase. Cette enzyme est impliquée dans la gluconéogenèse c'est-à-dire la synthèse de glucose à partir de précurseurs non hydratés. En condition hypoxique, la gluconéogenèse est donc inhibée.

Parmi les gènes régulés positivement par HIF-1, on retrouve :

- Glucose Transporter-1 (GLUT-1)

L'induction de la transcription du gène GLUT-1 par l'hypoxie permet d'importer davantage de glucose à l'intérieur de la cellule pour alimenter la glycolyse.

- Enzymes de la glycolyse

Citons quelques exemples : aldolase A, émolase 1, lactate déshydrogénase A, phosphofructokinase L, phosphoglycérate kinase 1.

Tous les promoteurs de ces gènes contiennent au moins une séquence HRE. Dans des cellules déficientes en HIF-1 α , Iyer *et al.* (1998 a) ont observé une diminution de l'expression constitutive de ces gènes en normoxie et la suppression de leur expression induite en hypoxie. Ces résultats soulignent le rôle essentiel que joue HIF-1 dans la régulation de la transcription des gènes codant pour les enzymes de la glycolyse.

Les produits de ces gènes cibles de HIF-1 participent donc à des mécanismes adaptateurs pour la cellule et le tissu soumis à l'hypoxie. Ces mécanismes orientent le

métabolisme énergétique de la cellule vers la glycolyse et favorisent l'oxygénation du tissu via la néo-vascularisation et la production d'érythropoïétine.

I.2.4 Régulation de HIF-1

I.2.4.1 Transduction du signal de la réponse hypoxique

La voie de transduction du signal menant à la régulation de l'expression génique et à l'activation de HIF-1 par l'hypoxie reste encore relativement obscure. La plupart des recherches menées dans ce domaine consistent en l'identification d'un senseur cellulaire à oxygène et de la voie de transduction du signal en aval de ce senseur. Cette tâche est d'autant plus ardue que l'hypoxie affecte presque toutes les fonctions cellulaires et modifie de nombreuses voies de transduction du signal (Czyzyk-Krzeska, 1997).

Plusieurs modèles ont été proposés quant à l'identité de ce senseur (Figure I.7). Selon une première hypothèse, la perception de l'oxygène serait médiée par une protéine à groupement hémique capable de lier l'O₂ de manière réversible. L'état conformationnel déoxy serait l'élément initiateur de la voie de transduction du signal.

Les preuves appuyant ce modèle sont les suivantes :

- Des cations bivalents tels que le CoCl₂ et des chélateurs de fer tels que la desferrioxamine induisent une expression accrue du gène de l'EPO et une augmentation de la liaison à l'ADN de HIF-1 (Wang et Semenza, 1993 a, b, c). Le CoCl₂ substituerait le fer dans le groupement hémique du senseur tandis que la desferrioxamine capturerait ce fer. Le résultat serait alors la perte de la liaison à l'O₂ pour le senseur et son passage à la conformation déoxy.

- Le monoxyde de carbone (CO) inhibe l'expression du gène de l'EPO induite par l'hypoxie (Wang et Semenza, 1993 a, b, c). Le CO agirait en se liant au senseur, stabilisant ce dernier dans la conformation oxy.

Cependant, les preuves exposées ci-dessus sont moins probantes aujourd'hui qu'elles ne l'étaient au moment où ces articles ont été publiés. En effet, bien que les mécanismes par lesquels le cobalt et la desferrioxamine induisent l'expression du gène de l'EPO n'aient pas encore été déterminés, des données récentes suggèrent qu'ils n'agissent pas par les mêmes voies que l'hypoxie (Chandel *et al.*, 1998).

Un deuxième modèle se base sur la conversion de l'oxygène en radicaux libres tels que H_2O_2 ou OH^\cdot . La production de ces espèces radicalaires serait plus élevée en normoxie qu'en hypoxie, ce qui déterminerait l'intensité des signaux dans la voie de transduction hypoxique (Ehlben *et al.*, 1998). L'enzyme responsable de la formation des superoxydes pourrait être une NADPH oxydoréductase. Cependant, des cellules délétées pour les gènes codant pour différentes sous-unités de NADPH oxydase sont toujours capables de répondre correctement à un stress hypoxique. De plus, un inhibiteur de NADPH oxydoréductase, le DPI (diphénylène iodonium) bloque l'induction de l'expression de l'ARNm de l'EPO et la liaison de HIF-1 à l'ADN dans des cellules soumises à l'hypoxie (Gleadle, 1995). Cette observation est en contradiction avec le modèle proposé ci-dessus.

En ce qui concerne la troisième hypothèse, ce serait la mitochondrie qui serait le senseur à l'oxygène. Dans cette hypothèse, la production de radicaux libres dérivés de l'oxygène par la mitochondrie augmenterait en conditions d'hypoxie et ce serait donc ces radicaux qui allumeraient la voie de transduction du signal. Plusieurs arguments expérimentaux tendent à étayer cette hypothèse :

- Chandel *et al.* (1998) ont effectivement mesuré une augmentation de la production de radicaux libres (H_2O_2) en hypoxie et le traitement des cellules au PDTC, un agent anti-radicalaire, inhibe l'activation de HIF-1 en hypoxie.
- Le traitement de cellules Hep3B à la roténone ou au myxothiazol, des inhibiteurs respectivement des complexes I et III de la chaîne de transport d'électrons, bloquent l'activation de la protéine HIF-1 α , sa liaison à l'ADN et l'expression du gène de l'EPO (Chandel *et al.*, 1998). Or le complexe III est la source majeure de production d' H_2O_2 au sein de la chaîne de transport des électrons (Turrens *et al.*, 1985).
- Enfin, dans des cellules ne possédant pas de mitochondries fonctionnelles, on ne détecte plus l'activation de HIF-1 en réponse à l'hypoxie.

Cependant, de nombreuses données existent déjà et tendent à démontrer qu'en hypoxie, la production radicalaire mitochondriale diminue. Cela serait dû à la diminution globale en O_2 . Ces résultats sont donc en contradiction avec ceux observés par Chandel *et al.* (1998).

En conclusion, aucune de ces hypothèses n'est à ce jour unanimement acceptée et de plus amples recherches sont encore nécessaires afin d'identifier le mécanisme par lequel la cellule "sent" la pression en O_2 .

Quelles que soient les étapes en aval du senseur à oxygène, un point clé dans la voie de transduction du signal induite par l'hypoxie est l'activation du facteur de transcription HIF-1. Plusieurs mécanismes impliquant essentiellement la sous-unité HIF-1 α ont été démontrés. Nous les envisagerons dans le point suivant.

I.2.4.2 Voies d'activation de HIF-1 α

Les régulations transcriptionnelle et post-traductionnelle de la sous-unité HIF-1 α constituent les deux grands niveaux de la régulation de l'activité du facteur de transcription HIF-1. Ces deux niveaux seront successivement abordés dans ce chapitre.

I.2.4.2.1 Régulation post-traductionnelle de HIF-1 α

° stabilité de la protéine

La liaison du facteur de transcription HIF-1 à sa séquence cible sur l'ADN est détectable 15 minutes après le début de l'hypoxie et atteint un maximum après 4 heures d'incubation. La sous-unité ARNT étant constitutivement exprimée, la liaison de HIF-1 à l'ADN est vraisemblablement dépendante de la disponibilité en sous-unité HIF-1 α . En effet, la protéine HIF-1 α s'accumule en hypoxie et disparaît endéans les 5 minutes suite à la réoxygénation des cellules. Cette variation dans la quantité de protéine peut être visualisée par Western Blot où l'on observe pour HIF-1 α une bande nettement plus intense en hypoxie par rapport à la normoxie.

Ces constatations suggèrent un mécanisme de déstabilisation de la protéine HIF-1 α en normoxie. Huang *et al.* (1998) ont découvert un domaine de dégradation dépendant de l'oxygène (ODD domain), localisé entre les résidus 401 et 603 de la protéine HIF-1 α qui induirait la dégradation de HIF-1 α en normoxie. En effet, ce domaine induit, quand il est fusionné à la protéine GAL4, une augmentation importante de sa vitesse de dégradation en condition normoxique, dégradation qui est inhibée en hypoxie. De plus, HIF-1 α s'accumule en normoxie quand le domaine ODD est délété.

La sous-unité HIF-1 α serait dégradée par le protéasome 26S après ubiquitination (Figure I.8). Kallio *et al.* (1999) ont en effet démontré les faits suivants :

L'utilisation d'un inhibiteur spécifique du protéasome 26S (clasto-lactacystin β -lactone) entraîne une accumulation importante de HIF-1 α dans des cellules en normoxie. De plus, la protéine HIF-1 α est polyubiquitinée en condition normoxique et l'ubiquitination diminue fortement en réponse à l'hypoxie.

Plusieurs pistes ont été proposées pour expliquer le mécanisme sous-jacent à cette déstabilisation de HIF-1 α en normoxie. D'une part, au moins 2 séquences PEST (Proline-Glutamate-Sérine-Thréonine) ont été identifiées au sein du domaine ODD (Huang *et al.*, 1998). Les séquences PEST constituent souvent des cibles pour les ubiquitine ligases. Cependant, il n'existe actuellement aucune preuve que les séquences PEST du domaine ODD sont effectivement responsables de la dégradation de HIF-1 α . D'autre part, de récentes données expérimentales démontrent que la protéine suppresseur de tumeur VHL (von Hippel-Lindau) jouerait un rôle important dans la dégradation de HIF-1 α , en interagissant avec HIF-1 α . La protéine VHL ciblerait la sous-unité HIF-1 α pour la destruction par la voie du protéasome (Maxwell *et al.*, 1999). En effet, cet auteur a démontré que dans des cellules déficientes pour VHL, HIF-1 α est constitutivement stabilisé. De plus, la réexpression de VHL dans ces cellules restaure l'instabilité dépendante de l'O₂ de HIF-1 α .

Outre la stabilisation de la protéine HIF-1 α , d'autres processus interviennent pour induire l'activation de HIF-1 en hypoxie. En effet, l'augmentation de la quantité de la protéine HIF-1 α est nécessaire mais pas suffisante pour l'activation de l'activité transcriptionnelle de HIF-1 par l'hypoxie.

° phosphorylation de HIF-1 α

La phosphorylation semble jouer un rôle important dans l'activation de HIF-1 en réponse à l'hypoxie. En effet, l'activation de la protéine HIF-1 α ainsi que la liaison de HIF-1 à sa séquence cible sont bloquées dans des cellules Hep3B en hypoxie lorsque celles-ci sont préalablement traitées avec des inhibiteurs de kinases (génistéine, 2-aminopurine) ou avec des inhibiteurs de phosphatases (NaF) (Wang *et al.*, 1995 b).

La phosphorylation interviendrait notamment dans la régulation de la dégradation de la protéine HIF-1 α (Wang *et al.*, 1995 b) mais aussi dans l'activation des domaines de transactivation de HIF-1 α dont nous parlerons plus en détail par la suite.

Par ailleurs, il avait été démontré qu'en condition hypoxique, l'activation de la transcription du gène du VEGF était inhibée par des dominants négatifs pour les protéines Raf-1 et Src-1. Ces deux protéines sont des intermédiaires de la voie d'activation des MAP kinases et en particulier de ERK1 et de ERK2 (p42 et p44). L'expression du VEGF en hypoxie était aussi inhibée par la thioguanine-6, un inhibiteur des ERK (Mukhopadhyay *et al.*, 1995).

Minet *et al.* (2000 a) ont dès lors étudié le rôle des ERK p42/p44 dans l'activation de HIF-1 par l'hypoxie dans les cellules endothéliales HMEC-1 (human microvascular endothelial cell-1).

Ils ont démontré que :

- les kinases ERK1 et ERK2 sont activées en hypoxie.
- l'inhibition de ces kinases avec du PD98059 (un inhibiteur de la MKK MEK1) n'inhibe ni la stabilisation de la sous-unité HIF-1 α en hypoxie, ni la liaison de HIF-1

à l'ADN. Par contre, dans les cellules traitées avec du PD98059, ils ont observé une inhibition de l'activité transcriptionnelle de HIF-1 induite par l'hypoxie.

- l'activité transcriptionnelle de HIF-1 induite par l'hypoxie est inhibée dans les HMEC-1 exprimant un mutant dominant négatif ERK1 mais pas dans les HMEC-1 exprimant un mutant dominant négatif ERK2.
- ERK1, activée par l'hypoxie, phosphoryle *in vitro* le domaine carboxy-terminal c'est-à-dire le domaine de transactivation de HIF-1 α (voir point suivant).

Ces différents résultats montrent l'implication des MAP kinases dans la réponse transcriptionnelle induite par l'hypoxie. Parallèlement, Richard *et al.* (1999) ont démontré la capacité des ERKs à phosphoryler HIF-1 α *in vitro*. Cependant, ils n'ont détecté aucune activation des ERKs en hypoxie dans la lignée cellulaire qu'ils ont utilisée, des fibroblastes CCL39.

° changements redox

Tout comme la phosphorylation, les processus d'oxydoréduction semblent également impliqués dans la régulation de l'activation de HIF-1. En effet, Ema *et al.* (1999) ont démontré qu'une cystéine présente dans la partie C-terminale du domaine de transactivation devait se trouver sous forme réduite pour assurer le recrutement de coactivateurs et ainsi permettre la transactivation proprement dite. Cette réduction est assurée par la protéine ref-1 (reduction factor-1), elle-même réduite en hypoxie par la thiorédoxine.

° **translocation nucléaire et dérégulation des domaines de transactivation de HIF-1 α**

Bien que la protéine ARNT soit constitutivement nucléaire (Eguchi *et al.*, 1997), la sous-unité HIF-1 α est quant à elle transloquée du cytoplasme vers le noyau en réponse à l'hypoxie. Cette translocation, étape importante dans la voie menant à l'activation de HIF-1 par l'hypoxie, est une étape où peuvent intervenir diverses régulations.

Gradin *et al.* (1996) ont démontré que HIF-1 α est associée à la protéine chaperonne Hsp90. En considérant cette observation et la ressemblance étroite entre HIF-1 α et Ahr tant au niveau structural qu'au niveau du partenaire de dimérisation, Kallio *et al.* (1998) ont proposé pour HIF-1 α , un modèle de translocation nucléaire similaire à celui de Ahr : en normoxie, la protéine HIF-1 α serait associée à la protéine chaperonne Hsp90. Sous cette conformation, HIF-1 α serait polyubiquitinée et dégradée par la voie du protéasome 26S. De plus, cette association masquerait le site de translocation nucléaire (NLS) de l'extrémité carboxy-terminale de HIF-1 α .

En fait, HIF-1 α possède 2 motifs NLS :

- un NLS bipartite situé entre les a.a. 17 et 33, au niveau du domaine bHLH
- un NLS de type AgT SV40, caractérisé par une séquence de 4 résidus basiques (RKRRK), localisé à l'extrémité carboxy-terminale de HIF-1 α .

Cependant, seul le NLS carboxy-terminal jouerait un rôle important dans l'importation nucléaire de HIF-1 α (Kallio *et al.*, 1998).

En condition d'hypoxie, une modification conformationnelle de HIF-1 α , induite par exemple, par une phosphorylation via une kinase dépendante d'une voie non identifiée, ou par une modification de l'état redox de la protéine, permettrait une transconformation du complexe HIF-1 α /Hsp90. Cette dernière aurait pour conséquence le démasquage du NLS carboxy-terminal de HIF-1 α . Suite à sa translocation dans le noyau, la sous-unité

HIF-1 α pourrait s'hétérodimériser avec la sous-unité ARNT, après dissociation d'avec la protéine chaperonne Hsp90. Cette hypothèse a été confirmée par des travaux réalisés au laboratoire : Minet *et al.* (1999 b) ont démontré, par co-immunoprécipitation, une interaction entre HIF-1 α et Hsp90 en normoxie. De plus, cette interaction disparaît en hypoxie, observation compatible avec la libération de HIF-1 α de ce complexe. Enfin, l'activité chaperonne de Hsp90 est nécessaire pour que HIF-1 α soit fonctionnel, probablement en assurant un repliement correct de HIF-1 α et/ou une " activabilité " adéquate en condition d'hypoxie.

Pour que le facteur de transcription HIF-1 soit actif, une modification supplémentaire de la sous-unité HIF-1 α doit encore se produire. Il s'agit de la dérégulation ou de l'activation du domaine carboxy-terminal. L'extrémité carboxy-terminale de HIF-1 α est composée, entre autres, de 3 domaines distincts (Figure I.9) :

- les deux domaines de transactivation : TAD-N (transactivation domain-N terminal) situé entre les résidus 531-575 et TAD-C (transactivation domain-C terminal) situé entre les résidus 786-826.
- le domaine ID (inhibitory domain) responsable de l'inhibition de l'activité transactivatrice des deux domaines TAD-N/C en normoxie.

(Jiang *et al.*, 1997)

Outre la phosphorylation et les changements redox déjà évoqués ci-dessus, l'interaction avec des coactivateurs semble être impliquée dans l'activation du domaine carboxy-terminal. En fait, les coactivateurs interagissant avec les domaines de transactivation TAD-N/C ont des rôles structuraux et catalytiques dans le processus d'activation transcriptionnelle (Semenza, 1998 a). Le domaine TAD-C de HIF-1 α interagit avec un complexe formé par les coactivateurs CBP/p300. Arany *et al.* (1996) ainsi que Kallio *et al.* (1998) ont d'ailleurs démontré une association physique entre le

complexe CBP/p300 et HIF-1 α au niveau du TAD-C, et le rôle critique de ce complexe dans la transactivation du promoteur du gène de l'EPO en réponse à l'hypoxie dans les cellules Hep3B.

Une des hypothèses quant au mécanisme d'action du complexe CPB/p300 est que son activité histone acétyl transférase lui permettrait d'opérer un réarrangement de la chromatine, nécessaire pour l'initiation de la transcription.

Pour clore ce chapitre, il est important de souligner qu'en dépit de l'existence de nombreux arguments expérimentaux suggérant l'implication des différentes voies de régulation de l'activité HIF-1 citées ci-dessus, ni l'ordre de succession de ces événements, ni le rôle prépondérant joué par l'un ou l'autre de ces processus, ne sont tout à fait déterminés. De plus, il semble que selon le type cellulaire étudié, des différences puissent être observées notamment quant à la nécessité de toutes les étapes.

Enfin, le senseur à oxygène ainsi que la voie de transduction du signal directement en aval de celui-ci restent à identifier.

1.2.4.2.2 Régulation transcriptionnelle de HIF-1 α

En plus de la régulation post-traductionnelle en réponse à l'hypoxie, il semblerait que la sous-unité HIF-1 α soit également régulée au niveau transcriptionnel. En fait, la présence ou l'absence de cette régulation transcriptionnelle semble être très variable d'un type cellulaire à l'autre.

D'une part, l'hypoxie engendre une augmentation de la transcription du gène HIF1A dans des lignées cellulaires hépatocytaires telles que Hep3B et HepG2 (Wang *et al.*, 1995 a), mais aussi dans les cardiomyocytes de rat, dans des cellules de cerveau et de

rein (Ladoux et Frelin, 1997; Wiener *et al.*, 1996; Palmer *et al.*, 1998). Dans ces cellules, on observe une augmentation de la quantité d'ARNm de HIF-1 α en hypoxie.

D'autre part, dans les cellules HeLa, L929, LN229 (Wenger *et al.*, 1997), dans les HMEC-1 (Minet *et al.*, 1999 a) et dans de nombreuses autres lignées cellulaires, l'hypoxie n'induit pas d'augmentation de la transcription du gène HIF1A et on n'observe pas de variation dans la quantité d'ARNm de HIF-1 α en hypoxie par rapport à la normoxie. Dans ce cas, le taux de transcription serait identique en normoxie et en hypoxie et donc, seule la régulation post-traductionnelle interviendrait en réponse à l'hypoxie (Huang *et al.*, 1996).

Le promoteur du gène HIF1A appartient à la famille des promoteurs dépourvus de boîte TATA (Iyer *et al.*, 1998 b). Souvent, la transcription constitutive avec ce type de promoteur dépend de sites de liaison de facteurs de transcription tels que Sp1 et NF-1, mais également de séquences Inr (Initiator) localisées en amont ou même en aval du site +1 d'initiation de la transcription.

Le promoteur du gène HIF1A comprend notamment une séquence riche en GC qui contient plusieurs sites de liaison potentiels de Sp1. Certains de ceux-ci sont localisés en aval du site +1, dans la région appelée 5'UTR (Untranslated Region). Ce promoteur contient également plusieurs sites potentiels HRE (Hypoxia Responsive Element), séquence *cis* du facteur de transcription HIF-1 (Iyer *et al.*, 1998 b).

Minet *et al.* (1999 a) ont démontré que la transcription constitutive de HIF1A est en partie médiée par des sites de liaison de Sp1 au sein du promoteur et par des séquences *cis* dans la 5'UTR .

En ce qui concerne les différences observées entre les types cellulaires quant à la régulation transcriptionnelle du gène HIF1A en réponse à l'hypoxie, l'hypothèse suivante

peut être émise. L'activation transcriptionnelle de HIF1A en réponse à l'hypoxie observée dans certains types cellulaires (HepG2) serait due à l'absence d'un facteur *trans* inhibiteur dans ces cellules. En effet, Minet *et al.* (1999 a) ont découvert dans la partie centrale du promoteur de HIF1A (nucléotides +1 à -200), un fragment (nt +1 à -105) contenant des éléments *cis* importants, impliqués dans la régulation positive de la transcription de HIF1A en réponse à l'hypoxie chimique (traitement au CoCl₂). Ceci aussi bien dans les cellules HMEC-1 que dans les cellules HepG2. En plus de cette séquence impliquée dans la régulation positive, les mêmes auteurs ont mis en évidence, et ce uniquement dans les cellules HMEC-1, un régulateur négatif de la transcription dans la séquence nucléotidique allant de -105 à -201. C'est l'activité de ce dernier qui éteint l'activité de l'élément de régulation positif mentionné ci-dessus et qui expliquerait ainsi l'absence d'augmentation du taux de transcription de HIF1A en réponse à l'hypoxie dans les cellules HMEC-1 et donc l'absence d'augmentation du taux d'ARNm de HIF-1 α en conditions d'hypoxie.

Cependant, les facteurs *trans* responsables des régulations positive et négative de la transcription de HIF1A n'ont pas encore été identifiés. Des analyses de séquences ont révélé l'existence d'un site potentiel de liaison du facteur de transcription AP-1, localisé entre les nucléotides -32 et -23, c'est-à-dire dans le site de régulation positive en réponse à l'hypoxie. En effet, la séquence -CCCTGACGCTG- de ce site est identique à un site AP-1 non-consensus. Les sites AP-1 non-palindromiques sont des sites de liaison potentiels pour différents facteurs *trans* hétérodimériques dont une des sous-unités est un membre de la famille jun, la seconde sous-unité pouvant être un membre de la famille fos ou d'une autre famille : ATF-1, 2, 3, 4 et 5, CREB. Etant donné que AP-1 est activé par l'hypoxie dans différents types cellulaires (voir point 3.3.), il est possible que ce facteur de transcription soit l'activateur transcriptionnel mentionné ci-dessus.

I.3 Le facteur de transcription AP-1 (Activator protein-1)

Etant donné l'hypothèse formulée à la fin du chapitre précédent quant au rôle du facteur de transcription AP-1 comme activateur transcriptionnel de HIF1A en hypoxie, nous allons décrire ce facteur un peu plus en détail dans cette troisième partie de l'introduction.

I.3.1 Généralités sur la transcription

Chez les cellules eucaryotes en général et chez les cellules de mammifères en particulier, la machinerie basale de transcription est responsable de la transcription des gènes en ARN pré-messager. Ce complexe basal porte le nom d'holoenzyme. Il comprend bien sûr l'ARN polymérase II, et en plus, une série de facteurs nécessaires pour la reconnaissance du promoteur et pour l'initiation de la transcription. Parmi ces facteurs, les plus importants sont les TF (Transcription Factor) II B, D, E, F et H. Le complexe TF II D reconnaît le promoteur, il comprend notamment la TBP (TATA-binding protein) qui se lie à la boîte TATA, située plus ou moins 30 nucléotides en amont du site +1 d'initiation de la transcription. Les autres sous-unités du complexe TF II D, les TAFs (TBP-associated factors), interagissent avec les séquences voisines de la boîte TATA, conférant ainsi une spécificité de séquence supplémentaire. La courbure de l'ADN autour de la protéine TBP crée un contexte favorable favorisant l'ancrage du complexe TF II B. Ce dernier permet le positionnement correct de la polymérase sur le promoteur. Le complexe TF II H comprend des hélicases qui déroulent l'ADN autour du site +1, ce qui déclenche la transcription.

(Kornberg, 1999)

A ce complexe minimal viennent s'ajouter d'autres éléments, responsables de la régulation de la transcription basale (Figure I.10). Nous ne parlerons ici que de la régulation positive de la transcription.

