



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Etude des interactions entre la sous-unité HIF-1 α du facteur de transcription HIF-1 (Hypoxia inducible factor-1) et les kinases ERK1 et GSK3 β dans un système double hybride en cellules de mammifère

Parent, Caroline

Award date:
2003

[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

**Etude des interactions entre la sous-unité HIF-1 α du facteur de
transcription HIF-1 (Hypoxia inducible factor-1) et les kinases ERK1 et
GSK3 β dans un système double hybride en cellules de mammifère**

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

Caroline PARENT

Juin 2003

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>

Etude des interactions entre la sous-unité HIF-1 α du facteur de transcription HIF-1 (Hypoxia inducible factor-1) et les kinases ERK1 et GSK3 β dans un système double hybride en cellules de mammifère

PARENT Caroline

Résumé

Des accidents vasculaires peuvent provoquer un arrêt de la circulation sanguine, plaçant les cellules en condition d'hypoxie. Afin de compenser ce manque en oxygène, les cellules sont capables de développer des mécanismes physiologiques et cellulaires leur permettant de s'adapter pour assurer leur survie.

Dans ces conditions d'hypoxie, un facteur de transcription est spécifiquement activé : HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor-1) qui est composé de deux sous-unités : HIF-1 α et ARNT. HIF-1 est capable d'induire la transcription de gènes cibles permettant aux cellules et aux tissus de s'adapter au manque d'oxygène. La stabilisation de la sous-unité HIF-1 α est un des mécanismes principaux conduisant à l'activation de HIF-1 en hypoxie. Cependant, d'autres mécanismes joueraient un rôle important dans la régulation de l'activité du facteur de transcription HIF-1. Parmi ceux-ci, on retrouve une voie dépendante de la kinase ERK1 ainsi qu'une voie dépendante de la voie PI3K/Akt/GSK3. On sait que ces kinases ont un effet sur la stabilisation et sur l'activation de HIF-1 α . La GSK3 β active est potentiellement capable de phosphoryler la sous-unité HIF-1 α régulant ainsi sa quantité. De même, en hypoxie, les MAPKK phosphorylent et activent les ERK qui sont alors capables de réguler HIF-1 α au niveau du domaine de transactivation C-terminal. Cependant, les interactions directes entre ces kinases ERK1 ou GSK3 β et HIF-1 α ne sont pas démontrées.

Le but du mémoire est donc de tester par la technique du double hybride en cellules de mammifère l'existence d'interactions directes entre HIF-1 α et ces kinases.

Dans la première partie du mémoire, nous avons cloné les gènes d'intérêt dans un vecteur contenant le domaine de liaison à l'ADN du facteur de transcription GAL4 ou le domaine d'activation de la protéine VP16. Une fois ces constructions obtenues, nous avons pu tester les interactions proprement dites dans des cellules CHO.

Parallèlement, nous avons réalisé des marquages en immunofluorescence afin de vérifier une co-localisation des différents partenaires au sein d'un même compartiment cellulaire.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Juin 2003

Promoteur: C. Michiels

Nous voici enfin arrivés au terme de ces quatre années d'étude et il est temps de remercier quelques personnes ayant contribué de près ou de loin au bon déroulement de celles-ci.

Je voudrais remercier Madame Martine Raes de m'avoir ouvert les portes de son laboratoire. J'adresse ensuite un grand merci à Madame Carine Michiels de m'avoir accueillie au sein de son équipe, pour sa disponibilité, son soutien et ses nombreux conseils afin d'élucider les problèmes rencontrés au cours de ce mémoire. Je voudrais aussi remercier mon tuteur Denis Mottet de m'avoir accompagnée tout au long de ce travail, de sa patience, merci d'avoir supporté mes « gourderies » et d'avoir contribué, à sa manière, à m'encourager.

Merci à toute l'équipe HIF pour les plaisanteries et blâmes pas toujours compris (DUM, DUM,...).

Merci à tous les membres du laboratoire (Edouard, Sof, Aline, Laurent,...et tous les autres pour ne pas les citer) pour leur bonne humeur et leur aide dans la rédaction de ce mémoire.

Un grand merci particulier à Marc Dieu sans qui ce mémoire n'aurait pu être rendu à temps s'il n'avait pas récupéré mes documents lors du « plantage » d'ordinateur.

Un petit clin d'oeil aux mémorants pour la bonne humeur et la complicité instaurée pendant ces quelques mois.

Je ne voudrais pas omettre de remercier Jonathan de m'avoir supportée et réconfortée pendant les moments difficiles.

Finalement, je remercie du fond du coeur mes parents de m'avoir permis d'accomplir mes études dans les meilleures conditions possibles.

Aujourd'hui, après 4 mois d'attente, je suis heureuse de vous présenter cet écrit. Cependant, ce travail ne peut nullement être considéré comme une fin en soi mais comme un tremplin vers d'autres horizons. Qui sait ce que la vie nous réserve ...

Maintenant, il est grand temps de vous plonger dans cet écrit .
Bonne lecture.

Liste des abréviations :

Aa	Acide aminé
Ac	Anticorps
AD	Activation domain
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
Ahr	Aryl hydrocarbon receptor
Amp	Ampicilline
ARNT-1	Aryl/hydrocarbon receptor nuclear translocator-1
ATP	Adénosine triphosphate
BD	Binding domain
BHLH	Basic helix-loop-helix
BSA	Bovine serum albumin
CBP	CREB binding protein
CO ₂	Dioxyde de carbone
CREB	cAMP responsive element binding protein
DBD	DNA Binding Domain
DMEM	Dulbecco Modified Eagle's Medium
DNTP	déoxynucléotide triphosphate
DO	Densité optique
EDTA	Acide éthylènedinitrilotétraacétique
EGF	Epidermal growth factor
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
EPO	Erythropoïétine
ERK	Extracellular regulated kinase
FRAP	FKBP12-rapamycin associated protein
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfert
Glut-1	Glucose transporter-1
GSK3 β	Glycogène synthase kinase 3 beta
Hepes	Hydroxyethyl piperazine-ethane sulfonic acid
HIF-1	Hypoxia inducible factor-1
HIF-1 α	Hypoxia inducible factor-1 alpha
HIF-PH	HIF-1 α prolyl hydroxylase
HRE	Hypoxia responsive element
HSP	Heat shock protein
Hsp90	Heat shock protein 90
IGF-1	Insulin-like growth factor
ILK	Integrin-Linked Kinase
IRS	Insulin receptor substrate
Kb	Kilobases
kDa	kiloDalton
LB	Luria bertani
MA	milli Ampère
MAP	Microtubule associated protein
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MCS	Site multiple de clonage
MEK	MAP/ERK kinase

NLS	Nuclear localization site
NO	Monoxyde d'azote
Nt	nucléotides
ODD	Oxygen-depedent degradation domain
PAS	Per Ahr/ARNT Sim
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polymeras chain Reaction
PDK	Phosphoinositide-dependent kinase
Pen	Pénicilline
PER	Period
PEST	Proline-Glutamate-Sérine-Thréonine
PFA	Paraformaldéhyde
PH	Pleckstrin homology
PI3K	Phosphatidyl inositol-3 kinase
PIP3	Phosphatidyl inositol-3,4,5-triphosphate
PKA	Protéine kinase A
PKB	Protéine kinase B
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PLB	Passive Lysis Buffer
PTEN	Phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphate phosphatase
pVHL	Protéine de Von Hippel Lindau
Ref-1	Reduction factor-1
Rpm	Rotation par minute
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
SDS-PAGE	Sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
Sim	Single minded
SNAP	S-nitroso-N-acetylpenicillamine
SRC-1	Steroid-Receptor co-activator
Strep	Streptomycine
TAD-C	Transactivation domain C-terminal
TAD-N	Transactivation domain N-terminal
TEMED	N,N,N'-Tétra-méthyl-éthylènediamine
Thr	Thréonine
TIF-2	Transcription Intermediary Factor 2
TRX	Thiorédoxine
UV	Ultra Violet
V	Volt
VEGF	Vascular endothélial growth factor
X-gal	5-bromo,4-chloro,3-indolyl- β -D-galactoside

Tables des matières

INTRODUCTION

1	L'hypoxie	1
1.1	Implication au niveau physiologique	1
1.2	Réponses physiologiques et cellulaires à l'hypoxie	1
1.3	Physiopathologie	1
2	Le facteur de transcription HIF-1	2
2.1	Structure et caractérisation de HIF-1	2
2.2	Régulation de l'activité de HIF-1	3
2.2.1	Stabilité et dégradation de la sous-unité HIF-1 α	3
2.3	Autres régulations	4
2.3.1	Régulation par la voie PI3K/Akt	4
2.3.2	Translocation nucléaire de HIF-1 α	6
2.3.3	Régulation de l'activité transcriptionnelle de HIF-1	7
3	Les kinases	7
3.1	ERK	8
3.2	GSK3 β	9
4	Etude des interactions protéine-protéine	10
4.1	Double hybride en levure	10
4.2	Double hybride en cellules de mammifère	12
4.3	Autres systèmes permettant de détecter une interaction entre deux protéines	13
4.3.1	Co-immunoprécipitation	13
4.3.2	Test de transcription-traduction <i>in vitro</i>	13
4.3.3	Immunofluorescence et FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfert)	14
5	Objectifs du mémoire	15

MATERIEL ET METHODES

1	Aspect moléculaire	16
1.1	Souche bactérienne et plasmides	16
1.1.1	Souche bactérienne	16
1.1.2	Plasmides (Figure II.1)	16
1.2	Transformation bactérienne par choc thermique	17
1.3	Extraction d'ADN plasmidique	17
1.3.1	Mini-préparation d'ADN plasmidique	17
1.3.2	Maxi-préparation d'ADN plasmidique	18
1.4	Restriction d'ADN	19
1.5	Purification d'ADN	19
1.6	Réaction de ligation	20
1.7	Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)	20
1.7.1	Préparation du mélange réactionnel :	21
1.7.2	Programmation des cycles PCR :	21
2	Aspect cellulaire	22
2.1	Culture cellulaire	22
2.1.1	Culture des cellules HepG2	22
2.1.2	Culture des cellules CHO	23
2.2	Transfection	23
2.3	Incubation sous hypoxie	24
2.4	Western blot	24
2.4.1	Lyse des cellules	24
2.4.2	Préparation des échantillons pour le gel d'électrophorèse	25
2.4.3	Electrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS	25
2.4.4	Transfert	26
2.4.5	Traitement de la membrane	27
2.5	Immunofluorescence	28
2.6	Système rapporteur	29
2.7	Dosage de l'activité de la β-Gal	30
2.8	Marquage cytochimique de l'activité β-Gal	30

RESULTATS ET DISCUSSION

1	Mise en évidence du rôle des kinases ERK et GSK3β dans l'activation transcriptionnelle de HIF-1	32
2	Préliminaire : Choix du modèle cellulaire	32
2.1	Mise en évidence de la réponse à l'hypoxie des cellules CHO	33
2.2	Vérification de la fonctionnalité du système double hybride dans les cellules CHO et mise au point de la mesure de l'activité β -Gal	33
2.2.1	Paramètres testés et optimisés	34
2.2.2	Tests d'interaction avec les contrôles positif et négatif	35
2.3	Mise en évidence des interactions par marquage cytochimique de l'activité β -Gal.	36
3	Clonage des protéines d'intérêt	36
3.1	Système Invitrogen	36
3.2	Système Clontech	38
3.2.1	Vérification de la fonctionnalité du kit double hybride Clontech par l'utilisation d'un système rapporteur <i>lacZ</i> (pGAL/LacZ)	38
3.2.2	Stratégie de clonage	39
4	Expression des protéines de fusion GSK3β-GAL4 DNA-BD, ERK-GAL4 DNA-BD, Akt-VP16 AD et HIF-1α-VP16 AD dans les cellules CHO	40
5	Evaluation de l'effet auto-activateur des protéines de fusion GSK3β-GAL4 DNA-BD, ERK-GAL4 DNA-BD et Akt-VP16 AD	41
6	Fonctionnalité du test d'interaction double hybride entre protéines de fusion	41
7	Immunofluorescence	42
	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	43
	BIBLIOGRAPHIE	47

INTRODUCTION

1 L'hypoxie

1.1 Implication au niveau physiologique

Les cellules de mammifère ont besoin d'un apport suffisant en oxygène pour assurer la production d'une quantité suffisante d'énergie et ceci, afin de maintenir les fonctions normales de la cellule et la survie cellulaire.

Pour ce faire, les systèmes respiratoire et circulatoire sont mis en place pendant le développement embryonnaire. Ces systèmes complexes ont pour but de prélever l'oxygène de l'environnement et de le distribuer à toutes les cellules de l'organisme.

Cet oxygène servira de substrat dans les phosphorylations oxydatives de la respiration cellulaire ce qui permettra in fine de synthétiser de l'ATP qui est la source d'énergie indispensable au bon fonctionnement des cellules.

1.2 Réponses physiologiques et cellulaires à l'hypoxie

Des accidents vasculaires tels que la thrombose ou l'athérosclérose peuvent provoquer localement un arrêt ou un ralentissement de la circulation sanguine.

Dans ces conditions ischémiques (qui représentent l'une des causes principale de décès aux Etats-Unis), des mécanismes physiologiques et cellulaires sont mis en place pour répondre à l'hypoxie (Chun *et al.*, 2002) :

- Au niveau physiologique :
 - Hyperventilation
 - Augmentation du nombre de globules rouges
 - Formation de nouveaux vaisseaux sanguins.

- Au niveau cellulaire :
 - Passage de la phosphorylation oxydative à la glycolyse anaérobique pour la production d'ATP.
 - Augmentation de l'apport du glucose.

Dans le cadre de cette adaptation bénéfique, un facteur de transcription spécifique (HIF-1 : Hypoxia Inducible Factor-1) est activé.

En condition d'hypoxie, HIF-1 active la transcription des gènes encodant le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) (qui promeut l'angiogenèse) ; des transporteurs de glucose et des enzymes glycolytiques nécessaires pour la production d'ATP en l'absence d'oxygène ; l'EPO (érythropoïétine, hormone stimulant la production de globules rouges); l'Insulin like growth factor 2 (facteur de croissance qui inhibe l'apoptose induite par l'ischémie) ;...

Toutes ces protéines participent aux réponses adaptatives de l'organisme et des cellules au manque d'oxygène.

1.3 Physiopathologie

Cependant, HIF-1 n'apporte pas que des effets bénéfiques ; en effet, celui-ci participe également à la croissance tumorale.

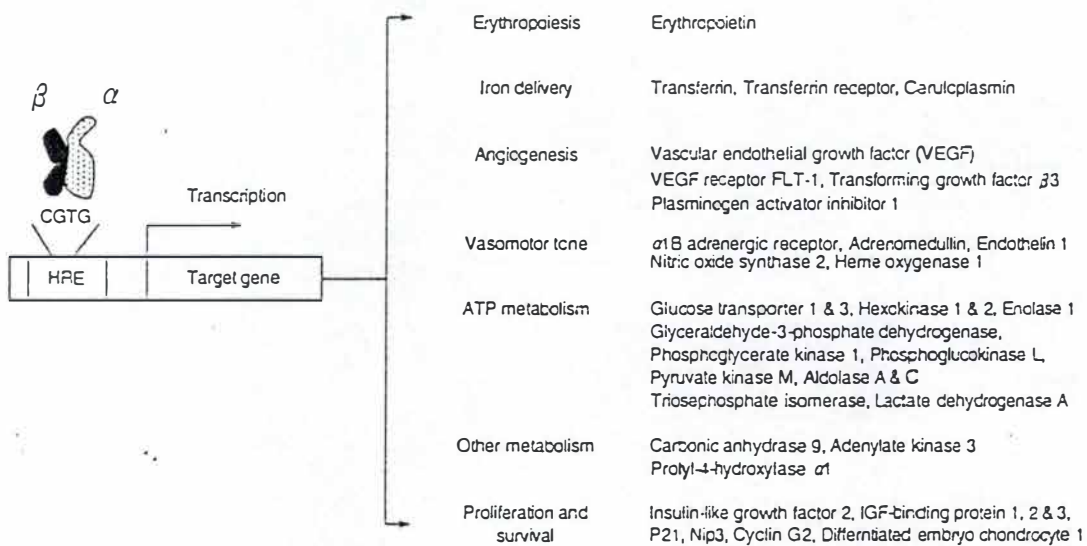


Figure L.1 : Principaux gènes induits et activés par HIF-1 et leurs fonctions (d'après Chun et al. 2002).

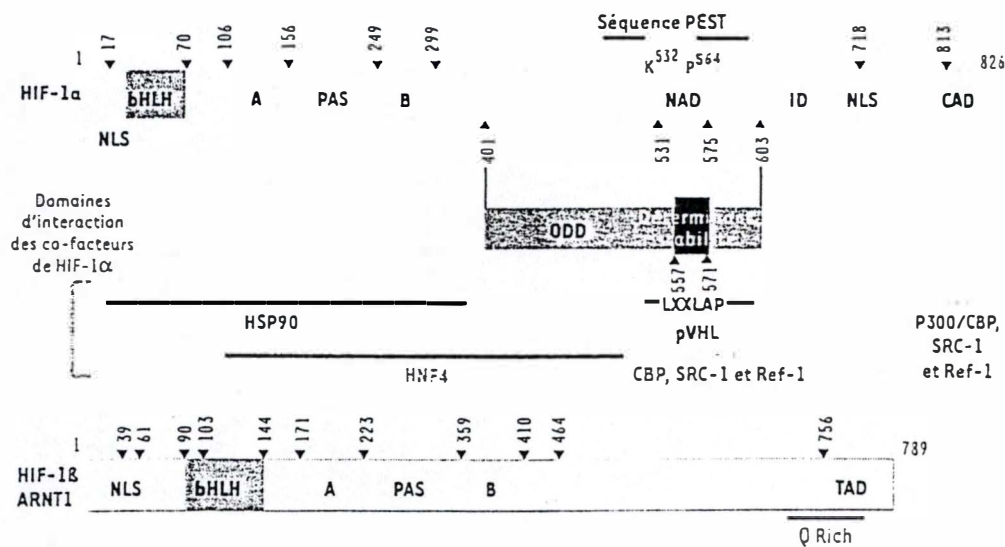


Figure I.2 : Structure des sous-unités du facteur de transmission HIF-1

Représentation des domaines fonctionnels des deux sous-unités de HIF-1 et des domaines d'interaction des co-facteurs de la sous-unité HIF-1α (d'après Gothié et Pouysségur, 2002).

ODD : Oxygen Dependent Degradation

LXXLAP : Motif conservé de *C. elegans* à l'homme, et reconnu par la HIF-proline hydroxylase.

pVHL : protéine de Von Hippel Lindau

PAS : motif Per, ARNT, Sim

NAD et CAD: domaines de transactivation N-et C-terminal

NLS : séquence de localisation nucléaire

HSP90 : Heat shock protein 90

Lorsqu'une tumeur croît et atteint plus d'un millimètre cube de volume, les cellules du centre de la tumeur ne reçoivent plus d'oxygène : elles sont au-delà de la limite de diffusion de ce gaz à partir des capillaires voisins. Ces cellules subissent donc une hypoxie et le facteur de transcription HIF-1 est alors activé. HIF-1 activé induit la transcription des gènes encodant le VEGF ainsi que les enzymes glycolytiques et le transporteur du glucose GLUT-1 (voir figure I.1)). Le passage à l'activité glycolytique permet aux cellules de survivre aux conditions hypoxiques du centre de la tumeur alors que le VEGF promeut l'angiogenèse.

La formation de nouveaux vaisseaux sanguins va permettre d'irriguer la tumeur et ainsi permettre la prolifération des cellules tumorales et la formation des métastases.

Finalement, les cellules tumorales inversent la balance pro-apoptotique contre anti-apoptotique afin de promouvoir leur survie dans de mauvaises conditions environnementales. Il semblerait que HIF-1 soit également impliqué dans ce processus.

L'hypoxie intratumorale et les altérations génétiques affectant les gènes suppresseurs de tumeurs sont donc capables de modifier la régulation des voies de transduction du signal résultant en l'activation de HIF-1. On observe ainsi une surexpression de HIF-1 α dans la plupart des cancers humains (Semanza *et al.*, 2002).

2 Le facteur de transcription HIF-1

2.1 Structure et caractérisation de HIF-1

L'hypoxie est capable d'augmenter l'expression de l'érythropoïétine (EPO), une hormone glycoprotéique synthétisée au niveau du foie et des reins et envoyée par voie sanguine jusqu'à la moelle osseuse où elle stimule les précurseurs des globules rouges qui vont proliférer et se différencier en érythrocytes (Gothié et Pouysségur, 2002). Ce processus permet d'augmenter le nombre de globules rouges et donc le potentiel de captage et de transport de l'oxygène.

L'étude du promoteur de l'EPO a permis de mettre en évidence la séquence enhancer HRE (Hypoxia Responsive Element) qui est sensible à l'hypoxie et sur laquelle vient se fixer le facteur de transcription HIF-1 en hypoxie. Ces études ont conduit à l'identification de ce facteur (Wang et Semenza, 1995).

HIF-1 est un hétérodimère composé de deux sous-unités (voir figure I.2) :

- HIF-1 α (826 aa) : qui est spécifique de la réponse hypoxique.
- HIF-1 β ou ARNT (789 aa) : qui est exprimé de manière constitutive dans le noyau des cellules.

Ces deux sous-unités sont constituées dans la partie N-terminale de domaines :

- -bHLH (basic Helix Loop Helix) (a.a.17 à 71): le domaine basique intervient dans la fixation et la spécificité de la protéine à l'ADN tandis que le domaine HLH intervient dans la dimérisation des deux sous-unités.
- -PAS (Per, ARNT, Sim) (a. a. 76 à 343) : constitue un second motif de dimérisation et permet également l'interaction et l'association avec d'autres protéines impliquées dans la régulation de HIF-1 α comme la protéine chaperone Hsp90 (Minet *et al.*, 1999).

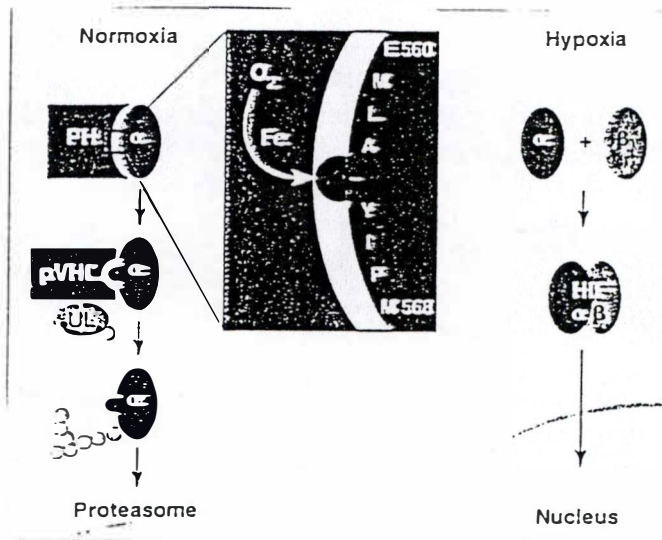


Figure I.3 : Représentation schématique de la régulation dépendante de l'oxygène du facteur de transcription HIF-1 (d'après Zhu et Bunn, 2001).

Lorsque la teneur en O₂ dans la cellule atteint un niveau critique, la sous-unité HIF-1 α est modifiée par la prolyl hydroxylase (PH) qui hydroxyle, suivant un processus dépendant du fer, une proline dans le domaine ODD de HIF-1 α . Cette modification permet la liaison de pVHL à HIF-1 α qui médie l'assemblage d'un complexe (UL) et qui active l'E3 ubiquitine ligase.

L'ubiquitinylation de HIF-1 α engendre sa dégradation par le protéasome.

En hypoxie, la proline n'est pas hydroxylée et donc HIF-1 α échappe à la dégradation.

La partie C-terminale est quant à elle constituée de deux domaines de transactivation (TAD-C/N) allant respectivement des a.a. 531 à 575 et 786 à 826 (Wang *et al.*, 1995). Ces deux domaines sont séparés par un domaine d'inhibition appelé Inhibitory Domain (ID) (Jiang *et al.*, 1997) qui est impliqué dans l'inactivation des deux domaines de transactivation TAD-N/C en normoxie.

Deux sites de localisation nucléaire NLS (Nuclear Localization Signal) ont été identifiés. Ils sont localisés respectivement sur les parties N-terminale (a.a. 17 à 74) et C-terminale (a.a. 718 à 721). Ce dernier qui joue un rôle critique dans l'import nucléaire de HIF-1 α induit par l'hypoxie.

Huang et son équipe (1998) ont aussi mis en évidence un domaine ODD (Oxygen-dependant Degradation Domain) qui régule un processus de dégradation de HIF-1 α dépendant de l'oxygène. Ce domaine ODD est localisé au niveau des résidus 401 et 603 de la protéine.

2.2 Régulation de l'activité de HIF-1

2.2.1 Stabilité et dégradation de la sous-unité HIF-1 α

La régulation de la sous-unité HIF-1 α est fortement dépendante de la concentration en oxygène.

En condition de normoxie, c'est-à-dire lorsque la teneur en oxygène est suffisante, la protéine HPH (HIF-1 α Prolyl Hydroxylase) est capable d'hydroxyler les résidus prolines en position 402 et 564 se situant dans le domaine ODD de HIF-1 α (Salceda et Caro., 1997). Cette hydroxylation est réalisée en utilisant comme substrat l'oxygène moléculaire et comme co-facteur le fer (Zhu et Bunn, 2001). Cette réaction génère comme sous-produit du dioxyde de carbone et du succinate.

Ce groupement hydroxyle sur HIF-1 α est alors reconnu par la protéine suppresseur de tumeur pVHL (von Hippel Lindau tumor suppressor protein) qui se fixe via son domaine β au domaine ODD hydroxylé de HIF-1 α .

Le complexe pVHL et E3 Ubiquitine ligase provoque alors l'ubiquitinylation de HIF-1 α et cible la dégradation de celui-ci par le protéasome (Jaakkola *et al.*, 2001).

Ce processus de dégradation explique le fait que HIF-1 α est une protéine extrêmement instable en normoxie : elle a un temps de demi-vie de l'ordre de 10 minutes dans ces conditions.

Comme l'activation de la HPH dépend de la concentration en fer et en oxygène, la déplétion de l'oxygène en hypoxie limite l'hydroxylation des prolines sur HIF-1 α empêchant ainsi la dégradation de cette sous-unité. HIF-1 α s'accumule alors en hypoxie (Maxwell *et al.*, 2002) (figure I.3).

Comme deuxième signal, Semenza *et al.* (2002) ont démontré que la protéine pVHL était capable de recruter des histones déacétylases en normoxie ; celles-ci interviennent dans la répression de la transactivation.

Enfin, le troisième signal dépendant de l'oxygène et intervenant dans la régulation de l'activité de HIF-1 α est l'hydroxylation en normoxie de l' asparagine (Asn) en position 803 de la sous-unité HIF-1 α au niveau du domaine de transactivation C-terminal. Cette hydroxylation est réalisée par une asparagine hydroxylase dont l'activité est également

dépendante de l'oxygène. Cette hydroxylation inhibe l'interaction entre HIF-1 α et le coactivateur p300 qui est normalement nécessaire à l'activité transcriptionnelle de HIF-1. En hypoxie, cette modification n'a plus lieu et HIF-1 α peut alors interagir avec p300.

Il est à remarquer qu'il existe d'autres mécanismes par lesquels HIF-1 peut être activé mais qui sont indépendants de l'oxygène. (voir point 2.3)

***Métaux de transition :** Des métaux tels que le nickel ou le cobalt sont capables de stabiliser la sous-unité HIF-1 α en normoxie, induisant alors l'expression de gènes cibles de HIF-1. Ces ions sont capables de substituer l'atome de fer au niveau du groupement hème de la protéine senseur d'oxygène (prolyl hydroxylase), emprisonnant ainsi la protéine dans un état dé-oxygéné. La protéine HPH inactivée n'est alors plus capable d'hydroxyler HIF-1 α et celle-ci n'est donc plus reconnue par pVHL et n'est plus dégradée par le protéasome.

Par ailleurs, il faut noter que le monoxyde de carbone, par liaison à l'hème, supprime à la fois l'accumulation de HIF-1 α en hypoxie et la production d'EPO car il bloque l'hème dans la forme oxydée.

***Oxyde nitrique :** L'hypoxie stimule la production d'oxyde nitrique (NO) à travers l'induction de la NOS (NO synthase). Réciproquement, le NO affecte l'induction médiée par HIF-1 des gènes induits par l'hypoxie tels que ceux encodant l'érythropoïétine et le VEGF. Cependant, les effets de l'oxyde nitrique sur l'expression de HIF-1 α sont biphasiques et peuvent dépendre de la structure chimique et de la concentration du donneur de NO utilisé.

Le NO à une concentration relativement haute réduit la capacité (en condition d'hypoxie) de liaison à l'ADN de HIF-1. Ainsi, l'oxyde nitrique à des concentrations relativement élevées (plus de 0,5 mM) diminuerait l'activité transcriptionnelle de HIF-1.

Le monoxyde de carbone qui a la capacité de bloquer l'induction des gènes médiés par l'hypoxie, a montré des effets similaires sur HIF-1.

Plus tard, il a été montré que le NO sous différentes conditions peut induire l'accumulation de HIF-1 α dans des conditions de normoxie.

Actuellement, on ne sait pas encore pourquoi le NO montre ces effets antinomiques (stimulation ou inhibition) sur HIF-1 α , bien que ces effets dépendent certainement de la présence ou de l'absence de l'oxygène.

Des hypothèses suggèrent que les effets du NO pourraient être déterminés directement par la concentration en NO. En effet, Kamura *et al.* (2000) ont montré que le SNAP (S-nitroso-N-acetylpénicillamine), un donneur de NO, stimule l'activité de HIF-1 dans des conditions de normoxie à des concentrations inférieures à 0,5 mM, mais que cela inhibe l'activité de HIF-1 dans des conditions à la fois de normoxie et d'hypoxie à des concentrations supérieures à 0,5 mM.

2.3 Autres régulations

2.3.1 Régulation par la voie PI3K/Akt

La voie de transduction du signal aboutissant à l'activation du facteur de transcription HIF-1 est un processus nécessitant la stabilisation de la sous-unité HIF-1 α mais aussi une régulation rédox, des phosphorylations médiées par différentes kinases dont celle de la famille des MAPKinases (Mitogen Activated Protein Kinase) et l'interaction avec la protéine chaperone Hsp90 et des coactivateurs transcriptionnels.

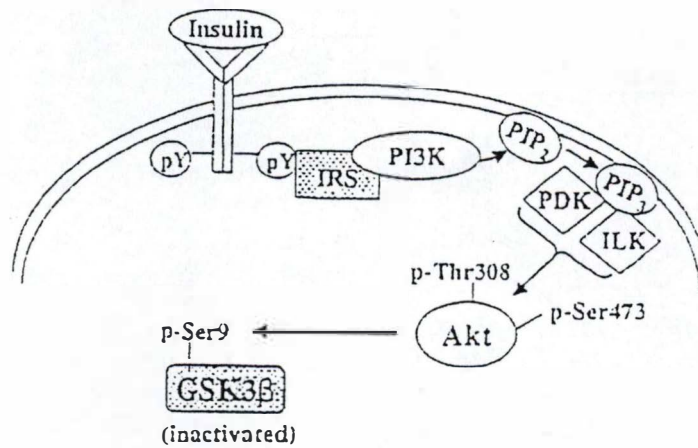


Figure I.4: Représentation schématisant la voie de transduction du signal PI3K ou MAPK régulée par des facteurs de croissance et l'oxygène ainsi que son influence sur l'expression et l'activité transcriptionnelle de la protéine HIF-1 α .

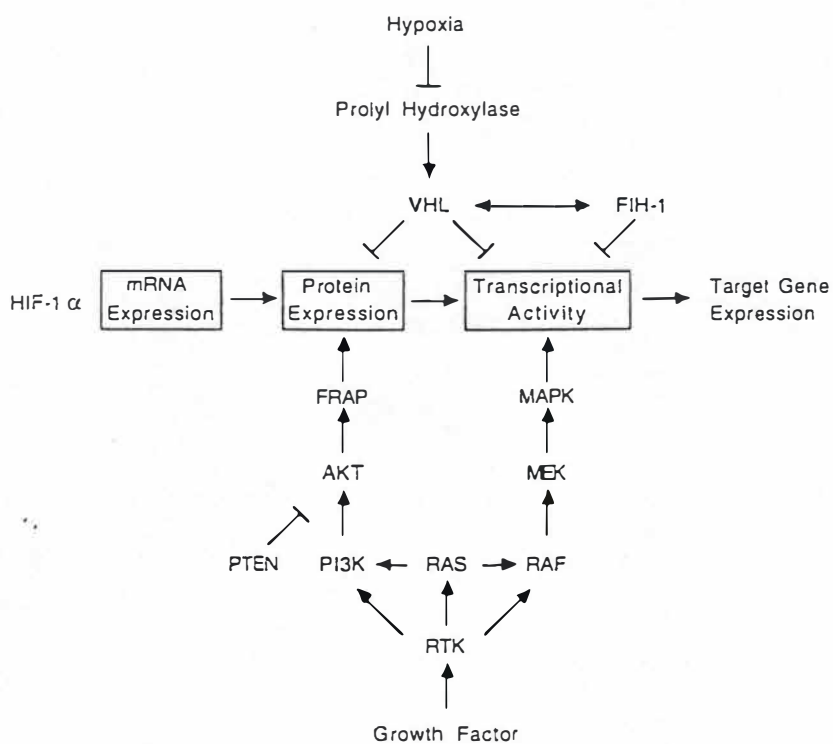


Figure I.5 : Schéma représentant la voie de transduction du signal du récepteur à l'insuline menant à l'inactivation de la GSK3 β . L'inactivation de la voie PI3K/AKT induit l'inhibition de la GSK3 β via une phosphorylation sur la ser-9 (Grimes et Jope, 2001) .

La première preuve indiquant que HIF-1 α était une phosphoprotéine a été montrée par Wang et Semenza (2002) utilisant un EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) où ils montraient que lorsque des extraits nucléaires de cellules Hep3B mises en hypoxie étaient traités avec une phosphatase, ils observaient une disruption du complexe HIF-1/ADN. De plus, de nombreux inhibiteurs ont montré que aussi bien la phosphorylation que la déphosphorylation pouvaient être impliquées dans l'activation de HIF-1.

Plusieurs kinases sont soupçonnées d'être activées en hypoxie et donc d'être des candidats pour réguler l'activité de HIF-1. Parmi celles-ci, on retrouve des membres de la famille des MAPK et la PI3K (Figure I.4).

Il a été démontré que les voies de transduction du signal menant à la stabilisation de HIF 1 α et à l'activation transcriptionnelle de HIF-1 étaient dépendantes de l'oxygène mais qu'elles pouvaient aussi être régulées par des facteurs de croissance en conditions de normoxie.

S'il est vrai que HIF-1 α est induit par l'hypoxie dans tous les types cellulaires, l'activation de HIF-1 par ces facteurs de croissance est par contre dépendante du type cellulaire et/ou spécifique du stimulus (Semenza *et al.*, 2002).

La stimulation des cellules par une variété de facteurs de croissance et de cytokines, comme l'EGF (Epidermal Growth Factor), l'insuline, l'interleukine-1 β ...induit l'expression de la protéine HIF-1 α . La liaison de ces ligands à leur récepteur tyrosine kinase active une variété de voies de transduction du signal dont celle incluant la PI3K, la sérine-thréonine protéine kinase Akt (Protéine kinase B) et FRAP (FKBP12-rapamycin associated protein).

Akt ou PKB est une sérine/thréonine kinase cytosolique qui joue un rôle important dans la survie cellulaire dans certaines conditions (pour une revue, Datta *et al.*, 1999). Akt possède au niveau de sa partie amino-terminale un domaine PH (Pleckstrin Homology) qui peut reconnaître des lipides phosphorylés (ex : PIP3) (Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate) et médier des interactions lipide/protéine et/ou protéine/protéine (Snezana et Driscoll, 2002).

La PI3K (Phosphatidylinositol-3 kinase) activée catalyse la formation de PIP3 ; induisant la translocation de Akt du cytosol vers le feuillet interne de la membrane plasmique pour se lier via son domaine PH aux PIP3.

Cette translocation provoque chez Akt une modification de conformation, permettant sa phosphorylation au niveau de la sérine 473 et la thréonine 308 par la PDK (Phosphoinositide-Dependant Kinase). Ce PIP3 activera de manière allostérique la PDK (Phosphoinositide-Dependant Kinase) qui phosphorylera à l'aide d'autres kinases comme l'ILK (Integrin-Linked Kinase) Akt au niveau de la sérine 473 (dans le domaine de régulation) et la thréonine 308 (dans le domaine catalytique), provoquant son activation. Cette phosphorylation provoque l'activation de cette kinase qui peut alors phosphoryler d'autres protéines régulatrices comme la sérine/thréonine kinase GSK3 (α et β respectivement sur la sérine 21 et sur la sérine 9) (Glycogene Synthase Kinase 3) (voir figure I.5).

La PI3K (Phosphatidyl Inositol 3 Kinase) est donc une des kinases qui pourrait être impliquée dans la régulation de HIF-1. Un des arguments indiquant que la PI3K est une kinase impliquée dans la régulation de HIF-1 est l'effet de la wortmanine (un inhibiteur de cette kinase). La wortmanine est capable d'inhiber l'augmentation de la transcription du gène du VEGF en hypoxie (Mazure *et al.*, 1997).

De plus Zhong *et al.* (2000) ont montré par Western blot que l'inactivation de la PI3K est capable d'inhiber la stabilisation de la sous-unité HIF-1 α dans les cellules Hep3B en hypoxie. Il a été également montré que l'utilisation de mutants dominants négatifs pour la PI3K ou pour la kinase Akt inhibe la surexpression du VEGF induite par l'hypoxie.

Ces différents résultats laisseraient donc penser que la voie PI3Kinase/Akt serait impliquée dans la stabilisation de la sous-unité HIF-1 α en hypoxie.

PTEN (Phosphatidylinositol 3, 4,5 triphosphate phosphatase) est un gène suppresseur de tumeur encodant une phosphatase est exprimé de manière constitutive dans la cellule et est capable de déphosphoryler les produits de la PI3K. Quand l'activité et/ou l'expression de PTEN est augmentée, Akt n'est plus phosphorylée et ne peut donc plus jouer son rôle dans la stabilisation de la protéine HIF-1 α et inversement. Ainsi, Zundel *et al.* (2000) ont montré que la surexpression de PTEN recombinant dans des cellules de gliome avait comme effet une très forte diminution de l'expression de HIF-1 α .

Par contre, la perte de fonction de PTEN est associée à l'angiogenèse et à la progression des tumeurs dans les gliomes et les cancers de la prostate puisque la voie PI3K/Akt/FRAP n'est pas inhibée et permet ainsi l'expression de la protéine HIF-1 (Semenza *et al.*, 2002)(Voir figure I.4). Ceci montre donc bien qu'en régulant négativement la voie PI3K/Akt/FRAP, on inhibe HIF-1.

Les mécanismes assurant la régulation (activation/dégradation) de la voie PI3K par l'hypoxie restent encore mal connus. Mottet *et al.*(sous presse) ont montré que la voie PI3K/Akt est constitutivement active dans les cellules HepG2 en normoxie. Akt serait probablement activée par l'insuline et/ou des facteurs de croissance présents dans le milieu de culture.

On sait qu'en normoxie, la sous-unité HIF-1 α est dégradée par le système ubiquitine-protéasome. En hypoxie, la dégradation de HIF-1 α serait inhibée par la voie PI3K/Akt en conjonction avec l'inhibition de la HPH par le manque d'oxygène. Une hypothèse concernant le mécanisme par lequel Akt activerait HIF-1 serait que la voie PI3K/Akt active maintiendrait la phosphorylation sur la sérine 9 de la GSK3 β , la rendant inactive. En effet, la GSK3 β active déstabiliserait HIF-1 α (voir point 3.2).

2.3.2 Translocation nucléaire de HIF-1 α

Afin de déterminer quel était le mécanisme qui permettait à la sous-unité HIF-1 α d'être transloquée dans le noyau en condition d'hypoxie, les chercheurs se sont penchés sur les mécanismes de translocation nucléaire du récepteur Ahr (Aryl hydrocarbon receptor) qui, comme HIF-1 α , est un partenaire de la sous-unité ARNT.

Les premières découvertes ont été réalisées par Whitelaw et son équipe (1993) qui ont observé qu'en l'absence de ligand, Ahr se trouve dans le cytoplasme associé à la protéine chaperone Hsp90 (Heat Shock Protein de 90 kDa). En présence de ligand, par contre, la sous-unité Ahr est "libérée" de Hsp90, démasquant ainsi les sites de dimérisation et de translocation nucléaire qui permettent alors à Ahr d'être transloqué dans le noyau et de s'y associer avec ARNT.

Des recherches similaires ont été menées par Minet *et al.* (1999) qui ont montré que la protéine chaperone Hsp90 jouait également un rôle déterminant dans ce processus de translocation nucléaire pour HIF-1 α . En normoxie, Hsp90 est associée à HIF-1 α via les domaines HLH-PAS et le complexe se trouve dans le cytosol. L'association entre ces deux protéines provoquerait une modification conformationnelle de HIF-1 α , empêchant les importines d'interagir avec le site de translocation nucléaire situé dans la partie C-terminale.

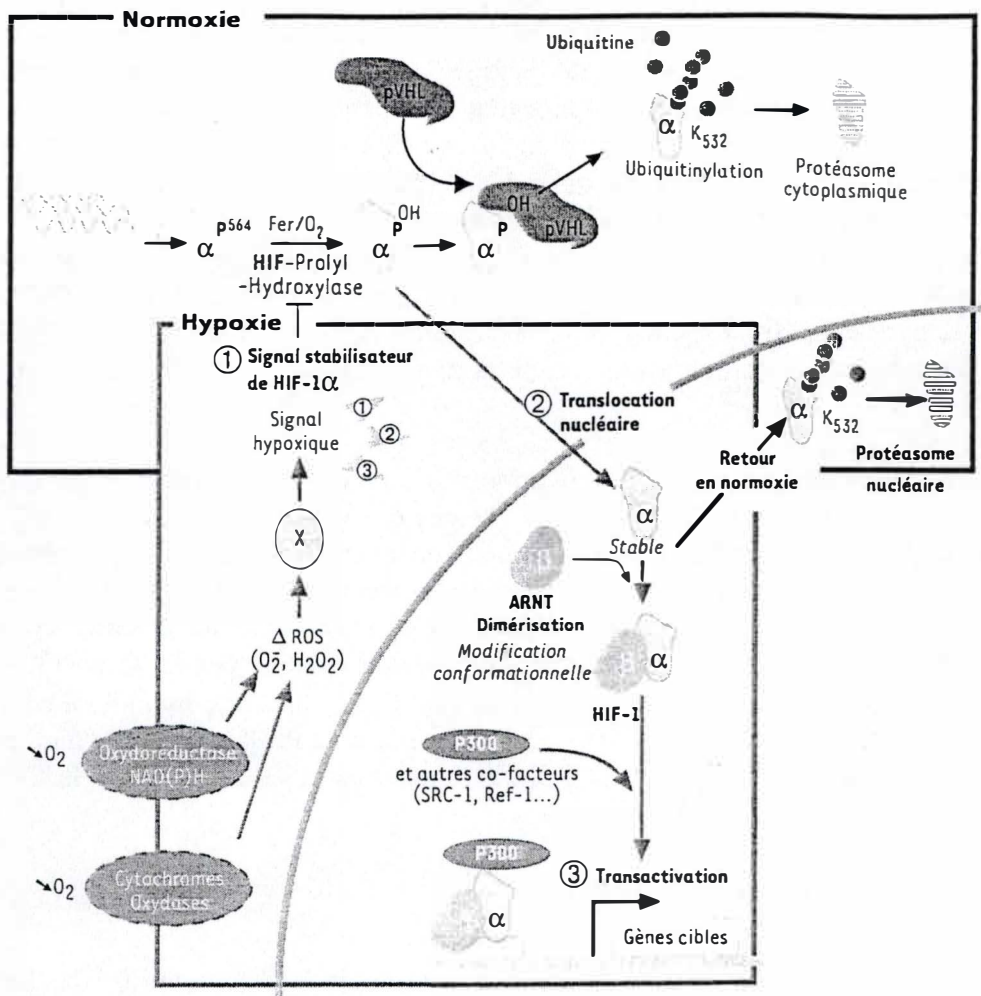


Figure I.6 : Représentation schématique de la régulation de l'activité de HIF-1.

En normoxie, HIF-1 α est ubiquitinyllé puis dégradé par le protéasome. Cette ubiquitinyllation résulte de l'interaction entre HIF-1 α et pVHL suite à l'hydroxylation d'un résidu proline sur HIF-1 α . En hypoxie, HIF-1 α n'est plus hydroxylé, ne fixe plus pVHL et donc n'est plus dégradé et s'accumule (Gothié et Pouyssegur, 2002).

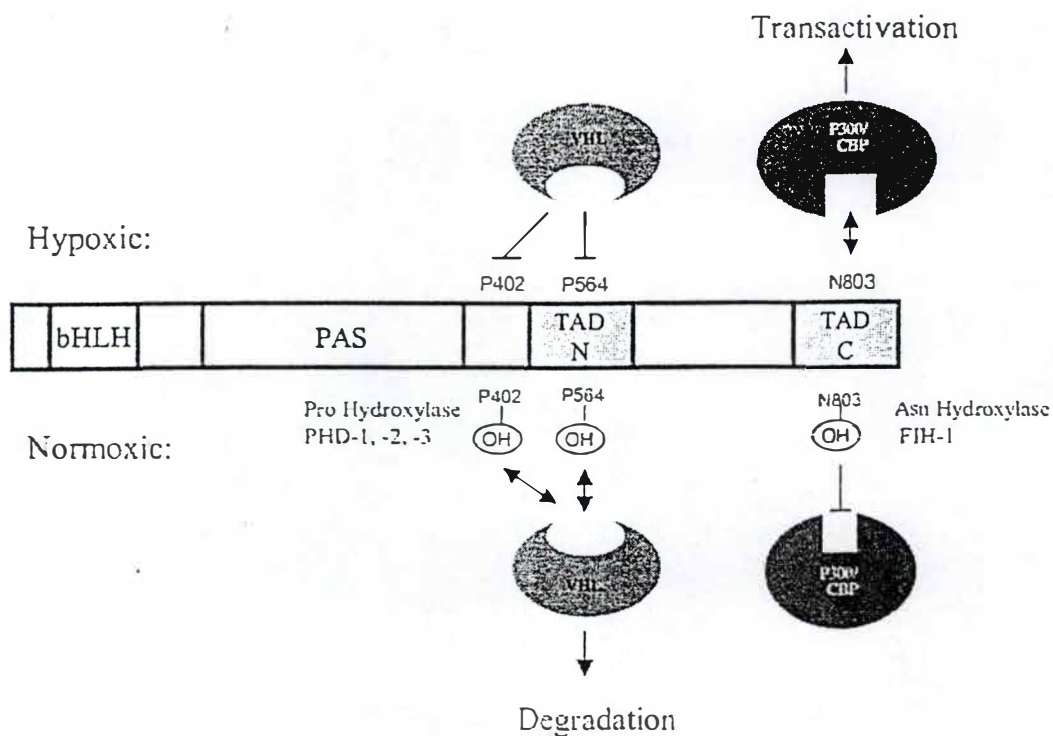


Figure I.7 : Représentation schématique de la sous-unité HIF-1 α cartographiant les différents domaines fonctionnels et les domaines d'interaction connus de HIF-1 α avec d'autres protéines (Semenza, 2002).

bHLH : basic Helix-Loop-Helix

CBP : CREB binding protein

PAS: Per Ahr/ARNT Sim

pVHL: protéine de Von Hippel Lindau

TAD-C: Transactivation Domain C-Terminal

TAD-N: Transactivation Domain N-Terminal

En hypoxie, une phosphorylation ou un autre mécanisme encore inconnu dissocierait Hsp90 de HIF-1 α , rendant ainsi le site NLS accessible aux protéines intervenant dans la translocation vers le noyau et permettant ainsi à HIF-1 α de migrer dans le noyau (figure I.6).

2.3.3 Régulation de l'activité transcriptionnelle de HIF-1

Afin de former un facteur de transcription actif, HIF-1 α transloqué dans le noyau dimérise avec ARNT et doit encore subir quelques modifications pour permettre son interaction avec des co-activateurs transcriptionnels comme CBP/p300 (CREB Binding Protein).

CBP et p300

Des co-activateurs tels que CBP/p300 sont capables d'interagir avec le domaine transactivateur C-terminal (TAD-C) de HIF-1 α .

Les co-activateurs transcriptionnels participent d'une part au recrutement de la machinerie basale de transcription et d'autre part, ils possèdent une activité histone acétyltransférase qui permet de modifier la superstructure de l'ADN pour favoriser la transcription.

L'interaction de p300 avec HIF-1 α est régulée par deux processus. D'une part, la réduction d'un groupement sulfhydryl d'un résidu cystéine localisé dans le domaine C-terminal de HIF-1 α est nécessaire (Ema *et al.*, 1999). Cette régulation redox fait intervenir deux protéines dont l'activité est régulée par le potentiel redox, à savoir TRX (thiorédoxine) et Ref-1 (Reduction factor-1).

D'autre part, comme nous l'avons mentionné précédemment ; en normoxie, l'asparagine en position 803 de HIF-1 α (au niveau du domaine de transactivation) se fait hydroxyler par une asparagine hydroxylase. Cette hydroxylation inhibe l'interaction entre HIF-1 α et le co-activateur p300 qui est normalement nécessaire à l'activité transcriptionnelle. En hypoxie, l'asparagine hydroxylase qui a une activité dépendante de l'oxygène ne peut donc plus hydroxyler l'Asn 803 et l'interaction avec p300 peut alors avoir lieu (Figure I.7).

D'autres protéines peuvent comme CBP/p300 servir de coactivateur pour HIF-1. Il s'agit des protéines TIF2 (Transcription Intermediary Factor 2) et SRC-1 (Steroid-Receptor co-activator).

En conclusion, la régulation de l'activité de HIF-1 par l'hypoxie nécessite plusieurs étapes faisant intervenir de nombreux acteurs (Figure I.6).

La séquence de ces processus et l'identité de ces différents acteurs ne sont cependant pas encore bien compris.

3 Les kinases

Deux kinases sont potentiellement susceptibles de phosphoryler directement HIF-1 α .

Il s'agit des kinases ERK1/2 et de la GSK3 β . Dans la suite de ce chapitre, nous allons présenter brièvement ces deux familles et les arguments qui laissent penser que ces kinases sont des acteurs importants de la régulation de l'activité de HIF-1.

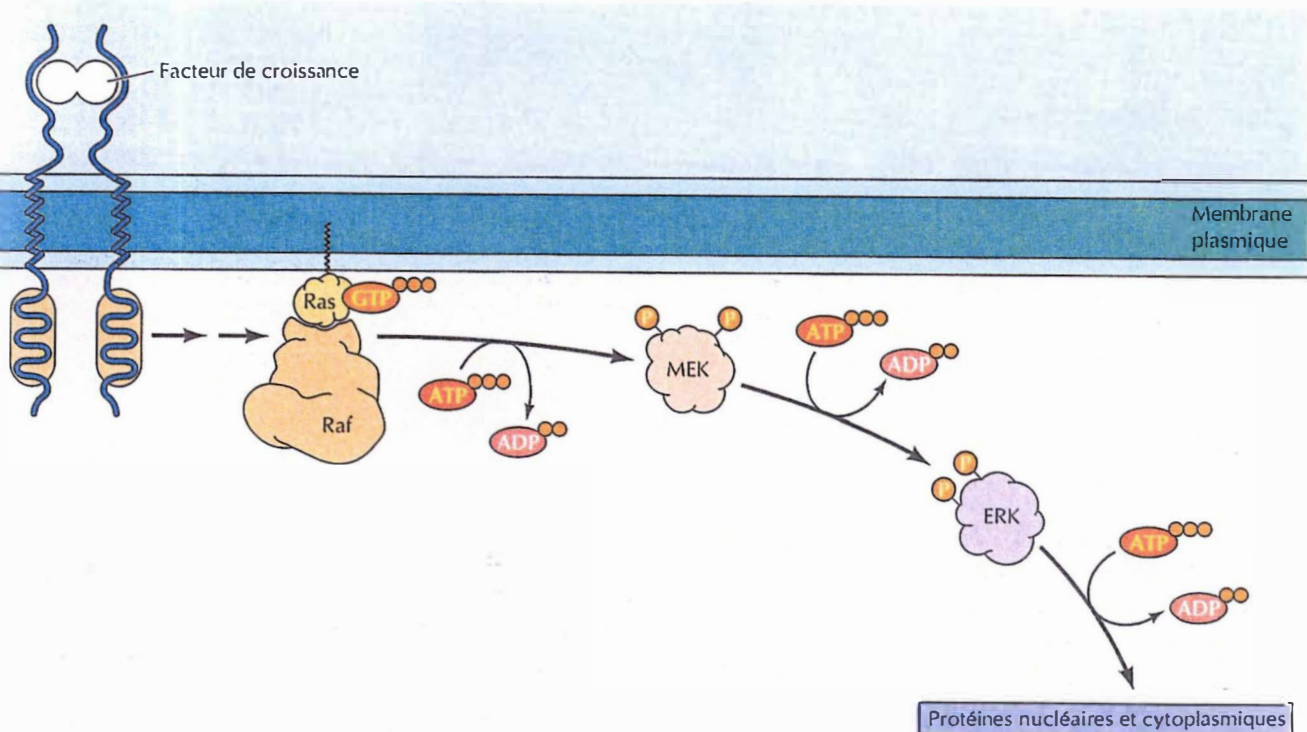


Figure I.8 : Schéma représentant la voie de transduction du signal aboutissant à l'activation des MAP kinases ERK (Geoffrey M. Cooper, La cellule, une approche moléculaire, 1998, De boeck University, p.545) .

La stimulation des récepteurs de facteur de croissance active Ras, qui entre en interaction avec la protéine kinase Raf. Celle-ci phosphoryle et donc active MEK qui phosphoryle les résidus Thr-183 et Tyr-185, provoquant l'activation de ERK. ERK va ensuite phosphoryler toute une série de protéines cibles cytoplasmiques et nucléaires.

3.1 ERK

Les ERK (extracellular signal regulated kinase) sont des kinases appartenant à la famille des MAPKinases et qui sont des régulateurs ubiquitaires de la prolifération et de la différenciation cellulaires. En effet, ces MAP-kinases catalysent la phosphorylation des MAP (Mitogen activated proteins) dont l'activation est essentielle à l'initiation du cycle cellulaire.

Les variétés les mieux connues de MAPkinase dans les cellules mammaliennes appartiennent à la famille ERK.

L'activation de ERK joue un rôle clef dans l'enclenchement de la prolifération induite par des facteurs de croissance agissant via une protéine-tyrosine kinase ou via un récepteur couplé à une protéine G. La voie ERK est mise en marche par le truchement de deux protéines kinases amont, couplées aux récepteurs de facteur de croissance par une protéine de fixation de GTP appelée Ras. L'activation de Ras entraîne celle de la protéine-sérine/thréonine kinase Raf, qui active, en la phosphorylant, une autre protéine kinase appelée MEK (MAP kinase/ ERK kinase). MEK est une protéine kinase bivalente qui active les membres de la famille ERK en y phosphorylant aussi bien des résidus thréonine que tyrosine, séparés par un seul résidu. Sous forme phosphorylée, ERK phosphoryle plusieurs cibles, parmi lesquelles d'autres protéines kinases et certains facteurs de transcription (Figure I.8).

Des résultats récents indiquent que la phosphorylation de HIF-1 α à travers la voie ERK MAPKinases semble être nécessaire pour l'activation de l'activité transcriptionnelle de HIF-1 en hypoxie mais n'est pas requise pour sa stabilisation de la sous-unité HIF-1 α .

L'hypoxie est capable d'activer les kinases ERK1 et ERK2. En effet, des analyses en Western blot utilisant des anticorps antiphospho-ERK ont montré une augmentation de la phosphorylation de ERK1 et de ERK2 en hypoxie dans les cellules endothéliales (Minet *et al.*, 2000).