Les éléments régulateurs *trans* ou facteurs de transcription comportent toujours :

- un domaine de liaison à l'ADN (DBD : DNA Binding Domain)
- un domaine de transactivation (TA)
- des régions de régulation telles que des sites de phosphorylation

Les facteurs de transcription peuvent être classés en deux grandes catégories :

- les facteurs constitutifs
- les facteurs induits c'est-à-dire les facteurs activés suite à un signal intracellulaire

Les éléments *cis* de ces facteurs *trans* sont également répartis dans différents groupes :

- les "upstream promoter elements", localisés directement en amont du promoteur minimal, lient des facteurs *trans* constitutifs (ex.: Sp1).
- les "cis regulatory elements", situés à proximité du promoteur minimal, lient des facteurs *trans* induits (ex.: CREB : cAMP Responsive Element Binding Protein, AP-1).
- les "enhancers", ils ne font pas partie du promoteur et peuvent en être distants de plusieurs kb. Ces enhancers constituent des sites de liaison pour des facteurs de transcription induits.

Les facteurs de transcription agissent via des coactivateurs qui transmettent les signaux émis par les premiers à la machinerie transcriptionnelle de base.

Ainsi, les facteurs de transcription permettent une régulation fine et spécifique de la transcription pour chaque gène en fonction des différents signaux que perçoit la cellule.

I.3.2 Le facteur de transcription AP-1 (Activator protein-1)

I.3.2.1 Structure et propriétés biochimiques importantes de AP-1

I.3.2.1.1. Liaison à l'ADN

AP-1 n'est pas un facteur de transcription unique mais comprend une série de complexes dimériques des familles protéiques appartenant au groupe des facteurs *trans* bZIP (basic leucine zipper). AP-1 est un facteur de transcription qui peut se présenter sous forme homodimérique ; dans ce cas il se compose de deux sous-unités identiques d'un membre de la famille jun. Il peut également se présenter sous forme hétérodimérique jun/fos. Enfin, jun peut aussi s'hétérodimériser avec des partenaires différents de jun et fos tels que CREB, ATF-1, 2, 3, ... (Figure I.11). La liaison des complexes AP-1 à l'ADN est médiée par le motif bZIP. La partie " tirette à leucines " permet la dimérisation des deux sous-unités. La dimérisation est nécessaire mais pas suffisante pour permettre la liaison à l'ADN. Cette dernière est médiée par les résidus de la région basique du motif bZIP via un contact direct avec les bases de l'ADN (Figure I.12).

La séquence consensus reconnue par AP-1 sous sa forme homodimérique est palindromique. L'élément central de cette séquence *cis* est le suivant : 5' TGAGTCA 3'. Cependant les éléments *cis* AP-1 identifiés peuvent différer de manière plus ou moins importante par rapport au consensus. En outre, certains dimères peuvent reconnaître préférentiellement l'une ou l'autre de ces variations. Il existe aujourd'hui des matrices réalisées à partir de séquences de sites AP-1 actifs dans des promoteurs connus, qui permettent d'identifier des sites AP-1 non consensus par alignement. La diversité des

sites AP-1 en fonction des promoteurs de gènes cibles et des facteurs *trans* qui les reconnaissent est illustrée dans l'Annexe I.

Par ailleurs, plusieurs études ont démontré que certaines substitutions dans la séquence consensus de AP-1 sont tolérées et n'entraînent qu'une faible réduction d'affinité de AP-1 pour sa séquence *cis*. L'existence de sites de liaison de AP-1 d'affinité variable pourrait constituer un moyen supplémentaire de régulation important, étant donné que les dimères fos-jun sont, dans beaucoup de circonstances, des facteurs limitants.

1.3.2.1.2 Activité transcriptionnelle

Comme la plupart des facteurs de transcription, AP-1 possède deux domaines bien distincts :

- le domaine de liaison à l'ADN
- la domaine de transactivation

Dans le cas des protéines fos et jun, ceux-ci sont même physiquement séparables.

Les domaines de transactivation des protéines fos et jun sont sous le contrôle de différentes voies de transduction du signal :

- Les membres de la famille jun possèdent un seul domaine de transactivation, localisé du côté amino-terminal du motif bZIP. En ce qui concerne la protéine c-jun, ce domaine est phosphorylé par les JNK (jun N-terminal kinase) appartenant à la famille des MAP (Mitogen Activated Protein) kinases. La phosphorylation des sérines 63 et 73 de c-jun induit une forte augmentation de l'affinité de c-jun pour la famille des coactivateurs CBP/p300. En interagissant avec ceux-ci, c-jun est alors capable d'activer la transcription (Arias *et al.*, 1994).

- Les protéines de la famille fos contiennent un domaine de transactivation des deux côtés amino-terminal et carboxy-terminal du motif bZIP localisé au centre de la protéine. Le domaine C-terminal est régulé par des phosphorylations dont les kinases responsables restent à identifier (Skinner *et al.*, 1997). Le domaine N-terminal est nécessaire pour l'activité des protéines fos mais il n'existe aucune preuve de la régulation de ce domaine en réponse à des signaux extracellulaires.

I.3.2.2 Grandes voies d'activation du facteur de transcription AP-1

L'expression des membres des familles constituant AP-1 ainsi que leur modification post-traductionnelle (phosphorylation) se produisent en réponse à une gamme extrêmement large de stimuli. Ces stimuli incluent des facteurs de croissance mitogéniques, des cytokines inflammatoires, des facteurs de croissance de la famille du TGF- β (Tumor Growth Factor- β), des irradiations UV ou ionisantes, des stress cellulaires, des liaisons antigéniques, des transformations néoplasiques et enfin l'hypoxie.

Dans les points suivants, nous aborderons plus en détail quelques-uns de ces stimuli ainsi que les voies de transduction du signal qu'ils empruntent pour activer AP-1. L'induction hypoxique quant à elle fera l'objet d'un paragraphe à part.

I.3.2.2.1 Transduction du signal induite par des facteurs de croissance mitogéniques via la voie des ERK, une sous-famille de MAP kinases

Bien qu'extrêmement complexe, la voie d'activation générale des MAP kinases peut être résumée comme suit. D'abord, un facteur extracellulaire active une MKKK (MAP Kinase Kinase Kinase) qui à son tour active une MKK (MAP Kinase Kinase). Enfin, la MKK active une MAP kinase. Il existe trois sous-familles de MAP kinases : les

ERK, les JNK et la p38 MAP kinase. Les différentes activations sont principalement dues à des phosphorylations.

En tant qu'exemple, nous citerons le cas du PDGF (Platelet Derived Growth Factor), un facteur de croissance activant la voie des ERK. La cascade induite est la suivante : le PDGF, par liaison à un récepteur tyrosine kinase, déclenche la dimérisation suivie de la transphosphorylation de ce dernier. Le récepteur phosphorylé interagit alors avec plusieurs protéines dont la protéine adaptateur Grb-2 (Growth factor binding protein-2). Grb-2 recrute et active la protéine Sos, un GEF (GDP Exchange Factor). Sos remplace le GDP de ras, une petite protéine G, par un GTP. ras-GTP induit alors un changement de conformation de la MKKK raf, qui, pour être totalement active, doit être en plus phosphorylée par d'autres kinases sur plusieurs domaines. raf activée phosphoryle à son tour la MKK MEK qui va elle-même phosphoryler la MAP kinase ERK (Figure I.13).

Un des niveaux d'action connus des ERK dans l'activation de AP-1 est l'activation de la transcription du gène c-fos. En fait, l'activation transcriptionnelle de c-fos par des mitogènes est principalement médiée par l'élément *cis* régulateur SRE (Serum Response Element). Pour que l'élément SRE soit actif, plusieurs facteurs de transcription provenant de deux familles différentes sont requis :

- le facteur de transcription ubiquiste SRF (Serum Response Factor)
- les TCFs (Ternary Complex Factors)

Les TCFs incluent les protéines Elk-1, SAP-1 et SAP-2.

Ces trois protéines forment un complexe avec l'élément SRF et l'ensemble se lie fermement à la séquence SRE. Le domaine de transactivation C-terminal de Elk-1 contient plusieurs sites de phosphorylation. L'activation de la voie des MAP kinases, notamment de ERK, médiée par des facteurs de croissance, résulte en la phosphorylation

des sites C-terminaux de Elk-1. Elk-1 hyperphosphorylé coopère avec le domaine de transactivation C-terminal de SRF pour activer la transcription du gène c-fos. De façon intéressante, Elk-1 est aussi activé par l'hypoxie et ce via la voie des ERK.

Plusieurs preuves d'ordre génétique montrent que AP-1 constitue une cible nucléaire de la voie de transduction du signal induite par des mitogènes et requise pour la progression normale du cycle cellulaire. En effet, chez la souris, des fibroblastes mutants pour soit c-jun, soit c-fos et fosB simultanément, montrent une nette diminution de l'expression de la cycline D1 et de la progression dans la phase G1 du cycle cellulaire en réponse à des facteurs de croissance (Brown *et al.*, 1998 ; Wisdom *et al.*, 1999).

Néanmoins, de nombreuses questions demeurent :

A quelles étapes du cycle cellulaire intervient AP-1?

Quelle est la nature des complexes AP-1 formés?

Outre les cyclines de type D, quels sont les gènes cibles de AP-1 requis pour une progression normale à travers la phase G1 du cycle cellulaire?

1.3.2.2.2 Transduction du signal induite par les rayonnements UV via la voie des JNK

En plus de la régulation par la voie des ERK, l'activité de AP-1 est également contrôlée par transduction du signal via la voie des JNK. Nous avons déjà signalé deux mécanismes par lesquels les JNK régulent l'activité de AP-1, à savoir la phosphorylation de c-Jun dans le domaine de transactivation et l'augmentation de l'expression du gène c-fos via la phosphorylation des facteurs de transcription Elk-1 et SAP-1 (Figure I.14).

La voie de transduction du signal proprement dite qui aboutit à l'activation des JNK par les UV n'est pas encore tout à fait élucidée. Il semblerait que les UV induisent l'agrégation d'une série de récepteurs, notamment ceux pour l'EGF, l'IL-1 et le TNF

avec l'activation subséquente de ras et d'une tyrosine protéine kinase, la src kinase. ras activée est ensuite capable de phosphoryler la MAP kinase kinase MEKK1, qui à son tour, active la MAP kinase MEK1, qui active les JNK (Rosette et Karin, 1996). Une partie de la réponse cellulaire aux UV est l'arrêt du cycle cellulaire qui dépend non seulement de l'activation de AP-1 mais aussi des dommages à l'ADN induits par les UV.

L'apoptose constitue un autre pôle de la réponse cellulaire suite à l'irradiation UV des cellules. Des analyses génétiques indiquent que des fibroblastes mutants pour c-jun ou pour c-fos, montrent une augmentation du taux d'apoptose (Schreiber *et al.*, 1995 ; Wisdom *et al.*, 1999). Ceci suggère un rôle protecteur du facteur AP-1 contre l'apoptose des cellules induite par irradiation UV. Ceci dit, le rôle de AP-1 dans les phénomènes apoptotiques n'est pas clair. En effet, les cytokines de la famille du TNF, de puissants activateurs de la voie de transduction du signal via les JNK et AP-1, induisent l'apoptose sans que l'on sache si AP-1 est impliqué dans l'induction proprement dite de l'apoptose.

L'analyse génétique du rôle des protéines AP-1 dans la transcription des gènes impliqués dans l'apoptose peut être corrélée avec l'analyse de l'expression génique résultant de l'activation des JNK. Les données obtenues suggèrent une fonction régulatrice soit positive soit négative pour la voie de transduction du signal via les JNK, dépendant du type et du contexte cellulaires, et donc AP-1 jouerait un rôle protecteur ou inducteur selon ces conditions.

Pour conclure cette partie traitant les grandes voies d'induction du facteur AP-1, soulignons la nature parfois très divergente des différents stimuli induisant le facteur de transcription AP-1 et des réponses cellulaires observées. Dès lors, la question suivante se pose : d'où vient la spécificité de la réponse cellulaire à chacun de ces stimuli?

Deux éléments d'explication sont proposés. Le premier est que les différences fonctionnelles entre les membres des familles fos et jun peuvent être des déterminants importants de la réponse aux différents stimuli. En effet, bien que les combinaisons possibles des sous-unités fos-jun puissent se lier à la séquence consensus de AP-1, il existerait des différences entre ces complexes dans leur capacité de se lier à des séquences *cis* AP-1 non consensus et dans leur capacité de médier l'activation transcriptionnelle. On pourrait donc observer des différences en fonction de la nature du dimère mis en œuvre et en fonction de la séquence des sites AP-1 non consensus présents dans les promoteurs des différents gènes cibles (Ryseck et Bravo, 1991 ; Wisdom et Verma, 1993).

La deuxième explication est que la spécificité d'action du facteur AP-1 est apportée par d'autres protéines. L'analyse du promoteur des gènes cibles de AP-1 a révélé l'existence de sites de liaison pour d'autres facteurs de transcription, adjacents au site de liaison de AP-1, et ce serait alors l'intégration des signaux amenés par les différents facteurs de transcription qui assurerait, en conjonction avec AP-1, cette spécificité.

En fonction du stimulus, ces deux paramètres jouent probablement un rôle plus ou moins important et ne sont certainement pas exclusifs.

I.3.3 AP-1 et l'hypoxie

Outre les facteurs de croissance ou les radiations UV, l'hypoxie est un autre stimulus capable d'activer AP-1. L'induction de ce facteur de transcription par l'hypoxie semble être un phénomène dépendant du type cellulaire. En effet, dans des cellules cancéreuses de colon humain (Yao *et al.*, 1994), dans les cellules endothéliales humaines et bovines (HUVEC : Human Umbilical Vein Endothelial Cells, BAEC : Bovine Arterial Endothelial Cells), dans les cellules Hep3B, dans les cellules HeLa (Bandyopadhyay, 1995), dans les cellules de phéochromocytome 12 (PC 12) de rat (Mishra *et al.*, 1998),

dans les chondrocytes (Rajpurohit *et al.*, 1996), l'hypoxie entraîne une augmentation de l'activité de AP-1.

Par contre, dans les cellules du neuroblastome de rat (Mishra *et al.*, 1998) et dans des cellules de carcinome cervical (Ausserer *et al.*, 1994), aucun changement dans l'activité de AP-1 ne se produit durant l'exposition des cellules à l'hypoxie. Ces différences ne sont pas encore expliquées à ce jour.

Plusieurs études montrant l'implication de AP-1, en conjonction avec HIF-1, dans la réponse adaptative des cellules à l'hypoxie ont été réalisées.

A titre d'exemples :

- Bandyopadhyay *et al.* (1995) ont démontré dans des cellules endothéliales l'activation hypoxique de plusieurs gènes cibles de AP-1 tels que ceux de la collagénase IV, de c-jun, de l'endothéline-1 et du PDGF-B. Etant donné que dans ces expériences, l'activation de ces différents gènes par l'hypoxie n'était pas strictement corrélée avec le taux d'activation du facteur AP-1, ces auteurs ont suggéré l'implication supplémentaire d'autres facteurs de transcription dans l'induction des gènes cibles de AP-1 en réponse à l'hypoxie.
- Mishra *et al.* (1998) ont fourni des preuves directes de l'implication de l'expression du gène c-fos dans la formation consécutive du complexe AP-1 et dans l'induction du gène de la TH (Tyrosine Hydroxylase) en réponse à l'hypoxie, dans des cellules PC12. En effet, leurs résultats montrent une augmentation de l'activité fonctionnelle de AP-1 en réponse à l'hypoxie et l'abolition de cette augmentation en présence d'ARN c-fos antisens. Une étude précédente (Norris et Millhorn, 1995) avait démontré que l'induction hypoxique du gène de la TH était médiée par un court fragment du promoteur contenant les séquences *cis* de HIF-1 et de AP-1 mais sans démontrer l'activation de AP-1 par l'hypoxie. La tyrosine hydroxylase est une

enzyme impliquée dans la voie de biosynthèse de la dopamine, neurotransmetteur nécessaire à la régulation de la ventilation pulmonaire quand l'apport en O₂ diminue. Cette enzyme est exprimée spécifiquement dans les cellules de type I des corps carotidiens, corps extrêmement sensibles à tout changement de la pression en oxygène dans les artères. Ces cellules sont donc directement responsables de la régulation de l'apport en O₂ dans la circulation systémique (Raymond et Millhorn, 1997).

- Damert *et al.* (1997) ont montré que la liaison du facteur AP-1 à un site enhancer en amont de la séquence *cis* de HIF-1, potentialise l'effet activateur du facteur HIF-1 dans l'induction hypoxique de la transcription du gène du VEGF dans les cellules de gliome C6. En effet, leurs résultats montrent, par la technique du gène rapporteur, que bien que le site de liaison de HIF-1 soit crucial pour l'induction hypoxique de l'expression du gène du VEGF, un sous-fragment contenant uniquement le site HRE n'est pas suffisant pour conférer une réponse maximale à l'hypoxie. Celle-ci est restaurée par la présence de séquences supplémentaires, en amont du site HRE. Ils ont également montré par la technique de l'EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) que cet effet est dû à la liaison du facteur de transcription AP-1. Cependant AP-1 tout seul n'est pas capable d'induire l'expression du VEGF en hypoxie.

- Muller *et al.* (1997) ont démontré l'induction hypoxique de la transcription du gène *c-fos* via la voie des MAP kinases ERK dont nous avons parlé précédemment. Ces résultats montrent que, dans les cellules HeLa, le complexe TCF/Elk-1 est activé par la MAP kinase ERK2 en réponse à l'hypoxie via la phosphorylation de Elk-1, complexe nécessaire pour l'activation de la transcription du gène *c-fos* (voir point 3.2.2.). Minet *et al.* (2000 a) ont démontré que l'hypoxie pouvait effectivement activer, dans les cellules endothéliales, les MAP kinases ERK1 et ERK2.

I.4. But du mémoire

Comme nous l'avons vu dans la dernière partie de l'introduction, le facteur de transcription AP-1 semble jouer un rôle important dans la voie de transduction du signal induite par l'hypoxie.

Le but de ce mémoire s'inscrit dans l'étude de la régulation transcriptionnelle de la sous-unité HIF-1 α en réponse à l'hypoxie et plus particulièrement de l'implication du facteur de transcription AP-1 dans l'activation de la transcription du gène HIF1A en réponse à l'hypoxie.

Notre étude est fondée sur les constatations expérimentales suivantes :

- ⇒ Wenger *et al.* (1998) ont observé dans des cellules issues de lignées d'hépatome, une augmentation de l'ARNm de HIF1A en hypoxie.
- ⇒ Minet *et al.* (1999 a) ont identifié une région *cis* activatrice dans le promoteur de HIF1A par système rapporteur. En effet, en étudiant l'expression du gène de la luciférase sous la dépendance de délétants du promoteur de HIF1A, ils ont observé en hypoxie chimique, une forte augmentation de l'expression du gène rapporteur en présence du fragment compris entre les nucléotides -30 et -41 du promoteur de HIF1A, par rapport à la normoxie. De plus, suite à des analyses de séquence, les mêmes auteurs ont mis en évidence l'existence d'un site potentiel de liaison pour le facteur de transcription AP-1. Il s'agit de la séquence -CTGACGCTG-, localisée entre les résidus -30 et -41.

Sur base de ces différentes observations, nous avons posé les questions suivantes :
L'augmentation de l'ARNm de HIF1A en réponse à l'hypoxie est-elle due à une augmentation de la transcription du gène HIF1A?

L'hypoxie est-elle capable d'activer AP-1?

La séquence *cis* potentielle - CTGACGCTG-, que nous appellerons dorénavant pwt (promoter wild-type), est-elle un site AP-1 fonctionnel et est-elle responsable de l'augmentation de la transcription du gène HIF1A en hypoxie?

Afin de répondre à ces questions, nous avons utilisé différentes approches expérimentales.

En premier lieu, nous avons vérifié l'augmentation de la quantité d'ARNm de HIF1A en réponse à l'hypoxie dans la lignée cellulaire HepG2. Ensuite, afin d'étudier l'activation du facteur AP-1 par l'hypoxie dans les cellules HepG2, nous avons étudié l'expression de sa forme phosphorylée, reflet de son activation, sa localisation subcellulaire et son activité transcriptionnelle en hypoxie par rapport à la normoxie. La troisième partie du travail avait pour objet l'étude de la fonctionnalité du site potentiel AP-1 pwt du promoteur de HIF1A. Nous avons réalisé cette étude premièrement en vérifiant la liaison de AP-1 au site pwt et deuxièmement en étudiant l'activité de ce site via l'utilisation d'un système rapporteur. Enfin, nous avons amorcé l'étude de l'identification des MAP kinases impliquées dans l'activation de AP-1 par l'hypoxie.

L'ensemble des résultats permettra d'approfondir les connaissances de la voie d'activation transcriptionnelle du facteur de transcription HIF-1 en condition d'hypoxie.

Matériel
et
Méthodes

II. MATERIEL ET METHODES

II.1 ASPECT MOLECULAIRE

II.1.1 Souche bactérienne, plasmides et oligonucléotides

II.1.1.1 Souche bactérienne

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

Caractéristiques génotypiques : *end A1, lac, thi-1, rec B, rec J, umuC* : : *Tn 5 (F' proAB, lacI^qZΔM15, 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 SURE étant délétée au niveau de l'opéron lactose, elle est incapable de métaboliser le lactose.
- Épisode 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 x la force du promoteur du gène codant pour le répresseur de l'opéron lactose.
 - *lac ZΔM15* : permet la sélection des colonies contenant un plasmide recombinant par coloration blanc-bleu. Le gène de la β-galactosidase est délété, produisant une protéine inactive. Ce fragment du gène *lac Z* donne, par complémentarité 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.

II.1.1.2 Plasmides

a) pGL3-SV40 (Promega, Madison, USA) et pGL3-SV40 3 x HRE

Ces 2 plasmides (Figures II.1, II.2) sont des vecteurs contenant le gène de la luciférase de luciole. Ils expriment une forme modifiée du gène luciférase (*luc+*). La luciférase émet de la lumière en dégradant son substrat (luciférine). Cette lumière est un signal quantifiable de l'expression du gène rapporteur.

Ils possèdent tous les deux un promoteur faible SV40 localisé en amont du gène *luc+* et le gène de résistance à l'ampicilline. Le plasmide pGL3-SV40 3 x HRE possède en plus 3 copies de l'élément HRE (Hypoxia Response Element) du gène de l'EPO en aval du gène codant pour la luciférase. Ces sites HRE fonctionnant en tant que « enhancer » régulent la transcription du gène *luc+* de façon dépendante de HIF-1.

b) pAP-1-Luc (Stratagène, La Jolla, USA)

Le plasmide pAP-1-Luc (Figure II.3) est un vecteur contenant le gène rapporteur luciférase.

Il possède une boîte TATA et 7 copies de l'élément TRE (TPA Responsive Element), l'élément consensus de AP-1, dont la séquence est -TGACTCA-.

c) pRL-SV40 (Promega, Madison, USA)

Le vecteur pRL-SV40 est un rapporteur contenant l'ADNc encodant la Renilla luciférase d'un vers marin (*Renilla reniformis*).

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

Ce plasmide servira de contrôle pour la normalisation des expériences de co-transfections (voir point II.2.6).

d) p11K, p8D, p15C

Ces vecteurs construits à partir du plasmide pGL3-Enhancer contiennent le gène rapporteur codant pour la luciférase dont l'expression est sous la dépendance de délétants du promoteur du gène HIF1A (voir article de Minet *et al.*, 1999 a). Le plasmide p15C contient les 30 premières bases du promoteur du gène HIF1A et la séquence AP-1

b) Méthode

- Inoculer une colonie de souche bactérienne dans 50 ml de milieu de culture LB additionné ou non d'antibiotiques.
- Incuber la culture une nuit à 37°C sous agitation modérée.
- Inoculer 2 x 200 ml de milieu LB (avec ou sans antibiotique) avec 2 x 2ml de préculture et laisser pousser à 37°C sous agitation modérée jusqu'à ce que la densité optique de la culture à 590 nm atteigne 0,8.
- Incuber sur glace pendant 10 minutes pour arrêter la croissance de la culture.
- Centrifuger 7 minutes à 4000 rpm à 4°C (Beckman J-21B, rotor JA-14).
- Resuspendre les culots dans 20 ml d'une solution de CaCl₂ froide et laisser sur glace 30 minutes.
- Centrifuger 5 minutes à 4000 rpm à 4°C (Beckman J-21B, rotor JA-14).
- Enlever le surnageant et resuspendre le culot dans 4 ml de solution de CaCl₂ froide.
- Aliquoter 100 µl sur glace et conserver à -70°C ou utiliser directement pour une transformation.

II.1.2.2 Méthode : choc thermique

(Ausubel *et al.*, 1996)

a) Méthode

- Dégeler sur glace les aliquots de 100 µl de bactéries CaCl₂ 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 à la suspension bactérienne.
- Incuber 1 heure à 37°C.
- Etaler sur un milieu solide sélectif et incuber pendant une nuit à 37°C.

II.1.3 Préparation des milieux de culture

(Sambrook *et al.*, 1996)

II.1.3.1 Le milieu Luria Bertani (LB)

a) Composition

Solution aqueuse contenant :

- Hydrolysate 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 (X-gal, IPTG, antibiotiques,...).
- Couler rapidement dans les boîtes 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.

II.1.3.2 Les additifs

Additif	Abréviation	Concentration Stock	Concentration Finale
Ampicilline	Amp	500 mg/ml	100 µg/ml
Tétracycline	Tet	5 mg/ml (EtOH)	50 µg/ml

Ampicilline (Sigma, St Louis, USA), Tétracycline (Sigma, St Louis, USA).

II.1.4 Extraction d'ADN plasmidique

II.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.
- La purification de l'ADN plasmidique sur colonne échangeuse d'anions.
- La resuspension de l'ADN plasmidique.

a) Solutions et tampons

Solutions du Kit Wizard Plus SV Minipreps (Promega, Madison, USA).

- Wizard Plus SV Cell Resuspension Solution : (tampon de resuspension)
RNase A 100 µg/ml
Tris-HCl (pH 7,5) 50 mM
EDTA 10 mM
- Wizard Plus SV Cell Lysis Solution : (tampon de lyse)
NaOH 200 mM
SDS 1 %
- Wizard Plus SV Neutralization Solution : (tampon de neutralisation)
Hydrochlorure de guanidium 4,09 M
Acétate de potassium 0,759 M
Acide acétique glacial 2,12 M
(pH final approximativement de 4,2)
- Wizard Plus SV Column Wash Solution : (solution de lavage des colonnes)
Acétate de potassium 162,8 mM
Tris-HCl (pH 7,5) 27,1 mM
Ethanol 60,45 %
- Alkaline Protease Solution : (solution contenant la protéase)
- Wizard Plus SV Minipreps Spin Columns : (colonnes de purification)
- Collection Tubes (2ml) : (tubes collecteurs des colonnes)

b) Méthode

- ensemencer 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 forte agitation (250 rpm).
- Centrifuger 1 ml de la culture dans un eppendorf 5 minutes à 13000 rpm (Heraus Sepatech, Biofuge pico, rotor 3324) et éliminer le surnageant.
- Resuspendre le culot dans 250 µl de tampon de resuspension.
- Ajouter 250 µl de tampon de lyse et mélanger doucement, incuber 5 minutes à température ambiante.
- Ajouter 10 µl de protéase et mélanger doucement, incuber 5 minutes à température ambiante.
- Ajouter 350 µl de tampon de neutralisation et mélanger doucement.
- Centrifuger 15 minutes à 15000 rpm à 4°C (Heraus Sepatech, Biofuge 17RS, rotor 1379) et récupérer le surnageant.
- Combiner la colonne de purification et le tube collecteur puis déposer le surnageant sur la colonne.
- Centrifuger 1 minute à 13000 rpm à température ambiante (Heraus Sepatech, Biofuge pico, rotor 3324).
- Éliminer l'éluat (débris cellulaires, ADN génomique,...).
- Ajouter 750 µl de solution de lavage dans la colonne.

- Centrifuger 1 minute à 13000 rpm à température ambiante (Heraus Sepatech, Biofuge pico, rotor 3324).
- Eliminer l'éluat.
- Ajouter 250 µl de solution de lavage dans la colonne.
- Centrifuger 1 minute à 13000 rpm à température ambiante (Heraus Sepatech, Biofuge pico, rotor 3324).
- Combiner la colonne de purification avec un eppendorf.
- Ajouter 100 µl d'eau distillée stérile dans la colonne pour éluer l'ADN plasmidique.
- Centrifuger 1 minute à 13000 rpm à température ambiante (Heraus Sepatech, Biofuge pico, rotor 3324).
- Concentrer l'ADN plasmidique 30 minutes au speedvac (Hetevac VR-1, Analis, Namur, Belgique).

II.1.4.2 Midi-préparation d'ADN plasmidique

La midi-préparation permet de purifier de 100 à 200 µg 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 4°C)
- **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 -20°C .

b) Méthode

- ensemencer 150 ml de milieu liquide (LB + antibiotique(s)) avec 10 μl d'une culture liquide issue d'une mini-culture.
- Incuber la culture une nuit à 37°C sous forte agitation (250 rpm).
- Prélever 50 ml de la culture
- Centrifuger les 50 ml à 6000 rpm pendant 15 minutes (Beckman J-21B, rotor JA-14) et éliminer le surnageant.
- Resuspendre le culot dans 4 ml de tampon P1.
- Ajouter 4 ml de tampon P2 et mélanger doucement puis laisser 5 minutes à température ambiante.
- Ajouter 4 ml de tampon P3 et agiter doucement puis laisser 20 minutes sur glace.
- Centrifuger 40 minutes à 4°C à 12000 rpm (Beckman J-21B, rotor JA-14) et récupérer le surnageant.
- Equilibrer les colonnes Qiagen-Tip 100 avec 4 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 10 ml de tampon QC.
- Eluer l'ADN plasmidique avec 5 ml de tampon QF.
- Précipiter l'ADN avec 0,7 volume d'isopropanol.
- Centrifuger 30 minutes à 13000 rpm à 4°C (Beckman J-21B, rotor JA-14) et éliminer le surnageant.
- Laver avec 2 ml d'éthanol 70 %.
- Centrifuger 10 minutes à 13000 rpm à 4°C (Beckman J-21B, rotor JA-14).
- Décantier le surnageant délicatement.
- Sécher le culot au speedvac à température ambiante ou à 37°C .
- Resuspendre le culot dans 500 μl d' H_2O distillée stérile.
- Conserver à -20°C .

II.1.5 Purification d'ADN

II.1.5.1 Extraction d'ADN au phénol/chloroforme et précipitation alcoolique

Ce procédé permet l'élimination de contaminants tels que les enzymes, les amorces, les dNTPs, les sels et d'autres agents qui pourraient interférer avec les étapes de traitement enzymatique de l'ADN.

a) Matériel

- Phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25 : 24 : 1) (Sigma, St Louis, USA)
- Ethanol 95 % (Merck, Darmstadt, Allemagne)
- Ethanol 70 % (Merck, Darmstadt, Allemagne)

b) Méthode

- Ajouter sous hotte un volume de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25 : 24 : 1).
- Mélanger vigoureusement.
- Centrifuger 10 minutes à 13000 rpm à température ambiante (Heraus Sepatech, Biofuge pico, rotor 3324).
- Prélever la phase aqueuse (phase supérieure).
- Ajouter 2 volumes d'éthanol 95 % de manière à précipiter l'ADN.
- Centrifuger 20 minutes à 15000 rpm à 4°C (Heraus Sepatech, Biofuge 17RS, rotor 1379).
- Enlever le surnageant et rincer le culot en ajoutant 150 µl d'éthanol 70 %.
- Centrifuger 20 minutes à 15000 rpm à 4°C (Heraus Sepatech, Biofuge 17RS, rotor 1379).
- Enlever le surnageant et sécher le culot au speedvac (Hetevac VR-1, Analis, Namur, Belgique).
- Resuspendre le culot dans le volume d'H₂O désiré.

II.1.5.2 Purification d'ADN par colonne échangeuse d'ions

a) Solutions et tampons

High Pure Product Purification Kit (Boehringer, Mannheim, Allemagne).

- Tampon 1 :
 - 3 M de thiocyanate de guanidium
 - 10 mM Tris-HCl pH 6,6 (25°C)
 - 5 % éthanol

- Tampon 2 : (tampon de lavage)
20 mM NaCl
2 mM Tris-HCl, pH 7,5 (25°C)
200 ml d'éthanol

b) Méthode

- Ajouter 5 volumes de tampon 1 au produit à purifier et mélanger.
- Combiner la colonne de purification et le tube collecteur puis déposer l'échantillon sur la colonne.
- Centrifuger 1 minute à 13000 rpm à température ambiante (Heraus Sepatech, Biofuge pico, rotor 3324).
- Eliminer le surnageant et déposer 500 µl de tampon 2 sur la colonne de purification.
- Centrifuger 1 minute à 13000 rpm à température ambiante (Heraus Sepatech, Biofuge pico, rotor 3324).
- Eliminer le surnageant et déposer à nouveau 250 µl de tampon 2 sur la colonne de purification.
- Centrifuger 1 minute à 13000 rpm à température ambiante (Heraus Sepatech, Biofuge pico, rotor 3324).
- Combiner la colonne de purification avec un eppendorf et ajouter 50 µl d'eau distillée stérile sur la colonne.
- Centrifuger 1 minute à 13000 rpm pour éluer l'ADN (Heraus Sepatech, Biofuge pico, rotor 3324) et récupérer l'ADN en solution obtenu dans l'eppendorf.

II.1.6 Restriction d'ADN

(Ausubel *et al.*, 1996)

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. Le tableau de la figure II.5 montre le site de clivage des endonucléases de restriction utilisées lors de ce mémoire.

a) 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.

La réaction peut être stoppée par chauffage 15 à 20 minutes à 65°C.

II.1.7 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 constitué de polymère d'agarose. Le pourcentage en agarose peut être modifié en fonction des tailles respectives des fragments à séparer (Figure II.6). Des gels de haut pourcentage permettent de séparer des fragments d'ADN de petite taille et inversement. La taille des différents fragments d'ADN tests 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 (Figure II.7). L'ADN ainsi marqué est visualisé sous illumination U.V.

a) Matériel

- Cuve d'électrophorèse (Horizon 11-14, Gibco, Paisley, Grande-Bretagne)
- Transilluminateur, longueur d'onde : 392 nm (Analis, Namur, Belgique)
- Appareil polaroïd (modèle 44-16 MP4 Instant Camera System, USA)
- Film polaroïd (Duofilm, 667 Iso 3000/36°C, Janssen Chimica, Beerse, Belgique)
- TBE 1X (Tris-borate 0,9 M ; EDTA 0,002M), pour 1 litre :
 - 54 g de Tris (Merck, Darmstadt, 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 µg/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)
- Marqueurs ADN de poids moléculaire utilisé (Figure II.8) :
 - Smart Ladder (Eurogentec, Seraing, Belgique) : fragments à 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 800, 600, 400, 200 pb.
 - 1kb DNA Ladder (Promega, Madison, USA) : fragments à 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250 pb.

b) Méthode

- Porter à ébullition un volume approprié d'un mélange contenant du TBE 1X additionné de 0,5 à 2 % 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 refroidir.
- 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 80 V et 120 V. Les fragments d'ADN, chargés négativement, se déplacent vers l'anode, alors que le bromure d'éthidium non lié, chargé positivement migre vers la cathode.
- Stopper l'électrophorèse et visualiser les différents fragments dans le gel sous une illumination U.V.
- Photographier le gel.

II.1.8 Réaction de ligation

(Sambrook *et al.*, 1996)

II.1.8.1 Traitement à la phosphatase alcaline (optionnel)

De manière à éviter la recircularisation du plasmide sur lui-même lors de la ligation, il est possible de le traiter à la phosphatase alcaline, une enzyme qui déphosphoryle les extrémités 5'-phosphate.

a) Méthode

- Mettre x μ l de phosphatase alcaline (Boehringer, Mannheim, Allemagne) à raison de 1 U/ μ g d'ADN à traiter.
- Ajouter 1/10 du volume final de tampon (Boehringer, Mannheim, Allemagne).
- Ajouter x μ l de plasmide.
- Compléter avec de l'eau distillée pour atteindre le volume final désiré.
- Incuber une heure à 37°C.
- Stopper la réaction par chauffage 5 minutes à 65°C.

II.1.8.2 Ligation

L'ADN ligase du bactériophage T4, en présence d'ATP et d'ions Mg^{++} , peut lier de façon covalente les extrémités d'ADN 3'-OH avec des extrémités d'ADN 5'-phosphate, par formation de liaisons phosphodiester 3'-5' propres aux acides nucléiques.

a) Méthode

- Dans un eppendorf, placer un mélange des deux fragments à lier.
- Ajouter le tampon de ligation (Promega, Madison, USA) : 1/10 du volume final du mélange de ligation.
- Compléter avec de l'eau distillée pour atteindre le volume final.
- Ajouter finalement la T4 ADN ligase (Promega, Madison, USA), à raison de 1 à 3 U pour un volume final de réaction de 20 µl.
- Incuber le mélange de ligation 12 heures soit à 4°C soit à 14°C.

II.1.9 Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR)

(Griffin & Griffin, 1994).

Cette technique d'amplification enzymatique consiste à amplifier spécifiquement un fragment d'ADN (matrice) encadré de séquences connues. Ce procédé est rendu possible grâce à l'utilisation, d'une part, d'amorces oligonucléotidiques anticcomplémentaires (c'est-à-dire de courts fragments d'ADN simple brin de séquence choisie) et, d'autre part, par l'emploi d'une ADN polymérase.

La PCR est réalisée par l'enchaînement de cycles successifs de dénaturation de l'ADN cible, hybridation des amorces et polymérisation d'une molécule d'ADN complémentaire sur laquelle s'hybrident ces amorces. Chacun de ces cycles est dépendant de la température à laquelle est placé le mélange réactionnel, ce qui justifie l'utilisation d'une polymérase thermostable. La répétition de ces cycles permet l'amplification quasi exponentielle de la séquence d'ADN cible : théoriquement, à chaque cycle est produit un nombre de molécules égal au nombre présent au cycle précédent.

II.1.9.1 Préparation du mélange réactionnel

- Amorce sens 10 pm (picomoles)
- Amorce anti-sens 10 pm (picomoles)
- dNTP
- Tampon de la polymérase concentré 1X
- Matrice
- Polymérase 1 unité
- Ajouter de l'eau stérile distillée pour atteindre le volume final désiré.

Les enzymes utilisées lors de ce mémoire sont :

- enzyme Pfu (Promega, Madison, USA)
- enzyme Vent (New England Biolabs, Beverly, USA)

II.1.9.2 Programmation des cycles PCR

L'appareil utilisé est le Gene Amp PCR System 9700 (PE Applied Biosystems, Perkin-Elmer, Foster City, USA).

Une réaction PCR standard se compose d'une :

- Dénaturation longue de 5 minutes à 96°C.
- Série de cycles (35 cycles) :
 - Dénaturation 10 secondes à 96°C.
 - Hybridation 10 secondes à 65°C.
 - Elongation 60 secondes à 75°C.

Le temps d'élongation utilisé est fonction de la taille du produit à amplifier et de la vitesse à laquelle la polymérase travaille.

Elle se termine par une étape d'élongation « finale » de 5 minutes à 75°C.

Les produits PCR sont conservés à 4°C.

II.1.9.3 Vérification de la production PCR

Le produit PCR est déposé sur un gel d'agarose (voir point II.1.6) afin de vérifier la taille du fragment amplifié par PCR.

II.1.9.4 Purification de la production PCR

L'ADN amplifié par PCR est purifié sur colonne échangeuse d'ions avec le kit High Pure Product Purification Kit (Boehringer, Mannheim, Allemagne) (voir point II.1.7.2).

II.1.9.5 Dosage de l'ADN purifié

Après purification, l'ADN amplifié par PCR est dosé au spectrophotomètre (GeneQuant II, Pharmacia Biotech).

II.1.10 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. Le mix PCR contient un ratio adéquat de nucléotides modifiés, marqués par un agent fluorescent (rhodamine, fluorescéine,...) stoppant l'élongation du brin et de nucléotides non marqués permettant l'élongation.

La réaction d'élongation produit une population d'amplicons de taille variable, terminés par un nucléotide marqué. 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 qui excite les marqueurs fluorescents émettant sous une autre longueur d'onde qui leur est spécifique. La succession des rayonnements émis est analysée, ce qui donne la séquence du fragment.

II.1.10.1 Préparation du mix d'élongation

a) Matériel

- Appareil PCR utilisé : Gene Amp PCR System 9700
- 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

b) 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 6 µl.
- Mettre 4 µl de Terminator Ready Réaction mix.

Les conditions PCR sont les suivantes :

- Dénaturation à 96°C pendant 30 secondes.
- Hybridation à 55°C pendant 30 secondes.
- Elongation à 60°C pendant 4 minutes.

On réalise 25 cycles et on conserve à 4°C à l'abri de la lumière.

II.1.10.2 Préparation des échantillons pour l'analyse sur gel

a) Matériel

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

b) 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 minutes à température ambiante pour précipiter les produits d'extension.
- Centrifuger 20 minutes à 16000 rpm à 4°C (Heraus Sepatech, Biofuge 17RS, rotor 1379).
- Eliminer le surnageant à la micropipette.
- Ajouter 250 µl d'éthanol 70 % et vortexer.
- Centrifuger 10 minutes à 16000 rpm à 4°C (Heraus Sepatech, Biofuge 17RS, rotor 1379).
- Eliminer le surnageant à la pipette.
- 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).

II.2 ASPECT CELLULAIRE

II.2.1 Culture cellulaire

II.2.1.1 Culture des cellules HepG2

a) Caractéristiques de la lignée Hep G2

La lignée cellulaire HepG2 provient d'un hépatome humain.

b) Milieux de culture et solutions

- Milieu DMEM + sérum : milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) enrichi par 10 % de sérum de veau foetal et additionné de glutamine (0,5 mM) (Gibco, Paisley, Grande Bretagne).

Antibiotiques ajoutés au milieu DMEM :

- Amphotéricine-B : 0,25 µg/ml (Gibco, Paisley, Grande Bretagne).
- Streptomycine sulfate : 100 µg/ml (Sigma, St Louis, USA).
- Pénicilline : 100 U/ml (Sigma, St Louis, USA).
- Milieu de rinçage : DMEM sans serum.

- Trypsine-EDTA : solution de trypsine à 0,5 g/l et EDTA à 0,2 g/l préparée dans une solution de Puck.

c) Repiquage des cellules HepG2

Les HepG2 sont cultivées dans des boîtes de culture de 75 cm² (T75, Costar, Corning, New York, USA) et sont repiquées environ deux fois par semaine en 2, 3 ou 4 en fonction de leur état de confluence selon le protocole suivant.

Le milieu de culture est décanté et les cellules sont rincées avec 10 ml de milieu de rinçage. Ensuite, les cellules sont détachées au moyen de 1 ml de trypsine + EDTA (chélateur de cations, 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 4 ml de DMEM + 10 % sérum. Ensuite, la suspension cellulaire est transvasée dans un tube stérile de 10 ml (Sterilin, Festham, Grande Bretagne) et centrifugé pendant 10 minutes à 1000 rpm (Centrifugeuse Universal, Hettich, Allemagne).

Le surnageant est décanté et le culot de cellules est resuspendu dans 6, 9 ou 10 ml de milieu DMEM + 10 % sérum pour un repiquage respectivement en 2, 3 ou 4. Les cellules sont ensuite réparties 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 % CO₂). Lorsque les cellules sont suffisamment confluentes, elles sont repiquées selon le même procédé.

II.2.2 Incubation sous hypoxie ou en présence de PMA

a) Matériel

- Milieu modifié : le milieu employé lors des incubations sous hypoxie est du milieu CO₂ indépendant (Gibco, Paisley, Grande-Bretagne) auquel on a ajouté 7,3 mg de glutamine pour 100 ml et des antibiotiques (Amphotéricine B et Pénicilline G). Ce milieu ne contient pas de sérum.
- PMA 100 nM (Sigma, St Louis, USA).

b) Méthode

Préalablement à l'incubation sous hypoxie, les cellules sont incubées 24 heures dans du DMEM sans sérum. Ensuite, le milieu des cellules est décanté et les cellules sont alors couvertes par du milieu CO₂ indépendant. La hauteur de ce milieu modifié doit être réduite à un fin film afin de faciliter la diffusion des gaz atmosphériques tout en empêchant la dessiccation des cellules. Le volume correspond à 300 µl pour les puits des

plaques à 24 puits et à 4 ml pour les boîtes de culture T75. Les boîtes sont ensuite ouvertes et placées dans un incubateur où règne une atmosphère composée à 99 % en azote et 1 % d'O₂ et incubées à 37 °C. Des boîtes contrôles sont incubées dans les mêmes conditions mais dans une atmosphère normale ou normoxie.

Pour les stimulations en présence de PMA, les cellules sont également cultivées dans du milieu CO₂ indépendant auquel on ajoute du PMA à une concentration finale de 100 nM.

II.2.3 Northern blot

La technique du northern blot permet de quantifier un ARN spécifique au sein d'une population hétérogène. Après extraction, les ARN totaux sont soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose en conditions dénaturantes afin d'obtenir une séparation en fonction de leur taille. Ils sont ensuite transférés sur une membrane de nylon. La révélation d'un ARN spécifique se fait alors grâce à une étape d'hybridation de cette membrane avec une sonde d'ADN radioactive qui reconnaît au moins une vingtaine de bases de la partie codante du gène correspondant.

L'extrême sensibilité des ARN vis-à-vis des RNases, enzymes très répandues et très stables, implique de travailler avec grand soin (port de gants) et dans des conditions RNases-free.

II.2.3.1 Extraction d'ARN total

L'ARN est extrait de cellules HepG2 incubées 5 heures en hypoxie, en présence de PMA ou en normoxie (voir point II.2.2)

a) Matériel et solutions

- PBS stérile
- tampon de lyse :
pour 500 ml :
 - 250 g de thiocyanate de guanidium (Sigma, St Louis, USA)
 - 17,5 ml de citrate de sodium 0,75 M pH 7,0 (Merck, Darmstadt, Allemagne)
 - 26,5 ml de sarkosyl 10 %
 - porter à volume avec de l'eau traitée au DEPC (0,5 %) (Sigma, St Louis, USA).

N.B. : à conserver à 4°C dans des tubes falcon de 50 ml.

- β-Mercaptoéthanol (Sigma, St Louis, USA)
- acétate de Na 2 M pH 4,0 (Merck, Darmstadt, Allemagne)
- phénol saturé en citrate de Na 0,1 M (conservé à 4°C) (Sigma, St Louis, USA)

- chloroforme (Merck, Darmstadt, Allemagne)
- isopropanol
- acétate d'ammonium pH 7,5
- éthanol 100 % (Merck, Darmstadt, Allemagne)

b) Méthode

- Retirer le milieu de culture et laver les cellules 2 fois avec 10 ml de PBS refroidi sur glace (4°C). Eliminer tout le surnageant et mettre les boîtes sur glace.
- Pour lyser les cellules, utiliser 4 ml de tampon de lyse additionné de β -mercaptoéthanol (0,35 ml pour 50 ml de tampon de lyse) par boîte de culture T75. Laisser agir entre 2 et 5 minutes puis amener le tampon de lyse dans le fond des boîtes au moyen d'un racloir.
- Transférer la solution dans un tube corex stérile de 30 ml.

N.B. : Ne pas mettre plus que le contenu de 2 boîtes par tube corex.

- Pour un volume de tampon de lyse, ajouter :
 - 0,1 volume d'une solution d'acétate de Na 2M pH 4,0
 - 1 volume de phénol saturé en citrate de Na 0,1M
 - 0,2 volume de chloroformeMélanger vigoureusement après l'addition de chaque réactif.
- Mélanger vigoureusement la suspension finale qui prend une coloration laiteuse et la refroidir sur glace pendant 20 minutes.
- Centrifuger à 8000 rpm pendant 20 minutes à 4°C (Beckman J-21B, rotor JA-20) après avoir équilibré les tubes corex avec du tampon de lyse.
- Prélever délicatement la phase aqueuse (supérieure) et la déposer dans un nouveau tube corex stérile de 30 ml. Eliminer la phase organique (inférieure).
- Ajouter un volume d'isopropanol à la phase aqueuse pour un volume de tampon de lyse et placer la solution 1 heure à -20°C pour permettre la précipitation de l'ARN.
- Centrifuger à 12000 rpm pendant 20 minutes à 4°C (Beckman J-21B, rotor JA-20) après avoir équilibré avec de l'isopropanol. Ensuite, dissoudre le culot dans 2 ml de tampon de lyse.
- Ajouter :
 - 0,5 ml d'acétate d'ammonium pH 7,5
 - 7,5 ml d'éthanol 100 %
- Précipiter overnight à -20°C.
- Centrifuger à 12000 rpm pendant 20 minutes à 4°C (Beckman J-21B, rotor JA-20) après avoir équilibré avec de l'éthanol.
- Laver le culot d'ARN au moyen de 5 ml d'éthanol refroidi à 4°C.
- Centrifuger à 12000 rpm pendant 20 minutes à 4°C (Beckman J-21B, rotor JA-20) après avoir équilibré avec de l'éthanol.

- Décanter le surnageant au maximum et resuspendre le culot dans 100 µl d'eau distillée .
- Estimer la quantité d'ARN au spectrophotomètre et congeler à -70°C.