De plus, par immunofluorescence, il a été remarqué que ERK1 et ERK2 transloquaient bien toutes les deux dans le noyau des cellules incubées sous hypoxie.

S'il a été prouvé que les ERK ne sont pas impliquées dans la stabilisation de HIF-1 α ni dans la régulation de l'activité de liaison à l'ADN en hypoxie, les résultats montrent que le domaine carboxy-terminal de HIF-1 α peut être directement phosphorylé par ERK1. De plus, l'utilisation de mutants dominants négatifs de ERK1 et ERK2 transfectés dans des cellules HMEC-1 placées en normoxie et en hypoxie induit une inhibition complète de l'activité transcriptionnelle de HIF-1 en présence du dominant négatif de ERK1 contrairement à celui de ERK2.

Ceci suggère que ERK1 en phosphorylant directement HIF-1 α augmente l'activité transcriptionnelle de HIF-1.

Mottet *et al.*, (2002) ont montré que les ERK sont également essentielles pour l'activation de HIF-1 en hypoxie dans les cellules HepG2 et que cette kinase peut être activée par un signal dépendant de la calmoduline/calcium dans ces conditions hypoxiques. En effet, ils ont remarqué qu'un mutant dominant négatif de la calmoduline ; le W7, un antagoniste de la calmoduline ainsi que le BAPTA, un chélateur de calcium intracellulaire, diminuent l'activité de HIF-1 induite par l'hypoxie ainsi que la phosphorylation de ERK.

Ceci laisse donc penser que ERK1 est un régulateur majeur de l'activation de HIF-1 en hypoxie et que celle-ci pourrait être activée en hypoxie par une voie dépendante du calcium et de la calmoduline.

3.2 GSK3 β

La GSK3 (Glycogen Synthase Kinase) est une enzyme impliquée dans la prolifération, la différenciation, le développement et l'apoptose (pour une revue, Grime et Jope, 2001).

La GSK3 existe sous deux formes homologues : GSK3 α et la GSK3 β (Woodget, 1999) ; celles-ci possèdent 97% de similarité de séquence dans leur domaine catalytique.

Afin d'activer la GSK3 β , une phosphorylation de la tyrosine 216 est nécessaire ; le mécanisme aboutissant à cette phosphorylation viendrait d'une autophosphorylation (Shaw *et al.*, 1997).

Un autre mécanisme permet l'activation de la GSK3 β par liaison de celle-ci aux membres de la famille des axines. Il a aussi été remarqué que l'état de phosphorylation sur la tyrosine 216 était augmenté suivant une élévation de la concentration en calcium intracellulaire et suite à certains stimuli proapoptotiques.

Il existe aussi d'autres sites de phosphorylation sur la GSK3 β comme par exemple la sérine en position 9 mais cette phosphorylation a comme effet une diminution de son activité (Plyte *et al.*, 1992). Différentes kinases couplées à un processus de signaling dépendant d'un récepteur sont capables d'inhiber la GSK3 β . L'un de ces mécanismes est celui de l'insuline : la liaison de l'insuline à son récepteur provoque la dimérisation de celui-ci ; ensuite ces récepteurs se phosphorylent l'un l'autre sur des résidus tyrosines. Les récepteurs activés provoquent ensuite la phosphorylation de la protéine IRS (Insulin Receptor Substrate) qui, une fois phosphorylée, peut être reconnue par le domaine SH2 de la PI3K qui est alors activée et peut catalyser la formation de PIP3. (comme nous l'avons mentionné plus tôt, cette voie conduit à la phosphorylation d'Akt.

Akt activée peut alors phosphoryler différents substrats comme par exemple la sérine 9 de la GSK3 β . Akt est capable de phosphoryler les deux isoformes de la GSK3 (α et β) respectivement sur la sérine 21 et la sérine 9 provoquant leur inactivation (Figure I.5).

A l'heure actuelle, la GSK3 β est connue pour phosphoryler et réguler l'activation de nombreux facteurs de transcription comme C-Myc (Sears *et al.*, 2000), AP-1 (Boyle *et al.*, 1991) et NF κ B (Bournat *et al.*, 2000)

Une étude récente réalisée par Sodhi *et al.* (2001) a montré qu'il y avait un site consensus potentiel pour la GSK3 β dans le domaine ODD de HIF-1 α et que ce site pourrait jouer un rôle dans la régulation de la stabilité de HIF-1 α mais aucun mécanisme n'était proposé.

Mottet *et al.*, (sous presse) ont déterminé l'état d'activation de la PI3K/Akt/GSK3 β dans les cellules HepG2. Ils ont remarqué qu'après un temps d'incubation en hypoxie long (16 hrs), la voie PI3K/Akt est inhibée.

Dans ce cas, Akt ne peut plus inhiber la GSK3 β en la phosphorylant sur la sérine 9 et l'activité de la GSK3 β augmente dans ces cellules. En parallèle, on observe une déstabilisation de HIF-1 α ; cela se marque par une diminution de l'accumulation de HIF-1 α et par une diminution de l'activité de HIF-1 (Mottet *et al.*, sous presse).

Si dans ces conditions, l'activité de la GSK3 β est inhibée soit par ce dominant négatif, soit par l'utilisation de sel de lithium, on observe une augmentation de la quantité de HIF-1 α et de l'activité de HIF-1, mesurée par un système rapporteur. Ces résultats suggèrent donc que ce serait l'activation de la GSK3 β qui serait responsable de l'inhibition de la stabilisation de HIF-1 α après de longs temps d'incubation sous hypoxie.

Inversément, après 5 hrs d'hypoxie, la voie PI3K/Akt est active et Akt maintient la GSK3 β inactive en la phosphorylant sur la sérine 9. En parallèle, on observe une accumulation

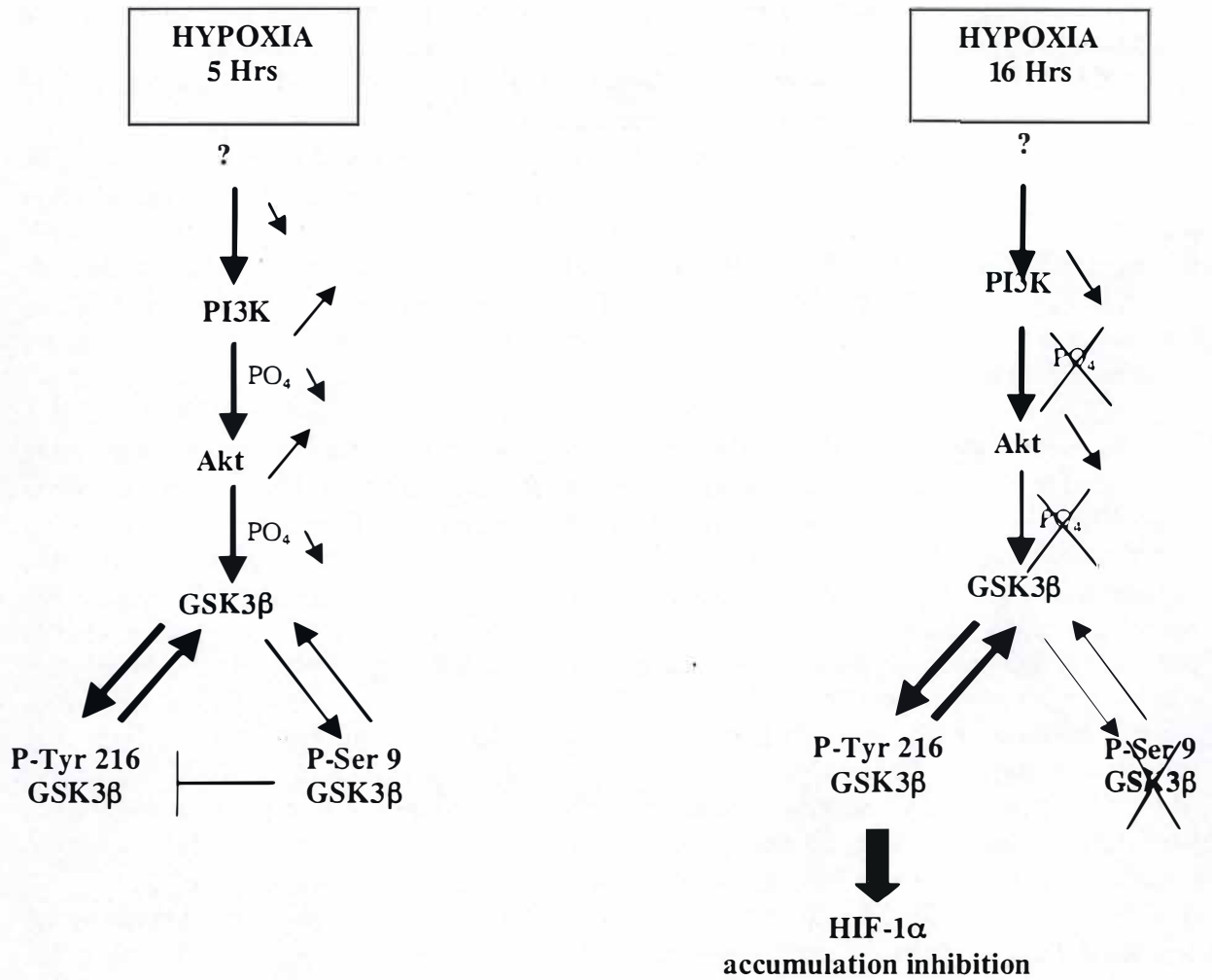


Figure I.9 : Représentation schématique de l'effet de durées croissantes d'hypoxie sur les kinases AKT et GSK3 β et sur leur modulation de la stabilisation de HIF-1 α et de l'activité transcriptionnelle de HIF-1 (Mottet et al., sous presse).

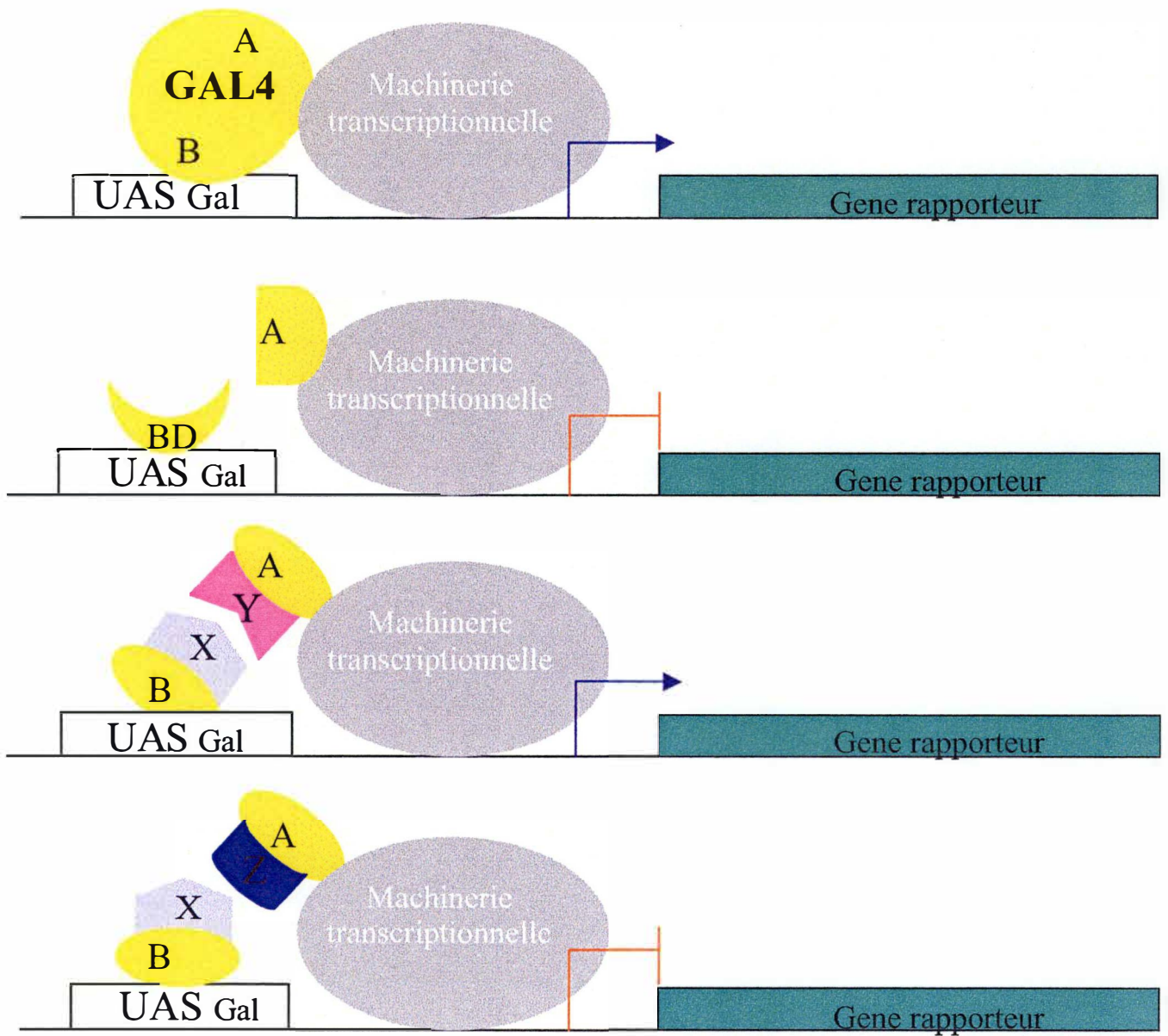


Figure I.10 : Schéma représentant le principe du test d'interaction double hybride.

abondante de HIF-1 α (voir figure I.9). Si cette voie est inhibée, par exemple en utilisant du LY294002 (qui est un inhibiteur de la PI3K), on provoque une diminution de la phosphorylation de la GSK3 β sur la sérine 9, une augmentation de son activité et une inhibition de l'accumulation de HIF-1 α .

Ces résultats suggèrent donc que la voie PI3K/Akt régule la stabilisation de HIF-1 α en jouant sur le degré d'activation de la GSK3 β .

4 Etude des interactions protéine-protéine

4.1 Double hybride en levure

Le test d'interaction double hybride est une méthode puissante pour mettre en évidence des interactions protéine-protéine.

Ce test fait appel à des facteurs de transcription c'est-à-dire des protéines pouvant moduler l'expression de gènes : ces protéines sont capables, en se liant à l'ADN au niveau de certaines séquences régulatrices, d'activer la transcription du gène en aval de ces séquences.

Les facteurs de transcription sont constitués d'un domaine de liaison à l'ADN (BD) et un domaine d'activation (AD). Il est possible de séparer physiquement ces deux domaines et de lier chacun d'eux à des protéines X et Y.

Si on sépare les deux domaines par biochimie ou génie génétique, aucune de ces deux parties seules n'active la transcription. Par contre, si une protéine X fusionnée au domaine de liaison à l'ADN (BD) et une protéine Y fusionnée au domaine d'activation (AD) interagissent, elles reconstitueront un système de deux protéines hybrides simulant le facteur de transcription fonctionnel qui peut alors activer la transcription du gène en aval (voir figure I.10) (Fields et Song, 1989).

Les "gènes" dont la transcription est activée par ce facteur reconstitué sont des gènes rapporteurs c'est-à-dire des gènes en fusion transcriptionnelle avec le promoteur activé et susceptibles de révéler aisément cette interaction (Roger *et al.*, 1997).

Le système le plus utilisé chez la levure fait appel à la protéine LexA (figure I.11). Les protéines dont les interactions sont à tester sont fusionnées avec le BD de LexA, répresseur dans *E. coli* de gènes responsables de la réparation d'ADN, constituant "l'appât", et avec l'AD de VP16, activateur de gènes du virus HSV, d'autre part, constituant la "proie". Les gènes rapporteurs sont placés sous la dépendance de plusieurs opérateurs cibles du facteur de transcription LexA. La reconstitution d'un transactivateur fonctionnel, reflétant une interaction entre les protéines est "mouchardée" par deux gènes rapporteurs différents. En plus du gène *LacZ* d' *E. coli* qui encode la β -galactosidase, le gène LEU2 de levure est utilisé, encodant une enzyme responsable de la catalyse d'une étape de la synthèse de la leucine, requise pour la croissance d'une levure sur un milieu de culture dépourvu de leucine. Son état d'activation (et par conséquent l'interaction entre les protéines d'intérêt) peut être estimée en observant le phénotype de croissance d'une levure auxotrophe pour la leucine sur un milieu de culture sélectif dépourvu de leucine. La levure ne pousse que si les protéines X et Y interagissent.

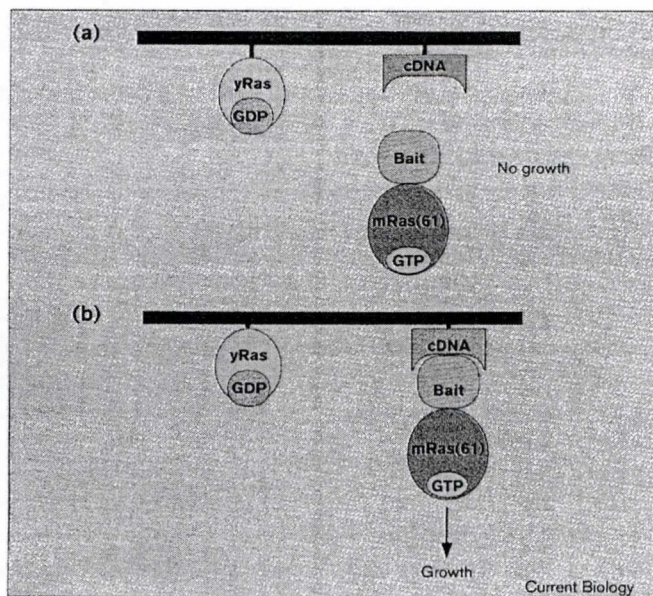


Figure I.11 : Représentation schématique du système RRS (Ras recruitment system) (Yehoshua *et al.*, 1998).

Avantages et limitations du double hybride en levure

Avantages :

- Facilité
- Permet de tester des interactions entre protéines à grande échelle
- Différentes méthodes de criblage (URA3, *LacZ*, HIS3)
- Les levures sont des cellules eucaryotes et leur génome est plus petit que ceux des mammifères ce qui implique que le contexte cellulaire de celui-ci est moins complexe que celui des cellules de mammifère (Liu, 1998).
- Cette méthode permet non seulement l'identification des protéines qui interagissent mais également la disponibilité immédiate des gènes clonés codant pour des protéines.
- Ce système est utilisé pour déterminer si deux protéines interagissent. D'autres analyses (ex : mutagenèse dirigée) peuvent ensuite être réalisées pour détecter les domaines impliqués dans cette interaction.

Ce système double hybride en levure présente cependant aussi des limitations.

Limitations :

- Certaines protéines sont réfractaires à l'analyse comme par exemple les protéines de membranes (car celles-ci possèdent des domaines membranaires et ont donc plus tendance à rester ancrées en membrane plutôt que d'être transloquées dans le noyau), les protéines extracytoplasmiques, les protéines qui lient l'ADN, les protéines toxiques pour la levure,...
- Certaines protéines donnent des signaux trop souvent négatifs (faux négatifs) soit parce que leur repliement est incorrect, soit parce que leur localisation subcellulaire est inappropriée car pour activer la transcription du gène rapporteur, les protéines appât et proie doivent interagir dans l'environnement nucléaire (Stagljär et Fields, 2002).
- L'interaction ne peut être détectée que si des modifications post-traductionnelles ne sont pas requises ; si la présence d'autre(s) partenaire(s) non présent(s) chez la levure n'est pas essentielle à l'interaction.
- Il peut y avoir un effet possible de la fusion génétique : le repliement de la protéine X ou Y ne se fait pas correctement à cause de la présence du domaine BD ou AD.

Afin de circonvenir certaines de ces limitations, un autre système double hybride a été développé. Il s'agit du système RRS (Ras Recruitment System) qui utilise la petite protéine G Ras. Ras est une protéine qui n'est fonctionnelle que lorsqu'elle est localisée au niveau de la membrane plasmique. Cette localisation en membrane est réalisée via l'attachement d'un groupement farnésyl à une séquence consensus à l'extrémité C-terminale de Ras. Ras est active et peut échanger le GDP en GTP et activer une voie aboutissant à la division cellulaire. Une lignée de levures exprimant un mutant thermosensible de Ras est utilisée pour le test d'interaction double hybride. Ce mutant est fonctionnel à 25°C mais pas à 36°C. Sur cette base, on cherche alors à compléter à 36°C la perte de fonctionnalité de Ras (figure I.11). Une protéine X ("proie") est fusionnée à l'extrémité N-terminale du peptide signal farnésyl et la protéine Y ("appât") est fusionnée à une protéine Ras qui ne contient pas ce peptide signal. Une interaction protéine-protéine entre l'appât et la proie résulte alors en la localisation membranaire de Ras, la rendant fonctionnelle et provoquant la division cellulaire. Par contre, si ces deux protéines n'interagissent pas, Ras ne se retrouve pas en membrane et n'est donc pas active (Broder *et al.*, 1998).

Ce système peut être utile pour étudier des facteurs de transcription qui donnent des faux positifs dans le système précédent mais pas pour étudier des protéines membranaires puisque celles-ci risqueraient d'être toutes les deux ancrées en membrane et ne pourraient donc jamais interagir.

4.2 Double hybride en cellules de mammifère

Si le système double hybride en levure est très efficace pour détecter une interaction entre deux protéines dans la plupart des cas, il ne s'applique cependant pas si un ou les deux partenaires nécessitent des modifications post-traductionnelles pour interagir, ou si cette interaction est initiée par un changement résultant d'une voie de transduction du signal. Afin de lever ces limites, le système double hybride tel que développé chez la levure a été transposé dans des cellules de mammifère. Le système le plus couramment utilisé repose sur les protéines GAL4 et VP16.

Des études antérieures ont montré que les acides aminés (a.a.) 1-147 de GAL4 se lient spécifiquement à une séquence d'ADN de 17 paires de bases mais n'active pas en lui-même la transcription. La protéine VP16 (a.a 411-490 ou 411 à 455) du virus de l'herpes quant à lui ne se lie pas spécifiquement à l'ADN mais fonctionne comme un activateur transcriptionnel. Par conséquent, la protéine chimérique entre le domaine de liaison à l'ADN de GAL4 et le domaine d'activation transcriptionnelle de la protéine VP16 du virus de l'herpes peut reconstituer un facteur de transcription fonctionnel (Fearon *et al.*, 1992).

Avantages et limitations du double hybride en cellules de mammifère

Avantages

- L'interaction se produit dans les conditions physiologiques dans les cellules de mammifère y compris avec les modifications post-traductionnelles (glycosylation, phosphorylation,...).
- Le système double hybride en mammifère présente l'avantage de pouvoir étudier des interactions protéine-protéine médiées par une transduction du signal activée par exemple par un ligand.
- Ce système peut être appliqué à n'importe quelle protéine, y compris les facteurs de transcription comme ce fut le cas pour par exemple SMAD3 (Changgong *et al.*, 2002) et MEF-2 (Maeda *et al.*, 2002).
- Le système de double hybride en mammifère permet parfois de détecter des interactions faibles et transitoires car il y a accumulation de la protéine "rapportrice".
- Ces interactions sont réalisées *in vivo* et donc, les protéines étudiées sont plus susceptibles d'être dans leur conformation native par rapport à des approches *in vitro*.

Inconvénients :

- Le système double hybride est plus difficile à mettre en œuvre dans les cellules de mammifère que dans les cellules de levure.
- On observe un taux élevé de faux négatifs dû notamment au fait que les protéines utilisées sont le résultat d'une fusion entre la protéine proprement dite et une partie du facteur de transcription. Cette fusion pourrait dès lors induire une modification de la

conformation de cette protéine hybride, empêchant son interaction potentielle avec une autre protéine cible.

- La stabilité d'expression des protéines de fusion est faible (2-3 jours). En effet, les transfections qui sont réalisées sont transitoires, les plasmides introduits sont rapidement dilués dans les cellules filles au cours des divisions successives de la cellule transfectée au départ.
- Ce système, comme pour la levure, n'est pas applicable aux protéines membranaires.

Les interactions protéine-protéine identifiées avec le système double hybride que ce soit en levure ou en cellules de mammifère doivent ensuite être vérifiées dans des systèmes biologiques pertinents, en utilisant d'autres approches.

Parmi celles-ci, on trouve la co-immunoprécipitation et l'immunofluorescence qui reposent toutes deux sur l'utilisation d'anticorps spécifiques (voir point 4.3).

4.3 Autres systèmes permettant de détecter une interaction entre deux protéines

4.3.1 Co-immunoprécipitation

La co-immunoprécipitation est une technique permettant de capturer des complexes de protéines interagissant entre elles à l'aide d'un anticorps dirigé contre l'une de ces protéines. Afin de sélectionner la protéine d'intérêt ainsi que ses partenaires, des anticorps dirigés contre cette protéine sont ajoutés à un lysat cellulaire. Le complexe anticorps-protéine d'intérêt-partenaire est ensuite séparé des autres protéines de l'extrait cellulaire par précipitation à l'aide de billes recouvertes de protéines A ou G. Après plusieurs lavages, les protéines recueillies sont séparées par électrophorèse. Elles peuvent alors être identifiées par Western blot ou par spectrométrie de masse.

4.3.2 Test de transcription-traduction *in vitro*

La co-immunoprécipitation permet de détecter la présence de deux ou plusieurs protéines dans un même complexe. Elle ne permet cependant pas de déterminer si deux de ces protéines interagissent directement l'une avec l'autre ou si une protéine partenaire est nécessaire pour faire le "pont" entre ces deux protéines.

Afin de détecter une interaction directe entre deux protéines, la technique de transcription-traduction *in vitro* est fréquemment utilisée. Il s'agit de produire *in vitro* les deux protéines d'intérêt à partir d'un plasmide portant l'ADNc codant ces protéines sous la dépendance d'un promoteur de l'ARN polymérase de phage (T3, T7 ou Sp6). La transcription se fait à l'aide d'une polymérase qui reconnaît spécifiquement un de ces promoteurs. L'ARNm produit est alors traduit *in vitro* à l'aide de la machinerie de traduction présente dans un lysat de réticulocytes ou de germes de blé. Cette traduction peut se faire en présence de méthionine (S^{35}) afin de produire une protéine marquée radioactivement. La protéine d'intérêt est alors mise en présence de son partenaire éventuel (issu également de transcription-traduction *in vitro* ou purifié par chromatographie d'affinité). Après immunoprécipitation à l'aide d'un anticorps dirigé contre la protéine d'intérêt, la présence du partenaire est détectée par Western blot. Inversement, on peut également immunoprécipiter le partenaire potentiel et vérifier par auto-radiographie la présence de la protéine d'intérêt puisque celle-ci est radioactive.

4.3.3 Immunofluorescence et FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfert)

Avant de confirmer une interaction protéine-protéine détectée par le système double-hybride, il convient de vérifier si dans des conditions physiologiques, ces deux protéines sont effectivement susceptibles d'interagir, c'est-à-dire si elles sont présentes dans le même compartiment subcellulaire au même moment. Un co-marquage en immunofluorescence des deux protéines avec observation en microscopie confocale est la technique de choix pour cette colocalisation.

Par ailleurs, la technique du FRET, utilisant également la microscopie confocale peut quant à elle directement de mettre en évidence des interactions protéine-protéine.

Cette technique repose sur l'interaction entre des états électroniques excités de deux fluorochromes au cours de laquelle l'énergie d'émission d'un fluorochrome donneur est transmise à un fluorochrome accepteur comme énergie d'excitation sans émission de photon.

Les deux protéines d'intérêt sont fusionnées à deux fluorochromes différents. Si ces deux protéines sont capables d'interagir, l'interaction aboutira au rapprochement des sondes fluorescentes. La première molécule fluorescente (donneuse) couplée à la première protéine absorbera l'énergie d'excitation et pourra la transférer par résonance des électrons excités à la seconde molécule fluorescente (acceptrice), couplée à l'autre protéine, qui émettra alors un signal lumineux détectable. Si par contre il n'y a pas d'interaction, le premier fluorochrome émettra des photons à la longueur d'émission qui le caractérise.