II.2.3.2 Electrophorèse

a) Matériel et solutions

- Solution MOPS 20 x pH 7.0 :
MOPS 0,4 M (Sigma, St Louis, USA)
Acétate de sodium 100 mM (Merck, Darmstadt, Allemagne)
EDTA 20 mM (Merck, Darmstadt, Allemagne)
Porter au volume désiré avec de l'H₂O DEPC.
Conserver à l'abri de la lumière.
- Gel d'agarose :
Dans un tube stérile de 50 ml :- 5 ml de MOPS 20 x (Sigma, St Louis, USA)
- 27,2 ml d'eau distillée
- 17,8 ml de formaldéhyde 37 % (Sigma, Saint-Louis, USA)

Dans un erlen de 250 ml : - 1,2 g agarose (Bio-Rad, Richmond, USA)
- 50 ml d'eau distillée
- Tampon d'échantillon :
Pour un échantillon - 2 µl de MOPS 20 x (Merck, Darmstadt, Allemagne)
- 7 µl de formaldéhyde 37 % (Sigma, St Louis, USA)
- 20 µl de formamide (Sigma, St Louis, USA)
- Solution de SDS 10 % (Merck, Darmstadt, Allemagne)

b) Méthode

- Laver la cuve d'électrophorèse (Horizon 11-14, Gibco, Paisley, Grande-Bretagne) dans une solution SDS 10 % pendant quelques minutes puis rincer à l'eau DEPC.
- Préparer les 2 solutions pour le gel comme mentionné ci-dessus, faire chauffer au micro-onde le mélange contenu dans l'erlen durant 1 minute. Ensuite, mélanger les 2 solutions en évitant de faire des bulles. Couler le gel sur son support.
- Pendant le refroidissement du gel (environ 1 heure), préparer les échantillons comme suit : dans un eppendorf, mettre 10 µg d'ARN/puits, ajouter le tampon d'échantillon et porter au volume désiré avec de l'eau distillée.
- Dénaturer l'ARN en chauffant les échantillons 15 minutes à 65°C puis refroidir les échantillons sur glace pendant 2 minutes. Ensuite, ajouter aux échantillons 6 µl de bleu de bromophénol et 1 µl de bromure d'éthidium.
- Déposer 40 µl d'échantillon par puits et faire migrer à 100 volts pendant environ 4 heures.

- Observer le gel sous une lampe U.V. Si l'ARN n'est pas dégradé, on observe 2 bandes principales d'ARN ribosomal d'environ 3 kb (ARN 28 S) et d'environ 2 kb (ARN 18 S).

II.2.3.3 Transfert

a) Matériel et solutions

- Solution de NaOH 50 mM (Merck, Darmstadt, Allemagne)
- SSC 20 x pH 7,0:
 - Pour 1 litre : - 175,3 g NaCl (Merck, Darmstadt, Allemagne)
 - 88,2 g de citrate de sodium (Merck, Darmstadt, Allemagne)
 - porter à volume avec de l'eau distillée et autoclaver
- Solution de SSC 10 x
- Solution de SSC 2 x
- Solution de SDS 10 %
- Membrane Hybond-N+ (Amersham, Gand, Belgique)

b) Méthode

- Plonger le gel dans 300 ml d'une solution NaOH 50 mM pendant 15 minutes sous une légère agitation pour éliminer le bromure d'éthidium et le tampon de migration dont la présence peut limiter l'efficacité du transfert, puis rincer 3 x avec de l'eau distillée.
- Le gel est ensuite incubé pendant 30 minutes dans 300 ml de SSC 10 x afin d'éliminer au maximum le bromure d'éthidium et le formaldéhyde, et d'équilibrer le gel avec le SSC 10 x.
- Pendant ce temps, on découpe un morceau de membrane de nylon, 8 morceaux de papier Whatman et une pile de papier buvard d'environ 5 cm d'épaisseur.
- Le montage suivant est ensuite réalisé : dans un bac contenant du SSC 10 x, on place un support en verre (préalablement lavé avec du SDS 10 %, puis rincé avec de l'eau distillée et de l'eau DEPC) sur lequel on met une feuille de papier Whatman dont les extrémités plongent dans le SSC 10 x. On place ensuite, dans l'ordre, le gel, la membrane, plusieurs papiers Whatman, la pile de papier buvard, une plaque de verre et des poids. Le montage doit être parfaitement plan pour éviter un transfert disymétrique. Le but du montage est d'établir un flux de SSC 10 x à travers le gel vers la membrane.
- Incuber une nuit.
- Rincer la membrane dans 100 ml de SSC 2 x pendant 1 minute.
- Placer la membrane sur une feuille de papier Whatman et la laisser sécher à l'air libre. Afin de fixer les molécules d'ARN, on chauffe la membrane à 80°C pendant 1 à 2 heures. La membrane peut alors être utilisée pour l'hybridation.

II.2.3.4 Marquage et purification des sondes

Le principe est de marquer des fragments d'ADN pour qu'ils puissent être utilisés comme sondes d'hybridation.

L'ADN « sonde » est d'abord dénaturé, puis mélangé avec des hexadéoxyribonucléotides de séquence aléatoire. Ces hexamères aléatoires se lient à des sites sur l'ADN « sonde » et servent de primers pour la synthèse d'ADN par une ADN polymérase. En présence de nucléotides marqués radioactivement, de l'ADN marqué est généré.

a) Matériel et solutions

- α -[³²P]-dCTP (NEN, Boston, USA)
- Kit Oligolabelling (Amersham Pharmacia Biotech, USA) :
 - ADN polymérase I « Klenow Fragment » de *E. Coli*
 - Reagent Mix contenant les dATP, dGTP, dTTP et les hexadéoxyribonucléotides aléatoires.
- Sonde de 1018 bp correspondant au domaine bHLH-PAS de HIF-1 α amplifiée par PCR (voir point II.1.9).
- Quick spin colonne : séphadex G-25 (Boehringer, Mannheim, Allemagne)
- Aqualuma (Lumac, Landgraaf, Pays-Bas)
- Compteur à scintillation β (Beckman LS1801, USA)

b) Méthode

- Dénaturer la sonde en la chauffant pendant 5 minutes à 100°C.
- Placer la sonde dénaturée sur glace pendant 2 minutes.
- Préparer le mix pour le marquage :
 - 200 ng de sonde dénaturée
 - 10 μ l de reagent mix
 - 5 μ l de α -[³²P]-dCTP
 - 1 μ l d'ADN polymérase I
 - porter à 50 μ l avec de l'eau distillée
- Incuber 1 heure à 37°C.

La sonde marquée est ensuite purifiée sur spin colonne. Le volume de l'échantillon est porté à 50 μ l en ajoutant 30 μ l d'eau distillée stérile. Après avoir resuspendu la résine dans le tampon, la colonne est placée dans un tube de 10 ml, puis tassée par une centrifugation de 2 minutes à 2400 rpm (Jouan B3-11). L'échantillon est ensuite déposé au centre de la colonne et on procède à une nouvelle centrifugation de 2 minutes à 2400 rpm. Cette dernière opération va être répétée plusieurs fois en récoltant l'éluat dans un tube différent à chaque fois. Le compteur Geiger permet d'évaluer dans quel tube la

sonde a été recueillie. La radioactivité contenue dans 1µl est évaluée au compteur à scintillation (triplicat) avec 5 ml d'Aqualuma.

II.2.3.5 Préhybridation, hybridation et lavage des membranes

a) Matériel et solutions

- Solution de préhybridation :
 - Formamide 50 % (Sigma, St Louis, USA)
 - SSC 5 x
 - SDS 1 % (Merck, Darmstadt, Allemagne)
 - Denhart 2 x
 - Dextran Sulfate 5 % autoclavé (Sigma, St Louis, USA)
 - ADN de sperme de saumon 12 µg/ml
- Solution d'hybridation :
 - Solution de préhybridation
 - Sonde dénaturée
- Solution de lavage I :
 - SSC 2 x
 - SDS 0,1 % (Merck, Darmstadt, Allemagne)
- Solution de lavage II :
 - SSC 0,5 x
 - SDS 0,1 % (Merck, Darmstadt, Allemagne)
- Solution de lavage III :
 - SSC 0,1 x
 - SDS 0,1 % (Merck, Darmstadt, Allemagne)
- Denhart 20 x :
 - Polyvinylpyrrolidon 0,02 M (Sigma, St Louis, USA)
 - Ficoll 400 10 µg/ml (Amersham Pharmacia, Uppsala, Suède)
 - Albumine bovine fraction V (A-6793) 0,15 mM (Sigma, St Louis, USA)
- SSC 20 x pH 7,0 :
 - NaCl 3 M (Merck, Darmstadt, Allemagne)
 - Citrate de sodium 0,3 M (Merck, Darmstadt, Allemagne)

b) Méthode

- Immerger la membrane dans le tampon d'hybridation ne contenant pas encore la sonde. Incuber entre 4 et 5 heures à 42°C sous faible agitation dans un hybridtube (le dessus de la membrane à l'intérieur du tube en contact avec le tampon d'hybridation). Cette étape permet de saturer la membrane avec de l'ADN dénaturé d'origine biologique différente des ARN d'intérêt (en l'occurrence l'ADN de sperme de

saumon), ce qui diminue les risques de liaison non spécifique de la sonde avec la membrane, et donc le bruit de fond.

- Ajouter ensuite à la sonde radioactive dont l'activité spécifique est de 1×10^8 cpm/ μ g, de l'ADN de sperme de saumon à raison de 60 μ l à 1 mg/ml pour 5 ml de volume d'hybridation.
- Dénaturer ce mélange en le chauffant 10 minutes à 100°C puis le placer 5 minutes sur glace.
- Ajouter le mélange à la sonde d'ADN dénaturée dans l'hybritube. Cette étape d'hybridation est réalisée à 42°C, sous faible agitation, pendant une nuit. Au terme de cette période d'hybridation, on enlève la solution d'hybridation, on lave la membrane 2 x dans 150 ml de solution de lavage I pendant 30 minutes à température ambiante puis 2 x dans 150 ml de solution de lavage II pendant 30 minutes entre 42°C et 55°C. Il est parfois nécessaire de faire 1 ou 2 lavages supplémentaires avec la solution de lavage III à une température entre 55°C et 62°C pour éliminer le bruit de fond de manière plus efficace.
- Vérifier que le bruit de fond n'est pas trop important à l'aide du compteur Geiger.
- La membrane est alors enveloppée de cellophane afin qu'elle reste humide, ceci est important si on veut par la suite décrocher la sonde et réhybrider la membrane avec une autre sonde.

II.2.3.6 Quantification et révélation

a) Matériel

- Instant Imager (Packard, Downers Grove, USA)
- Film MP pour isotopes émettant des radiations β et γ (Amersham, Gand, Belgique)
- Pour révéler les films, nous utilisons un révélateur dilué 5x (PQ Universal, Ilford, Grande-Bretagne), et un fixateur dilué 5x (Hypam, Ilford, Grande-Bretagne).

b) Méthode

Dès la fin des lavages, l'Instant Imager permet une première visualisation et une quantification des bandes observées. Suivant le niveau d'expression de l'ARN analysé, le temps d'exposition nécessaire pour obtenir un signal suffisant varie entre 5 minutes et 8 heures.

Dans une cassette, on met en présence la membrane et un film d'autoradiographie. Le temps d'exposition varie ici entre 12 heures et une semaine suivant l'ARN analysé. L'analyse à l'Instant Imager donne une évaluation approximative de ce temps. Pour développer le film, on le place dans le révélateur jusqu'à ce qu'apparaissent les bandes, puis dans de l'eau distillée et enfin dans un bain contenant le fixateur. Pour terminer, le film est rincé à l'eau courante avant d'être séché à l'air libre.

II.2.4 Western blot

La technique du Western blot permet de détecter une protéine particulière dans un extrait cellulaire. Les principales étapes de cette technique sont les suivantes :

- Séparation des protéines de l'extrait par électrophorèse.
- Transfert des protéines sur un support solide, en l'occurrence une membrane en dioxyfluorure de polyvinylidène.
- Détection de la protéine recherchée par un anticorps spécifique.
- Révélation par chimioluminescence, par le système ECL (Enhanced ChemiLuminescence).

II.2.4.1 Préparation des extraits cellulaires totaux

Les extraits cellulaires totaux sont préparés à partir de cellules HepG2 cultivées dans des boîtes de 25 cm². Avant l'extraction, les cellules ont été privées de sérum pendant 24 heures, puis incubées 1, 2,5 et 5 heures sous hypoxie, en présence de PMA ou en normoxie (voir point II.2.2).

a) Matériel et solutions

- PBS
- Tampon de lyse :
 - Tris 40 mM pH7,5 (Merck, Darmstadt, Allemagne)
 - KCl 300mM (Merck, Darmstadt, Allemagne)
 - EDTA 2mM (Merck, Darmstadt, Allemagne)
 - Triton X-100 1 % (Sigma, St Louis, USA)
 - inhibiteurs de protéase 1x (Complete protease inhibitor cocktail tablets 25 x, Boehringer, Mannheim, Allemagne)
 - inhibiteurs de phosphatase 1x à partir d'un stock 25 x :
 - NaVO₃ 25 mM (Sigma, St Louis, USA)
 - PNPP (phospho-nitrophényl phosphate) 250 mM
 - α-glycérophosphate 250 mM (Sigma, St Louis, USA)
 - NaF 125 mM (Merck, Darmstadt, USA)

b) Méthode

- Laver les cellules avec du PBS froid.
- Lysér les cellules avec 500 µl de tampon de lyse pour une boîte de culture T25.
- Collecter le lysat dans des eppendorfs et incubé à 4°C pendant 30 minutes.
- Centrifuger 15 minutes à 15000 rpm à 4°C (Heraus Sepatech, Biofuge 17RS, rotor 1379).

- Récupérer le surnageant et le conserver à -20°C .
- Garder un aliquot pour réaliser un dosage de protéines par la technique de Bradford (voir point II.2.5).

II.2.4.2 Electrophorèse

a) Matériel

- Gel séparateur d'acrylamide 13 % (ce pourcentage est à ajuster en fonction du PM des protéines que l'on veut mettre en évidence) composé de :
 - 14 ml de tampon Tris 2 M pH 8,8 (Merck, Darmstadt, Allemagne). La solution stock est à conserver maximum 3 mois à 4°C .
 - 16,25 ml d'acrylamide 30 %/N,N'-méthylène bisacrylamide 0,15 %. Cette solution se conserve maximum 6 semaines à 4°C à l'abri de la lumière.
 - 187 μl de SDS 20 % : dodécylsulfate de sodium (Merck, Darmstadt, Allemagne). La solution stock de 20 % se conserve à température ambiante car il précipite à 4°C .
 - 7,1 ml d'eau distillée.
 - 20 μl de TEMED (Bio-Rad, Richmond, USA).
 - 75 μl d'ammonium persulfate 10 % fraîchement préparé (Serva, Verviers, Belgique).
- Le gel concentrateur est composé de :
 - 2,5 ml de tampon Tris 0,5 M pH 6,8 (Merck, Darmstadt, Allemagne). La solution stock est à conserver maximum 3 mois à 4°C .
 - 1,5 ml d'acrylamide 30 %/N,N'-méthylène bisacrylamide 0,8 %. Cette solution se conserve maximum 1,5 mois à 4°C à l'abri de la lumière.
 - 50 μl de SDS 20 % : dodécylsulfate de sodium (Merck, Darmstadt, Allemagne). La solution stock de 20 % se conserve à température ambiante car il précipite à 4°C .
 - 6 ml d'eau distillée.
 - 15 μl de TEMED (Bio-Rad, Richmond, USA).
 - 50 μl d'ammonium persulfate 10 % fraîchement préparé (Serva, Verviers, Belgique).
- Le tampon d'électrophorèse est dilué 4X avant usage à partir d'une solution stock composée de :
 - Tris 0,05 M (Merck, Darmstadt, Allemagne)/glycine 0,38 M (Merck, Darmstadt, Allemagne), pH 8,3.
 - SDS 0,1 % (Merck, Darmstadt, Allemagne).Cette solution se conserve à température ambiante pendant un mois maximum.

- Le tampon d'échantillon est composé de :
 - Tris-HCl 1 M pH 6,8 (Merck, Darmstadt, Allemagne).
 - SDS 20 % (Merck, Darmstadt, Allemagne).
 - Glycérol 20 % (Merck, Darmstadt, Allemagne).
 - Bleu de bromophénol 1 % (Janssen Chimica, Beerse, Belgique).
 - β -Mercaptoéthanol 4 % (Sigma, St Louis, USA).

- Etalon de poids moléculaire Full Range Rainbow : protéines dont la taille est comprise entre 10 et 250 kDa (Amersham International, Buckinghamshire, Grande-Bretagne).

b) Méthode

Une fois réalisé le montage des plaques, on coule le gel séparateur entre les plaques et ce jusqu'à environ 1 cm en dessous du peigne. On ajoute alors à la surface du gel ainsi coulé de l'isobutanol saturé en eau pour éviter que le gel ne se craque en surface et pour favoriser la polymérisation en le préservant de l'oxygène.

Après polymérisation du gel (environ 1 heure 20 minutes), l'isobutanol est enlevé et la surface du gel est rincée avec de l'eau distillée. On enlève l'excès d'eau avec un papier Whatman puis le gel concentrateur est coulé jusqu'au bord des plaques. La polymérisation de ce dernier prend 45 à 60 minutes.

Pendant ce temps, les différents échantillons sont préparés. On prélève de chaque fraction le volume adéquat, de manière à déposer une quantité équivalente de protéines par puits (environ 20 μ g), et on y ajoute un volume de tampon d'échantillon concentré 2 x. Ensuite, les protéines sont dénaturées à 100°C pendant 5 minutes.

Une fois le gel concentrateur polymérisé, les échantillons et l'étalon préparés, on enlève délicatement le peigne ainsi que les pinces puis on place le gel dans la cuve à électrophorèse avec du tampon d'électrophorèse. Ensuite, on dépose les échantillons dans le fond des puits et on les fait migrer pendant 1 heure 30 à 30 mA (à travers le gel concentrateur) puis entre 3 et 4 heures à 45 mA (à travers le gel séparateur).

II.2.4.3 Transfert

a) Matériel

- Tampon de transfert :
 - tampon Tris 0,5 M (Merck, Darmstadt, Allemagne).
 - glycine 0,76 M (Merck, Darmstadt, Allemagne) pH 8,3 auquel on ajoute du méthanol 20 % final (Janssen Chimica, Beerse, Belgique).

- membrane immobilon en diofluorure de polyvylidène (Bio-Rad, Richmond, USA).

b) Méthode

Le transfert («blotting») se réalise en 3 étapes : une étape préliminaire qui consiste à préparer la membrane, l'arrêt de l'électrophorèse et la préparation du système de transfert («système sandwich»).

On découpe la membrane à la grandeur du gel séparateur, puis on l'immerge pendant 1 minute dans du méthanol 100 % et on l'équilibre enfin avec du tampon de transfert pendant 15 minutes. Parallèlement, on immerge dans du tampon de transfert : 2 éponges, 4 feuilles de papier Whatman (3 mm).

Lorsque le front de migration visualisé par le bleu de bromophénol se trouve à environ 1 cm du bas du gel, on arrête l'électrophorèse.

Ensuite, sur le support inférieur de l'appareil de transfert (2117 Multiphor II Electrophoresis Unit ; Pharmacia), on dépose par ordre et en évitant les bulles d'air :

- 1 éponge
- 2 feuilles de papier Whatman (3 mm) de la grandeur du gel
- La membrane de PVDF
- Le gel séparateur
- 2 feuilles de papier Whatman
- 1 éponge

Après avoir imbibé le «système sandwich» avec du tampon de transfert, le tout est déposé dans l'appareil mentionné ci-dessus de sorte que le gel soit du côté du pôle négatif et donc la membrane du côté du pôle positif. Les protéines, chargées négativement (électrophorèse au SDS), vont migrer du gel vers la membrane. Pour terminer, on place la plaque supérieure de l'appareil. On réalise le transfert toute la nuit à 30 mA.

II.2.4.4 Traitement et révélation

a) Matériel

- Blotto 5 % à préparer le jour même :
 - PBS 1X final dilué à partir d'une solution stock de PBS 10X
 - Lait en poudre 5 % (Gloria)
 - 1 % de Tween 20 (Sigma, St Louis, USA)
 - Porter au volume désiré avec de l'eau distillée.
- Solution TBS pH 7,4 + 0,1 % Tween 20 + 0,1 % de lait en poudre.

On prépare une solution stock constituée de Tris 0,2 M (Merck, Darmstadt, Allemagne), NaCl 1,37 M (Merck, Darmstadt, Allemagne). Cette solution se

conserve à température ambiante et le jour de l'expérience, elle est diluée 10 x de la manière suivante :

- 100 ml de la solution stock
 - 900 ml d'eau distillée
 - 1 ml de Tween 20 (Sigma, St Louis, USA)
 - 0,1 % de lait en poudre (Gloria)
- Solution TBS pH 7,4 + 0,1% Tween 20 + 0,1 % BSA.
La solution est la même que la précédente si ce n'est que l'on ajoute 1 % de BSA (Bovine Serum Albumin) (Sigma, St Louis, USA) au lieu de 0,1 % de lait en poudre.
- Anticorps primaires :
- anticorps de lapin anti c-jun (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) dilué 1000 x.
 - anticorps de souris anti-P-c-jun (New England Biolabs, Beverly, USA) dilué 1000 x.
 - anticorps de souris anti-P-p42/p44 (New England Biolabs, Beverly, USA) dilué 1000 x.
 - anticorps de lapin anti-P-p46/p56 (New England Biolabs, Beverly, USA) dilué 1000 x.
 - anticorps de lapin anti-P-p46/p56 (Promega, Madison, USA) dilué 4000 x.
 - anticorps de souris anti-JNK1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA).
 - anticorps de souris anti-HIF-1 α (Pharmigen, San Diego, USA)
 - anticorps de lapin anti-P-p38 (New England Biolabs, Beverly, USA) dilué 1000 x.
 - anticorps de souris anti- α -tubuline (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) dilué 2000 x.
 - anticorps de souris anti-Histone H1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) dilué 2000 x.

N.B. : Les anticorps dirigés contre des protéines non phosphorylées sont dilués dans du TBS-Tween + lait 0,1 %.

Les anticorps dirigés contre des protéines phosphorylées sont généralement dilués dans du TBS-Tween + BSA 0,1 % car la lait contient une quantité non négligeable de protéines phosphorylées, ce qui entraîne un risque de liaison non spécifique de l'anticorps.

- Anticorps secondaires : -anticorps anti-IgG de souris couplé à la peroxydase (Amersham, Gand, Belgique) dilué 1000 x.

- anticorps anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase (Amersham, Gand, Belgique) dilué 1000 x.
- anticorps anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase (Proméga, Madison, USA).

b) Méthode

Le lendemain matin, on arrête le transfert. La membrane est alors placée dans une bouteille en plastique en présence de 50 ml de Blotto 5 % pendant 1 heure à température ambiante, sous agitation. Le Blotto 5 % va saturer la membrane et donc empêcher les fixations non spécifiques des anticorps. La membrane est alors rincée 4 x (1 x 15 minutes et 3 x 5 minutes) avec la solution de TBS-T 1 x + 0,1 % de lait en poudre.

Pour localiser sur le support la protéine d'intérêt, nous utilisons un anticorps primaire qui reconnaît spécifiquement cette protéine. La détection se fait de manière indirecte puisque l'on ajoute un second anticorps qui reconnaît le premier. Cet anticorps secondaire est couplé à la 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 (Figure II.9). On voit donc apparaître une bande sur le film à l'endroit où se trouve la protéine d'intérêt.

En pratique, après les 4 rinçages, la membrane est incubée 2 heures en présence de l'anticorps primaire dilué dans du TBS-T + 0,1 % de lait ou 1% de BSA comme mentionné ci-dessus. Les anticorps non fixés sont éliminés par 4 rinçages (1 x 15 minutes et 3 x 5 minutes) avec du TBS-T + 0,1 % de lait si l'anticorps primaire est dirigé contre une protéine non phosphorylée, avec du TBS-T + 0,1 % BSA si l'anticorps primaire est dirigé contre une protéine phosphorylée. La membrane est ensuite incubée durant 45 minutes à température ambiante en présence de l'anticorps secondaire lié à la peroxydase dilué dans du TBS-T + 0,1 % de lait. Avant révélation, la membrane est rincée 3 x 5 minutes avec du TBS-T + 0,1 % de lait et 2 x 5 minutes avec du TBS-T sans lait. La membrane est alors mise en présence du liquide de révélation pendant 1 minute.

II.2.4.5 Révélation du film

a) Matériel

- Film d'exposition : hyperfilm MP (Amersham, Gand, Belgique).
- Pour révéler les films, on utilise un révélateur dilué 5X (PQ Universal Ilford, Grande-Bretagne) et un fixateur lui aussi dilué 5X (Hypam, Ilford, Grande-Bretagne).

b) Méthode

Après avoir soigneusement égouté au maximum la membrane, on la place dans une cassette d'autoradiographie et, en chambre noire, on dépose un film sur celle-ci. On expose le film 1 minute. Si après le développement le signal est trop intense, il convient de diminuer le temps d'exposition et, dans le cas contraire, de l'augmenter.

Le développement du film est réalisé comme expliqué au point II.2.3.6. On peut conserver la membrane, scellée entre 2 transparents et congelée à - 20°C.