5 Objectifs du mémoire

Comme nous l'avons mentionné dans l'introduction, l'activité du facteur de transcription HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor-1) est régulée à plusieurs niveaux. La stabilisation de la sous-unité HIF-1 α et l'activation du facteur de transcription par différents processus constituent deux étapes indispensables dans la régulation de l'activité du facteur de transcription HIF-1.

Plusieurs données semblent indiquer qu'une voie dépendante de la kinase ERK d'une part et une autre voie dépendante des kinases PI3K/Akt/GSK3 β d'autre part, pourraient jouer un rôle important dans la voie de transduction du signal menant à l'activation de HIF-1

En effet, on sait que la voie des MAPKs est activée par l'hypoxie et qu'elle peut phosphoryler les kinases ERK1 et ERK2 menant ainsi à leur activation. Seules les ERK1 activées sont capables de phosphoryler la sous-unité HIF-1 α au niveau du domaine de transactivation carboxy-terminal (TAD-C). La sous-unité HIF-1 α phosphorylée peut alors dimériser avec la sous-unité ARNT et former ainsi un facteur de transcription HIF-1 actif et fonctionnel, pouvant recruter la machinerie basale de transcription et induire la transcription de gènes cibles tels que l'EPO, le VEGF, ... La phosphorylation par ERK1 est directement nécessaire à l'activité transcriptionnelle de HIF-1.

D'autre part, on sait également qu'après des temps d'hypoxie prolongés, la kinase Akt n'est plus active. Cette kinase ne peut donc plus phosphoryler la GSK3 β au niveau de la sérine 9 et l'inactiver. La forme active de la GSK3 β peut alors moduler l'activité du facteur de transcription HIF-1 en régulant la quantité de la protéine HIF-1 α . HIF-1 α pourrait donc être un substrat potentiel de cette kinase mais ceci reste à démontrer.

On voit donc que les kinases ERKs et celles de la voie PI3K/Akt/GSK3 β ont une grande importance dans la régulation de l'activité du facteur de transcription HIF-1. Sur base de ces observations, nous avons voulu savoir si ces kinases ERK1 et GSK3 β interagissaient directement avec la sous-unité HIF-1 α ou si des intermédiaires étaient nécessaires pour qu'elles puissent jouer leur rôle.

Le but de mon mémoire est donc de tester, par la technique du double hybride en cellules de mammifère, l'existence d'interactions potentielles entre HIF-1 α et chacune de ces deux kinases.

Les interactions que nous avons testées au cours de ce mémoire sont les suivantes :

- HIF-1 α contre la kinase ERK1
- HIF-1 α contre la kinase GSK3 β
- Akt contre la kinase ERK1 (en tant que contrôle négatif)
- Akt contre la kinase GSK3 β (en tant que contrôle positif)

MATÉRIEL
ET
MÉTHODES

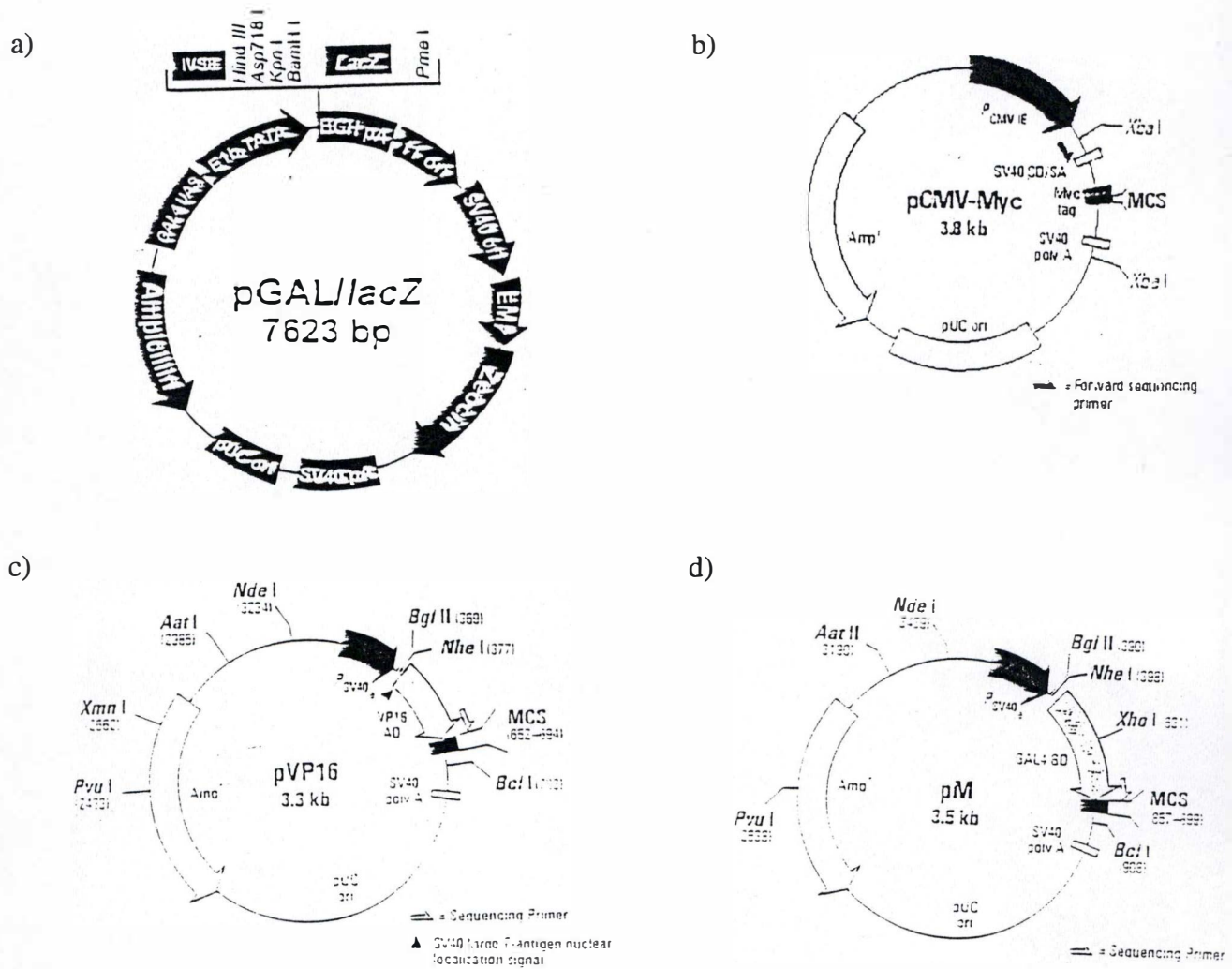


Figure II.1 : Représentation schématique des plasmides utilisés pendant ce mémoire :

- a) Plasmide pCMV-Myc (Clontech, Palo Alto, USA) .
- b) Plasmide pGAL/LacZ (Invitrogen, Carlsbad, USA)
- c) Plasmide pVP16 (Clontech, Palo Alto, USA)
- d) Plasmide pM (Clontech, Palo Alto, USA)

1 Aspect moléculaire

1.1 Souche bactérienne et plasmides

1.1.1 Souche bactérienne

La souche bactérienne *E.coli* SURE (Stratagene, La Jolla, USA) utilisée possède le génotype suivant : endA1, lac, thi-1, recB, recJ, umuC : Tn5 (F'proAB, lacI^qZΔDM15, Tn10 (Tet^r)). Elle a été rendue transformable par un traitement au CaCl₂.

1.1.2 Plasmides (Figure II.1)

- pCMV-Myc (Clontech, Palo Alto, USA) : ce vecteur d'expression contient un promoteur fort CMV en amont d'un épitope de 13 acides aminés de type c-Myc.
- Le vecteur d'expression pCMV-Myc/HIF-1 α contient l'ADNc de HIF-1 α cloné en phase de lecture avec l'épitope c-Myc. Il permet de surexprimer la protéine HIF-1 α en cellules de mammifère.
- pM GAL4 DNA-BD (Binding Domain) (Clontech, Palo Alto, USA): ce vecteur est utilisé pour générer la fusion entre une protéine d'intérêt et l'extrémité 3' du domaine de liaison à l'ADN du facteur de transcription GAL4 (a.a. 1 à 147). La protéine de fusion est ciblée vers le noyau par la séquence de localisation nucléaire de GAL4. La transcription est initiée à partir du promoteur SV40 et celle-ci se termine au signal de terminaison SV40 polyA.
- pVP16 AD (Activation Domain) (Clontech, Palo Alto, USA): ce vecteur est utilisé pour générer la fusion entre une protéine d'intérêt et l'extrémité 3' du domaine d'activation du facteur de transcription VP16 (a.a. 411 à 455). La protéine de fusion est ciblée vers le noyau de la cellule par la séquence de localisation nucléaire de SV40. La transcription est initiée à partir du promoteur SV40 et celle-ci se termine au signal de terminaison SV40 polyA.
- pM3-VP16 (Clontech, Palo Alto, USA): vecteur qui exprime la protéine de fusion entre le domaine de liaison de GAL4 (GAL4 DNA-BD) et le domaine d'activation de VP16AD. Ce vecteur sera utilisé en tant que contrôle positif.
- pM-53 (Clontech, Palo Alto, USA) : vecteur qui exprime la protéine de fusion entre la protéine p53 et le domaine de liaison de GAL4 (GAL4 DNA-BD).
- pVP16-CP (Clontech, Palo Alto, USA) : vecteur qui exprime la protéine de fusion entre la protéine de paroi du virus polyoma et le domaine d'activation de VP16 (VP16 AD).
- pVP16-T (Clontech, Palo Alto, USA) : vecteur qui exprime la protéine de fusion entre l'antigène T du virus SV40 et le domaine d'activation de VP16 (VP16 AD).

- pGAL/*LacZ* (Invitrogen, Carlsbad, USA): est un plasmide rapporteur contenant 6 boîtes GAL4 UAS (6x17pb) en amont d'un gène codant pour la β -Galactosidase. Ces 6 éléments permettent la liaison d'un domaine de liaison de GAL4 et le contrôle de l'expression du gène *LacZ*.
- pGL3-SV40/6HRE : plasmide rapporteur contenant 6 copies de l'élément HRE (Hypoxia Responsive Element) en aval du gène de la "firefly luciférase", fonctionnant en tant que enhancer et qui permet un taux élevé de la transcription du gène luciférase (luc+) lorsque HIF-1 est activé. Il possède également un promoteur faible SV40 localisé en amont du gène.
- pRL-SV40 (Promega, Madison, USA) : plasmide rapporteur contenant l'ADNc encodant la Renilla luciférase d'un organisme marin. Il contient un enhancer et un promoteur SV40 permettant une expression constitutive élevée de cette luciférase. Une boîte de signal poly(A) est présente en aval du gène Rluc qui a pour rôle d'augmenter la stabilité du messager issu du gène rapporteur

1.2 Transformation bactérienne par choc thermique

Méthode :

- Dégeler sur glace les aliquots de 100 μ l de bactéries CaCl₂ compétentes.
- Ajouter toute la préparation plasmidique aux bactéries et laisser reposer 10 minutes sur glace.
- Placer 2 minutes dans un bain à 42°C pour réaliser le choc thermique.
- Ajouter 500 μ l de milieu Luria Bertani (LB) froid complété ou non d'antibiotique (Amp 100 μ g/ml) à la suspension bactérienne.
- Incuber 1 heure à 37°C et étaler sur un milieu sélectif solide (LB additionné de 1,5% d'agar) et incuber pendant une nuit à 37°C.

1.3 Extraction d'ADN plasmidique

1.3.1 Mini-préparation d'ADN plasmidique

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

- Les principales étapes de cette technique sont les suivantes :
- La lyse alcaline des bactéries.
- La précipitation des protéines et des débris cellulaires.
- L'extraction de l'ADN plasmidique au phénol/chloroforme.
- La précipitation alcoolique de l'ADN plasmidique.
- Le lavage et la resuspension de l'ADN plasmidique.

Méthode :

- ensemencer 2 à 3 ml de milieu liquide (LB + antibiotique(s)) avec une colonie isolée, issue d'une culture en milieu solide.
- Incuber la culture liquide une nuit à 37 °C sous une agitation de 250 rpm (Innova TM 4300, New Brunswick Scientific).
- Centrifuger la culture à 15000 rpm pendant 5 minutes à 4°C (Heraus Sepatech, Biofuge 17 RS, rotor 1379) et éliminer le surnageant.
- Resuspendre le culot dans 200 µl de tampon P1 (avec RNase A).
- Lysér les cellules avec 200 µl de tampon P2 et mélanger doucement puis laisser 5 minutes à température ambiante.
- Neutraliser le lysat alcalin en ajoutant 200 µl de tampon P3 et agiter doucement puis laisser 30 minutes sur glace pour précipiter le SDS.
- Centrifuger 15 minutes à 4° C à 15000 rpm (Heraus Sepatech, Biofuge 17 RS, rotor 1379) et éliminer le surnageant.
- Précipiter l'ADN avec un volume de phénol-chloroforme-alcool isoamylique (550 µl) (Sigma, St Louis, USA).
- Homogénéiser en agitant lentement.
- Centrifuger 10 minutes à 13000 rpm à température ambiante.
- Reprendre 500 µl de la phase aqueuse, ajouter 2 volumes d'éthanol absolu (1000 µl) (Merck, Darmstadt, Allemagne) et incubé 5 minutes à température ambiante.
- Centrifuger 10 minutes à 15000 rpm à 4°C (Heraeus Sepatech ; Biofuge 17 RS, rotor 1379) et éliminer le surnageant.
- Laver l'ADN en ajoutant 300 µl d'éthanol 70 % (Merck, Darmstadt, Allemagne) et centrifuger pendant 10 minutes à 15000 rpm à 4°C (Heraeus Sepatech, Biofuge 17 RS, rotor 1379).
- Éliminer l'éthanol et sécher le culot au speedvac (Hetevac VR-1, Analis, Namur, Belgique).
- Resuspendre dans 20 µl d'H₂O distillée stérile.

1.3.2 Maxi-préparation d'ADN plasmidique

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

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

Méthode :

- ensemencer 200 ml de milieu liquide (LB + antibiotique(s)) avec 100 µl d'une culture liquide issue d'une miniculture.
- Incuber la culture liquide une nuit à 37 °C sous une agitation de 250 rpm (Innova TM 4300).
- Centrifuger la culture à 6000 g pendant 15 minutes à 4°C (Beckman Avanti J-25, rotor JLA-16.250) et éliminer le surnageant.

Enzyme	Site de reconnaissance	Optimum de température
EcoR I	5'-G/AATTC-3'	37°C
HindIII	5'-A/AGCTT-3'	37°C
PstI	5'-CTGCA/G-3'	37°C
BamHI	5'-G/GATCC-3'	37°C

Figure II.2 : Tableau représentant les enzymes de restriction utilisées au cours de ce mémoire.

- Resuspendre le culot dans 10 ml de tampon P1.
- Lysér les cellules avec 10 ml de tampon P2 et mélanger doucement puis laisser 5 minutes à température ambiante.
- Neutraliser le lysat alcalin en ajoutant 10 ml de tampon P3 et agiter doucement puis laisser 30 minutes sur glace.
- Centrifuger 30 minutes à 4° C à 20000 g (Beckman Avanti J-25, rotor JA-20) et récupérer le surnageant.
- Re-centrifuger le surnageant 10 minutes à 20000 g à 4° C si les débris cellulaires, le SDS, ne sont pas bien précipités.
- Equilibrer les colonnes Qiagen-Tip 500 avec 10 ml de tampon QBT et laisser les colonnes se vider par gravité.
- Déposer le surnageant sur la colonne et laisser pénétrer.
- Laver la colonne avec 2 x 30 ml de tampon QC.
- Eluer l'ADN plasmidique avec 15 ml de tampon QF et récupérer l'éluat dans des tubes COREX.
- Précipiter l'ADN avec 0,7 volume d'isopropanol (10,5 ml).
- Centrifuger 30 minutes à 15000g à 4°C (Beckman Avanti J-25, rotor JA-20) et éliminer le surnageant.
- Laver le culot avec 5 ml d'éthanol à 70 %.
- Centrifuger 10 minutes à 15000g à 4°C (Beckman Avanti J-25, rotor JA-20).
- Décanté le surnageant délicatement.
- Sécher le culot à 37°C.
- Resuspendre le culot dans 500 µl d'H₂O distillée stérile.
- Conserver à - 20°C.

1.4 Restriction d'ADN

Le clivage de l'ADN bicaténaire s'effectue par des enzymes de restriction qui coupent au niveau de courtes séquences d'ADN palindromiques appelées sites de restriction. Quatre enzymes ont été utilisés au cours de ce mémoire (Voir figure II.2).

Méthode :

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

1.5 Purification d'ADN

Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up (Promega, Madison, USA).

Celui-ci permet de purifier l'ADN provenant d'amplification PCR ou de restriction de plasmides. 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 traitements enzymatiques de l'ADN.

Méthode :

- Dans des nouveaux eppendorfs, ajouter un volume de produit PCR.
- Ajouter 1 volume de "Membrane binding solution" et homogénéiser.
- Déposer sur une colonne et laisser pénétrer une minute.
- Centrifuger 1 minute à 11000 rpm à t° ambiante et jeter le filtrat.
- Ajouter 700 µl de "Membrane wash solution".
- Centrifuger 1 minute à 11000 rpm à t° ambiante et enlever le filtrat.
- Ajouter 500 µl de "Membrane wash solution".
- Centrifuger 5 minutes à 11000 rpm à t° ambiante et éliminer le filtrat.
- Recentrifuger 1 minute la colonne à 11000 rpm à t° ambiante afin de décanter tout l'éthanol qui se trouvait dans la solution de lavage.
- Placer la colonne sur un nouveau tube.
- Ajouter 50 µl d'H₂O distillée et incubé une minute.
- Centrifuger 1 minute à 11000 rpm à t° ambiante.
- Récupérer le filtrat dans un nouvel eppendorf.

1.6 Réaction de 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.

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 stérile pour atteindre un volume final de 20 µl.
- Ajouter finalement la T4 ADN ligase (Promega, Madison, USA), à raison de 1 à 3 U pour le volume final de réaction.
- Incuber le mélange de ligation 16 heures à 4°C.

1.7 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

L'amplification d'un fragment d'ADN matrice est rendu possible grâce à l'utilisation, d'une part, d'amorces oligonucléotidiques et, d'autre part, par l'emploi d'une ADN polymérase thermostable de haute fidélité. 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 et permettant l'amplification quasi exponentielle de la séquence d'ADN cible. Théoriquement, à chaque cycle est produit un nombre de molécules égal au double du nombre de molécules présent au cycle précédent.

Nom	Séquences	Séquences à amplifier	Enzyme de restriction associée
5GECOI	5'-CCG-GAA-TTC-ATG-TCA-GGG-CCC-A-3'	GSK3 β	EcoRI
3GPSTI	5'-AAC-TGC-AGT-CAT-CAG-GTG-GAG-TTG-GAA-3'	GSK3 β	PstI
5AECOI	5'-CCG-GAA-TTC-ATG-AGC-GAC-GTG-GCT-ATT-3'	AKT	EcoRI
3ABHI	5'-CGC-GGA-TCC-TCA-TCA-GGC-CGT-GCC-3'	AKT	BamHI
5EKECOI	5'-CCG-GAA-TTC-ATG-GCG-GCG-GCG-GCG-GCT-3'	ERK	EcoRI
3EKPSTI	5'-AAC-TGC-AGT-CAT-CAG-GGG-CCT-CCA-GCA-CT-3'	ERK	PstI
5HBAI	5'-CGC-GGA-TCC-GTA-GTA-AAG-AAT-CTG-AAG-TTT-TTT-ATG-AGC-TT-3'	HIF-1 α	BamHI
3CPST	5'-AAC-TGC-AGT-CAT-CAT-GAT-TGC-CCC-AGC-AGT-CT-3'	HIF-1 α	PstI

Figure II.3 : Tableau représentant les séquences des amorces utilisées pour amplifier les gènes d'intérêt ainsi que les enzymes de restriction qui sont associées à ces amorces.

1.7.1 Préparation du mélange réactionnel :

- 1 μ l d'amorce sens (10 picomoles) (Eurogentec, Verviers, Belgique).
- 1 μ l d'amorce anti-sens (10 picomoles) (Eurogentec, Verviers, Belgique).
- 1 μ l de dNTP mix (Promega, Madison, USA).
- 5 μ l de tampon de la polymérase concentré 10 X.
- 1 μ l de plasmide Matrice (25 ng/ μ l).
- 1 μ l de Pfu Turbo DNA polymérase (2,5 U/ μ l) (Promega, Madison, USA).
- Ajouter de l'eau stérile pour atteindre un volume final de 50 μ l.

Les amorces utilisées pendant ce mémoire sont présentées dans le tableau de la figure II.3.

1.7.2 Programmation des cycles PCR :

1) Dénaturation		99°C/4 minutes
2) 35 cycles	-Dénaturation	96°C/5 secondes
	-Hybridation	65°C/10 secondes
	-Elongation	75°C/2 minutes 50 secondes
3) Elongation		75°C/5 minutes

2 Aspect cellulaire

2.1 Culture cellulaire

2.1.1 Culture des cellules HepG2

2.1.1.1 Caractéristiques de la lignée HepG2

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

2.1.1.2 Milieux de culture et solutions

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

2.1.1.3 Repiquage des cellules HepG2

Lorsque les cellules sont à confluence, les cellules sont repiquées en 2 ou 3 ou à une autre densité selon l'expérience à réaliser. Le milieu de culture est précédemment préchauffé à 37°C et les cellules sont cultivées dans des boîtes de 75 cm² (T75, Costar, Corning, New-York, USA).

- Décanter le milieu et rincer les cellules avec 5 ml de milieu de rinçage.
- Détacher les cellules avec 2 ml de trypsine+EDTA (chélateur de cations et notamment de Ca⁺⁺) pendant quelques minutes.
- Ajouter 8 ml de DMEM+10% sérum afin d'arrêter la réaction.
- Transvaser la suspension cellulaire dans un tube de 10 ml (Sterilin, Feltham, Grande-Bretagne) et centrifuger pendant 5 minutes à 1000 rpm (Centrifugeuse Universal, Hettich, Allemagne).
- Décanter le surnageant et resuspendre le culot dans 10 ml de milieu DMEM+10% sérum
- Répartir les cellules à la densité désirée dans les boîtes de culture ou les plaques multi-puits.
- Placer les boîtes dans l'étuve à 37°C (95 % d'air humide et 5 % CO₂).

HepG2	
Boîte de culture	24 puits (50.000 cellules/puits)
Mix ADN -pRL -p6HRE -Plasmide test	-177 ng -355 ng -1775 ng
Volume de PBS stérile	x μ l pour arriver à un volume final de 150 μ l/puits
Volume superfect	6 μ l/puits
Volume de transfection	1 ml DMEM sans sérum
Temps de transfection	3 hrs
Volume de récupération	1 ml DMEM+10% sérum.
Temps de récupération	24 hrs

CHO				
Boîte de culture		24 puits (150.000 cellules/puits)	6 puits (750.000 cellules/puits)	T25 (1.500.000 cellules)
Mix ADN	-Plasmide appât	-0,4 μ g	-1 μ g	-2,5 μ g
	-Plasmide proie	-0,4 μ g	-1 μ g	-2,5 μ g
	-Plasmide rapporteur	-0,5 μ g	-1,5 μ g	-3,5 μ g
Volume α -MEM seul		- x μ l pour un volume final de 50 μ l	- x μ l pour un volume final de 250 μ l	-x μ l pour un volume final de 500 μ l
Volume de lipofectamine 2000		- 2 μ l	- 10 μ l	- 25 μ l
Volume α -MEM		- 50 μ l	- 250 μ l	- 500 μ l
Mix lipo/ADN		50 μ l mix ADN +50 μ l mix lipo	250 μ l mix ADN+250 μ l mix lipo	500 μ l mix ADN+500 μ l mix lipo
Volume de transfection		500 μ l/puits α -MEM sans sérum	2ml/puits α -MEM sans sérum	4 ml α -MEM sans sérum
Temps de transfection		8 hrs		
Volume de récupération		1 ml α -MEM + 7% sérum	4 ml α -MEM +7% sérum	5 ml α -MEM +7% sérum
Temps de récupération		16 hrs		

Figure II.4 : Tableau illustrant les méthodes de transfection utilisées pour transfecter les cellules HepG2 et CHO.

2.1.2 Culture des cellules CHO

2.1.2.1 Caractéristique de la lignée CHO

Les cellules CHO sont une lignée de cellules d'ovaire d'hamster chinois (Chinese Hamster Ovary).

2.1.2.2 Milieu de culture et solutions

Le milieu de culture utilisé est du α -MEM (MEM Alpha Medium with Glutamax-I, Gibco, Paisley, Grande-Bretagne) complété de 7 % de sérum de veau foetal (Gibco, Paisley, Grande-Bretagne).

2.1.2.3 Repiquage des cellules CHO

Les conditions de repiquage sont identiques à celles utilisées pour les HepG2.

2.2 Transfection

La transfection est une méthode qui permet d'incorporer de l'ADN dans les cellules d'eucaryotes. L'introduction de l'ADN se fait via un agent lipofectant qui complexe cet ADN et permet son introduction dans la cellule par fusion avec les membranes cellulaires.

2.2.1.1 Matériel :

- Boîte T25 (Costar, Corning, New-York, USA).
- Boîte T75 (Costar, Corning, New-York, USA).
- Plaque multi puits de :
 - 24 puits (Costar, Corning, New-York, USA).
 - 6 puits (Costar, Corning, New-York, USA)
- α -MEM sans sérum (Gibco, Paisley, Grande-Bretagne).
- DMEM sans sérum (Gibco, Paisley, Grande-Bretagne).
- Superfect Transfection Reagent (Qiagen, Hilden, Allemagne).
- Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, USA).

2.2.1.2 Méthode :

- Ensemencer les boîtes à la confluence désirée
- Incuber 24 h à 37°C (95% d'air humide et 5 % de CO₂).
- Préparer les mix ADN et les mix agent transfectant et incuber les cellules en présence des mix ADN/agent transfectant selon les conditions décrites à la figure II.4

2.3 Incubation sous hypoxie

2.3.1.1 Matériel :

Milieu: 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 ainsi que des antibiotiques (Pen (50 U/ml)/Strep (50 µg/ml)). Ce milieu ne contient pas de sérum.

2.3.1.2 Méthode :

Pour les incubations sous hypoxie, le milieu des cellules est décanté et les cellules sont couvertes de milieu CO₂ indépendant. Le volume correspond à 2 ml pour les puits des plaques 24 puits, 5 ml pour les T25 et 10 ml pour les T75. Les boîtes sont ensuite ouvertes et placées dans un incubateur à 37°C où règne une atmosphère composée à 99% d'azote (créée par un flux de 2 minutes) et à 1 % d'O₂. Des boîtes contrôles sont incubées dans les mêmes conditions mais dans une atmosphère normale ou normoxie.

2.4 Western blot

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

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

2.4.1 Lyse des cellules

2.4.1.1 Matériel :

Tampon de lyse :

- Tris 20 mM pH 7,5 (Merck, Darmstadt, Allemagne).
- KCl 150 mM (Merck, Darmstadt, Allemagne).
- EDTA 1 mM (Merck, Darmstadt, Allemagne).
- Triton X-100 1% (Sigma, St Louis, USA).
- Inhibiteurs de protéases 1x (Complete protease inhibitor cocktail tablets 25x, Roche, Mannheim, Allemagne).
- Inhibiteurs de phosphatases 1x à partir d'un stock 25x :
 - Na VO₃ 25 mM (Sigma, St Louis, USA).
 - PNPP (phospho-nitrophényl phosphate) 250 mM (Sigma, St Louis, USA).

Etape	Gel concentrateur	Gel séparateur
1	<u>Spacer gel buffer :</u> - SDS 0,4% - Tris 5% - pH 6,8	<u>Running gel Buffer :</u> -SDS 0,4% -Tris 18% -pH 8,9
2	<u>Spacer gel mix :</u> - 60 ml Spacer gel buffer - 40 ml Acryl/bis - 140 ml H ₂ O	<u>Running gel mix (10%):</u> - 60 ml Running gel Buffer - 83 ml Acryl/bis - 107 ml H ₂ O
3	<u>Gel concentrateur final :</u> - 10 ml Spacer Gel mix - 50 μ l APS 25% - 3 μ l TEMED	<u>Gel séparateur final:</u> - 35 ml Gel mix - 175 μ l APS 25% - 10,5 μ l TEMED

Figure II.5 : Tableau représentant la préparation des solutions pour les gels concentrateur et séparateur de l'électrophorèse en gel de polyacrylamide SDS-PAGE.