II.2.5 Dosage protéique par la méthode de Bradford

a) Matériel

- Colorant Bradford (Bio-Rad, Munich, Allemagne)

b) Méthode

- Diluer le colorant 5x dans de l'eau.
- Filtrer la solution avec un filtre à café.
- Pour chaque test, ajouter 1 ml de colorant.
- Ajouter de minute en minute une quantité donnée de protéines à doser (par exemple: 5 µl).
- Laisser agir 5 min.
- Doser au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 595 nm.
- Prévoir un tube avec l'étalon (3,7 µl), un tube avec le blanc étalon (3,7 µl d'eau) et un blanc avec le tampon dans lequel se trouvent les protéines (même quantité que pour les protéines).

Les dosages sont réalisés en duplicat.

La formule à utiliser pour estimer la quantité de protéines est la suivante :

$$\frac{((\text{Moyenne test} - \text{Moyenne blanc}) / (\text{Moyenne étalon} - \text{Moyenne Blanc étalon})) \times 5}{\text{Volume des échantillons}}$$

II.2.6 Immunofluorescence

L'immunofluorescence est une technique qui permet de localiser des protéines 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'expose à un rayonnement de longueur d'onde appropriée.

a) Matériel et solutions

- Boîtes de Pétri de 3,5 cm de diamètre (Falcon, Plymouth, Grande-Bretagne).
- Lamelles couvre-objet de 13 mm de diamètre (Vel, Knittel Glaser, Allemagne).
- Lame porte-objet de 2,6 x 7,6 cm (Vel, Knittel Glaser, Allemagne).
- PBS (Phosphate Buffer Saline).
Pour 100 ml : - 0,9 g de NaCl (Merck, Darmstadt, Allemagne)
 - 2 ml de tampon $\text{KH}_2 / \text{K}_2\text{HPO}_4$ 0,5 mM pH 7,4
 porter à volume avec de l'eau distillée.
- PBS + 4 % PFA (Paraformaldéhyde) (Merck, Darmstadt, Allemagne).
- PBS + 1 % Triton X-100 (Sigma, St Louis, USA).
- PBS + 3 % BSA (Sigma, St Louis, USA).
- Anticorps primaires : Anticorps anti-c-jun (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) dilué 1000 x dans du PBS + 3 % BSA.
 Anticorps anti-P-c-jun (P sur sérine 73 ou 63) dilué 1000 x dans du PBS + 3 % BSA (New England Biolabs, Beverly, USA).
- Anticorps secondaires : anticorps anti-IgG de souris (Molecular Probes, Eugene, USA) marqués à l'Alexa 488 ou 568, dilué 1000 x dans du PBS + 3 % BSA.
- Mixture pour le marquage de l'ADN du noyau :
 PBS + 3 % BSA + RNase A (Worthington) 10 mg/ml +. iodure de propidium (Sigma, St Louis, USA) 10 µl/ml
- Mowiol (Sigma-Aldrich, Allemagne-Angleterre) : milieu de montage

b) Méthode

Après avoir été repiquées dans des boîtes de Pétri contenant quatre lamelles porte-objet puis incubées 24 heures dans un milieu sans sérum et ensuite incubées soit 2,5 heures soit 5 heures sous hypoxie, en présence de PMA ou en normoxie (voir point II.2.2), les cellules sont rincées avec 1 ml de PBS. Ensuite, les cellules sont fixées sur les lamelles avec 1 ml de PBS + 4 % PFA pendant 10 minutes avant d'être à nouveau rincées 3 x avec 1 ml de PBS. Leurs membranes sont alors perméabilisées avec 1 ml de PBS + 1 % Triton X-100 pendant 5 minutes. Après avoir rincé les cellules 2 x avec 1 ml de PBS et 1 x avec 1 ml de PBS + 3 % BSA, on décante et on réalise ensuite le marquage spécifique des cellules en les incubant en présence d'anticorps primaires pendant 12 heures à 4°C et en chambre humide. Le système de la chambre humide permet d'utiliser moins d'anticorps. Il s'agit 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. On ferme ensuite hermétiquement la boîte de Pétri pour éviter toute évaporation. Après avoir rincé les cellules avec 3 x 1 ml de PBS + 3 % BSA, on ajoute alors l'anticorps secondaire. Celui-ci est incubé sur agitateur mécanique pendant 1 heure à température ambiante en chambre humide et dans l'obscurité. Après avoir rincé les cellules avec 3 x 1 ml de PBS + 3 % BSA, on ajoute 1 ml du mélange PBS + 3 % BSA/Iodure de propidium/RNase pour le marquage des noyaux. L'iodure de propidium s'intercale entre les brins d'ADN et permet le marquage des noyaux en rouge. Les cellules sont incubées sur agitateur mécanique pendant 1 heure à température ambiante en chambre humide et dans l'obscurité. Après avoir rincé les cellules avec 3 x 1 ml de PBS + 3 % BSA, les quatre couvre-objet sont délicatement déposés à l'aide d'une pince sur une lame porte-objet sur laquelle on a préalablement déposé des gouttes 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).

II.2.7 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

La technique du retard sur gel ou EMSA permet de mettre en évidence la liaison d'une protéine avec une séquence d'ADN déterminée. Un oligonucléotide marqué radioactivement contenant la séquence cible d'un facteur de transcription est incubé en présence d'un extrait nucléaire avant d'être déposé sur un gel d'électrophorèse en conditions non dénaturantes permettant de séparer les molécules. Si la protéine active est présente dans l'extrait, elle se lie à la séquence marquée, et la migration du complexe ADN-protéine sera retardée par rapport à la migration de la sonde seule (Figure II.10). Un retard plus important peut également être mis en évidence sur le gel par l'utilisation d'un anticorps dirigé contre le facteur de transcription étudié (supershift).

Les principales étapes de cette technique sont les suivantes : la culture des cellules et l'incubation en normoxie, en hypoxie ou en présence de PMA, la préparation des extraits nucléaires, le marquage de la sonde, la liaison entre les protéines et la sonde marquée, l'électrophorèse, la quantification et la révélation du gel.

Les cellules sont incubées 5 heures en hypoxie, en présence de PMA ou en normoxie comme décrit au point II.2.2.

II.2.7.1 Préparation des extraits nucléaires

a) Matériel et solutions

- HB 2x (tampon hypotonique) :

Hepes 40 mM (Janssen Chimica, Beerse, Belgique)

NaF 10 mM (Merck, Darmstadt, Allemagne)

Na₂MoO₄ 2 mM

EDTA 0,2 mM (Merck, Darmstadt, Allemagne)

inhibiteurs de protéase 1x (Complete protease inhibitor cocktail tablets 25 x,
Boehringer, Mannheim, Allemagne)

inhibiteurs de phosphatase 1x à partir d'un stock 25 x :

- NaVO₃ 25 mM (Sigma, St Louis, USA)
- PNPP (phospho-nitrophényl phosphate) 250 mM
- α-glycérophosphate 250 mM (Sigma, St Louis, USA)
- NaF 125 mM (Merck, Darmstadt, USA)

DTT 1 mM (dithiothréitol, D-8024, Sigma Chemical, St Louis, USA)

(à ajouter extemporanément)

porter à volume avec de l'eau distillée.

- HB 1x

- HB 1x 0,2 % NP-40

pour 5ml : 2,5 ml HB 2x

100 µl NP-40 10 %

porter à volume avec de l'eau distillée.

- HB 1x 20 % glycérol

pour 1ml : 500 µl HB 2x

200 µl glycérol 87 % (Janssen Chimica, Beerse, Belgique)

porter à volume avec de l'eau distillée.

- HB 1x 20 % glycérol NaCl 0,8M

pour 2ml : 1 ml HB 2x

400 µl glycérol 87 % (Janssen Chimica, Beerse, Belgique)

400 µl NaCl 4 M (Merck, Darmstadt, Allemagne)

porter à volume avec de l'eau distillée.

- PBS (phosphate buffer saline)

b) Méthode

- placer les boîtes de culture T75 sur glace.
- décanter le milieu CO₂ indépendant.
- laver avec 3 ml de PBS froid.
- décanter.
- laver avec 3 ml de HB 1x.
- décanter.
- déposer 2 ml de HB 1x et laisser les cellules gonfler sur glace entre 2 et 5 minutes.
- décanter.
- lyser les cellules avec 500 µl de HB 0,2 % NP-40
- racler les cellules du fond de la boîte avec un racloir.

- récupérer le lysat cellulaire dans un eppendorf.
- centrifuger 30 secondes à 13000 rpm (Heraus Sepatech, Biofuge pico, rotor 3324) et éliminer le surnageant.
- resuspendre le culot dans 100 µl de HB 20 % glycérol.
- ajouter un volume de HB 20 % glycérol NaCl 0,8 M pour perméabiliser la membrane nucléaire.
- mélanger 30 minutes à 4°C.
- centrifuger 10 minutes à 4°C à 16000 rpm (Heraus Sepatech, Biofuge 17 RS, rotor 1379) et récupérer le surnageant.
- réaliser le dosage protéique de l'extrait nucléaire par la technique du Bradford (voir point II.2.4).
- conserver l'extrait nucléaire à -70°C.

II.2.7.2 Hybridation de la sonde

a) Matériel

- Oligonucléotides à hybrider (Eurogentec, Seraing, Belgique)
- Tampon Tris 50 mM pH8,0 MgCl₂ 10 mM (Merck, Darmstadt, Allemagne)

b) Méthode

- Les oligonucléotides lyophilisés sont resuspendus dans de l'eau distillée de manière à ce que leur concentration soit de 1 nmole/µl.
- Dans des tubes PCR, mettre 2 µl d'un oligonucléotide et du nucléotide anticomplémentaire correspondant et 46 µl de tampon Tris/MgCl₂.
- L'hybridation est réalisée dans l'appareil PCR (GeneAmp PCR System 9700, Perkin-Elmer) selon le programme suivant : 5 minutes à 96°C, 15 minutes à 80°C, 15 minutes à 70°C, 15 minutes à 60°C, 15 minutes à 50°C, 15 minutes à 40 °C et 15 minutes à 30°C.
- La sonde hybridée est conservée à 4°C.

II.2.7.3 Marquage et purification de la sonde

Après avoir été hybridée, la sonde est marquée radioactivement. Ce marquage s'effectue à l'aide d'ATP radioactif γ -[³²P]-ATP. Le phosphore du groupement phosphate à l'extrémité 5' de la sonde est substitué par le phosphore du γ -[³²P]-ATP et ceci grâce à une enzyme : la polynucléotide kinase.

a) Matériel

- mixture réactionnelle
pour 20 µl : 2 µl de la sonde à marquer (Eurogentec, Seraing, Belgique)

2 µl de tampon de réaction 10x (Boehringer, Mannheim,
Allemagne)

14 µl d'eau distillée

1 µl de γ -[³²P]-ATP (10µCi/ml) (NEN Dupont, Vilvoorde, Belgique)

1 µl de T4 polynucléoytine kinase (10 U/µl) (Boehringer, Mannheim,
Allemagne)

- Les sondes oligonucléotidiques utilisées sont les suivantes :

- site potentiel AP-1 du promoteur de HIF1A :
5'-CAGCCCCTGACGCTGCCTCCACG-3'
- site potentiel AP-1 du promoteur de HIF1A muté :
5'-CAGCCCCAATTGCTGCCTCCACG-3'
- site consensus AP-1 :
5'-CGCTTGATGAGTCAGCCGGAA-3'
- site consensus AP-1 muté :
5'-CGCTTGAAATTCAGCCGGAA-3'

- Quick spin colonne : séphadex G-25 (Boehringer, Mannheim, Allemagne)

- Aqualuma (Lumac, Landgraaf, Pays-Bas)

- Compteur à scintillation β (Beckman LS1801, USA)

b) Méthode

Après avoir chauffé un bain à 37°C et décongelé le γ -[³²P]-ATP, la mixture réactionnelle est préparée dans un eppendorf et incubée 30 minutes à 37°C. A la fin de l'incubation, le γ -[³²P]-ATP est séparé des nucléotides radioactifs grâce à une purification sur spin colonne comme décrit au point II.2.3.4.

II.2.7.4 Liaison sonde-protéine

a) Matériel

- tampon de liaison 3x

Hepes 6 mM pH 7,9 (Janssen Chimica, Beerse, Belgique)

NaCl 24 mM (Merck, Darmstadt, Allemagne)

EDTA 0,6 mM (Merck, Darmstadt, Allemagne)

glycérol 36 % (v/v) (Merck, Darmstadt, Allemagne)

inhibiteurs de protéase 1 x (Complete protease inhibitor cocktail tablets 25 x,
Boehringer, Mannheim, Allemagne)

15 mM DTT (Sigma, St Louis, USA)

N.B. : Le DTT et les inhibiteurs de protéases doivent être ajoutés au dernier moment et sur glace.

- tampon de liaison 1x

pour 20 réactions : 170 µl tampon de liaison 3x
20 µl polydI-dC 1µg/µl
50 µl DTT 10 mM (Sigma, St Louis)
150 µl eau distillée stérile

N.B. : Le tampon de liaison est préparé sur glace.

- sonde marquée
- extraits nucléaires

b) Méthode

Les extraits protéiques sont décongelés et maintenus à 4°C. Dans un eppendorf sur glace, on ajoute 20 µl de tampon de liaison, entre 5 µg d'extrait nucléaire puis on laisse incuber 10 minutes à 4°C. Ensuite, un volume équivalent à 10000 cpm de sonde nucléotidique marquée (2 µl en l'occurrence) est ajouté et le tout est incubé 20 minutes à 4°C.

II.2.7.5 Supershift

a) Matériel

- voir point II.2.8.4
- Anticorps utilisés lors de ce mémoire :
 - anticorps de anti-c-jun (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA)
 - anticorps de anti-CREB, anti-ATF-1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA)
 - anticorps anti-P-ATF-2 (Upstate Biotechnology, Lake Placid, USA)
 - anticorps anti-P-CREB (Upstate Biotechnology, Lake Placid, USA)
 - anticorps anti-c-fos (Santa Cruz Biotechnology)

b) Méthode

La préparation des échantillons jusqu'à l'ajout de la sonde marquée est identique à ce qui est décrit au point II.2.8.4 Après l'incubation de 20 minutes à 4°C, un volume équivalent à 1µg d'anticorps est ajouté. Les échantillons sont alors incubés 40 minutes sur glace (4°C).

II.2.7.6 Compétition entre sondes froide et marquée

a) Matériel

- voir point II.2.8.4
- sonde non marquée AP-1 CTL et pwt

b) Méthode

Le protocole suivi est le même que celui décrit au point II.2.8.4 hormis l'ajout de sonde froide en excès de 50 x par rapport à la sonde marquée.

II.2.7.7 Electrophorèse

a) Matériel et solutions

- gel de polyacrylamide 5 % :
 - 10 ml d'acrylamide/bisacrylamide (30 % d'acrylamide pour 0,8 % de N,N'-méthylène bisacrylamide)
 - 6 ml de TBE 10x : Tris 0,9 M (Merck, Darmstadt, Allemagne)
Acide borique 0,9 M (Merck, Darmstadt, Allemagne)
EDTA 0,02 M (Merck, Darmstadt, Allemagne)
 - 44 ml d'eau distillée
 - 40 µl de TEMED (Bio-Rad, Richmond, USA)
 - 400 µl de persulfate d'ammonium 10 % (Serva, Vervier, Belgique), à préparer extemporanément
- N.B. : Le TEMED et le persulfate d'ammonium sont ajoutés en dernier lieu puisque ce sont les agents polymérisateurs.
- solution de bleu :
 - glycérol 50 % (Merck, Darmstadt, Allemagne)
 - bleu de bromophénol (Janssen Chimica, Beerse, Belgique)
- Sécheur de gel (modèle 583, Bio-Rad, Richmond, USA)

b) Méthode

Le gel coulé polymérise pendant environ 1 heure. Il s'agit d'un gel natif, sans SDS afin de ne pas séparer le facteur de transcription de la sonde ni de dénaturer les protéines présentes dans l'extrait nucléaire.

Lorsque le gel est polymérisé, il est placé dans la cuve d'électrophorèse (V15-17, Life Technologies, Paisley, Angleterre). Ensuite, les échantillons sont déposés dans les puits (30 µl) ainsi que du bleu de bromophénol dans les puits extrêmes pour repérer le front de migration. La migration qui suit se déroule à 200V et dure environ 2 heures jusqu'à ce que le bleu de bromophénol atteigne l'extrémité inférieure du gel.

Le gel est alors démoulé et placé sur un papier Whatman. Un cellophane recouvre l'autre face du gel. Le gel est séché. A ce moment, le gel est prêt pour la quantification de la radioactivité associée aux différentes bandes. Cette quantification est réalisée grâce à un Instant Imager, appareil qui détermine la radioactivité contenue en chaque point du gel. La durée du comptage du gel est arbitraire, celle-ci est fonction de l'intensité des spots obtenus qui est proportionnelle au nombre de cpm contenus dans l'échantillon.

II.2.7.8 Révélation de l'autoradiographie

a) Matériel

- Instant Imager (Packard, Downers Grove, USA)
- Film MP pour isotopes émettant des radiations β et γ (Amersham, Gand, Belgique)
- Pour révéler les films, nous utilisons un révélateur dilué 5x (PQ Universal, Ilford, Grande-Bretagne), et un fixateur dilué 5x (Hypam, Ilford, Grande-Bretagne).

Après quantification, le gel est placé sur un film pendant 3 à 6 jours afin de réaliser une autoradiographie. Le film est révélé comme décrit au point III.2.4.5.

II.2.8 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.

II.2.8.1 Transfection des cellules HepG2 par le DOTAP

L'agent lipofectant DOTAP (Figure II.11) peut former des complexes avec l'ADN et interagir avec les membranes cellulaires de manière à délivrer directement le matériel recombinant dans la cellule.

a) Matériel

- Plaque multi-puits 24 puits (Costar, Corning, New York, USA).
- milieu CO₂ indépendant (Gibco, Paisley, Grande-Bretagne) auquel on a ajouté 7,3 mg de glutamine pour 100 ml et des antibiotiques.
- Hepes 20 mM filtré pH 7,4 (Janssens Chimica, Beerse, Belgique).
- DOTAP (Boehringer, Mannheim, Allemagne).

b) Méthode

- Pour une plaque multi-puits (24 puits), ensemercer 50000 cellules par puits dans 2 ml de milieu CO₂ indépendant sans sérum.
- Laisser la culture 12 heures au repos.
- Pour un puits d'une plaque :
 - Réaliser un mix plasmide :
 - 2,5 μ g de plasmide test.
 - x μ l de solution d'Hepes 20 mM filtré pour atteindre un volume final de 25 μ l.

Réaliser un mix DOTAP :

- 15 µl de DOTAP.
- 35 µl d'Hepes 20 mM filtré.
- Rassembler les mix DOTAP/ADN et incuber 10 minutes à température ambiante pour permettre au complexe de se former.
- Ajouter 75 µl du mix DOTAP/ADN par puits.
- Incuber 12 heures dans une étuve à 37°C.
- Eliminer le milieu de transfection et le remplacer par 1 ml/puits de milieu CO₂ indépendant.
- Incuber les cellules en hypoxie, en normoxie ou en présence de PMA pendant 12 heures (voir point II.2.2).
- Lysér les cellules et réaliser les quantification et normalisation de la transfection par système Dual-luciférase (voir point II.2.7.2).

II.2.8.2 Système Dual-luciférase

Le système Dual-luciférase permet la quantification et la normalisation des expériences de transfection par le biais de l'utilisation de deux rapporteurs différents pouvant être révélées au sein de la même expérience.

En effet, les deux types de rapporteurs utilisés possèdent un gène luciférase provenant de deux organismes différents. Ces deux luciférases utilisent des substrats distincts permettant ainsi une quantification mais aussi une normalisation des tests. Ces deux luciférases ont des structures différentes et utilisent des substrats différents pour leur réaction en bioluminescence (Figure II.12).

a) Matériel et solutions

- Tampon PBS 10 X (1 litre) :
 - 11,5 g Na₂HPO₄ (Merck, Darmstadt, Allemagne).
 - 2 g KH₂PO₄ (Merck, Darmstadt, Allemagne).
 - 80 g NaCl (Merck, Darmstadt, Allemagne).
 - 2 g KCl (Merck, Darmstadt, Allemagne).utiliser du PBS 1 X à pH 7,4.
- PLB 1 x (Passive Lysis Buffer) (Promega, Madison, USA)

b) Méthode (Figure II.13)

Dans ce système, deux activités luciférases sont mesurées séquentiellement à partir du même échantillon: firefly (*Photinus pyralis*) et renilla (*Renilla reniformis*). L'activité de la firefly luciférase est mesurée après l'addition du premier substrat (Luciferase Assay reagent II) qui génère une première émission de lumière. Après ce premier signal, on ajoute le deuxième substrat (Stop & Glo) qui inhibe la firefly

luciférase et qui initie la réaction enzymatique de la renilla luciférase, engendrant le deuxième signal lumineux. Les cellules sont préalablement lysées en présence d'un tampon spécifique (PLB). Celui-ci garantit une stabilité optimale des activités des deux luciférases et de plus minimise l'auto-luminescence de la coelentérazine, le substrat de la renilla luciférase.

Les différentes étapes peuvent se résumer comme suit:

- lyser les cellules.
- prélever le lysat cellulaire et y ajouter le substrat de la firefly luciférase.
- quantifier l'activité firefly luciférase.
- ajouter l'inhibiteur de la firefly luciférase et le substrat de la renilla luciférase.
- quantifier l'activité enzymatique de la renilla luciférase contrôle.

Dans ce mémoire, nous avons utilisé comme plasmides tests le pGL3-SV40, le pGL3-SV40 3 x HRE, le pGL3-SV40 contenant l'insert issu du promoteur de HIF1A sauvage ou sa forme mutée, le plasmide pAP-1-Luc, tous contenant l'ADNc de la firefly luciférase, et enfin comme plasmide contrôle pRL-SV40 encodant la renilla luciférase.

La méthode utilisée est la suivante :

- décanter le milieu CO₂ indépendant.
- ajouter 150 µl de PLB dans chaque puits pour lyser les cellules.
- placer la plaque multipuits sur un agitateur mécanique pendant 10-15 minutes pour assurer un recouvrement de tout le tapis cellulaire par la solution de lyse.
- mettre la plaque sur glace et prendre 20 µl du lysat.
- ajouter ces 20 µl à 100 µl de luciférase Assay Reagent II, mélanger avec la pipette.
- effectuer la première lecture au luminomètre (Biocounter, M2010, Lumac, USA).
- ajouter 100 µl de Stop & Glo, mélanger.
- effectuer la deuxième lecture .

c) Normalisation des transfections dans le système Dual-luciferase

Les co-transfections permettent de corriger la variabilité des mesures d'activité des rapporteurs. Cette variabilité provient de différences dans l'efficacité de transfection d'un puits à l'autre.

La correction se fait en rapportant les mesures d'activité du rapporteur test à un rapporteur contrôle, le rapporteur contrôle étant co-transfecté avec le rapporteur test.

Dans le système Dual-luciferase, le plasmide test est un vecteur de la famille pGL3 (Promega, Madison, USA) utilisant comme gène rapporteur la luciférase de firefly et le

plasmide contrôle est le pRL-SV40 (Promega, Madison, USA) qui utilise le gène rapporteur luciférase de renilla.

La normalisation est calculée par le rapport des mesures des activités respectives du test (firefly) sur le contrôle (renilla).

exemple :

	Blanc (RLU)	Test (RLU)
renilla	12	1050
firefly	5	3179

Normalisation : $(3179-5)/(1050-12)=3,057$

Les résultats sont donc exprimés en RF/R : « ratio de firefly sur renilla ».

Résultats
et
Discussion

III. RESULTATS ET DISCUSSION

La partie expérimentale de ce mémoire s'inscrit dans l'étude des facteurs de transcription responsables de la régulation positive de la transcription du gène de HIF1A en hypoxie, et plus particulièrement du rôle joué par AP-1 dans cette activation.

En pratique, toutes les expériences effectuées au niveau cellulaire ont été réalisées en hypoxie réelle (1 % O₂). Celle-ci diffère de l'hypoxie chimique au CoCl₂ qui agit en remplaçant le fer par du cobalt au niveau du groupement hémique dans le senseur à oxygène, le bloquant ainsi dans sa forme déoxy. La lignée cellulaire utilisée est issue d'un hépatome humain (HepG2). Ce type cellulaire fut et reste largement utilisé dans le cadre d'études concernant la régulation transcriptionnelle induite par l'hypoxie. Des cellules HepG2 et Hep3b ont notamment été utilisées par Semenza et son équipe lors de la découverte du facteur de transcription HIF-1.

III.1 Augmentation de l'ARNm de HIF1A en hypoxie

En étudiant l'activité du promoteur du gène codant pour la sous-unité HIF-1 α du facteur de transcription HIF-1, Minet *et al.* (1999 a) ont mis en évidence une région *cis* activatrice répondant à l'hypoxie. Dans les cellules HepG2, cette région est responsable de l'augmentation induite par l'hypoxie de la transcription de la luciférase dans un système rapporteur. Cependant, il restait à démontrer que dans le contexte génomique complet, la transcription du gène HIF1A est effectivement augmentée en conditions d'hypoxie.

Pour répondre à cette question, nous avons estimé la quantité d'ARNm de HIF1A dans les cellules HepG2 incubées en hypoxie par rapport à des cellules contrôles maintenues en normoxie. En parallèle, l'effet du PMA, un activateur puissant de AP-1, a été étudié. Cette estimation a été réalisée par Northern blot.

a) Description de l'expérience

Après avoir été incubées 5 heures en normoxie, en hypoxie ou en présence de PMA à 100 nM, les cellules sont lysées et les ARN totaux sont extraits du lysat cellulaire. Les ARN sont ensuite séparés sur gel d'agarose dénaturant. Après transfert sur membrane, l'ARNm de HIF1A est détecté en utilisant une sonde radioactive spécifique et complémentaire de la partie de l'ARNm codant pour le domaine bHLH-PAS de HIF-1 α .

b) Résultats et discussion

Sur l'autographie électronique représentée à la figure III.1, on observe une accumulation considérable de l'ARNm de HIF1A en hypoxie et après stimulation au PMA par rapport à la normoxie. Il faut cependant noter qu'aucun contrôle permettant de vérifier qu'une même quantité d'ARN a bien été déposée dans chaque puits n'a été réalisé. Dès lors, la prudence s'impose dans l'interprétation de ces résultats. Toutefois, Wenger *et al.* (1998) ont obtenu des résultats similaires en travaillant avec des cellules HepG2, c'est-à-dire une augmentation de l'ARNm de HIF1A en hypoxie par rapport à la normoxie.

En considérant l'ensemble de ces différents éléments, nous pouvons suggérer que l'hypoxie et la stimulation des cellules par du PMA entraînent une augmentation de la quantité d'ARNm de HIF1A par rapport à la normoxie.

L'augmentation de la quantité d'un ARNm peut être la conséquence d'un accroissement de la stabilité de cet ARN ou de l'activation de la transcription du gène correspondant. Dans la suite du travail, nous avons orienté nos recherches sur l'étude de la régulation transcriptionnelle du gène HIF1A.

III.2 Activation de AP-1 par l'hypoxie

L'étude de la séquence de la région *cis* activatrice répondant à l'hypoxie du promoteur de HIF1A suggère la présence d'un site potentiel de liaison pour le facteur de transcription AP-1 (Minet *et al.*, 1999 a). Afin de vérifier si AP-1 est bien le facteur de transcription responsable de l'augmentation de la quantité d'ARNm de HIF1A en hypoxie, nous avons tout d'abord étudié si l'hypoxie est capable d'activer ce facteur. L'activation de AP-1 passe respectivement par la déphosphorylation de son domaine de liaison à l'ADN, ce qui permet la fixation de AP-1 sur son élément *cis* et par la phosphorylation de son domaine de transactivation ainsi que par une augmentation de la transcription des gènes codant pour ses différentes sous-unités. Il faut noter que l'expression du gène *c-jun* est elle-même régulée par AP-1.

III.2.1 Détection de c-jun, P-c-jun et HIF-1 par Western blot

La première étape dans l'étude de l'activation de AP-1 par l'hypoxie est d'étudier l'expression des protéines constituant le complexe AP-1 ainsi que celle de leur forme active (phosphorylée). A cette fin, nous avons réalisé un Western blot pour détecter la protéine *c-jun* et sa forme phosphorylée. *c-jun* est la sous-unité la plus fréquemment rencontrée dans les complexes AP-1. Le PMA, inducteur de la voie de transduction menant à l'activation de AP-1, est utilisé comme contrôle positif. Nous avons également

suivi l'accumulation de HIF-1 α en hypoxie afin de mettre en parallèle les cinétiques d'activation de AP-1 et de stabilisation de HIF-1 α .

a) Description de l'expérience

Après avoir été incubées 1, 2,5 ou 5 heures en normoxie, en hypoxie ou en présence de PMA (100 nM), les cellules sont lysées. Un Western blot est alors réalisé avec ce lysat cellulaire, en utilisant des anticorps anti-c-jun, anti-P-c-jun (forme phosphorylée de c-jun sur la ser 73) et anti-HIF-1 α . Les complexes protéiques d'intérêt sont détectés de manière indirecte par l'emploi d'anticorps anti-IgG couplés à la peroxydase dont l'activité est révélée en chimioluminescence.

b) Résultats

La figure III.2 présente le film de révélation des Western blots décrits ci-dessus. La protéine c-jun est faiblement présente dans les lysats des cellules incubées en normoxie, par contre, elle s'accumule au cours du temps dans les cellules incubées en hypoxie, et très rapidement dans les cellules stimulées au PMA. Les mêmes observations peuvent être réalisées pour la forme phosphorylée de la protéine c-jun. La phosphorylation de la sérine 73 de c-jun est impliquée dans la fonction transactivatrice du facteur de transcription AP-1. Dès lors, la présence de la protéine P-c-jun (ser 73) reflète celle de AP-1 activé.

En ce qui concerne la protéine HIF-1 α , on constate qu'elle est absente dans les cellules incubées en normoxie, qu'elle s'accumule au cours du temps dans les cellules en hypoxie, et dans les cellules stimulées au PMA mais uniquement pour un temps d'incubation court (1 heure). L'accumulation de HIF-1 α en hypoxie démontre que les conditions d'hypoxie utilisées dans ce travail sont effectives.

Enfin, la détection de la protéine α -tubuline nous permet de comparer les quantités protéiques chargées par puits. L'intensité des différentes bandes montre qu'une même quantité de protéines a bien été déposée dans chaque puits.

c) Discussion

L'accumulation de la protéine c-jun dans les cellules soumises à l'hypoxie démontre que l'hypoxie induit fortement AP-1. De plus, l'augmentation de la phosphorylation de c-jun en hypoxie constitue une première indication allant dans le sens d'une activation de AP-1 par l'hypoxie.

Néanmoins, nous devons rester prudents car l'accumulation de la forme phosphorylée de la protéine c-jun peut être due soit à l'augmentation globale de la quantité de c-jun, soit à l'augmentation de la proportion de la forme phosphorylée par rapport à la forme non phosphorylée. D'autres expériences sont dès lors nécessaires pour montrer sans ambiguïté l'activation de AP-1 par l'hypoxie.

III.2.2 Localisation subcellulaire de c-jun et P-c-jun par immunofluorescence

Afin de compléter les résultats obtenus par Western blot, nous avons étudié la localisation subcellulaire de la protéine c-jun et de sa forme phosphorylée et ce, par immunofluorescence.

a) Description de l'expérience

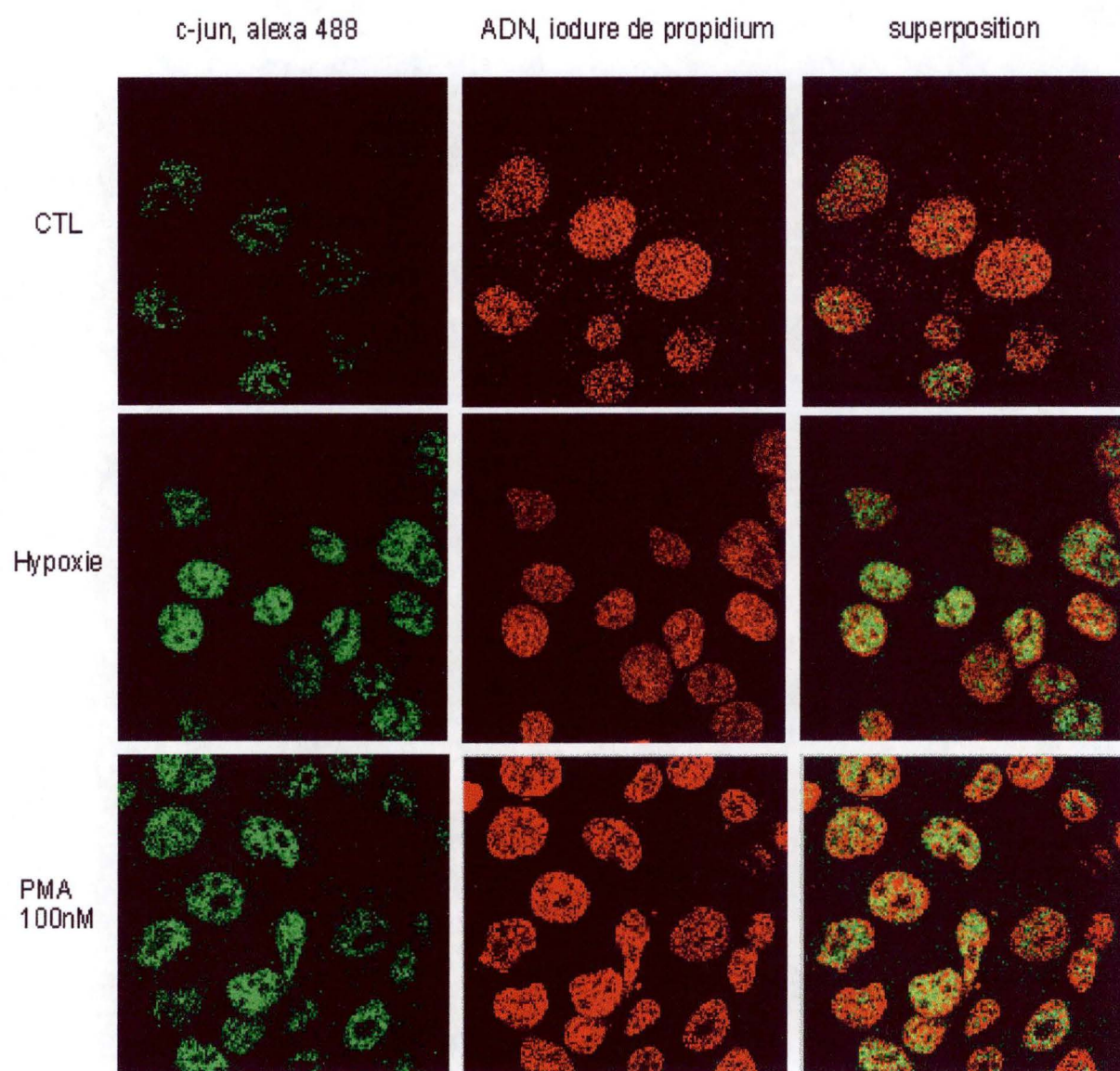
Après avoir incubé les cellules pendant 2,5 ou 5 heures en normoxie, en hypoxie ou en présence de PMA, nous avons mis en évidence la localisation subcellulaire de la protéine c-jun et de sa forme phosphorylée (ser 73) à l'aide d'anticorps primaires dirigés contre c-jun ou contre sa forme phosphorylée et d'anticorps secondaires anti-IgG couplés

b)

Incubation : 5 heures

objectif : 100x

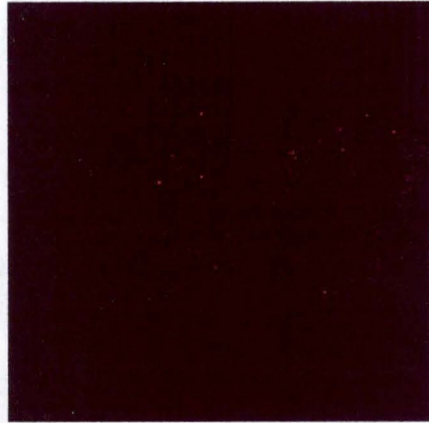
PMT : 689



b) Photographies en microscopie confocale de la localisation de c-jun et de l'ADN du noyau dans des cellules incubées 5 heures en normoxie, en hypoxie ou en présence de PMA.

P-c-jun (ser 73), Alexa 568

CTL

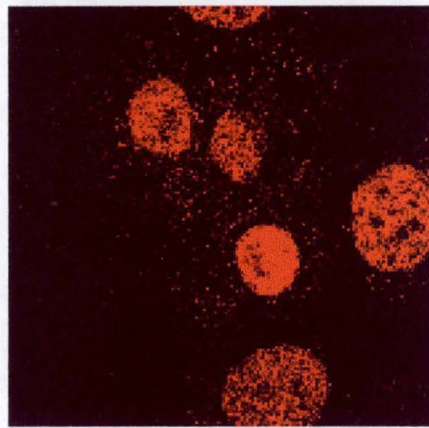


Incubation : 5 heures

Objectif 100x

PMT : 647

**PMA
100 nM**



Hypoxie

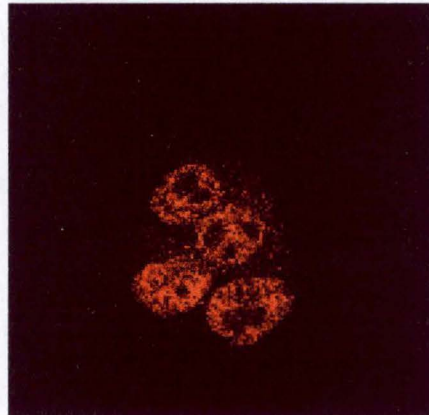


Figure III.4 : Localisation subcellulaire de la forme phosphorylée de c-jun en normoxie, en hypoxie et après stimulation au PMA (100 nM). Les cellules HepG2 sont incubées pendant 5 heures en normoxie, en hypoxie ou en présence de PMA. La localisation de P-c-jun est déterminée par immunofluorescence indirecte via l'utilisation d'anticorps anti-P-c-jun et visualisée en microscopie confocale.

aux fluorochromes Alexa 488 ou 568. Nous avons également marqué l'ADN du noyau à l'iodure de propidium. Les cellules ont ensuite été observées au microscope confocal.

b) Résultats et discussion

Les figures III.3 a et b montrent le marquage de la protéine c-jun ainsi que celui du noyau à l'iodure de propidium. Les marquages sont réalisés après incubation des cellules pendant 2,5 et 5 heures en normoxie, en hypoxie ou en présence de PMA 100 nM. La puissance du photomultiplicateur est la même partout de manière à ce que les résultats soient semi-quantitatifs. Une superposition des marquages nucléaire et de la protéine c-jun est réalisée pour confirmer la localisation nucléaire du facteur AP-1.

On observe que quels que soient les conditions et le temps d'incubation, la localisation de la protéine c-jun dans les cellules est presque exclusivement nucléaire. Cependant, on constate une nette accumulation de la protéine c-jun en hypoxie et après stimulation au PMA par rapport au contrôle normoxie.

La figure III.4 montre le marquage de la forme phosphorylée (ser 73) de la protéine c-jun en normoxie, en hypoxie et après stimulation au PMA, pour un temps d'incubation de 5 heures, avec une puissance du photomultiplicateur constante.

On constate que la quantité de protéine c-jun phosphorylée augmente nettement en hypoxie et suite à une stimulation au PMA par rapport au contrôle normoxie où elle n'est pas détectée pour cette puissance de photomultiplicateur. Ceci montre d'une part que AP-1 n'est pas activé en normoxie et d'autre part que AP-1 est bien activé par le PMA et par l'hypoxie.

Ces résultats confirment ceux obtenus dans les expériences précédentes où l'on avait déjà constaté une augmentation de l'expression de c-jun et de sa phosphorylation dans ces deux conditions.

III.2.3 Détection de l'activation de AP-1 et de HIF-1 par système rapporteur

La dernière étape dans l'étude de l'activation de AP-1 par l'hypoxie est de tester l'activité de la fonction transactivatrice du facteur de transcription AP-1. Pour ce faire, nous avons utilisé un système rapporteur utilisant le gène codant pour la luciférase.

III.2.3.1 Activation de AP-1 par l'hypoxie et par le PMA

a) Description de l'expérience

Après avoir été transfectées avec le plasmide pAP-1-Luc et le plasmide pRL-SV40 pour la normalisation, les cellules HepG2 sont incubées pendant 12 heures en normoxie, en hypoxie ou en présence de PMA. Le plasmide pAP-1-Luc contient 7 copies de l'élément TRE (site consensus de AP-1 : séquence TGACTCA) en amont du gène codant pour la luciférase qui possède une boîte TATA. Les cellules sont ensuite lysées et l'activité luciférase est mesurée.

b) Résultats et discussion

La figure III.5 montre une nette augmentation de l'expression du gène de la luciférase en hypoxie par rapport à la normoxie, indiquant clairement l'activation de AP-1 par l'hypoxie.

activables. Etant donné que d'une part le PMA est connu pour activer AP-1 par la voie de la PKC (Arts *et al.*, 1996) et que d'autre part la littérature suggère que l'hypoxie active AP-1 par la voie des MAP kinases (Müller *et al.*, 1997), nous privilégions plutôt la deuxième hypothèse.

III.2.3.2 Activation de HIF-1 par l'hypoxie

Afin de s'assurer de la fonctionnalité de l'hypoxie, nous avons vérifié qu'elle active bien l'activité transcriptionnelle du facteur de transcription HIF-1.

a) Description de l'expérience

La démarche suivie est la même que celle décrite dans le point précédent. Les cellules HepG2 sont transfectées avec les plasmides pGL3-SV40 3 x HRE et pRL-SV40. Le plasmide pGL3-SV40 possède 3 copies de l'élément EPO HRE en aval du gène codant pour la luciférase qui est sous la dépendance du promoteur faible SV40. Le plasmide pGL3-SV40 est utilisé comme contrôle négatif.

b) Résultats et discussion

Comme le montre la figure III.6, on observe que le facteur de transcription HIF-1 est activé en hypoxie et augmente l'expression du gène rapporteur codant pour la luciférase. Ces résultats montrent que l'hypoxie est effectivement fonctionnelle, comme nous l'avons déjà observé pour la stabilisation de HIF-1 α .

L'ensemble de ces résultats montrent que l'hypoxie induit non seulement l'accumulation de c-jun et sa phosphorylation mais aussi l'activation de AP-1, comme le

b) Résultats et discussion

Comme le montre la figure III.6, on observe que le facteur de transcription HIF-1 est activé en hypoxie et augmente l'expression du gène rapporteur codant pour la luciférase. Ces résultats montrent que l'hypoxie est effectivement fonctionnelle, comme nous l'avons déjà observé pour la stabilisation de HIF-1 α .

L'ensemble de ces résultats montrent que l'hypoxie induit non seulement l'accumulation de c-jun et sa phosphorylation mais aussi l'activation de AP-1, comme le montre l'augmentation de l'expression de la luciférase dans le système rapporteur pour AP-1.

III.3 Fonctionnalité du site potentiel AP-1 pwt

Après avoir montré l'activation du facteur de transcription AP-1 par l'hypoxie, nous avons ensuite étudié la fonctionnalité du site potentiel AP-1 du promoteur de HIF1A (baptisé pwt au début de ce mémoire). De plus, nous voulions déterminer si le facteur *trans* responsable de la régulation positive de la transcription de HIF1A en hypoxie est bien AP-1.

III.3.1 Liaison de AP-1 au site AP-1 potentiel pwt

La première étape dans l'analyse de la fonctionnalité du site AP-1 potentiel du promoteur de HIF1A consiste à étudier la liaison de AP-1 à ce site.

III.3.1.1 EMSA

a) Description de l'expérience

Après avoir été incubées pendant 5 heures en normoxie, en hypoxie ou en présence de PMA, les cellules sont lysées afin d'en recueillir l'extrait nucléaire. Un EMSA est ensuite réalisé avec cet extrait. On utilise une sonde marquée radioactivement contenant la séquence d'intérêt afin de visualiser la liaison de la protéine correspondante à cette séquence, en l'occurrence AP-1, à la séquence pwt du promoteur de HIF1A. La sonde pwt correspond au site AP-1 potentiel pwt issu du promoteur de HIF1A, la sonde pmt au site AP-1 potentiel muté au niveau des bases les plus conservées et présentes dans tous les sites AP-1, la sonde AP-1 CTL à la séquence consensus de AP-1, la sonde AP-1 CTL mt à la séquence consensus de AP-1 mutée (Figure III.7).

b) Résultats et discussion

Comme le montre la figure III.8, outre la bande correspondant à l'excès de sonde non liée dans le bas du gel, on observe essentiellement deux bandes.

La première, présente dans toutes les conditions (normoxie, hypoxie, PMA) et pour les 4 sondes, correspond à la liaison d'un facteur constitutif et probablement non spécifique.

La deuxième bande est présente pour les sondes AP-1 CTL et pwt mais pas pour la forme mutée de ces sondes. On remarque également une nette augmentation de sa densité en hypoxie et après stimulation au PMA par rapport à la normoxie. Cette bande correspond visiblement à la liaison d'un facteur induit dans ces deux conditions, peut-être AP-1. Nous avons quantifié la liaison du facteur induit aux sondes AP-1 CTL et pwt en mesurant la radioactivité associée la bande spécifique à l'aide de l'Instant Imager.

Comme le montre la figure III.9, le taux de liaison de AP-1 à la séquence pwt issue du promoteur de HIF1A est près de 5 x plus élevé en hypoxie qu'en normoxie et près de 8 x plus élevé après stimulation au PMA (le contrôle positif) qu'en normoxie.

En ce qui concerne la liaison de AP-1 sur la sonde AP-1 CTL, on observe les mêmes variations du taux de liaison de ce facteur à cette séquence en fonction des différentes conditions (normoxie, hypoxie, PMA) mais avec une amplitude plus faible que pour la séquence pwt du promoteur de HIF1A : le taux de liaison est près de 4,5 x plus élevé après stimulation au PMA et 4 x en hypoxie, par rapport à la normoxie. Ceci pourrait être expliqué par le fait que le taux basal de liaison du facteur induit à la sonde AP-1 CTL est plus important que celui pour la sonde pwt. Ces résultats montrent que l'hypoxie et le PMA augmentent la liaison de AP-1 aux sondes AP-1 CTL et pwt. Remarquons cependant que des expériences complémentaires de supershift sont nécessaires afin de s'assurer que le facteur de transcription détecté est bien AP-1. Par ailleurs, soulignons que la liaison d'un facteur de transcription à l'ADN ne signifie en aucune manière que ce facteur est transcriptionnellement actif.

Afin de déterminer si ce facteur induit est bien AP-1, nous avons réalisé un supershift avec un anticorps anti-c-jun.

III.3.1.2. Détection de c-jun par supershift

Un supershift a été réalisé en utilisant un anticorps anti-c-jun afin de déterminer si le facteur induit qui se lie aux sondes AP-1 CTL et pwt en hypoxie ou en présence de PMA est le facteur de transcription AP-1.

a) Description de l'expérience

La démarche suivie est la même que celle expliquée dans le point précédent si ce n'est qu'on ajoute en plus un anticorps, dans ce cas un anticorps anti-c-jun lorsque l'extrait nucléaire est incubé en présence de la sonde. L'expérience est réalisée uniquement avec les sondes AP-1 CTL et pwt étant donné que le facteur induit ne se lie pas aux formes mutées de ces sondes.

b) Résultats et discussion

Comme le montre la figure III.10, pour les sondes AP-1 CTL et pwt, sans anticorps, on remarque les mêmes bandes et les mêmes variations d'intensité en fonction des conditions (normoxie, hypoxie, PMA) que celles observées dans l'expérience décrite au point précédent.

Par contre, en présence de l'anticorps, on observe pour les deux sondes, une nette diminution d'intensité de la bande " induite " dans toutes les conditions, et l'apparition d'une troisième bande localisée plus haut dans le gel, correspondant au supershift.

L'existence d'un supershift en présence de l'anticorps anti-c-jun indique que le facteur induit qui se lie aux sondes AP-1 CTL et pwt est effectivement le facteur de transcription AP-1. Il faut cependant noter que la disparition de la bande " induite " en présence de l'anticorps anti-c-jun n'est pas complète. On peut émettre deux hypothèses pour expliquer cette observation. La première est que la concentration en anticorps est insuffisante pour " shifter " la totalité des complexes AP-1. Cependant, l'utilisation d'une quantité plus importante d'anticorps risquerait de diluer le tampon de liaison et pourrait entraîner la perte du facteur AP-1. La deuxième hypothèse serait que certains des complexes AP-1 présents dans les extraits nucléaires seraient composés de sous-unités autres que c-jun, et donc ceux-ci ne seraient pas " shiftés " par l'anticorps anti-c-jun.

III.3.1.3 Compétition entre sondes froide et marquée pour la liaison de AP-1 sur son élément *cis*

Afin de confirmer la spécificité de la liaison de AP-1 au site pwt issu du promoteur de HIF1A, nous avons réalisé une compétition entre les sondes AP-1 CTL et pwt.

a) Description de l'expérience

La démarche suivie est la même que celle expliquée au point III.3.1.1, avec en plus, l'ajout d'une sonde non marquée ou froide lors de l'incubation de l'extrait nucléaire avec la sonde marquée. Les sondes marquées utilisées lors de cette expérience sont les suivantes : AP-1 CTL, pwt et pmt. Ces sondes sont mises en compétition avec un excès de 50 x en sonde froide c'est-à-dire, la sonde AP-1 CTL froide pour pwt et pmt, avec la sonde pwt froide pour AP-1 CTL.

b) Résultats et discussion

La figure III.11 montre que, quelle que soit la sonde marquée, les bandes correspondant à la liaison respectivement du facteur constitutif (sondes pmt, pwt et AP-1 CTL) et de AP-1 (sondes pmt et pwt) disparaissent lorsque la sonde froide est ajoutée. Ceci démontre que AP-1 reconnaît indifféremment les deux sondes AP-1 CTL et pwt, et donc que le site *cis* AP-1 issu du promoteur de HIF1A (sonde pwt) constitue bien un site de liaison pour AP-1.