- α -glycérophosphate 250 mM (Sigma, St Louis, USA).
- NaF 125 mM (Merck, Darmstadt, Allemagne).

2.4.1.2 Méthode :

Après incubation, les boîtes sont placées sur glace, décantées et rincées avec du PBS froid. Un volume de tampon de lyse adéquat est ajouté à chaque boîte et les cellules sont raclées. Le lysat cellulaire est ensuite récupéré et transféré dans des eppendorfs. Les échantillons sont centrifugés 5 minutes à 15000 rpm à 4°C (Heraeus Sepatech, Biofuge 17 RS, rotor 1379). Le surnageant est ensuite récupéré et placé dans de nouveaux eppendorfs. Les échantillons sont conservés à -20°C. Un volume est prélevé pour la quantification des protéines par la méthode Bradford.

2.4.2 Préparation des échantillons pour le gel d'électrophorèse

- Prélever le volume adéquat de manière à déposer une quantité équivalente de protéines par puits
- Ajouter du tampon d'échantillon 5X concentré (0,5 M Tris pH 6,8 ; 20% SDS ; 20% glycérol ; 1% bleu de bromophénol ; 20% de β -mercaptoéthanol).
- Porter tous les échantillons au volume désiré avec de l'eau distillée.
- Faire bouillir 3 à 4 minutes les échantillons pour dénaturer les protéines puis centrifuger brièvement.

2.4.3 Electrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS

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

2.4.3.1 Matériel :

(Voir figure II.5)

2.4.3.2 Méthode:

- Monter les plaques et couler le gel séparateur entre les plaques.
- Déposer 1 ml d'isobutanol au-dessus et mettre le montage bien à l'horizontal.
- Laisser polymériser.
- Eliminer l'isobutanol et rincer abondamment à l'eau distillée.
- Eliminer l'eau avec un papier Whatman.
- Couler le gel concentrateur jusqu'au bord des plaques et glisser le peigne entre celles-ci.
- Laisser polymériser.
- Retirer le peigne et monter le gel dans la cuve d'électrophorèse (modèle V 15- 17, Life Technologies, GibcoBRL, Gaithersburg, USA).
- Ajouter du tampon de migration 1X.
- Rincer les puits et chasser les bulles d'air au bas du montage à l'aide d'une seringue.

- Déposer le volume adéquat d'échantillons et l'étalon Full Range Rainbow (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Grande- Bretagne) dans les puits.
- Faire migrer : à travers le gel concentrateur à 35 mA puis à travers le gel séparateur à 45 mA.

2.4.4 Transfert

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

2.4.4.1 Matériel :

- Membrane PVDF (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Grande- Bretagne)
- Papiers Whatman (Macherey-Nagel, Allemagne)
- Eponge
- Méthanol 100 % (Merck, Darmstadt, Allemagne)
- Tampon de transfert (pour 5 litres) :
 - 24 g TRIS (0,04 M)
 - 115 g Glycine (0,3 M)
 - 1 litre méthanol
- Appareil de transfert : Hoefer Semiphor (Amersham Biosciences, Minnesota, San Francisco, USA)

2.4.4.2 Méthode :

a) Préparation de la membrane :

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

b) Préparation du système "sandwich ":

- Arrêter l'électrophorèse lorsque le front de migration, visualisé par le bleu de Bromophénol, se trouve à environ 1 cm du bas du gel.
- Démouler le gel, enlever le gel concentrateur et éventuellement l'excès de gel séparateur à l'aide d'un scalpel.
- Immerger les papiers Whatman dans du tampon de transfert.
- Le système "sandwich "se constitue de plusieurs couches (en partant du côté de l'anode) :
 - Une éponge
 - Deux papiers Whatman
 - La membrane
 - Le gel
 - Deux papiers Whatman
 - Une éponge

- Le transfert se fait toute la nuit à 35mA. Les protéines, chargées négativement, vont migrer du gel vers la membrane.

2.4.5 Traitement de la membrane

2.4.5.1 Matériel :

- Solution stock de TBS 10x (pour 1 litre) :
 - 24,22 g TRIS (0,2 M) (ICN Biomedicals, Ohio, USA)
 - 80,06 g NaCl (1,37 M) (Merck, Darmstadt, Allemagne)
 - pH 7,6
- Solution TBS + Tween20 (0,1 %) (Sigma, St Louis, USA) à préparer le jour même (TBS-T).
- Solution TBS+Tween20 + Gloria (5%) (Nestlé, Bruxelles, Belgique).
- Anticorps primaires :
 - Ac de souris anti-GAL DNA-BD (Clontech, Palo Alto, USA) dilué 1000 x.
 - Ac de souris anti-VP16 AD (Santa Cruz, USA) dilué 1000 x.
- Anticorps secondaires :
 - Ac anti-IgG de souris couplé à la peroxydase (Amersham Biosciences, Minnesota, San Francisco, USA) dilué 2000 x
- Solution de révélation (Western Lightening NEN, Perkin Elmer Life sciences, Boston, USA).
- Film d'exposition : film photos ECL (Amersham Biosciences, Minnesota, San Francisco, USA).
- Révélateur dilué 5x (Ilford Imaging, Victoria, Grande-Bretagne).
- Fixateur dilué 5x (Ilford Imaging, Victoria, Grande-Bretagne).

2.4.5.2 Méthode :

Le traitement de la membrane permet de diminuer les liaisons non spécifiques des anticorps par saturation de la membrane avec des protéines du lait. La membrane est ensuite incubée avec l'anticorps spécifique dirigé contre la protéine d'intérêt.

La détection se fait de manière indirecte puisqu'un anticorps reconnaissant le premier anticorps et couplé à une HRP (Horseradish peroxidase) va être utilisé.

- Démouler le "sandwich" et découper les excès de membrane.
- Placer celle-ci dans une bouteille en plastique avec le côté des protéines vers l'intérieur.
- Incuber 2 hrs dans une solution de TBS-T 0,1% + 5% Gloria.
- Incuber l'anticorps primaire dilué 1000x dans TBS-T 0,1% + 5% Gloria pendant 2 heures.
- Effectuer 3 rinçages de 5 minutes avec TBS-T 0,1% + 5% Gloria.
- Incuber l'Ac secondaire dilué 2000 x dans du TBS-T 0,1% + 5% Gloria pendant 45 minutes.
- Rincer 1x au TBS-T 0,1% + 5% Gloria et 2x au TBS-T 0,1%.
- Incuber 2 minutes la membrane dans une solution de révélation
- Placer la membrane dans une cassette d'autoradiographie et déposer sur cette membrane un film d'exposition photos ECL et exposer pendant une minute.

- Plonger le film dans du révélateur pendant quelques minutes puis rincer le dans l'eau de ville et finalement plonger le dans du fixateur.

2.5 Immunofluorescence

L'immunofluorescence consiste à détecter une protéine d'intérêt au sein des cellules par l'utilisation d'anticorps spécifiques dirigés contre la protéine d'intérêt. Des anticorps anti-immunoglobulines sont ensuite ajoutés, destinés à reconnaître les anticorps primaires. Ces anticorps secondaires sont couplés chimiquement à des fluorochromes qui, lors d'une excitation à une longueur d'onde appropriée émettent de la lumière.

2.5.1.1 Matériel :

- Plaque multi puits (Costar, New-York).
- Lamelle couvre-objet de 13 mm de diamètre (Vel, Knittel Glaser, Allemagne).
- Lames porte-objet de 2,6 x 7,6 cm (Vel, Knittel Glaser, Allemagne).
- PBS (150mM).
- PBS + BSA 2%.
- PBS + Triton X-100 1%.
- PBS + 4% PFA (Paraformaldéhyde) (Merck, Darmstadt, Allemagne).
- Anticorps primaires dilués dans du PBS + BSA 2%.
 - HIF-1 α (BD Biosciences Transduction Laboratories, USA) dilué 50x ou 100x.
 - ARNT (BD Biosciences Transduction Laboratories, USA) dilué 50x ou 100x.
 - P-Tyr 279/216 GSK3 α/β (BioSource, Belgique) (dilué 50x ou 100x)
- Anticorps secondaires : Anticorps anti-IgG de souris ou de lapin marqué au fluorochrome Alexa vert 488 ou Alexa rouge 578, dilué 500 x dans du PBS + BSA 2% (Molecular Probes, USA).
- Mowiol (Sigma-Aldrich, Allemagne-Angleterre) : milieu de montage.

2.5.1.2 Méthode :

- Repiquer les cellules HepG2 à raison de 50.000 cellules/puits (24 puits) dans le fond duquel une lamelle couvre-objet a été préalablement déposée.
- Incuber 24 hrs dans du milieu DMEM avec sérum à 37°C sous une atmosphère de 95% d'air humide et 5% de CO₂.
- Décanter le milieu et incuber les cellules 16 hrs ou 5 hrs en hypoxie et/ou en normoxie.
- Au terme de ces incubations, rincer les cellules au PBS préchauffé à 37°C.
- Ajouter du PBS + 4% PFA pendant 10 min pour fixer les cellules sur les lamelles.
- Rincer 3x avec du PBS.
- Mettre du PBS + Triton X-100 1% sur les cellules pendant 5 min pour perméabiliser les membranes et permettre l'accès des anticorps.
- Laver 3 x pendant 10 min avec du PBS+BSA10%.
- Ajouter 30 μ l d'anticorps primaires spécifiques sur un morceau de parafilm pendant 16 hrs, à 4°C et en chambre humide.
- Remettre les lamelles dans les puits et rincer 3x avec du PBS + BSA 2%.

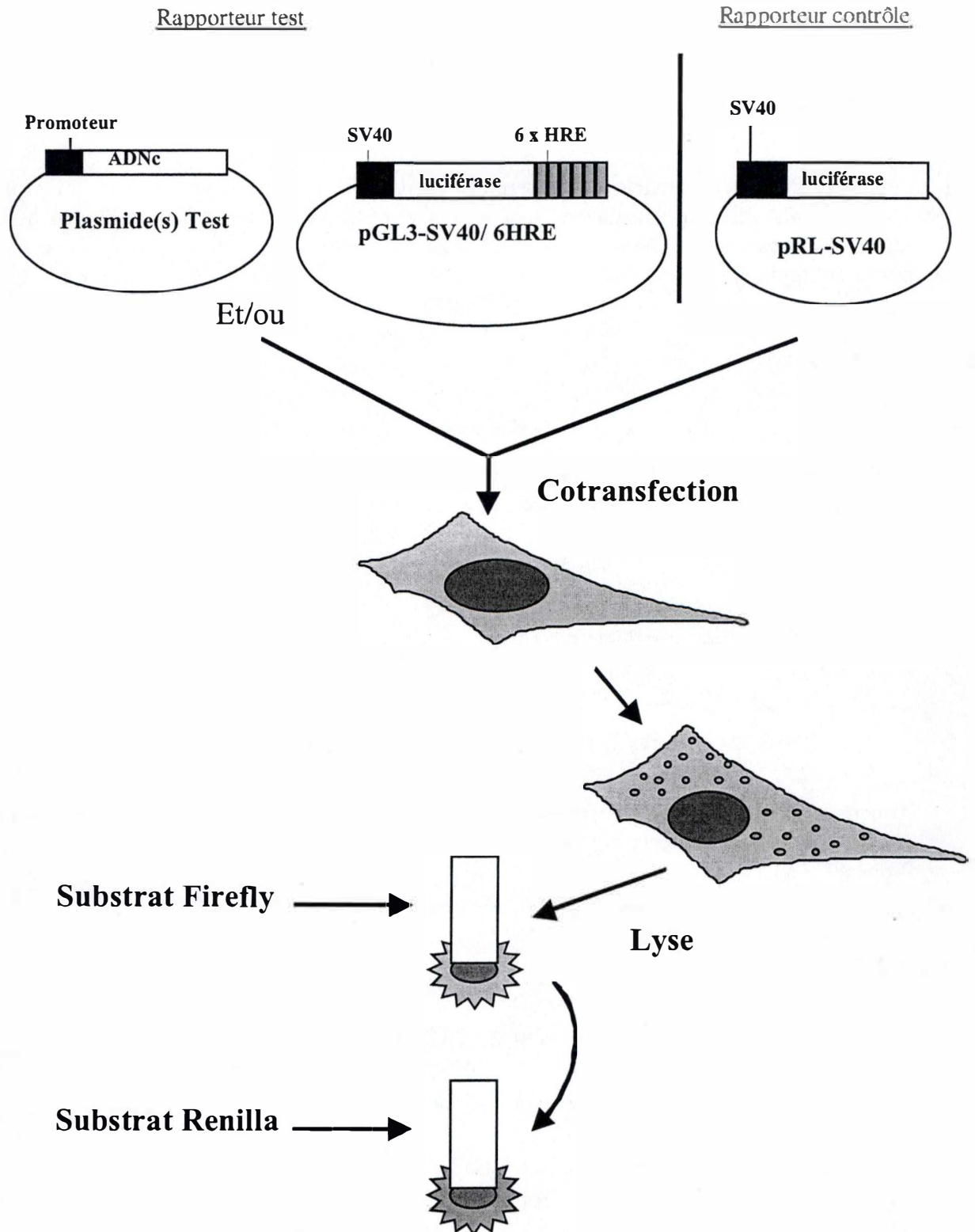


Figure II.6 : Principe du système « dual luciférase ». Les cellules sont co-transfectées avec un plasmide test et/ou un plasmide rapporteur dont l'expression de la firefly luciférase est sous la dépendance de 6 boîtes HRE (pGL3-SV40/6HRE) et avec un plasmide contrôle dont l'expression de la renilla luciférase est constitutive (pRL-SV40). L'activité des deux luciférases peut être mesurée séquentiellement dans le même lysat cellulaire.

- Incuber les lamelles en chambre humide avec les anticorps secondaires pendant une heure, à l'abri de la lumière pour conserver le fluorochrome.
- Rincer 2x les lamelles avec du PBS + BSA 2% et 1x avec du PBS seul.
- Monter les lamelles sur les lames porte-objet sur lesquelles il y a déjà une goutte de mowiol.
- Observer les lames au microscope confocal (Leica, Heidelberg, Allemagne).

2.6 Système rapporteur

(Kit dual luciférase reporter assay system (Promega, Madison, USA))

Cette technique est utilisée afin de mesurer l'activité d'un facteur de transcription. Les cellules sont transfectées avec deux plasmides. Le premier contient le gène rapporteur luciférase sous le contrôle de 6 boîtes HRE (pGL3-SV40/6HRE) qui représente le site de fixation pour le facteur de transcription HIF-1. L'expression de cette luciférase sera donc dépendante de l'activité transcriptionnelle de HIF-1. Le deuxième est le pRL-SV40 encodant une autre luciférase sous la dépendance d'un promoteur constitutif fort. Il servira à normaliser les valeurs pour tenir compte de la variabilité d'efficacité de transfection de puits à puits.

Ce système fait appel à l'utilisation de deux luciférases d'organismes distincts : La première est la firefly luciférase (*Photinus pyralis*) qui émet un premier signal lumineux suite à l'ajout d'un premier substrat (Luciférase Assay Reagent) et qui nous rapporte l'activité du facteur de transcription. Après ce premier signal, on ajoute le deuxième substrat (Stop&Glo) ayant pour but d'inhiber la firefly luciférase et d'initier la réaction enzymatique de la Renilla luciférase, engendrant un second signal lumineux (voir figure II.6).

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

2.6.1.1 Matériel :

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

2.6.1.2 Méthode :

- Décanter le milieu CO₂ indépendant.
- Ajouter 100 µl de PLB dans chaque puits pour lyser les cellules.
- Placer la plaque multi-puits sur un agitateur mécanique pendant 15 min.
- Ajouter 20 µl de lysat cellulaire à 100 µl de substrat de firefly.
- Effectuer la première lecture au luminomètre pendant 10 secondes.
- Ajouter 100 µl de solution Stop&Glo Reagent 1x.
- Effectuer la deuxième lecture au luminomètre pendant 10 secondes.

Les résultats sont exprimés en activité de la luciférase Firefly rapportée à l'activité de la luciférase Renilla (RF/R) pour chaque puits.

2.7 Dosage de l'activité de la β -Gal

L'interaction entre une protéine de fusion "appât"(Prot.X/GAL4 DNA-BD) et une protéine de fusion "proie"(Prot.Y/VP16 AD) permet l'expression du gène rapporteur *LacZ*. Celui-ci code pour la β -Galactosidase qui hydrolyse l'ONPG (o-nitro-phényl-galactopyranoside) en anion ONP, un produit jaune que l'on peut quantifier à une absorbance de 420 nm.

2.7.1.1 Matériel :

- plaque 96 puits (Costar, Corning, New-York,USA).
- Tampon PBS (Phosphate Buffer Saline) pH 7,5.
- M-PER (Mammalian Protein Extraction Reagent (détergent servant à lyser la membrane des cellules) (Pierce, Erembodegem, Belgique).
- Substrat β -Gal (pour 50 ml) :
 - 66,5 mg ONPG (o-nitro-phényl-galactopyranoside)
 - 3 ml NaHPO₄ 0,2 M pH 7, 3
 - 50 μ l MgCl₂ 2M
 - 45 ml H₂O
 - 350 μ l 2-mercaptoéthanol

2.7.1.2 Méthode :

- Décanter tous les puits.
- Rincer 2x les cellules avec 1 ml de PBS.
- Ajouter 100 μ l de M-PER dans chaque puits.
- Laisser incubé pendant 15 min sur l'agitateur.
- Homogénéiser le lysat.
- Mettre 50 μ l du contenu des puits dans les puits correspondants d'une nouvelle plaque 96 puits.
- Ajouter 50 μ l de substrat β -Gal dans chacun des puits.
- Placer un film adhésif sur la plaque.
- Déposer la plaque à l'obscurité et à 37°C dans la chambre chaude.
- Effectuer une lecture à 405 et à 420 nm toutes les 30 minutes jusqu'à 3 hrs maximum si la DO n'est pas assez élevée.

2.8 Marquage cytochimique de l'activité β -Gal

Kit β -Gal Staining Set (Roche, Manheim, Allemagne).

L'interaction entre une protéine de fusion "appât"(Prot.X/GAL4 DNA-BD) et une protéine de fusion "proie"(Prot.Y/VP16 AD) permet l'expression du gène rapporteur *LacZ*. Celui-ci code pour la β -Galactosidase qui hydrolyse le X-Gal en un produit bleu qui précipite dans les cellules. Les cellules exprimant ainsi la β -Galactosidase sont ainsi colorées en bleu.

2.8.1.1 Matériel :

- PBS (Phosphate Buffer Saline pH 7,4).
- Colorant X-Gal : 3-indolyl- β -D-Galactopyranoside dilué dans du DMSO
- Fixateur (pour 20 ml) :
 - 1080 μ l de formaldéhyde 37% (Merck, Darmstadt, Allemagne)
 - 160 μ l de glutaraldéhyde
 - 18,76 ml de PBS

2.8.1.2 Méthode :

- Décanter le milieu.
- Rincer 1x avec 3 ml de PBS et décanter.
- Fixer les cellules avec 2 ml de fixateur/puits pendant 15 minutes à température ambiante.
- Décanter et rincer 3x avec 2 ml de PBS.
- Ajouter 1 ml de colorant dilué/puits.
- Incuber les boîtes à 37°C et visualiser les cellules au microscope toutes les 15 minutes.
- Décanter et rincer 3x avec 2 ml du PBS.
- Observer au microscope.

RÉSULTATS
ET
DISCUSSION

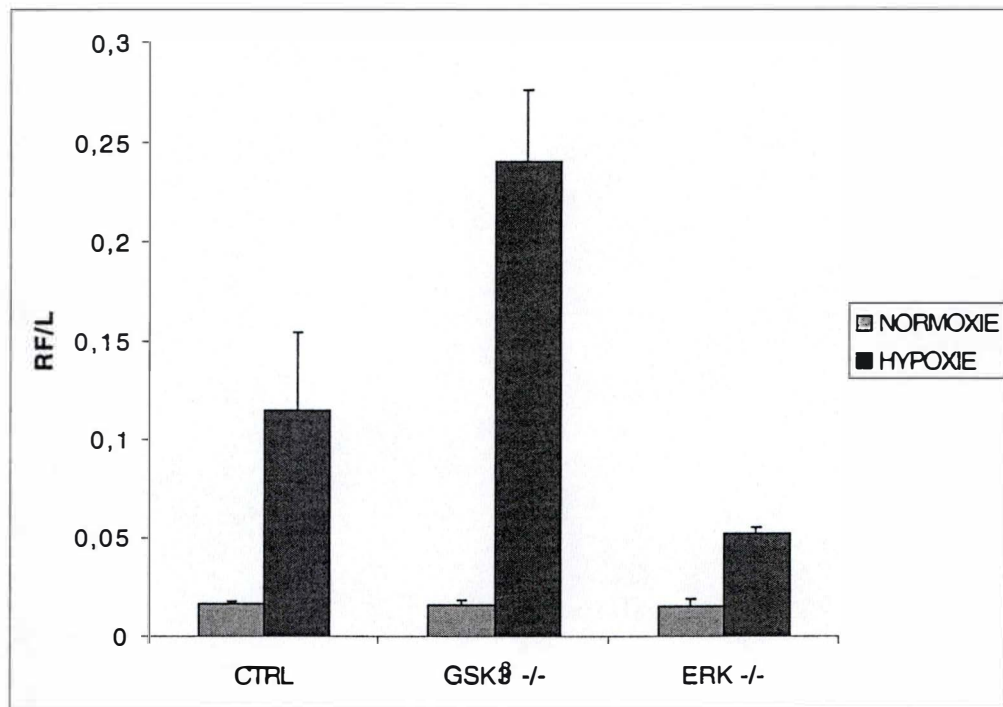


Figure III.1 : Effet de l'inhibition des kinases GSK3 β et ERK sur l'activité du facteur de transcription HIF-1. Les cellules HepG2 ont été co-transfectées avec les plasmides rapporteur firefly (pGL3-SV40/6HRE) et de normalisation renilla luciférase (pRL-SV40). Les cellules sont également transfectées soit avec le plasmide vide pCMV-Myc (CTRL), soit avec le dominant négatif de la GSK3 β (GSK3 β -/-) soit avec le dominant négatif de ERK (ERK-/-). Les cellules sont ensuite incubées en normoxie et en hypoxie pendant 16 heures. Les résultats sont exprimés en RF/L en tant que moyenne +/- 1 écart-type pour n=3.

1 Mise en évidence du rôle des kinases ERK et GSK3 β dans l'activation transcriptionnelle de HIF-1

Les connaissances actuelles concernant les voies de transduction du signal conduisant à l'activation du facteur HIF-1 suggèrent que différentes kinases sont impliquées dans cette activation. Les résultats obtenus au laboratoire indiquent que ERK1 et GSK3 β régulent respectivement de manière positive et négative l'activité de HIF-1.

Afin de confirmer l'influence des kinases ERK1 et GSK3 β sur l'activité transcriptionnelle de HIF-1, nous avons utilisé un système rapporteur spécifique de HIF-1.

Pour ce faire, les cellules HepG2 ont été co-transfectées avec un plasmide rapporteur codant pour le gène de la firefly luciférase dont l'expression est sous la dépendance de 6 boîtes HRE (pGL3-SV40/6HRE) mais également avec un plasmide de normalisation pRL-SV40 et avec le plasmide pCMV-Myc (CTRL).

Afin de tester l'influence des kinases ERK1 et GSK3 β sur l'activité transcriptionnelle de HIF-1, on substitue la transfection du pCMV-Myc par un vecteur exprimant soit un mutant dominant négatif de la GSK3 β (GSK3 $^{-/-}$), soit un mutant dominant négatif de ERK1 (ERK1 $^{-/-}$).

Après 24 heures de transfection, les cellules sont ensuite incubées en normoxie ou en hypoxie pendant 16 heures. Au terme des incubations, les cellules sont lysées et l'activité des deux luciférases est révélée au sein de la même expérience.

La figure III.1 montre qu'en normoxie, dans les conditions CTRL, l'activité luciférase est faible et correspond au niveau d'expression basale de la luciférase. L'activité de HIF-1 en normoxie est faible puisque la sous-unité HIF-1 α est dégradée par le protéasome.

Par contre, en hypoxie, l'activité de HIF-1 est plus élevée, ce qui se traduit par une augmentation de l'expression de la luciférase. En effet, en hypoxie, HIF-1 α est stabilisé car elle n'est plus dégradée par le protéasome. Elle peut-être transloquée vers le noyau et dimériser avec ARNT pour former un facteur de transcription HIF-1 actif.

La surexpression du mutant dominant négatif de la GSK3 induit une augmentation de l'expression de la luciférase en hypoxie. Ceci suggère que l'inhibition de l'activité de la GSK3 augmente l'activité transcriptionnelle de HIF1 et ce, via la stabilisation de la sous-unité HIF-1 α (Mottet *et al.*, sous presse).

Les cellules co-transfectées avec le dominant négatif de ERK1 $^{-/-}$ présentent en hypoxie une diminution de l'expression de la luciférase témoignant d'une diminution de l'activité transcriptionnelle de HIF-1. Ce résultat indique que ERK est nécessaire à l'activation de HIF-1 en hypoxie. Il est à noter que ces deux mutants n'ont pas d'effet en condition de normoxie.

Ces résultats montrent que les kinases ERK et GSK3 β influencent l'activité transcriptionnelle de HIF-1 mais aucun argument ne démontre actuellement une interaction directe entre ces kinases et HIF-1 α , la sous-unité régulable par l'hypoxie.

2 Préliminaire : Choix du modèle cellulaire

Les cellules CHO ont été choisies comme modèle cellulaire pour développer le test d'interaction double hybride en cellules de mammifère et ce pour différentes raisons.

D'une part, elles possèdent une grande capacité proliférative. D'autre part, des interactions protéine-protéine peuvent être mises en évidence qui par la présence de mécanismes de régulation post-traductionnels éventuellement absents dans d'autres organismes hôtes.

Finalement, de nombreuses interactions ont déjà été mises en évidence dans ce type cellulaire et constitue un modèle de choix pour développer un test

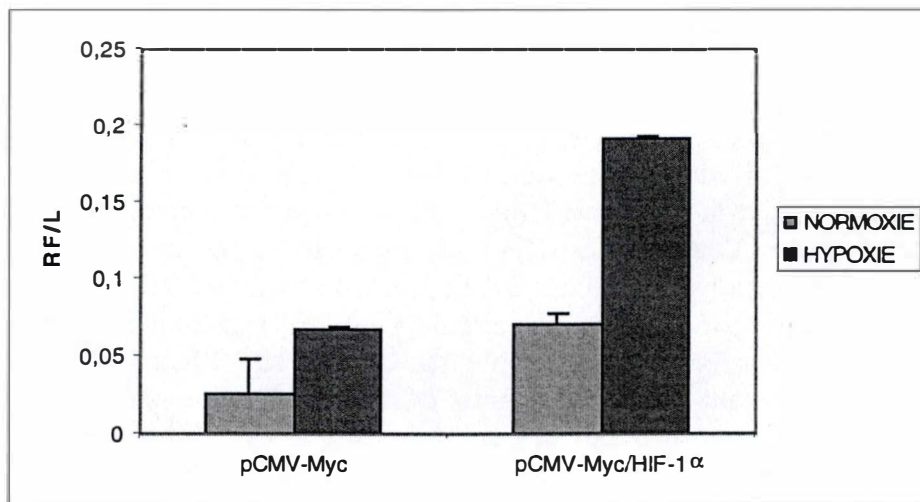


Figure III.2 : Effet de l'hypoxie sur l'activité de HIF-1 dans les cellules CHO. Les cellules CHO ont été co-transfectées avec les plasmides rapporteur firefly luciférase (pGL3-SV40/6HRE) et de normalisation renilla luciférase (pRL-SV40). Les cellules sont également transfectées soit avec le plasmide pCMV-Myc, soit avec le plasmide pCMV-Myc/HIF-1 α dans le but de surexprimer la sous-unité HIF-1 α dans la cellule. 24 heures après la transfection, les cellules sont incubées en normoxie ou en hypoxie pendant 16 heures. Les résultats sont exprimés en RF/L en tant que moyennes +/- 1 écart-type pour n=3.