III.3.1.4 Identification du partenaire de c-jun par supershift

Après avoir démontré que AP-1 se lie à la séquence pwt du promoteur de HIF1A, nous avons recherché l'identité du partenaire de c-jun dans le complexe AP-1 induit par

l'hypoxie en réalisant un supershift avec des anticorps dirigés contre une série de facteurs présents dans les complexes AP-1 : P-CREB, CREB/ATF-1, ATF-2 et c-fos.

a) Description de l'expérience

Le protocole suivi est le même qu'au point III.3.1.2. Le supershift est réalisé en ajoutant les différents anticorps cités ci-dessus, la sonde utilisée est la sonde pwt et la seule condition testée est l'hypoxie.

b) Résultats et discussion

Sur le film de révélation du supershift représenté à la figure III.12, on constate la présence des deux bandes induite et constitutive déjà observées lors des expériences précédentes. De plus, en présence de l'anticorps anti-CREB/ATF-1, on remarque l'existence d'une troisième bande plus haut dans le gel, correspondant au supershift. L'absence de supershift avec l'anticorps anti-P-CREB suggère que le supershift observé en présence de l'anticorps anti-CREB/ATF-1 est dû au facteur ATF-1 plutôt qu'au facteur CREB.

Ces résultats semblent indiquer qu'un des partenaires de c-jun pour former le complexe AP-1 activé par l'hypoxie est ATF-1. Ceci dit, la séparation des différentes bandes sur le gel n'est pas parfaite et montre que le protocole de cette expérience doit encore être optimisé. Il serait également intéressant de réaliser des supershifts supplémentaires avec des anticorps dirigés contre d'autres partenaires potentiels de c-jun comme par exemple JunB.

Les différents résultats de cette série d'expériences réalisées dans le cadre de l'étude de la liaison du facteur de transcription AP-1 à la séquence pwt issue du promoteur de HIF1A, indiquent que AP-1 se lie effectivement à ce site et donc qu'il s'agit bien d'une séquence *cis* AP-1. Cependant il existe une grande variété d'éléments *cis* sur lesquels AP-1 peut se lier. Par ailleurs, la fixation de AP-1 sur un élément *cis* en condition d'EMSA ne signifie pas toujours que cet élément *cis* est actif *in vivo*. Nous allons donc aborder cette étude dans les points suivants.

III.3.2 Activité de l'élément *cis* AP-1 du promoteur de HIF1A

Pour que la séquence pwt soit un site AP-1 entièrement fonctionnel, il faut non seulement que AP-1 s'y lie mais également que cette liaison active la transcription du gène en aval du site. C'est dans cette optique que nous avons ensuite étudié, par système rapporteur, l'activité du site AP-1 du promoteur de HIF1A.

III.3.2.1 Localisation d'un élément *cis* activateur dans le promoteur de HIF1A

Avant l'étude proprement dite de l'activité de l'élément *cis* AP-1 du promoteur de HIF1A, nous avons réalisé l'expérience de Minet *et al.* (1999 a) décrite dans le but de ce mémoire, mais en hypoxie réelle plutôt qu'en présence de CoCl₂, afin de vérifier que l'élément *cis* AP-1 dont est issue la sonde pwt, répond bien à l'hypoxie.

a) Description de l'expérience

Après avoir été transfectées avec les plasmides p11K, p8D ou p15C et avec le plasmide pRL-SV40 pour la normalisation, les cellules HepG2 sont incubées pendant 12 heures en normoxie, en hypoxie ou en présence de PMA. Ces trois plasmides possèdent le gène rapporteur codant pour la luciférase et sous la dépendance de délétants du

promoteur de HIF1A. Le plasmide p15C possède l'élément *cis* AP-1 incomplet, le plasmide p8D contient l'élément *cis* AP-1 complet et le plasmide p11K possède des séquences en amont en plus de cet élément. Après cette incubation, les cellules sont lysées et l'activité luciférase est mesurée.

b) Résultats et discussion

Comme le montre la figure III.13, on remarque une augmentation de l'expression du gène rapporteur en hypoxie et après stimulation au PMA par rapport à la normoxie quand l'élément *cis* AP-1 est présent dans sa totalité mais pas quand il est incomplet.

Cette augmentation est maintenue mais pas augmentée en présence de séquences en amont de l'élément AP-1, ce qui démontre que l'élément principal *cis* activateur en hypoxie est bien localisé entre les résidus -20 et -41 dans le promoteur de HIF1A.

Deux autres informations sont apportées par les résultats présentés dans la figure III.13. La première est que, comme nous l'avons déjà observé, les effets activateurs de l'hypoxie et du PMA ne sont pas additionnels. La deuxième est que la présence de séquences en amont de l'élément *cis* AP-1 entraîne une augmentation de l'expression du gène rapporteur dans toutes les conditions, signe de l'existence d'éléments *cis* transactivateurs constitutifs au sein de ces séquences. Ces éléments pourraient être des sites de liaison pour Sp1 car deux séquences CCCGCC succèdent au site AP-1.

III.3.2.2 Clonage de l'élément *cis* AP-1 du promoteur de HIF1A dans le plasmide pGL3-SV40

Après avoir localisé la séquence *cis* activatrice répondant à l'hypoxie dans le promoteur de HIF1A, nous avons vérifié que c'était bien l'élément *cis* AP-1 localisé dans cette séquence qui était responsable de cet effet.

A cette fin, nous avons d'abord cloné dans un vecteur rapporteur un insert contenant trois copies de l'élément *cis* AP-1 pwt issu du promoteur de HIF1A. Nous avons également cloné en parallèle un autre insert contenant la forme mutée de cet élément. Les constructions plasmidiques ont ensuite été transfectées dans des cellules HepG2 afin d'étudier l'activité de l'élément *cis* AP-1 par système rapporteur. Pour réaliser ce clonage, nous avons dû utiliser plusieurs stratégies avant d'obtenir le plasmide désiré.

III.3.2.2.1 Première stratégie

Afin de cloner les inserts contenant les formes sauvage et mutée de l'élément *cis* AP-1 du promoteur de HIF1A dans le vecteur pGL3-SV40, nous avons élaboré une première stratégie de clonage en utilisant les enzymes de restriction Sma I et Sac I. Les sites de restriction des deux enzymes utilisées dans cette stratégie de clonage sont situés dans le site multiple de clonage du pGL3-SV40. Le plasmide pGL3-SV40 possède le gène rapporteur codant pour la luciférase dont l'expression est sous la dépendance du promoteur faible SV40.

a) Description de la démarche

La première étape est l'hybridation des oligonucléotides S/AP-1 contenant 3 x la séquence pwt du promoteur de HIF1A. Ces oligonucléotides sont bordés à une extrémité par le site de restriction de l'enzyme Sac I qui coupe l'ADN à bouts collants.

Ensuite, le plasmide pGL3-SV40 est restreint par Sma I. Cette enzyme de restriction coupe l'ADN à bouts francs.

A l'étape suivante, les oligonucléotides double brin S/AP-1 sont ajoutés au plasmide restreint par Sma I. L'enzyme Sac I est alors ajoutée au mélange. Après avoir été restreint, le mélange d'ADN est purifié par une extraction au phénol chloroforme.

Vient alors l'étape de ligation du plasmide et de l'insert. La réaction est réalisée pendant 12 heures à 4 et 14°C.

Les produits de cette réaction sont transformés dans des bactéries *E.Coli* SURE CaCl₂ compétentes par choc thermique. Ensuite, les bactéries transformées sont étalées sur un milieu de culture solide contenant de la tétracycline et de l'ampicilline. Ces deux antibiotiques sélectionnent positivement, respectivement la souche *E.Coli* SURE et les bactéries transformées.

Après avoir poussé une nuit à 37°C, une série de clones sont sélectionnés et mis en culture liquide (milieu contenant de l'ampicilline) pendant une nuit à 37 °C, sous forte agitation.

Le lendemain matin, l'ADN plasmidique est extrait de la culture par mini-prep puis restreint par les enzymes Hind III et Sac I. L'ADN restreint est déposé sur un gel d'agarose 2 %. L'électrophorèse permet de vérifier si les clones sont positifs ou non c'est-à-dire si les plasmides contiennent au moins un insert.

Parallèlement à cette méthode, nous avons utilisé la même technique de clonage mais avec en plus, un traitement des plasmides restreints à la phosphatase alcaline, enzyme qui déphosphoryle les extrémités 5'-phosphate afin d'éviter la recircularisation

du plasmide sur lui-même lors de la ligation. Les premières étapes diffèrent quelque peu de celles suivies pour le clonage sans traitement à la phosphatase alcaline : le plasmide et les oligonucléotides sont restreints séparément. Les enzymes de restriction Sma I et Sac I sont utilisées pour restreindre le plasmide et l'enzyme Sac I est utilisée uniquement pour restreindre les oligonucléotides. Ils sont ensuite purifiés respectivement par colonne échangeuse d'anions et extraction au phénol chloroforme. Le plasmide est alors traité à la phosphatase alcaline pendant 1 heure à 37°C puis à nouveau purifié par colonne échangeuse d'anions. Les étapes suivantes, de la ligation à l'électrophorèse, sont identiques à celles de la méthode sans traitement à la phosphatase alcaline.

La figure III.14 montre la taille des fragments d'ADN attendus après restriction avec les enzymes Hind III et Sac I :

- un fragment de 4776 pb
- un fragment de - 217 pb si le plasmide ne contient pas d'insert.
- 266 pb si le plasmide contient un insert (49 bp).

b) Résultats et discussion

La figure III.15 représente un des gels d'agarose obtenus. On observe pour chaque clone

- un fragment de taille supérieure à 4000 pb correspondant au fragment de 4776 pb.
- un fragment de taille légèrement supérieure à 200 pb correspondant au fragment de 217 pb.

Que ce soit avec ou sans traitement à la phosphatase alcaline, nous n'avons obtenu aucun clone positif. Nous avons alors augmenté les temps de restriction pour Sac I et d'incubation en présence de la phosphatase alcaline respectivement à 12 heures et 4 heures. Malgré cela, nous n'avons constaté aucune amélioration. L'absence de plasmide

recombinant serait due à un problème de restriction des oligonucléotides par Sac I à cause de la localisation trop “ extrême ” de son site de restriction sur les oligonucléotides. Plutôt que de “ screener ” tous les clones présents sur milieu solide à la recherche d’un éventuel et peu probable plasmide recombinant, nous avons opté pour une autre stratégie de clonage.

III.3.2.2.2 Deuxième stratégie

Puisque la restriction des oligonucléotides par Sac I dont le site de restriction situé à l’extrémité de ceux-ci pose problème, nous avons essayé une seconde stratégie en employant uniquement l’enzyme de restriction Sma I. Comme cette enzyme coupe l’ADN à bouts francs, les oligonucléotides ne doivent pas être restreints. De plus, cette stratégie permet de simplifier le protocole expérimental dont le nombre d’étapes élevé est un handicap.

a) Description de la démarche

La démarche suivie est très semblable à celle expliquée dans le point précédent. Le plasmide pGL3-SV40 est restreint avec l’enzyme Sma I uniquement puis traité à la phosphatase alcaline.

La figure III.14 montre la taille des fragments d’ADN attendus après restriction par Hind III et Sac I :

- un fragment de 4776 pb
- un fragment de - 234 pb si le plasmide est vide.
- 283 pb si le plasmide contient un insert (49 pb).

b) Résultats et discussion

Sur le gel d'agarose représenté à la figure III.16, on observe deux fragments :

- un fragment de taille supérieure à 4000 pb, correspondant au fragment attendu de 4776 pb.
- un fragment légèrement supérieur à la bande marqueur de 200 pb, correspondant au fragment de 234 pb.

Comme pour la première stratégie, nous n'avons pas obtenu de clone positif. L'augmentation des temps de restriction et d'incubation en présence de la phosphatase alcaline n'a entraîné aucun changement dans les résultats. L'échec de la tentative de clonage par cette stratégie est probablement liée au fait que Sma I restreint le plasmide à bouts francs, ce qui entraîne une moins bonne stabilisation de l'insert dans le plasmide. Nous nous sommes alors tournés vers une troisième stratégie de clonage.

III.3.2.2.3 Troisième stratégie

Dans la troisième tentative de clonage, nous avons utilisé l'enzyme de restriction Kpn I. Cette enzyme reconnaît son site de restriction avec une forte affinité même aux extrémités des oligonucléotides. Il coupe l'ADN à bouts collants, ce qui permet d'augmenter les chances d'insertion dans le plasmide.

a) Description de la démarche

La démarche suivie est la même que celle décrite pour la seconde stratégie si ce n'est que les oligonucléotides K/AP-1/K sont bordés à chaque extrémité par le site de restriction de l'enzyme Kpn I et sont donc restreints avant l'étape de ligation. De plus, les enzymes utilisées pour la restriction contrôle sont ici Hind III et Sca I. Des clonages avec et sans traitement à la phosphatase alcaline ont été réalisés.

La taille des fragments attendue après restriction par Hind III et Sca I (Figure III.17) est de :

- 3380 pb
- 1083 pb
- 200 pb
- 347 pb si le plasmide ne contient pas d'insert ou
401 pb si le plasmide contient un insert (54 pb).

b) Résultats et discussion

Les résultats obtenus après migration sont présentés à la figure III.18. Pour chaque clone, on observe :

- une bande d'environ 3000 pb correspondant au fragment de 3380 pb.
- une bande d'un peu plus de 1000 pb correspondant au fragment de 1083 pb.
- une bande de 200 pb correspondant au fragment de même taille.
- une bande dont la taille varie entre 400 et 500 pb indiquant la présence de un ou de plusieurs inserts.

Curieusement, nous avons obtenu des clones positifs uniquement lorsque les plasmides n'ont pas subi de traitement à la phosphatase alcaline.

Différents plasmides recombinants ont ensuite été séquencés afin de déterminer le nombre d'inserts et leur sens pour chacun d'eux. Parmi les 35 plasmides séquencés, nous en avons sélectionné deux contenant chacun un insert dans l'orientation "sens" avec les sites AP-1 pwt ou les sites équivalents mais mutés. Ces plasmides ont été appelés respectivement pGL3-SV40 3x AP-1wt et pGL3-SV40 3x AP-1mt.



Figure III.18 : Profil de restriction par Hind III/Sca I de l'ADN plasmidique de différents clones obtenus par la troisième stratégie de clonage, sans traitement à la phosphatase alcaline.

Piste 1 à 3 : ADN plasmidique isolé des clones 1 à 3 digéré par Hind III/Sca I

Mq : 1kb DNA Ladder (Promega)

Piste 4 à 9 : ADN plasmidique isolé des clones 4 à 9 digéré par Hind III/Sca I

CTL : ADN du pGL3-SV40 digéré par Hind III/Sca I

III.3.2.3 Etude fonctionnelle de l'élément *cis* AP-1 par système rapporteur

Après avoir cloné l'élément *cis* AP-1 issu du promoteur de HIF1A et sa forme mutée dans le plasmide pGL3-SV40, nous avons étudié son activité dans les cellules HepG2 par système rapporteur. Le but étant de vérifier si cette séquence pouvait effectivement médier la régulation de l'expression du gène en aval, ici la luciférase, en fonction des conditions hypoxique ou normoxique.

a) Description de la démarche

Après avoir été transfectées avec les plasmides pGL3-SV40 3 x AP-1 wt/mt et pRL-SV40, les cellules HepG2 sont incubées pendant 5 heures en normoxie, en hypoxie ou en présence de PMA. Ce plasmide possède 3 copies de l'élément *cis* AP-1 du promoteur de HIF1A ou sa forme mutée en amont du gène rapporteur codant pour la luciférase. L'expression de ce dernier est sous la dépendance du promoteur faible SV40. Le plasmide pGL3-SV40 est utilisé comme contrôle négatif. Après cette incubation, les cellules sont lysées et l'activité luciférase est mesurée.

b) Résultats et discussion

Comme le montre la figure III.19, l'expression du gène de la luciférase augmente fortement en hypoxie et après stimulation au PMA par rapport à la normoxie lorsque l'élément *cis* AP-1 issu du promoteur de HIF1A est présent. Cette différence d'expression est supprimée quand l'élément *cis* est muté, ce qui indique clairement que l'effet activateur observé en hypoxie et après stimulation au PMA est bien dû à l'élément *cis* AP-1 du promoteur de HIF1A.

L'ensemble des résultats obtenus dans le cadre de l'étude de l'activité de l'élément *cis* AP-1 issu du promoteur de HIF1A permet de suggérer que celui-ci est effectivement l'élément *cis* activateur responsable de l'activation de la transcription du gène HIF1A en hypoxie.

III.4 Etude préliminaire de la voie d'activation de AP-1 par l'hypoxie

Dans la dernière partie du volet expérimental de ce mémoire, nous avons cherché par quelle voie de transduction du signal l'hypoxie active le facteur de transcription AP-1. Puisque la littérature suggère une action de l'hypoxie au niveau de la voie des MAP kinases (Müller *et al.*, 1997), nous avons étudié le taux de phosphorylation des trois sous-familles de MAP kinases, à savoir les ERK (p42/p44), les JNK (p46/p56) et la p38 MAP kinase. Rappelons que la phosphorylation de ces différentes enzymes est le signe de leur activation.

Pour ce faire, nous avons réalisé différents Western blot avec des anticorps dirigés contre les formes phosphorylées de ces kinases.

III.4.1 Les ERK

Suite à l'article de Müller *et al.* (1997) suggérant un rôle important des ERK dans l'activation de AP-1 par l'hypoxie, principalement via l'activation de c-fos, dans différents types cellulaires, la première sous-famille de MAP kinases que nous avons étudiée est celle des ERK.

a) Description de l'expérience

Après avoir été incubées 1, 2,5 ou 5 heures en normoxie, en hypoxie ou en présence de PMA (100 nM), les cellules sont lysées. Un Western blot est ensuite réalisé à partir de ces extraits en utilisant un anticorps de souris anti-P-p42/p44. Le complexe protéique est détecté indirectement par l'emploi d'anticorps anti-IgG de souris couplé à la peroxydase dont l'activité est révélée en chémiluminescence.

b) Résultats et discussion

Les différents Western blot réalisés sont très peu spécifiques, le nombre de bandes apparaissant sur les films de révélation après un temps d'exposition relativement long est fort élevé. Ceci dit, nous pouvons supposer que si les ERK kinases avaient été activées par l'hypoxie, les bandes correspondantes seraient apparues sur le film pour un temps d'exposition plus court, comme c'est le cas dans les cellules HMEC-1 soumises à une hypoxie . Donc aucune phosphorylation significative ne fut détectée pour ces kinases.

III.4.2 La p38 MAP kinase

Nous avons ensuite étudié la variation du taux de phosphorylation de la p38 MAP kinase en hypoxie par rapport à la normoxie par Western blot en utilisant un anticorps de lapin anti-P-p38.

A nouveau, les Western obtenus sont d'une très faible spécificité et la même conclusion que pour les ERK peut être tirée pour la p38 MAP kinase, à savoir qu'elle n'est probablement pas activée par l'hypoxie.

III.4.3 Les JNK

En dernier lieu, nous avons étudié l'existence d'une activation éventuelle des JNK par l'hypoxie, toujours par Western blot, avec deux anticorps : un anti-P-JNK1/2 et un anti-P-JNK1. En effet, il est maintenant très clairement démontré que pour avoir une transactivation dépendante de AP-1, les sérines 73 et 63 de AP-1 doivent être phosphorylées. Or ce sont les JNK qui phosphorylent spécifiquement ces sites.

Dans une première approche visant à détecter les P-JNK1/2, nous avons suivi les protocoles utilisés pour les ERK et la p38 MAP kinase. Comme pour les deux autres sous-familles de MAP kinases, les Western blot obtenus furent très peu spécifiques et donc non informatifs quant à l'activation des JNK par l'hypoxie.

Dans une seconde approche, l'anticorps anti-P-JNK été incubé en présence de lait et d'un anticorps secondaire recommandé pour ce protocole. Le film de révélation du Western blot représenté à la figure III.20 montre une accumulation non négligeable et dépendante du temps d'incubation de la forme phosphorylée de la JNK1 en hypoxie par rapport à la normoxie. La protéine JNK1 est présente en normoxie et en hypoxie dans une quantité pratiquement équivalente quels que soient les temps d'incubation et les conditions. Le contrôle α -tubuline montre qu'une même quantité de protéines a été chargée dans chaque puits.

Ce résultat suggère que l'hypoxie active bien la JNK1.

Conclusion
et
Perspectives

IV. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Lorsque la concentration en O₂ diminue dans l'environnement tissulaire, la cellule perçoit ce changement grâce à un senseur à O₂ dont l'identité reste encore inconnue à ce jour. Ce dernier est en fait l'élément initiateur de toute une voie de transduction du signal, encore relativement mystérieuse, conduisant à court terme à la réorientation du métabolisme énergétique aérobie vers la glycolyse, et à plus long terme, à l'érythropoïèse et à la néo-angiogenèse. Ces différentes adaptations permettent à la cellule et au tissu en ischémie de pallier à la situation d'hypoxie dans laquelle ils se trouvent.

Une des étapes clé de la voie de transduction du signal induite par l'hypoxie est l'activation du facteur de transcription HIF-1, facteur largement impliqué dans la réponse adaptative des cellules à l'hypoxie. HIF-1 est un dimère dont seule la sous-unité HIF-1 α est régulée par l'hypoxie.

Le but du mémoire était d'étudier la régulation transcriptionnelle de la sous-unité HIF-1 α en réponse à l'hypoxie, et plus particulièrement le rôle joué par le facteur de transcription AP-1 dans l'activation du gène HIF1A en réponse à l'hypoxie. En effet, un site potentiel de liaison de AP-1 localisé dans une région du promoteur de HIF1A contenant des éléments *cis* activateurs a récemment été découvert (Minet *et al.*, 1999 a).

Si le facteur de transcription AP-1 est impliqué dans l'activation de la transcription du gène HIF1A en réponse à l'hypoxie, celui-ci doit être activé en réponse à l'hypoxie. L'hypoxie active AP-1 dans de nombreux types cellulaires (voir le point I.3.3 de l'introduction). De même, nous avons constaté l'activation de AP-1 en réponse à l'hypoxie dans les cellules HepG2, la lignée cellulaire utilisée dans les expériences

réalisées au cours du mémoire. Cette activation est rapide, on peut l'observer après 1 heure d'incubation sous hypoxie. Elle est le résultat d'une augmentation de l'expression de c-jun ainsi que d'une augmentation de sa phosphorylation. c-jun phosphorylé s'accumule alors dans le noyau.

Dès lors, deux questions peuvent être soulevées :

Quelles sont les kinases impliquées dans l'activation de AP-1 par l'hypoxie et quelle est la nature des dimères formés?

Certains éléments de réponse ont été apportés dans la littérature montrant l'implication de AP-1, en conjonction avec HIF-1, dans la réponse adaptative des cellules à l'hypoxie. En effet :

- Müller *et al.* (1997) ont démontré l'augmentation de l'expression du gène c-fos en réponse à l'hypoxie, dans les cellules HeLa, via la phosphorylation de Elk-1 par la MAP kinase ERK2 (voir point I.3.3). La protéine c-fos pourrait alors s'assembler avec un autre facteur pour former des complexes AP-1, complexes pouvant à leur tour induire l'activation de la transcription de gènes cibles.
- Dans les cellules de gliome C6, Damert *et al.* (1997) ont montré, en réalisant des expériences de supershift, que le facteur AP-1 potentialisant l'effet activateur du facteur HIF-1 dans l'induction hypoxique de la transcription du gène du VEGF, est un hétérodimère fos-jun.
- Norris et Millhorn (1995) ont montré que, dans les cellules PC12, la séquence *cis* (résidus -284 à -150) responsable de l'activation de la transcription du gène de la TH en réponse à l'hypoxie comporte le site de liaison des facteurs HIF-1 et AP-1. En outre, des études immunologiques (supershift, shift-Western assays) ont révélé que les protéines c-fos et JunB se lient au site de liaison de AP-1 en condition d'hypoxie. Par la suite, Mishra *et al.* (1997) ont démontré, au moyen d'une stratégie utilisant de

l'ARN c-fos antisens, l'implication directe de l'expression du gène c-fos dans la formation consécutive du complexe AP-1 et dans l'activation de la transcription du gène de la TH en réponse à l'hypoxie (voir point I.3.3). Ces différentes études suggèrent un rôle central de c-fos.