Interaction	Plasmide appât	Plasmide proie	Plasmide rapporteur
Ctrl +	pGAL4 -VP16		pGAL/lacZ
Positive	pGAL4 -53	pVP16-LgT	pGAL/lacZ
Négative	pGAL4 -53	pVP16-CP	pGAL/lacZ

Figure III.3 : Tableau représentant les plasmides contrôles fournis par Invitrogen permettant de vérifier la fonctionnalité du test d'interaction double hybride en cellules de mammifères.

d'interaction en cellules de mammifère (Dang *et al.*, 1991), (Fearon *et al.*, 1992), (Vasavada *et al.*, 1991).

2.1 Mise en évidence de la réponse à l'hypoxie des cellules CHO

Avant de nous lancer dans les tests d'interaction proprement dits, nous avons voulu déterminer si les cellules CHO étaient capables de répondre à l'hypoxie c'est-à-dire voir si elles possédaient potentiellement tous les partenaires et les mécanismes de régulation post-traductionnels essentiels à l'activation de HIF-1 dans ces conditions.

Pour se faire, nous avons réalisé un système rapporteur identique à celui utilisé ci-dessus. Toutefois, nous avons également surexprimé la sous-unité HIF-1 α afin de voir si l'on pouvait également augmenter l'activité de HIF-1 en normoxie comme cela a été démontré dans d'autres types cellulaires.

Pour cela, les cellules CHO ont été transfectées avec les deux plasmides rapporteur pGL3-SV40/6HRE et le plasmide de normalisation pRL-SV40. Les cellules sont également transfectées avec le plasmide pCMV-Myc/HIF-1 α ou le plasmide pCMV-Myc comme contrôle négatif.

La surexpression de HIF-1 α dans la cellule engendre une activité de HIF-1 deux fois plus importante en normoxie par rapport aux cellules ne surexprimant pas cette sous-unité (figure III.2). Dans ce cas, la quantité de HIF-1 α exprimée est très importante, ce qui sature le protéosome. HIF-1 α s'accumule alors et peut former un facteur de transcription actif.

Dans les cellules ne surexprimant pas HIF-1 α , l'activité de HIF-1 est augmentée d'environ deux fois en hypoxie. Par contre, celle-ci est nettement plus grande dans les cellules exprimant HIF-1 α , résultant d'une activité endogène de HIF-1 additionnée à celle médiée par la surexpression de HIF-1 α .

En conclusion, les cellules CHO répondent positivement à l'hypoxie car HIF-1 est bien activé lors d'une diminution de la concentration en oxygène.

On peut donc suggérer que les mécanismes de régulation post-traductionnels sont bien présents dans les cellules. Les cellules CHO sont donc adéquates pour mettre en évidence des interactions protéine-protéine dans le cadre de la voie d'activation de HIF-1. Nous pouvons donc utiliser ces cellules pour tester des interactions potentielles entre des kinases régulatrices de l'activité de HIF-1 et la sous-unité régulée par l'hypoxie à savoir HIF-1 α .

2.2 Vérification de la fonctionnalité du système double hybride dans les cellules CHO et mise au point de la mesure de l'activité β -Gal

Avant de tester les interactions entre protéines potentiellement impliquées dans la régulation de l'activité du facteur de transcription HIF-1, nous avons testé les interactions proposées par Invitrogen comme interaction positive et interaction négative afin de nous assurer de la faisabilité et de la reproductibilité du test d'interaction double hybride.

Trois contrôles ont été fournis pour vérifier la fonctionnalité du kit (figure III.3):

- En tant que contrôle positif, nous avons utilisé le plasmide pGAL4-VP16 qui code pour une protéine de fusion entre le domaine de liaison de GAL4 (GAL4 DNA-BD) et le domaine d'activation de VP16 (VP16 AD).
- En tant qu'interaction positive, nous avons utilisé le plasmide "appât" pGAL4-53 codant pour la protéine p53 fusionnée avec le domaine de liaison à l'ADN de GAL4 (GAL4

Paramètres	Conditions testées	Résultats observés	Conditions conservées
Densité cellulaire	* 50.000 cellules par puits/ 24 hrs de transfection * 150.000 cellules par puits/ 24 hrs de transfection	* Mortalité cellulaire * Mortalité cellulaire	150.000 cellules par puits
Quantité d'ADN	* 0,5 µg de pl. rapporteur 0,2 µg de pl. appât 0,2 µg de pl. proie * 0,5 µg de pl. rapporteur 0,4 µg de pl. appât 0,4 µg de pl. proie	* Taux de transfection faible * Taux de transfection élevé	- 0,5 µg de pl. rapporteur - 0,4 µg de pl. « appât » - 0,4 µg de pl. « proie »
Temps de transfection	* 24 hrs de transfection * 24 hrs : - 8 hrs de transfection - 16 hrs de récupération * 48 hrs : -8 hrs de transfection - 40 hrs de récupération	* Mortalité cellulaire élevée * Taux de transfection élevé * Dosage activité β-Gal similaire	24 hrs : - 8 hrs de transfection -16 hrs de récupération
Lecture	* 405 nm * 420 nm	* Signal faible * Signal élevé	420 nm

Figure III. 4 : Tableau représentant les paramètres de transfection et de dosage d'activité enzymatique de la β-Galactosidase testés et optimisés.

DNA-BD) et le plasmide "proie" pVP16-LgT qui code pour l'antigène T fusionné avec le domaine d'activation de VP16 (VP16 AD). En effet, on sait que ces deux protéines sont capables d'interagir l'une avec l'autre.

- En tant qu'interaction négative, nous avons utilisé le plasmide "appât" pGAL4-53 codant pour la protéine p53 en fusion avec le domaine de liaison à l'ADN de GAL4 (GAL4 DNA-BD) et le plasmide "proie" pVP16-CP codant pour la protéine CP de paroi du virus polyoma fusionné avec le domaine d'activation de VP16 (VP16 AD). Ces deux protéines sont connues pour ne pas interagir l'une avec l'autre.

Pour ces trois types d'interaction, le plasmide rapporteur utilisé est le pGAL/LacZ qui contient les sites de reconnaissance pour le domaine de liaison du facteur de transcription de GAL4 et la β -galactosidase comme gène rapporteur.

2.2.1 Paramètres testés et optimisés

Tous les paramètres qui pouvaient avoir une influence sur la transfection et la mesure de l'activité β -Galactosidase ont dû être optimisés afin d'obtenir un résultat adéquat et reproductible. Les résultats de ces mises au point sont résumés à la figure III.4.

Parmi ces paramètres, le premier que nous avons testé est la densité cellulaire. Nous avons d'abordensemencé les cellules CHO dans une boîte 24 puits à une densité cellulaire de 50000 cellules par puits avec un temps de transfection de 24 heures mais dans ce cas, on obtenait un taux de mortalité cellulaire élevé. Nous avons alorsensemencé les cellules à une densité de 150000 cellules par puits avec un temps de transfection de 24 heures également; nous obtenions toujours un taux de mortalité élevée.

En conclusion, il est apparu que ce n'était pas la densité cellulaire qui était toxique pour les cellules mais le temps de transfection.

Nous avons cependant gardé une densité cellulaire de 150000 cellules par puits pour que les cellules atteignent une confluence proche de 80 à 90 %, comme recommandé pour l'agent de transfection que nous avons utilisé, la lipofectamine.

Le deuxième paramètre testé et optimisé est la quantité d'ADN transfecté.

Le système Invitrogen proposait d'utiliser pour la transfection une concentration de 0,2 μ g de plasmide "proie", 0,2 μ g de plasmide "appât" et une concentration de 0,5 μ g de plasmide rapporteur mais lorsque nous avons effectué la mesure de l'activité β -Galactosidase, nous n'obtenions pas une activité élevée. Nous avons alors augmenté la quantité de plasmide transfecté en utilisant toujours une concentration de 0,5 μ g de plasmide rapporteur mais une concentration de 0,4 μ g de plasmide appât et de plasmide proie. Dans ce cas, le taux de transfection était nettement supérieur et l'activité mesurée plus importante.

Le troisième paramètre étudié a été le temps de transfection.

Nous avons commencé avec un temps de transfection de 24 heures comme suggéré par Invitrogen afin de laisser un temps suffisant à l'ADN pour pouvoir rentrer dans les cellules ; mais comme nous l'avons dit plus haut, un temps de transfection de 24 heures est toxique pour les cellules. Nous avons alors décidé de scinder ce temps de transfection en deux . Un temps de transfection de 8 heures dans du milieu α -MEM seul suivi d'une phase de récupération des cellules de 16 heures dans du milieu α -MEM +7% de sérum.

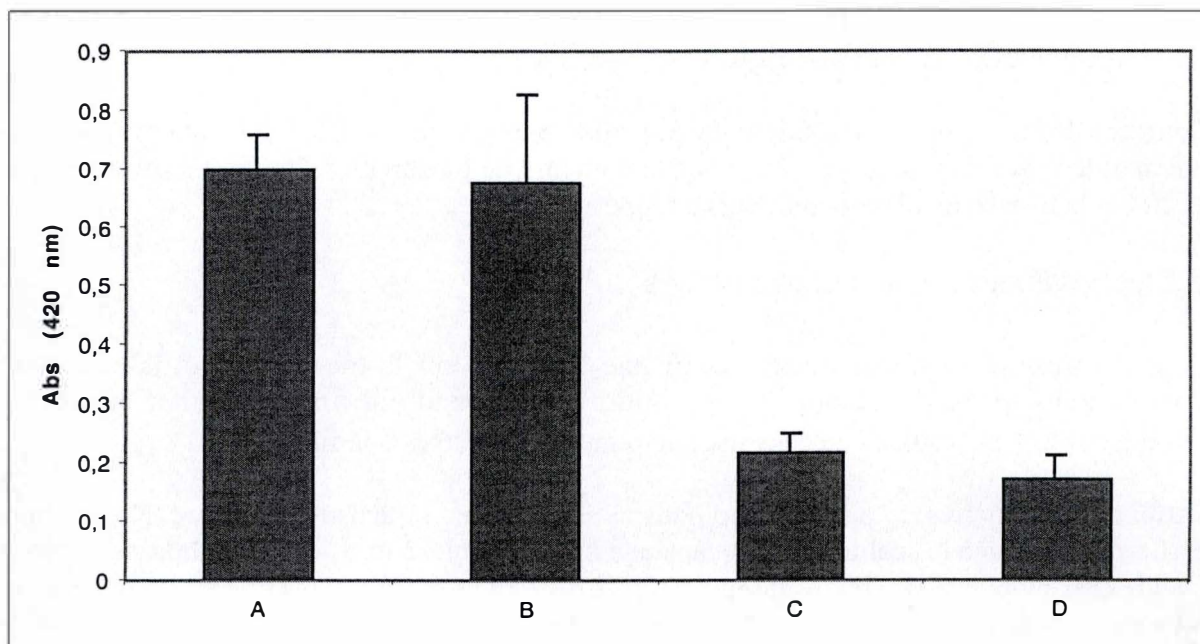


Figure III.5 : Test d'interaction dans les cellules CHO des contrôles positif et négatif fournis par Invitrogen. Les cellules CHO ont été transfectées avec les plasmides contrôles provenant d'Invitrogen selon les conditions optimisées décrites à la figure III.4. Une mesure de l'activité β -galactosidase a ensuite été réalisée. Les résultats sont exprimés en unités d'absorbance à 420 nm en tant que moyennes \pm 1 écart-type pour $n=3$.

- A. CTRL + : pGAL4-VP16
- B. Interaction positive : pGAL4-53/pVP16-LgT
- C. Interaction négative : pGAL4-53/pVP16-CP
- D. CTRL- : Pas de plasmide

Un temps de transfection de 48 heures (également scindé en 8 hrs de transfection et 40 hrs de récupération) a été également expérimenté afin d'augmenter encore le signal mais nous obtenions une activité β -gal identique à celle obtenue dans les conditions présentées ci-dessus. Nous avons donc décidé de garder un temps de transfection de 24 heures scindé en 8 heures de transfection et 16 heures de récupération.

Enfin, le dernier paramètre testé a été la mesure de l'absorbance.

Au laboratoire, les lectures de l'activité enzymatique de la β -galactosidase se font généralement à une densité optique de 405 nm mais dans le système Invitrogen, il était recommandé de faire cette lecture à une longueur d'onde de 420 nm afin d'obtenir un meilleur signal. On observe qu'effectivement, les valeurs d'absorbance sont plus élevées à 420 nm. Les mesures seront donc réalisées dans la suite du travail à 420 nm.

En conclusion, ces différentes mises au point nous ont permis d'optimiser les conditions expérimentales de transfection des cellules et de mesure de l'activité β -galactosidase.

2.2.2 Tests d'interaction avec les contrôles positif et négatif

Après avoir optimisé ces différents paramètres, nous avons réalisé les tests d'interaction positive et négative proposées par Invitrogen. Les résultats obtenus sont présentés à la figure III.5.

Pour le contrôle positif qui correspond au facteur de transcription fonctionnel reconstituée par la fusion du domaine de liaison à l'ADN de GAL4 et du domaine d'activation de VP16, la transcription du gène cible du plasmide rapporteur a lieu de manière intense et on peut observer une activité β -Gal très importante.

Pour l'interaction positive, la protéine p53 fusionnée avec le domaine de liaison à l'ADN de GAL4 (GAL4 DNA-BD) est capable d'interagir avec l'antigène T fusionné avec le domaine d'activation de VP16 (VP16 AD).

Dans ce cas, le facteur de transcription est reconstitué, se lie à l'ADN, recrute la machinerie basale de transcription et peut induire la transcription du gène cible. En effet, on voit que dans ce cas, l'activité β -Gal est quasi identique à l'activité que nous avons observée pour le contrôle positif.

Pour l'interaction négative, la protéine p53 fusionnée avec le domaine de liaison à l'ADN de GAL4 (GAL4 DNA-BD) n'est jamais capable d'interagir avec la protéine de paroi du virus polyoma fusionnée avec le domaine d'activation de VP16 (VP16 AD).

Dans ce cas, le facteur de transcription n'est pas reconstitué et celui-ci ne peut donc pas recruter la machinerie basale de transcription et la transcription ne peut donc pas être effectuée. Sur le graphe de la figure III.5, on voit en effet que l'activité β -galactosidase est nettement inférieure à celle observée pour les conditions correspondant à l'interaction positive ou au contrôle positif.

Enfin, le dernier test effectué est le contrôle négatif dans lequel des cellules suivent le traitement en présence de lipofectamine mais où aucun plasmide n'est introduit dans le processus de transfection. On a donc l'équivalent d'un blanc et on observe en effet une activité β -galactosidase endogène assez faible.

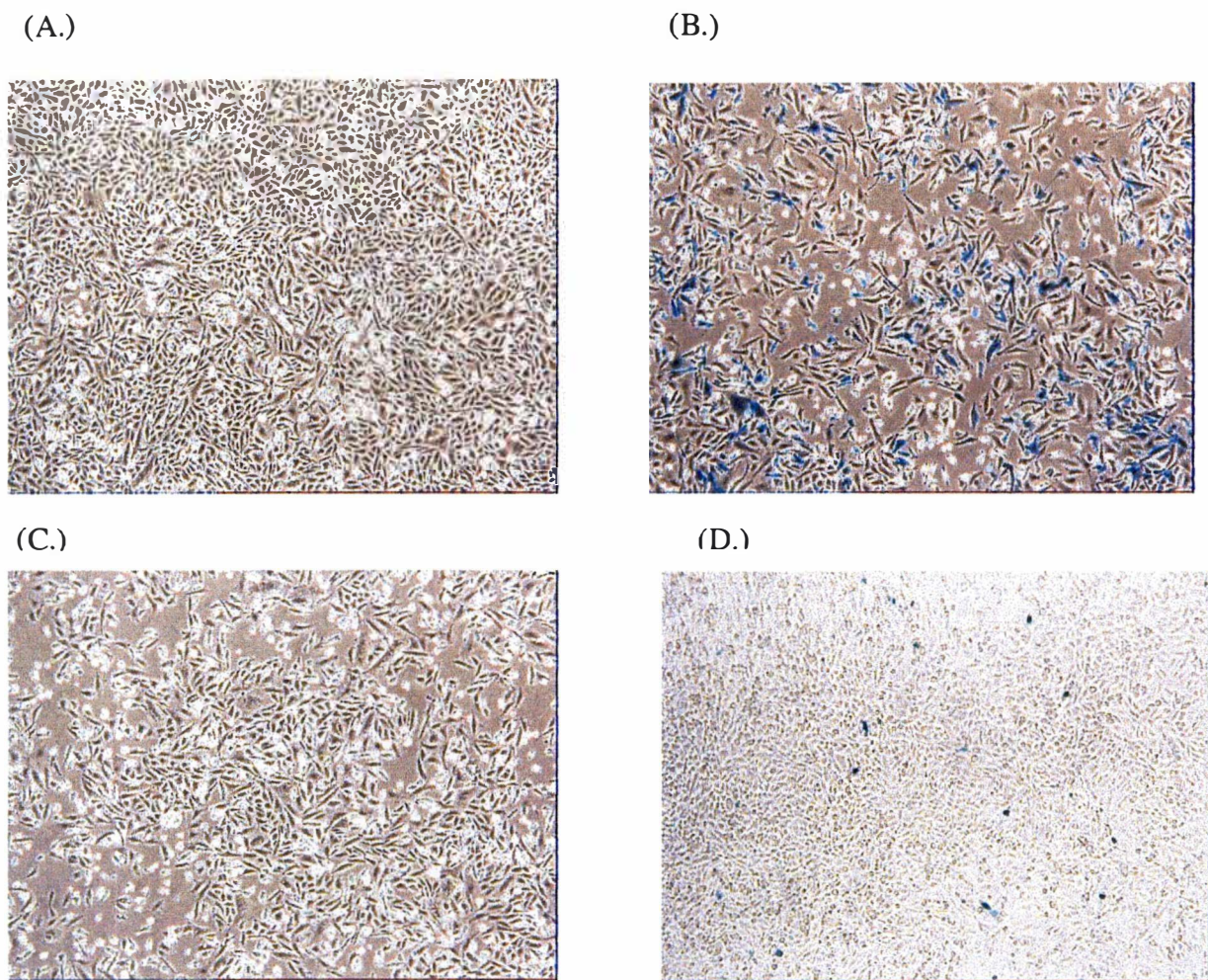
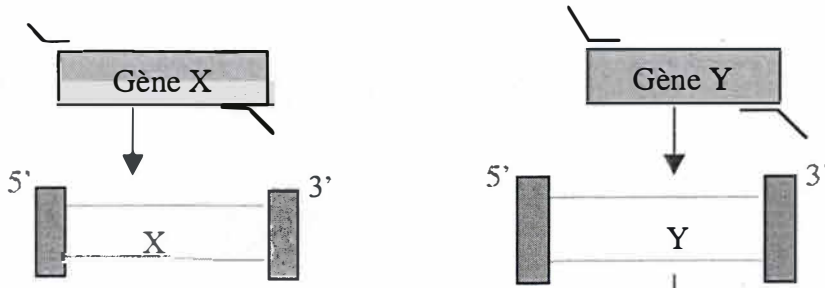


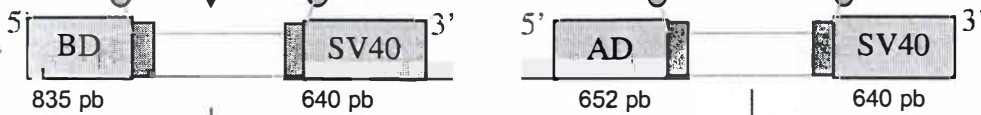
Figure III.6 : Marquage cytochimique de l'activité β -Gal sur les cellules transfectées avec les plasmides contrôles d'Invitrogen. Les cellules qui expriment la β -galactosidase, en reconstituant un facteur de transcription fonctionnel après interactions des protéines, prennent une coloration bleue en présence du substrat X-Gal.

- (A.) CTRL -
- (B.) CTRL+ : pGAL4-VP16
- (C.) Interaction négative : pGAL4-53/pVP16-CP
- (D.) Interaction positive : pGAL4-53/pVP16-LgT

1) PCR1:



2) Ligation:



3) PCR2:

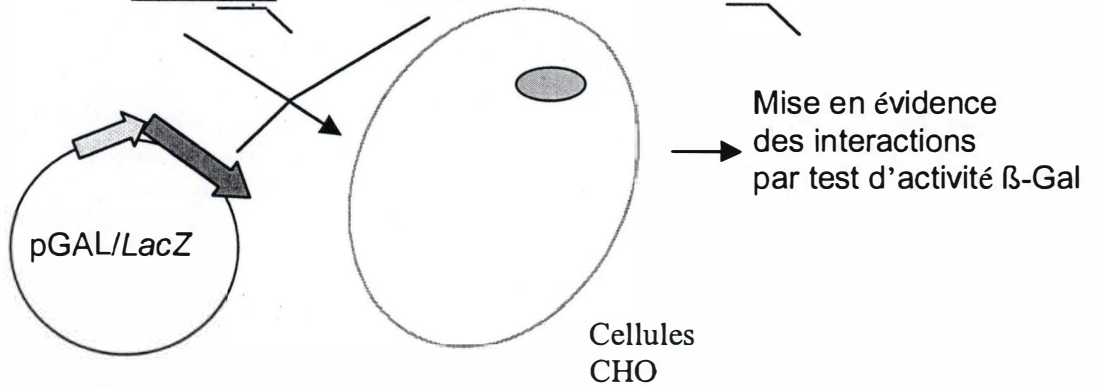
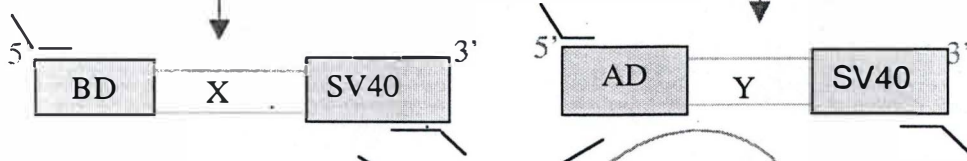


Figure III.7 : Schéma illustrant la stratégie utilisée par le système Invitrogen pour tester l'interaction entre deux protéines. Ce système comprend trois étapes : La première est une étape d'amplification par PCR de l'ADNc du gène d'intérêt en utilisant des amorces contenant des séquences d'ancrage; la deuxième est une ligation afin de fixer les domaines d'activation ou de liaison à l'ADN d'un côté et le promoteur de l'autre à la séquence d'ancrage. La dernière étape est une PCR pour amplifier le gène d'intérêt ainsi que les domaines se trouvant aux extrémités. Une fois ces constructions obtenues, celles-ci peuvent être transfectées avec le plasmide rapporteur pGal/LacZ dans les cellules CHO et les interactions seront mises en évidence par un dosage d'activité enzymatique β -galactosidase.

En conclusion, les résultats présentés ci-dessus montrent que nous sommes effectivement capables de détecter une interaction entre deux protéines avec ce système.

2.3 Mise en évidence des interactions par marquage cytochimique de l'activité β -Gal.

Les résultats obtenus ci-dessus montrent que le test d'interaction double hybride avec les plasmides contrôles est fonctionnel. Pour confirmer ces interactions, un marquage cytochimique de l'activité β -galactosidase a été réalisé (figure III.6). Les cellules exprimant la β -galactosidase et mises en présence du substrat X-Gal prennent une couleur bleue alors que les cellules ne l'exprimant pas restent blanches.

Afin de visualiser ces interactions, nous avons transfecté les cellules CHO dans une boîte 6 puits à une densité de 750000 cellules par puits. Les conditions de transfection utilisées sont les mêmes que celles que nous avons optimisées lors de la transfection réalisée en boîte 24 puits.

Pour le contrôle négatif et l'interaction négative on n'observe aucune cellule bleue, la transcription n'a en effet pas eu lieu puisque le facteur de transcription n'est pas reconstitué.

Pour le contrôle positif et l'interaction positive, on voit des cellules bleues correspondant aux cellules dans lesquelles le facteur de transcription a été reconstitué, la transcription a pu se faire et la β -galactosidase est présente.

Il est à noter qu'on observe nettement moins de cellules marquées dans le cas de l'interaction positive par rapport au contrôle positif alors que lorsqu'on mesure l'activité β -galactosidase, on n'observe pas de différence entre ces deux conditions. Une explication probable serait que dans le cas de la mesure de l'activité, le substrat ONPG est limitant. L'activité importante observée dans le cas du contrôle positif serait alors sous-estimée.

3 Clonage des protéines d'intérêt

3.1 Système Invitrogen

Comme nous avons montré que le système d'interaction double hybride proposé par Invitrogen est fonctionnel, nous avons alors entrepris les clonages des ADNc correspondant aux protéines HIF-1 α , Akt, GSK3 β et ERK dans les plasmides d'intérêt dans le but de tester les interactions entre ces différentes protéines. La première stratégie de clonage utilisée est celle proposée par la firme Invitrogen et appelée: "Mammalian Two hybrid kit with Topo Tools technology".

Le principe de ce clonage en trois étapes est le suivant (figure III.7): on amplifie par PCR l'ADNc codant pour les protéines à l'aide d'amorces 5' et 3' flanquées respectivement à leur extrémité d'une séquence nucléotidique d'ancrage A (5'-TGAGTCAAGGG-3') et d'une séquence nucléotidique d'ancrage B (5'-CGGAACAAGGG-3').

Une seconde étape de ligation va permettre de lier soit le domaine de liaison à l'ADN soit le domaine d'activation à l'extrémité 5' du produit PCR et va permettre de lier également un promoteur de type SV40 à l'extrémité 3' de ce même produit PCR.

Cette réaction est catalysée par la topoisomérase qui a pour but de créer des liens covalents entre les séquences d'ancrage présentes à la fois sur les produits PCR et sur les éléments à fixer.

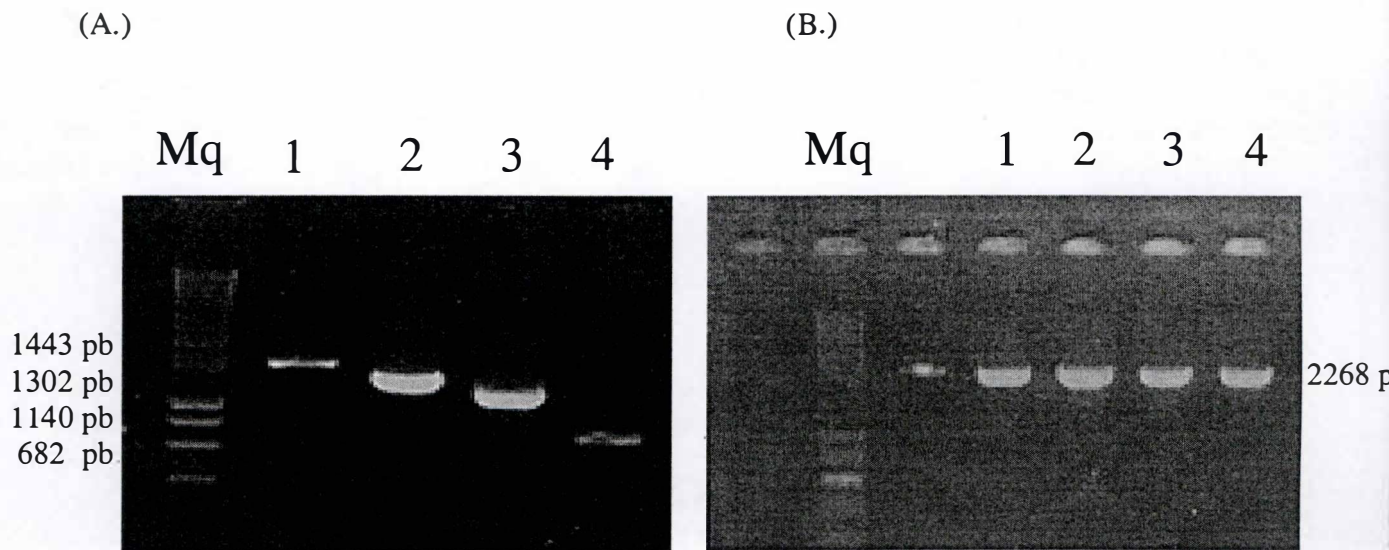


Figure III.8 : Produit des amplifications PCR de l'ADNc des protéines d'intérêt Akt, GSK3 β , ERK et HIF-1 α obtenus à partir des amorces flanquées des séquences d'ancrage A et B.