Lors de l'étude de la nature des complexes AP-1 activés par l'hypoxie se liant au site TRE potentiel du promoteur de HIF1A dans les cellules HepG2, des expériences de supershift ont permis de mettre en évidence l'existence de complexes constitués des sous-unités c-jun et ATF-1. c-fos ne serait pas impliqué dans ces complexes. Par ailleurs, nous avons constaté l'induction de la protéine c-jun en hypoxie par rapport à la normoxie de même que l'augmentation de sa forme phosphorylée dans ces conditions, cette dernière témoignant de l'activation de AP-1 en hypoxie. Ceci dit, il serait nécessaire de compléter ces observations entre autres par des expériences utilisant des dominants négatifs notamment pour c-jun et ATF-1, ainsi que de poursuivre plus avant la recherche de la constitution de ces complexes AP-1. Notons toutefois que l'utilisation de dominants négatifs pour AP-1 risque d'être fatale pour la cellule, étant donné l'importance de ce facteur de transcription ; il faudrait donc envisager une expression inductible de ces mutants.

En ce qui concerne les kinases impliquées dans l'activation de AP-1, les résultats des expériences préliminaires réalisées dans ce mémoire suggèrent une activation de la MAP kinase JNK1 en condition d'hypoxie. Il reste cependant à vérifier si c'est par l'activation de cette kinase que l'hypoxie entraîne l'induction de c-jun et l'activation de AP-1, par exemple en utilisant un dominant négatif de cette kinase.

Plusieurs auteurs ont montré l'activation des JNK en condition d'hypoxie dans différents autres types cellulaires tels que les fibroblastes d'artère pulmonaire bovine

(Scott *et al.*, 1998), les cellules HT29 d'adénocarcinome de colon humain (Vasilevskaya et O'Dwyer, 1999), les cellules MCF-7/ADR de carcinome de sein humain (Le et Corry, 1999) et dans les cellules musculaires lisses vasculaires (Lin *et al.*, 2000). Il faut cependant noter que dans aucune de ces études, la voie de transduction qui conduit à l'activation des JNK par l'hypoxie n'est connue.

Lorsqu'AP-1 est activé, il est capable d'augmenter la transcription des gènes dont le promoteur contient un ou plusieurs sites de liaison pour ce facteur. Les expériences que nous avons réalisées dans ce cadre montrent que AP-1 peut effectivement se lier au site AP-1 potentiel du promoteur de HIF1A, faisant de celui-ci un gène cible de AP-1. Si cette séquence *cis* AP-1 est effectivement l'élément régulateur responsable de l'activation de la transcription du gène HIF1A en réponse à l'hypoxie, la liaison de AP-1 à ce site doit entraîner une augmentation du taux de transcription du gène situé en aval, en hypoxie par rapport à la normoxie. Le clonage de l'élément *cis* AP-1 du promoteur de HIF1A dans un vecteur rapporteur nous a permis de montrer l'activité effective du site *cis* AP-1 du promoteur de HIF1A dans les cellules HepG2 en condition d'hypoxie.

L'ensemble de ce travail indique que la liaison du facteur de transcription AP-1 à la séquence *cis* AP-1 du promoteur de HIF1A en réponse à l'hypoxie est bien l'événement régulateur par lequel l'hypoxie active la transcription du gène HIF1A dans la lignée cellulaire HepG2 et conduit à une augmentation de son ARNm. A l'avenir, il conviendrait de réaliser une étude similaire dans une autre lignée cellulaire telle que les cellules HMEC-1 dans lesquelles aucune augmentation du taux de transcription du gène HIF1A n'a été observée en hypoxie par rapport à la normoxie (Minet *et al.*, 1999 a). Comme nous l'avons mentionné dans l'introduction de ce mémoire, la différence existant entre ces deux types cellulaires à propos de la régulation transcriptionnelle du gène HIF1A en

réponse à l'hypoxie pourrait être expliquée par l'activité d'un facteur *trans* inhibiteur présent dans les cellules HMEC-1 mais pas dans les cellules HepG2.

Par ailleurs, il est intéressant de noter que les kinases ERK1/2 sont activées dans les HMEC-1 en conditions d'hypoxie (Minet *et al.*, 2000 b) alors qu'elles ne semblent pas l'être dans les cellules HepG2. Il n'est pas déterminé si cette seconde différence entre ces deux types cellulaires est responsable en tout ou en partie de la différence observée au niveau de la présence ou non du répresseur transcriptionnel. Ces observations suggèrent cependant que les voies de transduction du signal induites par l'hypoxie sont au moins partiellement différentes dans les cellules HepG2 et dans les HMEC-1. On peut alors envisager qu'il y ait en conséquence des différences quant aux gènes cibles de ces voies qui seraient allumés en condition d'hypoxie. L'adaptation à l'hypoxie d'une cellule endothéliale ou d'un hépatocyte passerait alors par une ou plusieurs voies communes, comme l'activation de HIF-1 avec par exemple l'augmentation de l'expression des enzymes glycolytiques, ainsi que par des voies spécifiques du tissu et adaptées aux fonctions de celui-ci.

Il faut aussi noter que HIF-1 α n'est certainement pas le seul gène cible du complexe AP-1 activé par l'hypoxie. AP-1 participe donc également à la mise en place de la réponse adaptative à l'hypoxie. Nous avons par exemple déjà mentionné la coopération entre AP-1 et HIF-1 pour induire l'augmentation de la transcription du gène du VEGF dans les cellules de gliome C6 (Damert *et al.*, 1997). Par ailleurs, Le et Corry (1999) ont récemment montré que AP-1 était responsable de l'augmentation de l'expression du bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) dans des cellules cancéreuses. Dans ce cas, comme dans les cellules HepG2, AP-1 est activé en hypoxie par la JNK1. Le bFGF est également un facteur angiogénique qui va favoriser la vascularisation de la tumeur et

donc sa survie. D'autres gènes induits par AP-1 en conditions d'hypoxie restent probablement à découvrir.

Une dernière considération concerne le rôle de AP-1 dans la modulation de l'apoptose. Les JNK et AP-1 sont activés en réponse aux rayonnements UV qui conduisent à la mort des cellules par apoptose (Rosette et Karin, 1996). L'hypoxie peut également conduire à l'apoptose dans différents types cellulaires (Li *et al.*, 1999 ; Halterman *et al.*, 1999). La question d'un rôle éventuel de AP-1 dans l'apoptose induite par l'hypoxie se pose au vu des résultats de ces différentes études. Effectivement, Lin *et al.* (2000) ont montré que l'apoptose induite chez les cardiomyocytes dépendait de l'activation des JNK. Des études complémentaires restent nécessaires afin de mieux comprendre les interrelations qui existent entre AP-1, HIF-1 et la survie ou la mort des cellules en hypoxie.

Annexes

Annexe 1 : Hétérogénéité du site de liaison de AP-1

Nous avons décrit précédemment le site de liaison de AP-1 dont la séquence consensus est : TGACTCA. Cependant, il ne faut pas perdre de vue que les séquences consensus sont établies sur base des éléments *cis* AP-1 identifiés au sein de promoteurs divers. Par conséquent, ces séquences divergent souvent des séquences consensus. Voici quelques exemples de sites TRE (TPA Responsive Element) identifiés :

<u>promoteur du gène</u> :	<u>séquence <i>cis</i> TRE</u> :
Collagénase (site 1)	<u>ATGAGTCAC</u>
Collagénase (site 2)	<u>ATTAATCAT</u>
Hème oxygénase-1 (site 1)	<u>TGTGTCA</u>
Hème oxygénase-1 (site 2)	<u>TGAGTCA</u>
Cholécystokinine	<u>CTGCGTCAGCG</u>
TIMP-1	<u>TGAGTAA</u>
Choline Acétyltransférase	<u>TGACCCA</u>

Par ailleurs, les bases qui flanquent directement ces sites peuvent également jouer un rôle important dans la reconnaissance et la stabilité de la liaison du facteur *trans* à l'ADN.

Actuellement, on considère que les sites TRE pour la liaison de c-jun/c-jun répondent à la séquence : RSTGACTNMNW où N=AGCT

M=AC

W=AT

R=GA

S=GC

Cette séquence est établie sur base de la matrice obtenue avec 15 sites TRE identifiés comme actifs au sein de divers promoteurs. L'hétérodimère jun/fos se lie également à cette séquence mais avec une affinité 25 fois supérieure à celle observée pour l'homodimère c-jun/c-jun.

Il ne faut pas non plus oublier les sites TRE sur lesquels se lient les hétérodimères jun/ATF ou jun/CREB dont les séquences sont :

CNSTGACGTNNNYC où N=ACGT

S=GC

Y=TC

Cette séquence est établie avec 25 sites TRE identifiés comme actifs au sein de divers promoteurs.

La séquence du site AP-1 potentiel présent dans le promoteur du gène HIF1A est la suivante : CCCTGACGCTGCCTC.

Elle possède une similarité de 100 % avec la matrice établie pour le site de liaison du complexe c-jun/ATF.

Bibliographie

Arany Z., Huang L.E., Eckner R., Bhattacharya S., Jiang C., Goldberg M.A., Bunn H.F., Livingston D.M.

An essential role for p300/CBP in the cellular response to hypoxia.

Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 93 (1996) 12969-12973.

Arias J., Alberts A.S., Brindle P., Claret F.X., Smeal T., Karin M., Feramisco J., Montminy M.

Activation of cAMP and mitogen responsive genes relies on a common nuclear factor [see comments].

Nature 370 (1994) 226-229.

Arnould T., Michiels C., Alexandre I., Remacle J.

Effect of hypoxia upon intracellular calcium concentration of human endothelial cells.

J. Cell. Physiol. 152 (1992) 215-221.

Arts J., Grimbergen J., Bosma P.J., Rahmsdorf H.J., Kooistra T.

Role of c-Jun and proximal phorbol 12-myristate-13-acetate-(PMA)- responsive elements in the

regulation of basal and PMA-stimulated plasminogen-activator inhibitor-1 gene expression in HepG2.

Eur. J. Biochem. 241 (1996) 393-402.

Ausserer W.A., Bourrat-Floeck B., Green C.J., Laderoute K.R., Sutherland R.M.

Regulation of c-jun expression during hypoxic and low-glucose stress.

Mol. Cell. Biol. 14 (1994) 5032-5042.

Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K.

Current protocols in molecular biology.

John Wiley & Sons, Inc., 3 vols (1996)

Bandyopadhyay R.S., Phelan M., Faller D.V.

Hypoxia induces AP-1-regulated genes and AP-1 transcription factor binding in human endothelial and other cell types.

Biochim. Biophys. Acta. 1264 (1995) 72-78.

Brown J.R., Nigh E., Lee R.J., Ye H., Thompson M.A., Saudou F., Pestell R.G., Greenberg M.E.

Fos family members induce cell cycle entry by activating cyclin D1.

Mol. Cell. Biol. 18 (1998) 5609-5619.

Castellazzi M., Sergeant A.

[The C-Jun oncoprotein].

Bull. Cancer 80 (1993) 757-759.

Chandel N.S., Maltepe E., Goldwasser E., Mathieu C.E., Simon M.C., Schumacker P.T.

Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription.

Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 95 (1998) 11715-11720.

Czyzyk-Krzeska M.F.

Molecular aspects of oxygen sensing in physiological adaptation to hypoxia.

Respir. Physiol. 110 (1997) 99-111.

Damert A., Ikeda E., Risau W.

Activator-protein-1 binding potentiates the hypoxia-inducible factor-1- mediated hypoxia-induced transcriptional activation of vascular- endothelial growth factor expression in C6 glioma cells.
Biochem. J. 327 (1997) 419-423.

Eguchi H., Ikuta T., Tachibana T., Yoneda Y., Kawajiri K.

A nuclear localization signal of human aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator/hypoxia-inducible factor 1beta is a novel bipartite type recognized by the two components of nuclear pore-targeting complex.

J. Biol. Chem. 272 (1997) 17640-17647.

Ehleben W., Bolling B., Merten E., Porwol T., Strohmaier A.R., Acker H.

Cytochromes and oxygen radicals as putative members of the oxygen sensing pathway.

Respir. Physiol. 114 (1998) 25-36.

Ema M., Hirota K., Mimura J., Abe H., Yodoi J., Sogawa K., Poellinger L., Fujii-Kuriyama Y.

Molecular mechanisms of transcription activation by HLF and HIF-1alpha in response to hypoxia: their stabilization and redox signal-induced interaction with CBP/p300.

Embo. J. 18 (1999) 1905-1914.

Gleadle J.M., Ebert B.L., Ratcliffe P.J.

Diphenylene iodonium inhibits the induction of erythropoietin and other mammalian genes by hypoxia. Implications for the mechanism of oxygen sensing.

Eur. J. Biochem. 234 (1995) 92-99.

Gradin K., McGuire J., Wenger R.H., Kvietikova I., Whitelaw M.L., Toftgard R., Tora L., Gassmann M., Poellinger L.

Functional interference between hypoxia and dioxin signal transduction pathways: competition for recruitment of the Arnt transcription factor.

Mol. Cell. Biol. 16 (1996) 5221-5231.

Griffin H.G., Griffin A.M.

PCR technology. Current innovations.

CRC Press, Inc., Boca Raton (1994)

Guillemin K., Krasnow M.A.

The hypoxic response: huffing and HIFing.

Cell 89 (1997) 9-12.

Halterman M.W., Miller C.C., Federoff H.J.

Hypoxia-Inducible Factor-1 α Mediates hypoxia-induced delayed neuronal death that involves p53.

J. Neuroscience 19 (1999) 6818-6824.

Huang L.E., Arany Z., Livingston D.M., Bunn H.F.

Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit.

J. Biol. Chem. 271 (1996) 32253-32259.

Huang L.E., Gu J., Schau M., Bunn H.F.

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 (1998) 7987-7992.

Iyer N.V., Kotch L.E., Agani F., Leung S.W., Laughner E., Wenger R.H., Gassmann M., Gearhart J.D., Lawler A.M., Yu A.Y., Semenza G.L.

Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia- inducible factor-1alpha.

Genes Dev. 12 (1998a) 149-162.

Iyer N.V., Leung S.W., Semenza G.L.

The human hypoxia-inducible factor 1alpha gene: HIF1A structure and evolutionary conservation.

Genomics 52 (1998b) 159-165.

Jiang B.H., Zheng J.Z., Leung S.W., Roe R., Semenza G.L.

Transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor-1alpha. Modulation of transcriptional activity by oxygen tension.

J. Biol. Chem. 272 (1997) 19253-19260.

Kallio P.J., Okamoto K., O'Brien S., Carrero P., Makino Y., Tanaka H., Poellinger L.

Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1alpha.

EMBO. J. 17 (1998) 6573-6586.

Kallio P.J., Wilson W.J., O'Brien S., Makino Y., Poellinger L.

Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor-1alpha by the ubiquitin-proteasome pathway.

J. Biol. Chem. 274 (1999) 6519-6525.

Kayne P.S.

Knocking down a pathway to built it up.

Trends Genetics 10 (1994) 145-147.

Kornberg R.D.

Eukaryotic transcriptional control.

Trends Cell. Biol. 9 (1999) M46-49.

Ladoux A., Frelin C.

Cardiac expressions of HIF-1alpha and HLF/EPAS, two basic loop helix/PAS domain transcription factors involved in adaptative responses to hypoxic stresses.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 240 (1997) 552-556.

Le Y.J., Corry P.M.

Hypoxia-induced bFGF gene expression is mediated through the JNK signal transduction pathway.

Mol. Cell. Biochem. 202 (1999) 1-8.

Levy N.S., Chung S., Furneaux H., Levy A.P.

Hypoxic stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by the RNA-binding protein HuR.
J. Biol. Chem. 273 (1998) 6417-6423.

Liu Y., Cox S.R., Morita T., Kourembanas S.

Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells.
Identification of a 5' enhancer.
Circ. Res. 77 (1995) 638-643.

Li D., Baichun Y., Jawahar L.M.

Tumor necrosis factor- α enhances hypoxia-reoxygenation-mediated apoptosis in cultured human coronary artery endothelial cells : critical role of protein kinase C.
Cardiovascular Res. 42 (1998) 805-813.

Lin Z., Weinberg J.M., Malhotra R., Merritt S.E., Holzman L.B., Brosius F.C., 3rd

GLUT-1 reduces hypoxia-induced apoptosis and JNK pathway activation.
Am. J. Physiol. 278 (2000) E958-E966.

Maxwell P.H., Wiesener M.S., Chang G.W., Clifford S.C., Vaux E.C., Cockman M.E., Wykoff C.C., Pugh C.W., Maher E.R., Ratcliffe P.J.

The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis.
Nature 399 (1999) 271-275.

Minet E., Ernest I., Michel G., Roland I., Remacle J., Raes M., Michiels C.

HIF1A gene transcription is dependent on a core promoter sequence encompassing activating and inhibiting sequences located upstream from the transcription initiation site and cis elements located within the 5'UTR.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 261 (1999 a) 534-540.

Minet E., Mottet D., Michel G., Roland I., Raes M., Remacle J., Michiels C.

Hypoxia-induced activation of HIF-1: role of HIF-1 α -Hsp90 interaction.
FEBS Lett. 460 (1999 b) 251-256.

Minet E., Michel G., Remacle J., Michiels C.

Role of HIF-1 as a transcription factor involved in embryonic development, cancer progression and apoptosis (review).
Int. J. Mol. Med. 5 (2000 a) 253-259.

Minet E., Arnould T., Michel G., Roland I., Mottet D., Raes M., Remacle J., Michiels C.

ERK activation upon hypoxia: involvement in HIF-1 activation.
FEBS Lett. 468 (2000 b) 53-58.

Mishra R.R., Adhikary G., Simonson M.S., Cherniack N.S., Prabhakar N.R.

Role of c-fos in hypoxia-induced AP-1 cis-element activity and tyrosine hydroxylase gene expression.
Brain Res. Mol. Brain Res. 59 (1998) 74-83.

Mukhopadhyay D., Tsiokas L., Zhou X.M., Foster D., Brugge J.S., Sukhatme V.P.

Hypoxic induction of human vascular endothelial growth factor expression through c-Src activation.
Nature 375 (1995) 577-581.

Muller J.M., Krauss B., Kaltschmidt C., Baeuerle P.A., Rupec R.A.

Hypoxia induces c-fos transcription via a mitogen-activated protein kinase-dependent pathway.
J. Biol. Chem. 272 (1997) 23435-23439.

Norris M.L., Millhorn D.E.

Hypoxia-induced protein binding to O₂-responsive sequences on the tyrosine hydroxylase gene.
J. Biol. Chem. 270 (1995) 23774-23779.

Okino S.T., Chichester C.H., Whitlock J.P.

Hypoxia-inducible mammalian gene expression analyzed in vivo at a TATA- driven promoter and at an initiator-driven promoter.
J. Biol. Chem. 273 (1998) 23837-23843.

Palmer L.A., Semenza G.L., Stoler M.H., Johns R.A.

Hypoxia induces type II NOS gene expression in pulmonary artery endothelial cells via HIF-1.
Am. J. Physiol. 274 (1998) L212-219.

Rajpurohit R., Koch C.J., Tao Z., Teixeira C.M., Shapiro I.M.

Adaptation of chondrocytes to low oxygen tension: relationship between hypoxia and cellular metabolism.
J. Cell. Physiol. 168 (1996) 424-432.

Raymond R., Millhorn D.

Regulation of tyrosine hydroxylase gene expression during hypoxia: role of Ca²⁺ and PKC.
Kidney Int. 51 (1997) 536-541.

Richard D.E., Berra E., Gothie E., Roux D., Pouyssegur J.

p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia- inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) and enhance the transcriptional activity of HIF-1.
J. Biol. Chem. 274 (1999) 32631-32637.

Rosette C., Karin M.

Ultraviolet light and osmotic stress: activation of the JNK cascade through multiple growth factor and cytokine receptors.
Science 274 (1996) 1194-1197.

Ryseck R.P., Bravo R.

c-JUN, JUN B, and JUN D differ in their binding affinities to AP-1 and CRE consensus sequences: effect of fos proteins.
Oncogene 6 (1991) 533-542.

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T.

Molecular cloning.

Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1996)

Schreiber M., Baumann B., Cotten M., Angel P., Wagner E.F.

Fos is an essential component of the mammalian UV response.

EMBO. J. 14 (1995) 5338-5349.

Scott P.H., Paul A., Belham C.M., Peacock A.J., Wadsworth R.M., Gould G.W., Welsh D., Plevin R.

Hypoxic stimulation of the stress-activated protein kinases in pulmonary artery fibroblasts.

Am. J. Respir. Crit. Care Med. 158 (1998) 958-962.

Semenza G.L., Wang G.L.

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 (1992) 5447-5454.

Semenza G.L., Roth P.H., Fang H.M., Wang G.L.

Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1.

J. Biol. Chem 269 (1994) 23757-23763.

Semenza G.L.

Hypoxia-inducible factor 1 and the molecular physiology of oxygen homeostasis.

J. Lab. Clin. Med. 131 (1998 a) 207-214.

Semenza G.L.

Hypoxia-inducible factor-1: master regulator of O₂ homeostasis.

Curr. Opin. Genet. Dev. 8 (1998 b) 588-594.

Semenza G.L.

Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor-1.

Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. 15 (1999 a) 551-578.

Semenza G.L.

Perspectives on oxygen sensing.

Cell 98 (1999 b) 281-284.

Semenza G.L.

Expression of hypoxia-inducible factor-1: mechanisms and consequences.

Biochem. Pharmacol. 59 (2000) 47-53.

Shweiki D., Itin A., Soffer D., Keshet E.

Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis.

Nature 359 (1992) 843-845.

Skinner M., Qu S., Moore C., Wisdom R.

Transcriptional activation and transformation by FosB protein require phosphorylation of the carboxyl-terminal activation domain.

Mol. Cell. Biol. 17 (1997) 2372-2380.

Tibbles L.A., Woodgett J.R.

The stress-activated protein kinase pathways.

Cell. Mol. Life Sci. 55 (1999) 1230-1254.

Tijan R.

Molecular Machines that Control Genes.

Scientific American (1995) 55-61.

Turrens J.F., Alexandre A., Lehninger A.L.

Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria.

Arch. Biochem. Biophys. 237 (1985) 408-414.

Vasilevskaya I.A., O'Dwyer P.J.

Effects of geldanamycin on signaling through activator-protein 1 in hypoxic HT29 human colon adenocarcinoma cells.

Cancer Res. 59 (1999) 3935-3940.

Wang G.L., Semenza G.L.

Characterization of hypoxia-inducible factor-1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia.

J. Biol. Chem. 268 (1993 a) 21513-21518.

Wang G.L., Semenza G.L.

General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia.

Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 90 (1993 b) 4304-4308.

Wang G.L., Semenza G.L.

Desferrioxamine induces erythropoietin gene expression and hypoxia-inducible factor-1 DNA-binding activity: implications for models of hypoxia signal transduction.

Blood 82 (1993 c) 3610-3615.

Wang G.L., Jiang B.H., Rue E.A., Semenza G.L.

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 (1995 a) 5510-5514.

Wang G.L., Jiang B.H., Semenza G.L.

Effect of protein kinase and phosphatase inhibitors on expression of hypoxia-inducible factor-1.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 216 (1995 b) 669-675.

Wang G.L., Semenza G.L.

Purification and characterization of hypoxia-inducible factor-1.

J. Biol. Chem. 270 (1995) 1230-1237.

Wang G.L., Semenza G.L.

Molecular basis of hypoxia-induced erythropoietin expression.
Curr. Opin. Hematol. 3 (1996) 156-162.

Watson J.D., Gilman M., Witkowski J., Zoller M.

ADN recombinant.
De Boeck Universit , Bruxelles (1989)

Wenger R.H., Gassmann M.

Oxygen(es) and the hypoxia-inducible factor-1.
Biol. Chem. 378 (1997) 609-616.

Wenger R.H., Kvietikova I., Rolfs A., Gassmann M., Marti H.H.

Hypoxia-inducible factor-1 alpha is regulated at the post-mRNA level.
Kidney Int. 51 (1997) 560-563.

Wenger R.H., Camenisch G., Desbaillets I., Chilov D., Gassmann M.

Up-regulation of hypoxia-inducible factor-1 alpha is not sufficient for hypoxic/anoxic p53 induction.
Cancer Res. 58 (1998) 5678-5680.

Wiener C.M., Booth G., Semenza G.L.

In vivo expression of mRNAs encoding hypoxia-inducible factor-1.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 225 (1996) 485-488.

Wisdom R., Verma I.M.

Transformation by Fos proteins requires a C-terminal transactivation domain.
Mol. Cell. Biol. 13 (1993) 7429-7438.

Wisdom R.

AP-1: one switch for many signals.
Exp. Cell. Res. 253 (1999) 180-185.

Wisdom R., Johnson R.S., Moore C.

c-Jun regulates cell cycle progression and apoptosis by distinct mechanisms.
Embo. J. 18 (1999) 188-197.

Yao K.S., Xanthoudakis S., Curran T., O'Dwyer P.J.

Activation of AP-1 and of a nuclear redox factor, Ref-1, in the response of HT29 colon cancer cells to hypoxia.
Mol. Cell. Biol. 14 (1994) 5997-6003.