(A.) Mq : Marqueur de poids moléculaire Smart Ladder (Eurogentec).

Piste 1 : Produit PCR de l'ADNc de Akt

Piste 2 : Produit PCR de l'ADNc de GSK3 β

Piste 3 : Produit PCR de l'ADNc de ERK

Piste 4 : CTRL+ (CAT (Chloramphénicol acétyltransférase))

(B.) Mq : Marqueur de poids moléculaire Smart Ladder (Eurogentec)

Piste 1 : Produit PCR de l'ADNc de HIF-1 α

Piste 2 : Produit PCR de l'ADNc de HIF-1 α

Piste 3 : Produit PCR de l'ADNc de HIF-1 α

Piste 4 : Produit PCR de l'ADNc de HIF-1 α

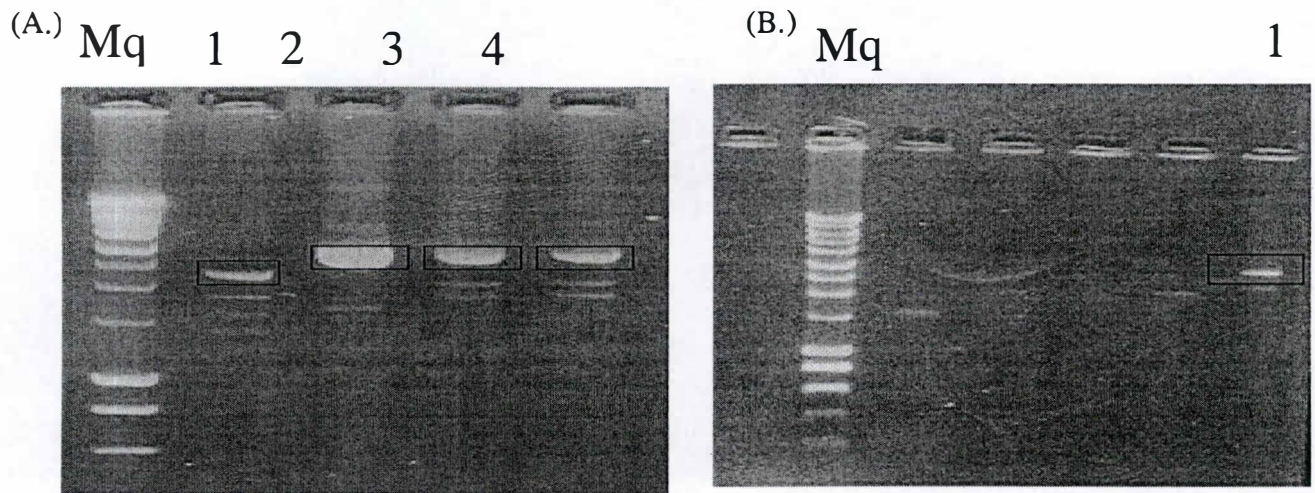


Figure III.9 : Résultats de l'amplification PCR réalisée sur les produits de ligation des gènes d'intérêt fusionnés au promoteur SV40 en 5' et au domaine de liaison à l'ADN ou au domaine d'activation en 3'.

(A.) Mq : Marqueur de poids moléculaire Smart Ladder (Eurogentec).

Piste 1 : Produit PCR du produit de ligation GAL4 DNA-BD (835 pb)-CTRL+ (CAT (663 pb)-SV40 (640 pb)).

Piste 2 : Produit de ligation VP 16 AD (2625 pb)-Akt-SV40 (640 pb)

Piste 3 : Produit de ligation GAL4 DNA-BD-GSK3 β -SV40.

Piste 4 : Produit de ligation GAL4 DNA-BD-ERK-SV40

(B.) Mq : Marqueur de poids moléculaire Smart Ladder (Eurogentec)

Piste1 : Produit PCR du produit de ligation VP16AD-HIF-1 α -SV40.

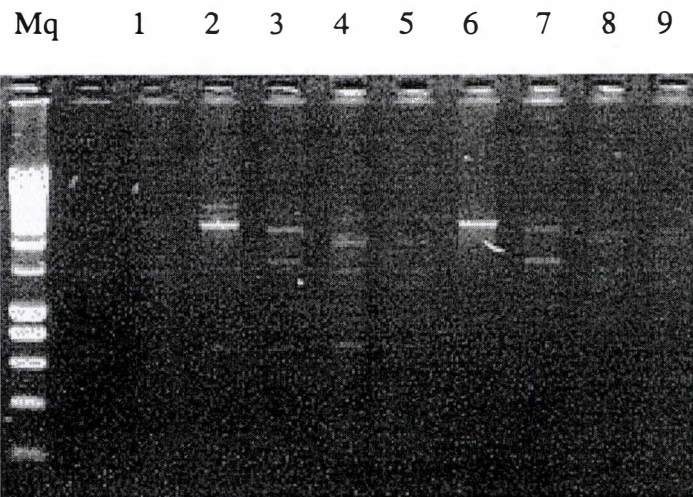


Figure III.10 : Résultats de l'amplification PCR réalisée sur les produits PCR2 obtenus après ligation du promoteur SV40 en 3' et des domaines de liaison à l'ADN (GAL4 DNA-BD) ou d'activation (VP16 AD) en 3' des gènes d'intérêt.

Mq : Marqueur de poids moléculaire Smart Ladder (Eurogentec).

Piste 1 : Produit PCR de GAL4 DNA-BD-CTRL (CAT)

Piste 2 : Produit PCR de VP16 AD-HIF-1 α -SV40

Piste 3 : Produit PCR de VP16 AD-Akt-SV40

Piste 4 : Produit PCR de VP16 AD-GSK3 β -SV40

Piste 5 : Produit PCR de VP16 AD-ERK-SV40

Piste 6 : Produit PCR de GAL4 DNA-BD-HIF-1 α -SV40

Piste 7 : Produit PCR de GAL4 DNA-BD-Akt-SV40

Piste 8 : Produit PCR de GAL4 DNA-BD-GSK3 β -SV40

Piste 9 : Produit PCR de GAL4 DNA-BD-ERK-SV40

Finalement, une deuxième PCR est réalisée afin d'amplifier le gène d'intérêt flanqué des domaines à l'extrémité 5' et du promoteur à l'extrémité 3'. Cette PCR est réalisée avec des amorces spécifiques du domaine de liaison à l'ADN, ou du domaine d'activation VP16 et du promoteur SV40.

Nous obtenons ainsi une séquence d'ADN linéaire codant pour une protéine de fusion entre la protéine d'intérêt, le domaine de liaison à l'ADN ou le domaine d'activation et un promoteur SV40.

Ces constructions peuvent être ensuite transfectées dans des cellules CHO en présence d'un plasmide rapporteur pGAL/*LacZ* et les interactions éventuelles sont mises en évidence en mesurant l'activité β -Gal.

Les résultats obtenus pour chacune des étapes sont les suivants :

La première PCR destinée à amplifier les gènes d'intérêt a bien fonctionné puisqu'on retrouve des bandes correspondant à la taille attendue pour chacun d'eux.

Sur la figure III.8, on voit effectivement des bandes de taille correspondant à 1443 pb, 1302 pb, 1140 pb, 2268 pb et 682 pb correspondant respectivement à Akt, GSK3 β , ERK, HIF-1 α et le contrôle positif fourni par Invitrogen. Il est à noter que pour HIF-1 α , le domaine basique et le domaine de transactivation N-terminal ont été tronqués afin d'éviter un effet auto-activateur potentiel de cette protéine.

Les résultats présentés à la figure III.9 correspondant à l'étape de ligation suivie de la PCR 2 réalisée avec des amorces spécifiques des domaines de liaison à l'ADN et du promoteur, et destinée à amplifier de l'ADN linéaire sur lequel sont fixés un domaine d'activation ou de liaison à l'ADN en 5' ainsi qu'un promoteur en 3' du gène d'intérêt. Ils montrent que pour chacun des gènes d'intérêt, il y a effectivement une bande ayant un poids moléculaire correspondant à la taille du gène d'intérêt additionné par la taille des fragments ajoutés à chaque extrémité. Ces résultats suggèrent que la ligation s'est réalisée correctement.

Afin d'obtenir suffisamment de matériel pour réaliser les transfections dans les cellules CHO, il faut réamplifier les amplicons obtenus après cette deuxième PCR. Pour cela, les mêmes amorces utilisées dans cette PCR 2 sont utilisées.

Cependant, nous avons rencontré des problèmes au niveau de la dernière PCR. En effet, lorsque nous avons voulu réamplifier les amplicons issus des produits ligués, nous n'avons pas obtenu de bande correspondant à la taille attendue (Figure III.10).

Plusieurs autres expériences semblables ont été réalisées en modifiant différents paramètres de l'étape de ligation tels que le temps de ligation et les rapports insert/ fragments à ajouter. Nous avons également joué sur les conditions de la PCR 2 en changeant la température et le rapport amorces/ ADN mais aucune amplification n'a pu être obtenue.

Une des raisons pour laquelle ce clonage n'a pas fonctionné pourrait être le fait que la réaction de ligation n'est pas suffisamment stable pendant la PCR et donc que les domaines d'activation ou de binding ainsi que le promoteur ne seraient pas fixés aux séquences d'ancrage pendant un temps suffisamment long que pour permettre l'amplification de l'entièreté de la construction par PCR, même si celle-ci est réalisée tout de suite après. Les produits visibles sur les gels de la figure III.9 ne seraient donc probablement pas des amplicons générés par la PCR 2 mais les produits de ligation eux-mêmes.

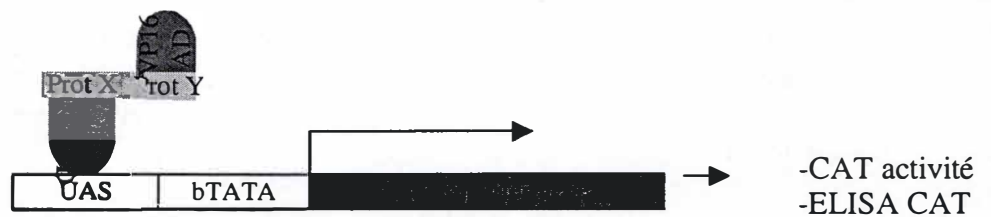
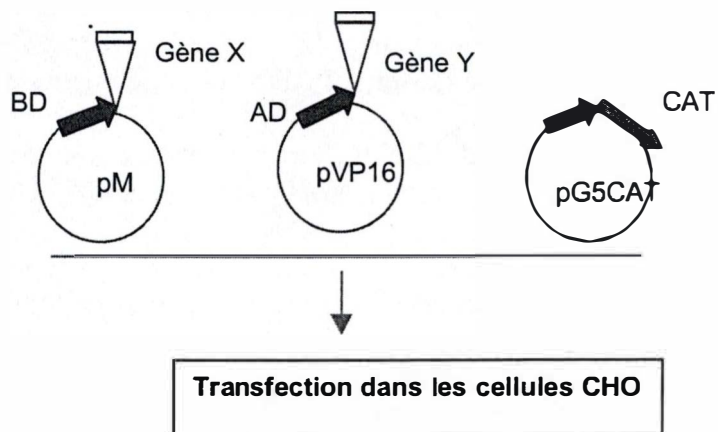


Figure III.11 : Schéma représentant la stratégie de clonage utilisée pour cloner les gènes d'intérêt dans le système Clontech.

Le gène d'intérêt X est cloné dans le plasmide pM en amont du domaine de liaison de GAL4 (GAL4 DNA-BD) et le gène d'intérêt Y est cloné dans le plasmide pVP16 en amont du domaine d'activation de VP16 (VP16 AD).

Ces deux plasmides sont transfectés dans les cellules CHO avec le plasmide pG5CAT et les interactions sont mises en évidence pour une mesure de l'activité CAT ou de l'abondance de la protéine CAT.


Interaction	Plasmide appât	Plasmide proie	Plasmide rapporteur
Ctrl +	pM - VP16		pG5CAT pGAL/lacZ
Positive	pM - 53	pVP16-LgT	pG5CAT pGAL/lacZ
Négative	pM - 53	pVP16-CP	pG5CAT pGAL/lacZ

Figure III.12 : Tableau représentant les plasmides contrôles fournis par le système Clontech pour vérifier la fonctionnalité du système double hybride en cellules de mammifères.

Une autre stratégie (Mammalian Matchmaker Two Hybrid Assay Kit de chez Clontech) a alors été mise en place afin de pouvoir cloner les gènes d'intérêt, non plus sous forme d'ADN linéaire mais au sein de plasmides circulaires par un système de clonage dont le principe est développé au point suivant.

3.2 Système Clontech

Ce système consiste à introduire à l'intérieur d'un plasmide pM un gène d'intérêt X, en amont du domaine de liaison à l'ADN du facteur de transcription GAL4. De la même manière, le gène d'intérêt Y dont nous voulons tester l'interaction contre le gène X, est cloné à l'intérieur du plasmide pVP16, en amont du domaine d'activation du facteur de transcription VP16 (Figure III.11).

Ces deux plasmides sont co-transfectés via la lipofectamine dans des cellules CHO (dans les mêmes conditions que pour le système Invitrogen) avec le plasmide rapporteur pG5CAT dans lequel l'expression de la chloramphénicol acétyltransférase est sous la dépendance du promoteur GAL4.

Si la protéine X fusionnée au GAL4 DNA-BD est capable d'interagir avec la protéine Y liée à VP16 AD, un facteur de transcription fonctionnel est reconstitué et le gène rapporteur CAT peut être transcrit.

L'activité de ce gène rapporteur peut être mesurée par un ELISA qui détecte la protéine CAT ou par une mesure de l'activité CAT qui utilise le chloramphénicol radioactif comme substrat.

3.2.1 Vérification de la fonctionnalité du kit double hybride Clontech par l'utilisation d'un système rapporteur *lacZ* (pGAL/*LacZ*)

Comme pour le système Invitrogen, des plasmides contrôles ont été fournis par Clontech afin de pouvoir vérifier la fonctionnalité du système (voir Figure III.12).

En tant que contrôle positif, nous avons utilisé le plasmide pM-VP16 qui code pour le facteur de transcription non disrupté.

Comme interaction positive, nous avons utilisé le plasmide "appât" pM-53 codant pour la protéine p53 fusionnée au domaine de liaison de GAL4 et qui est censée interagir avec l'antigène T en fusion avec le domaine d'activation de VP16 encodé par le plasmide "proie" pVP16-LgT. Le facteur de transcription étant reconstitué, la transcription du gène rapporteur peut avoir lieu.

Enfin, l'interaction négative est représentée par le plasmide "appât" pM-53 codant pour la protéine p53 en fusion avec le domaine de liaison de GAL4 qui n'interagit jamais avec la protéine de paroi du virus polyoma (en fusion au domaine d'activation de VP16) codée par le plasmide proie pVP16-CP. Ces deux protéines ne pouvant pas interagir, le facteur de transcription n'est pas reconstitué et la transcription du gène rapporteur ne peut pas se faire.

Le plasmide rapporteur que le système Clontech proposait était le pG5CAT qui encode le gène rapporteur CAT sous la dépendance de boîtes GAL4 UAS. Comme nous avons mis au point les interactions pour le système Invitrogen avec le plasmide rapporteur pGAL/*LacZ*, nous nous sommes demandés si nous ne pouvions pas tester ces interactions avec ce dernier plasmide puisque les promoteurs de ces deux plasmides rapporteurs sont les mêmes et que la mesure de l'activité β -Gal est techniquement plus facile que celle de l'activité CAT.

Nous avons donc testé les interactions en utilisant les plasmides encodant les protéines de fusion mentionnés ci-dessus avec le plasmide rapporteur pGAL/*LacZ* après un temps de

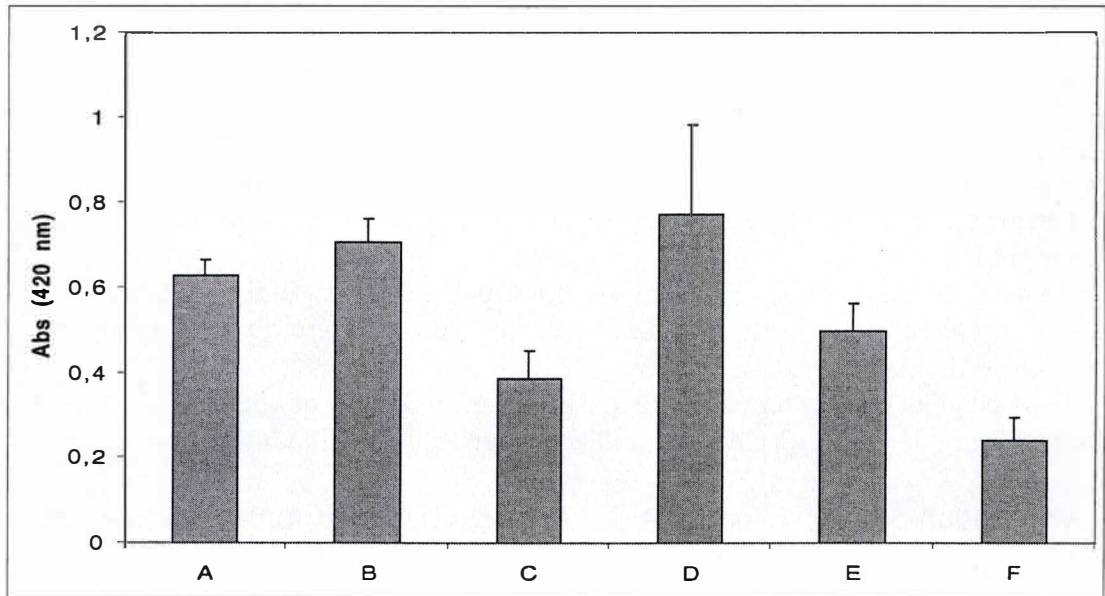


Figure III.13 : Mesure de l'activité β -galactosidase dans les cellules CHO transfectées avec les plasmides contrôles provenant d'Invitrogen et de Clontech. Les résultats sont exprimés en unités d'absorbance à 420 nm en tant que moyennes \pm 1 écart-type pour $n=3$.

- A : CTRL + : pGAL4-VP16 (Invitrogen)
- B : Int + : pGAL4-53/pVP16-LgT (Invitrogen)
- C : Int - : pGAL4-53/pVP16-CP (Invitrogen)
- D : CTRL + : pM-VP16 (Clontech)
- E : Int - : pM-53/pVP16-LgT (Clontech)
- F : Int - : pM-53/pVP16-CP (Clontech)

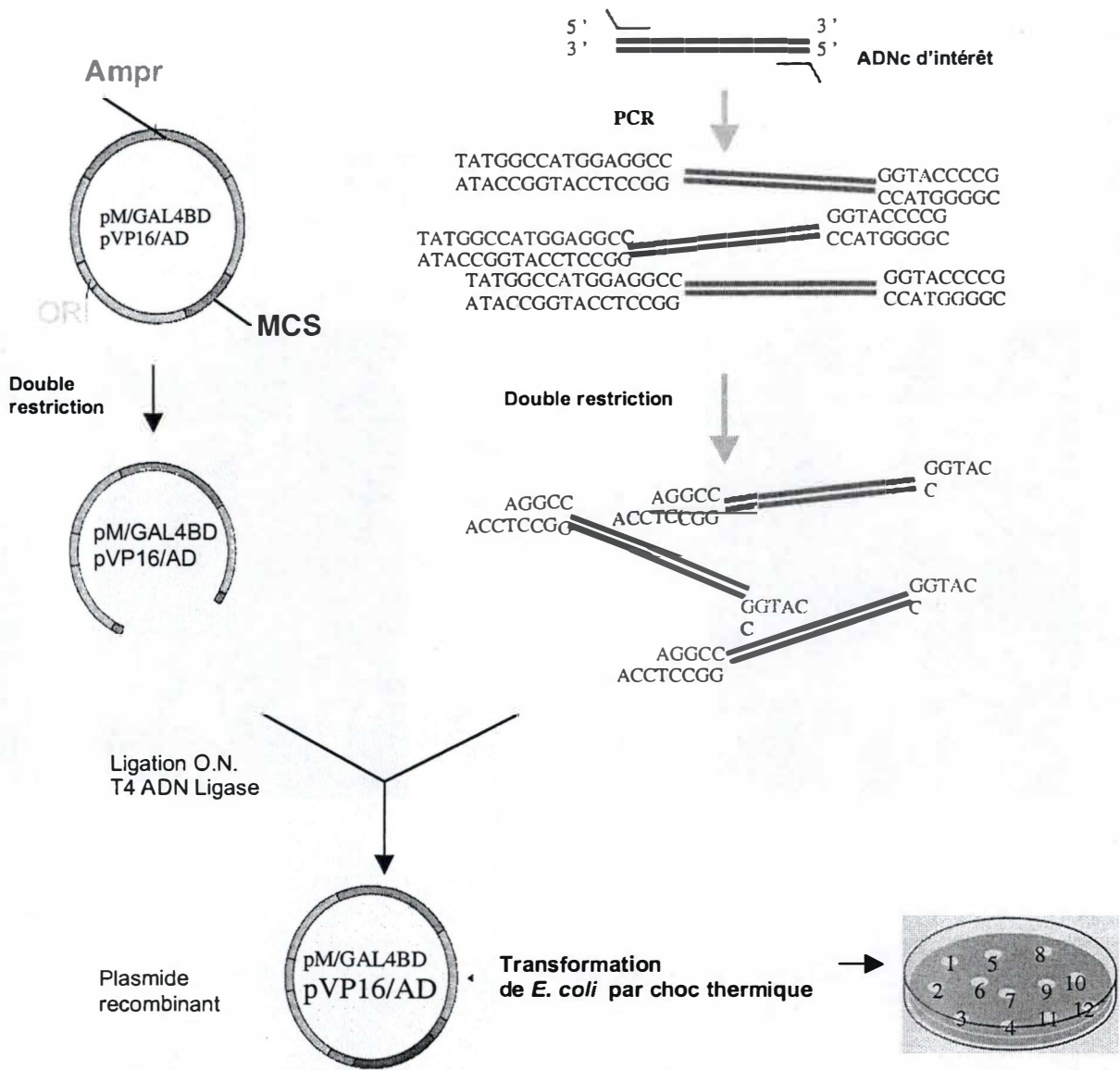


Figure III.14 : Schéma illustrant la stratégie de clonage utilisée pour cloner les ADNc d'intérêt dans les vecteurs d'expression commercialisés par Clontech.

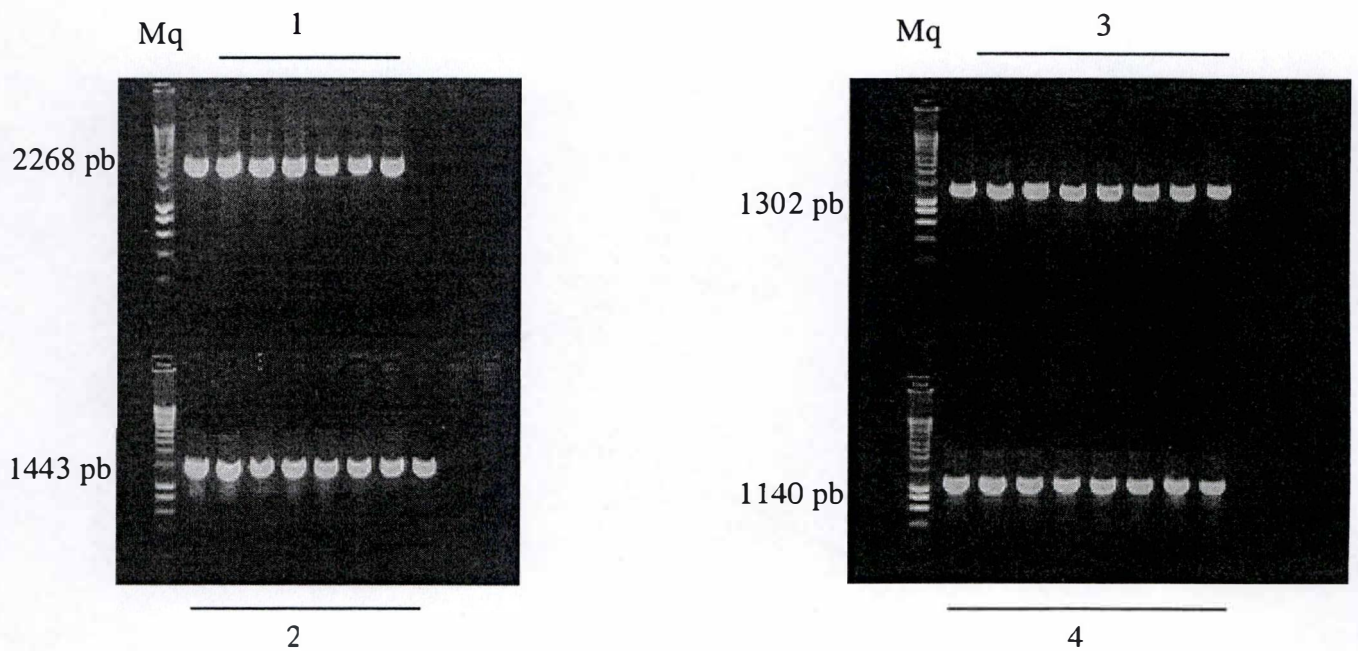


Figure III.15 : Produits des amplifications PCR de l'ADNc des protéines d'intérêt Akt, GSK3 β , ERK et HIF-1 α effectué via des amorces flanquées de sites restriction.

Mq : Marqueur de poids moléculaire Smart Ladder (Eurogentec)

Piste 1 : Produit PCR de l'ADNc de HIF-1 α

Piste 2 : Produit PCR de l'ADNc de Akt

Piste 3 : Produit PCR de l'ADNc de GSK3 β

Piste 4 : Produit PCR de l'ADNc de ERK

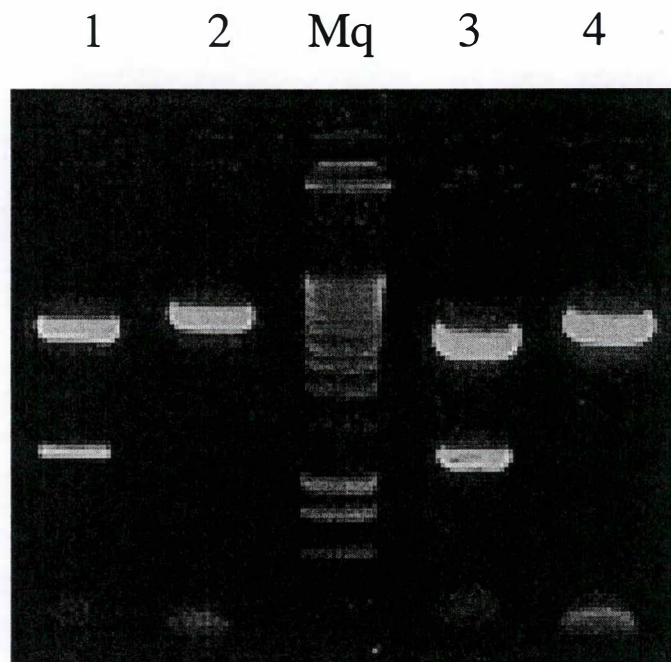


Figure III.16 : Profil de restriction par EcoRI/PstI et Hind III des clones GSK3 β -GAL4 DNA-BD et ERK-GAL4 DNA-BD.

Piste 1 : ADN plasmidique du clone 1 GSK3 β GAL4 DNA-BD digéré par EcoRI/PstI

Piste 2 : ADN plasmidique du clone 1 GSK3 β GAL4 DNA-BD digéré par Hind III

Mq : Marqueur de poids moléculaire : Smart Ladder (Eurogentec)

Piste 3 : ADN plasmidique du clone 5 ERK-GAL4 DNA-BD digéré par EcoRI/PstI

Piste 4 : ADN plasmidique du clone 5 ERK-GAL4 DNA-BD digéré par HindIII

transfection de 24 heures scindé en 8 heures de transfection et 16 heures de récupération. L'activité β -Gal a ensuite été mesurée à 420 nm et comparée avec celle obtenue lorsque les interactions positive et négative sont testées avec les plasmides du système Invitrogen.

Les résultats de la figure III.13 montrent que pour le contrôle positif qui représente le facteur de transcription non disrupté, on observe une très forte activité β -Gal pour le système Clontech ainsi que pour le système Invitrogen.

Pour l'interaction positive, les protéines de fusion "appât" et "proie" respectivement appelées (p53-GAL4 DNA-BD et l'antigène T-VP16 AD) sont capables d'interagir et donc de reconstituer le facteur de transcription fonctionnel. Ainsi, on observe une forte activité β -Gal pour le système Invitrogen et un peu plus faible pour le système Clontech.

L'interaction négative représentée par la protéine de fusion p53-GAL4 DNA-BD et par la protéine de fusion de paroi du virus polyoma CP-VP16 AD ne sont pas capables d'interagir et ne reconstituent donc pas un facteur de transcription actif. C'est la raison pour laquelle on observe une activité β -Gal pour les deux systèmes nettement inférieure à celle observée pour l'interaction positive ou le contrôle positif.

En conclusion, le plasmide rapporteur pGAL/*LacZ* peut être utilisé pour tester les interactions dans le système Clontech. Il est à noter que les résultats que nous avons obtenus pour le premier système Invitrogen sont reproductibles d'une expérience à l'autre.

3.2.2 Stratégie de clonage

De manière générale, la stratégie de clonage (Figure III.14) utilise deux sites de restriction différents présents dans le site multiple de clonage des vecteurs pM et pVP16 mais absents de l'ADNc des protéines d'intérêt. L'emploi des deux sites de restriction différents va permettre de forcer l'orientation du gène d'intérêt à l'intérieur du plasmide.

Nous avons donc amplifié par PCR chacun des gènes d'intérêt avec des couples d'amorces flanquées de sites de restriction différents. On peut remarquer sur le gel d'agarose représenté à la figure III.15 que la taille du fragment amplifié pour le gène codant pour la protéine HIF-1 α , Akt, GSK3 β et ERK1 correspond à la taille attendue c'est-à-dire respectivement 2268 pb, 1443 pb, 1302 pb et 1140 pb.

Ces amplicons ont été digérés avec les deux enzymes de restriction adéquates. Parallèlement, les vecteurs d'expression pM GAL4 DNA-BD et VP16 AD ont été digérés avec les enzymes de restriction identiques à celles utilisées pour le gène d'intérêt à cloner.

La ligation du gène d'intérêt avec le plasmide a été réalisée pendant 16 heures à 4°C. Le mélange de ligation est alors transformé dans les bactéries *E.coli* SURE CaCl₂ compétentes par choc thermique et les bactéries transformées sont étalées sur un milieu solide sélectif (Ampicilline). Une série de clones sont alors sélectionnés, mis en culture liquide et une extraction d'ADN plasmidique est effectuée. L'ADN plasmidique est alors soumis à différentes restrictions de manière à vérifier d'une part que les clones possèdent le gène d'intérêt adéquat et d'autre part que celui-ci est inséré dans l'orientation sens pour la traduction protéique.

Les clones GSK3 β -GAL4 DNA-BD et ERK-GAL4 DNA-BD ont été doublement restreints par EcoRI et PstI (Figure III.16). Cette enzyme de restriction coupe de part et d'autre de l'insert et libère donc un fragment de haut poids moléculaire correspondant à la taille du plasmide et un autre fragment de poids moléculaire plus faible (1302 pb et 1140 pb

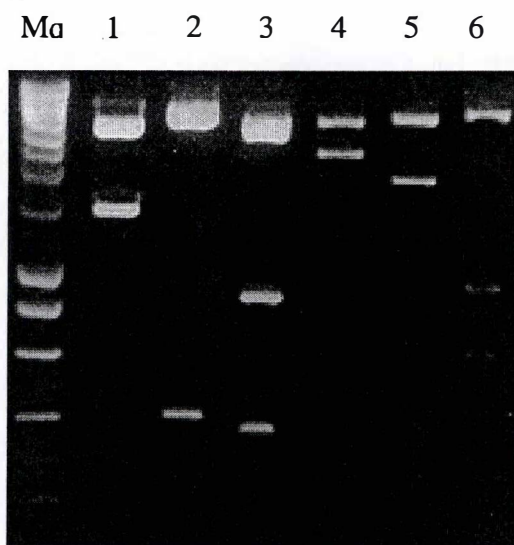


Figure III.17 : Profil de restriction par EcoRI/BamHI, HindIII et PstI pour le clone AKT-VP16 AD et par BamHI/PstI, HindIII et EcoRI pour les clones HIF-1 α -VP16 AD.

Mq : Marqueur de poids moléculaire utilisé : Smart Ladder (Eurogentec)

Piste 1 : ADN plasmidique du clone 9 Akt-VP16 AD digéré par EcoRI/BamHI

Piste 2 : ADN plasmidique du clone 9 Akt-VP16 AD digéré par HindIII

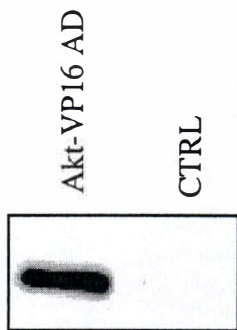
Piste 3 : ADN plasmidique du clone 9 Akt-VP16 AD digéré par PstI

Piste 4 : ADN plasmidique du clone 6 HIF-1 α -VP16 AD digéré par BamHI/PstI

Piste 5 : ADN plasmidique du clone 6 HIF-1 α -VP16 AD digéré par HindIII

Piste 6 : ADN plasmidique du clone 6 HIF-1 α -VP16 AD digéré par EcoRI

(A)



(B)

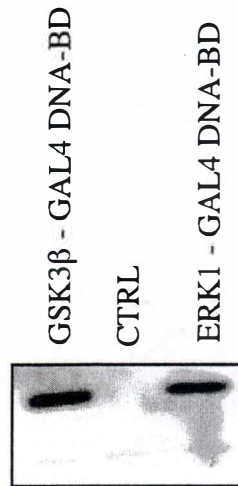


Figure III.18. : Evaluation du niveau d'expression dans les cellules CHO de la protéine de fusion Akt-VP16 AD révélée par un western blot anti - VP16 AD (A) et des protéines de fusion GSK3 β - GAL4 DNA-BD et ERK1 - GAL4 DNA-BD révélées par un western blot anti - GAL4 DNA-BD(B).

respectivement) correspondant à la taille du gène d'intérêt qui a été libéré. Cette restriction a pour but de vérifier que l'ADNc adéquat s'est inséré dans le plasmide.

De plus, une restriction diagnostique HindIII a été effectuée et permet de vérifier si l'insertion du gène d'intérêt s'est effectuée dans l'orientation sens pour la traduction protéique.

Cette restriction des clones GSK3 β -GAL4 DNA-BD et ERK1-GAL4 DNA-BD libère respectivement un fragment de 266 pb et de 261 pb correspondant à la taille attendue (Figure III.16).

Le clone Akt-VP16 AD a été restreint par les enzymes de restriction EcoRI et PstI (Figure III.17) qui coupent de part et d'autre de l'insert et libèrent donc un fragment de 1443 pb c'est-à-dire correspondant à la taille de Akt et un autre fragment de poids moléculaire plus élevé correspondant au plasmide.

Le clone HIF-1 α -VP16 AD a été restreint par les enzymes de restriction BamHI et PstI qui libèrent un fragment de haut poids moléculaire correspondant au plasmide et un fragment de 2268 pb correspondant à la taille de HIF-1 α .

L'enzyme de restriction HindIII a aussi été utilisée comme pour les clones GSK3 β et ERK pour vérifier le sens de l'orientation. La restriction par HindIII des clones Akt-VP16 AD libère deux fragments ; un fragment de 231 pb et un fragment de 372 pb. La restriction par HindIII des clones HIF-1 α -VP16 AD libère un fragment de 1864 pb (Figure III.17).

Une restriction par PstI du clone Akt-VP16 AD de même qu'une restriction par EcoRI du clone HIF-1 α -VP16 AD libère respectivement des fragments de 372 pb et de 840 pb ou de 895 pb et de 604 pb et confirme l'orientation sens pour la traduction protéique.

Ensuite, un séquençage a été réalisé sur chaque construction afin de vérifier si la phase de lecture a bien été respectée et si l'insert correspondait bien à l'ADNc attendu. Les séquençages ont révélé que les constructions étaient correctes.

4 Expression des protéines de fusion GSK3 β -GAL4 DNA-BD, ERK-GAL4 DNA-BD, Akt-VP16 AD et HIF-1 α -VP16 AD dans les cellules CHO

Après avoir construit les plasmides encodant ces différentes protéines de fusion et avant de les tester les unes contre les autres dans un test d'interaction double hybride, nous avons voulu vérifier, par Western blot, que ces protéines de fusion étaient bien exprimées dans les cellules CHO.

Pour ce faire, les cellules CHO ont été transfectées avec les différents plasmides codant pour les protéines de fusion. Après 24h de transfection, les cellules sont lysées et la présence de la protéine de fusion est mise en évidence par Western blot. La figure III.18 (A) représente le film de révélation du Western blot anti-VP16 AD. On remarque que la protéine de fusion Akt-VP16 AD est correctement exprimée et se situe à un poids moléculaire légèrement supérieur à 60 kDa correspondant à la taille de Akt fusionnée à VP16 AD. Une expérience similaire a été réalisée pour HIF-1 α mais aucune protéine n'a été détectée. Cette expérience a été recommencée avec quatre autres clones toujours sans succès.

La figure III.18 (B) représente le film de révélation de Western blot anti GAL4 DNA-BD. On remarque que deux bandes intenses apparaissent, toutes deux d'un poids moléculaire avoisinant 55 kDa. L'une correspond à la protéine de fusion GSK3 β -GAL4 DNA-BD, l'autre à la protéine de fusion ERK-GAL4 DNA-BD. Ceci témoigne donc que les protéines de fusion générées s'expriment correctement dans les cellules CHO sauf celle correspondant à HIF-1 α .

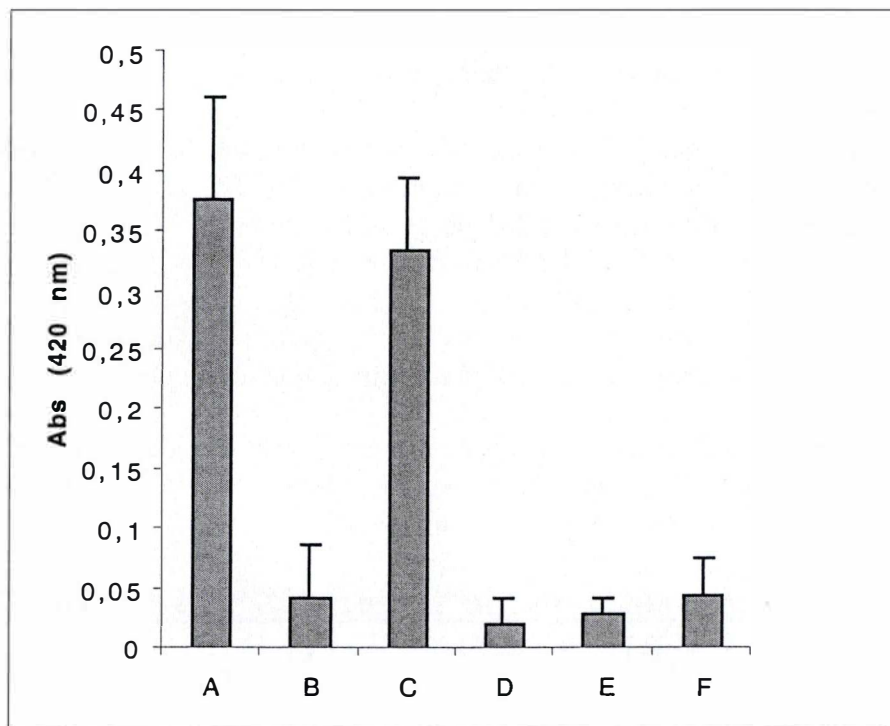


Figure III.19 : Evaluation de l'effet auto-activateur des protéines de fusion GSK3 β -GAL4 DNA-BD, ERK-GAL4 DNA-BD et Akt-VP16-AD. Les cellules CHO ont été transfectées avec les plasmides encodant des protéines de fusion et le plasmide vide pVP16 AD ou pGAL4 DNA-BD ainsi que le plasmide rapporteur pGAL/LacZ. L'activité enzymatique de la β -galactosidase a été mesurée 24 heures après la transfection. Les résultats sont exprimés en unités d'absorbance à 420 nm en tant que moyennes \pm 1 écart-type pour n=3.

A : CTRL+ :pM-VP16

B : Int - : pM-53/pVP16-LgT

C : Int + :pM-53 /pVP16-CP

D : GAL4 GSK3 β -DNA-BD/VP16 AD

E : Akt-VP16 AD/GAL4 DNA-BD

F : GAL4 ERK-DNA-BD/VP16 AD

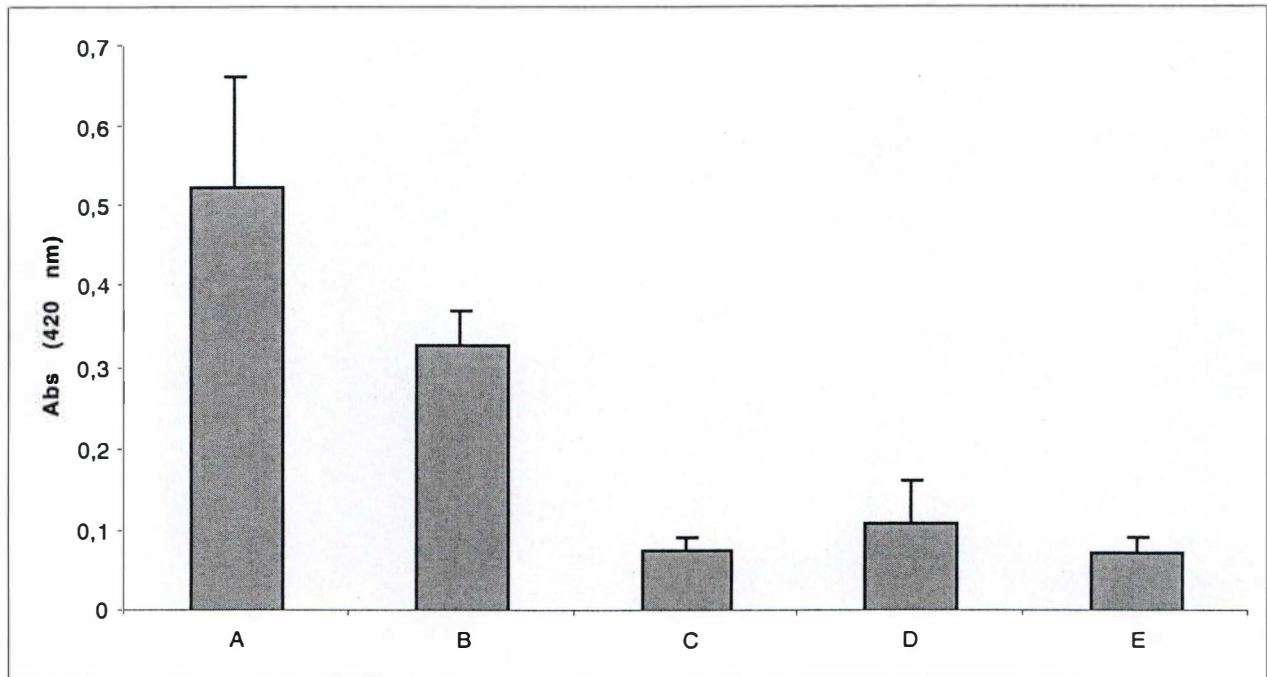


Figure III.20 : Test d'interaction dans les cellules CHO des protéines de fusion GAL4 DNA-BD-GSK3 β , VP16 AD-Akt et GAL4 DNA-BD-ERK. Les cellules CHO ont été transfectées avec les plasmides encodant les protéines de fusion et le plasmide rapporteur pGAL/LacZ. Les résultats sont exprimés en unités d'absorbance à 420 nm en tant que moyennes +/- 1 écart-type.

A : CTRL+ : pM-VP16

B : Int - : pM-53/pVP16-LgT

C : Int + : pM-53 /pVP16-CP

D : GAL4 GSK3 β -DNA-BD/Akt-VP16 AD

E : GSK3 β -GAL4 DNA-BD/ERK-GAL4 DNA-BD

5 Evaluation de l'effet auto-activateur des protéines de fusion GSK3 β -GAL4 DNA-BD, ERK-GAL4 DNA-BD et Akt-VP16 AD

Un autre test préliminaire nécessaire avant de tester les interactions proprement dites est d'évaluer l'effet auto-activateur des protéines de fusion, c'est-à-dire si elle présente à elle seule la capacité de se lier à l'ADN et de recruter la machinerie transcriptionnelle sans la moindre interaction avec la protéine de fusion proie d'intérêt.

Les cellules CHO ont été transfectées avec chacun des plasmides encodant les protéines de fusion. Les plasmides exprimant les protéines d'intérêt clonées en fusion avec le domaine de liaison de GAL4 (GAL4 DNA-BD) sont co-transfectés avec le plasmide vide pVP16 AD tandis que les plasmides exprimant les protéines d'intérêt clonées en fusion avec le domaine d'activation de VP16 (VP16 AD) sont quant à eux co-transfectés avec le plasmide vide possédant le domaine de liaison à l'ADN.

Sur le graphique présenté à la figure III.19, on ne voit aucune des protéines de fusion générées présenter un effet auto-activateur. En effet, on n'observe pas d'activité β -galactosidase supérieure au contrôle d'interaction négative. Par contre, le contrôle positif et l'interaction positive induisent comme précédemment une augmentation importante de l'activité β -galactosidase.

Ce résultat montre que les protéines de fusion GSK3 β -GAL4 DNA-BD, ERK-GAL4-DNA-BD et Akt-VP16 AD ne sont pas capables à elles seules d'induire la transcription du gène rapporteur *LacZ*. Elles sont donc utilisables pour un test d'interaction avec d'autres protéines.

6 Fonctionnalité du test d'interaction double hybride entre protéines de fusion

Afin de s'assurer de la fonctionnalité du test d'interaction double hybride en cellules de mammifère que nous avons mis au point et dont les conditions sont à présent optimisées, nous avons voulu vérifier que les protéines de fusion d'intérêt que nous avons générées pouvaient interagir. Les deux seules protéines de fusion que nous pouvons utiliser pour réaliser ce test sont la protéine de fusion "appât" GSK3 β -GAL4 DNA-BD et la protéine de fusion "proie" Akt VP16 AD. Tester l'interaction entre ces deux protéines présente un intérêt certain puisqu'il a été démontré que l'activité d'Akt pouvait réguler celle de la GSK3 β en la phosphorylant sur sa sérine 9 et que l'influence de l'une sur l'autre se manifeste dans le cadre de phénomènes d'hypoxie et ce de façon dépendante du type cellulaire.

Nous avons donc testé les deux protéines de fusion l'une contre l'autre. Pour cela, nous avons transfecté les cellules CHO avec le plasmide "appât" et le plasmide "proie" correspondant et nous avons mesuré l'activité enzymatique de la β -galactosidase. Nous avons également utilisé les constructions GSK3 β -GAL4 DNA-BD et ERK-GAL4 DNA-BD comme contrôle négatif.

Nous pouvons observer sur la figure III.20 que le test double hybride ne permet pas de révéler une interaction entre la GSK3 β et Akt car on mesure une activité β -galactosidase identique à celle correspondant à l'interaction négative contrôle. Nous n'avons donc pas mis en évidence d'interaction positive entre les kinases Akt et GSK3 β dans les cellules CHO. Il se peut toutefois que l'interaction soit médiée par le niveau d'activation d'Akt et que Akt ne soit pas activé dans les cellules CHO en condition de normoxie. Il serait alors intéressant de soumettre les cellules CHO à des conditions d'hypoxie afin d'activer Akt, Akt active pourrait alors interagir avec GSK3 β .

(A.)

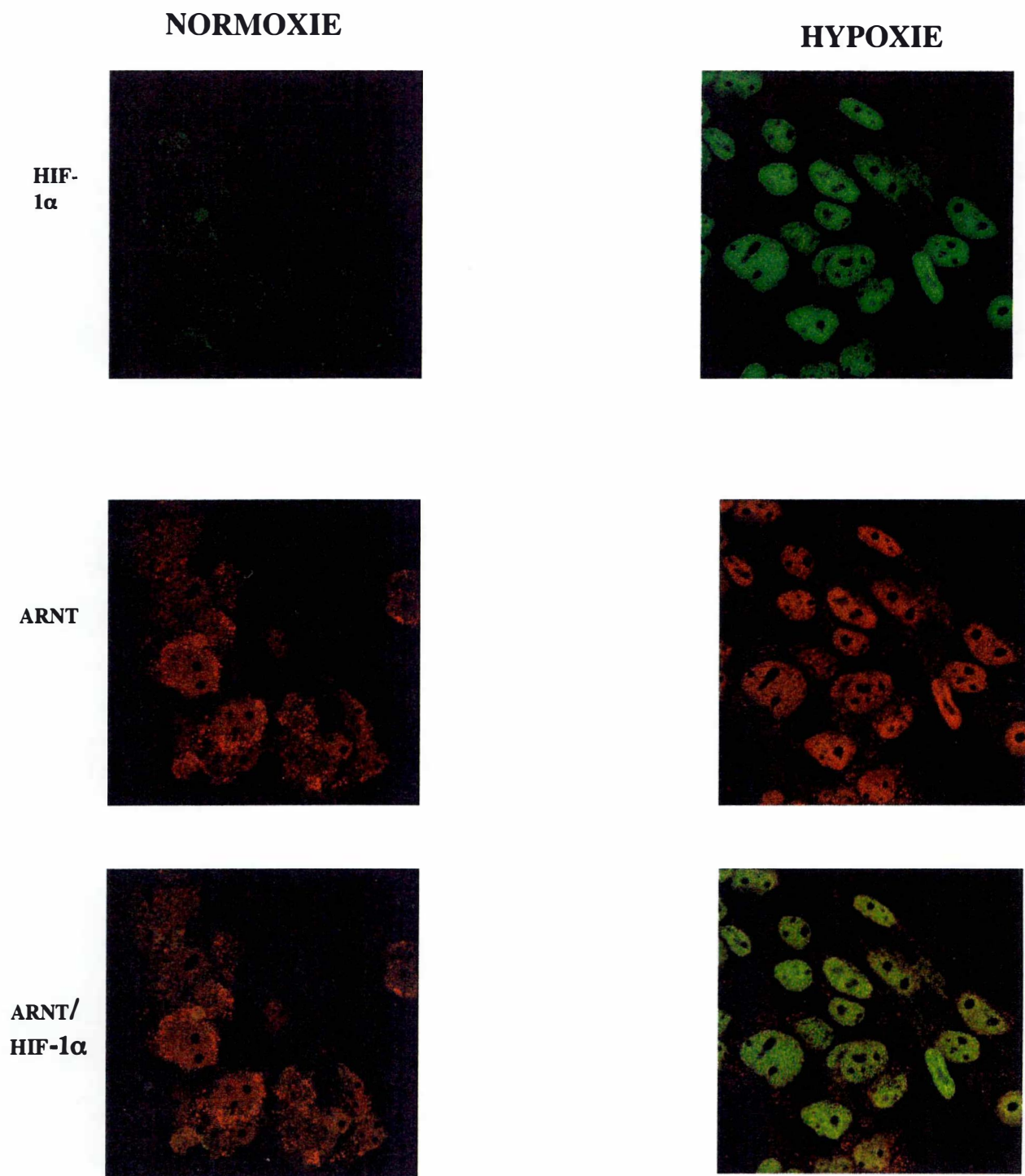
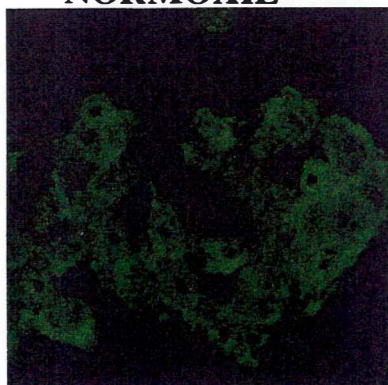


Figure III. 21 : Effet de l'hypoxie sur la localisation et l'expression des protéines HIF-1 α et ARNT (A) ou la forme phosphorylée sur les tyrosines 216/279 de la GSK3 (B). Ces protéines ont été détectées par immunofluorescence via des anticorps spécifiques. Les cellules ont été observées au microscope confocal (Grossissement : 100x).

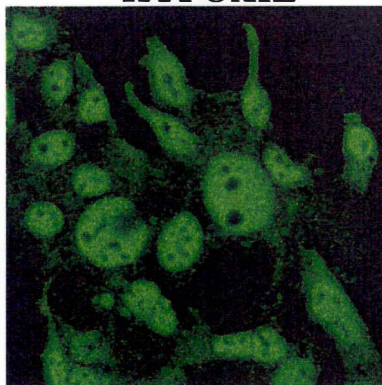
(B.)

NORMOXIE

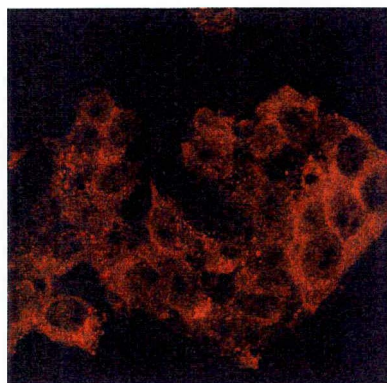


HIF-1α

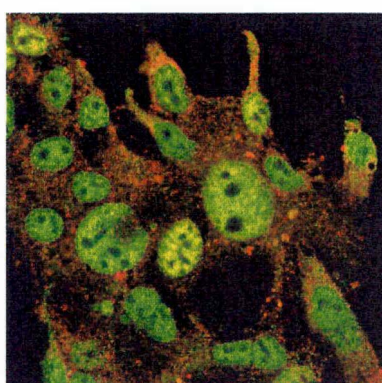
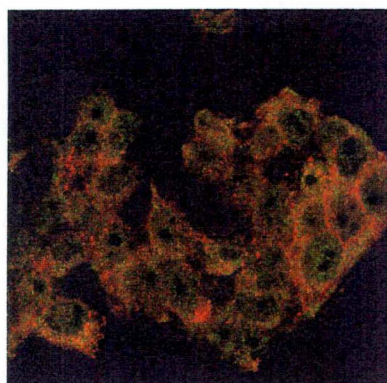
HYPOXIE



Phospho-TyrGSK3



Phospho-Tyr GSK3/ HIF-1α



7 Immunofluorescence

Comme mentionné dans l'introduction, il est important de vérifier que les deux protéines qui sont susceptibles d'interagir puissent être colocalisées dans le même compartiment subcellulaire et au même moment. Nous avons donc réalisé une étude de la co-localisation de HIF-1 α et de GSK3 en microscopie confocale. Pour réaliser cela, nous avons marqué les protéines en immunofluorescence et observé les cellules en microscopie confocale. Cette technique permet de mettre en évidence la localisation subcellulaire de la protéine étudiée. Lors d'une première expérience et afin de valider la méthode, nous avons marqué HIF-1 α et ARNT dans les cellules incubées pendant 16 heures en normoxie ou en hypoxie (Figure III.21). On remarque qu'en normoxie, HIF-1 α n'est pas présent, ce qui confirme les résultats obtenus lors d'études précédentes puisque, en normoxie, la sous-unité HIF-1 α est dégradée par le protéasome. En hypoxie, par contre, on voit que celle-ci s'accumule et est localisée dans le noyau. Lorsqu'on superpose les images obtenues pour HIF-1 α et ARNT, on observe une co-localisation des deux protéines au niveau du noyau indiquée par la coloration jaune. Les résultats sont cohérents puisqu'en hypoxie, HIF-1 α et ARNT dimérisent dans le noyau pour former un facteur de transcription HIF-1 actif.

Ensuite, nous avons étudié si HIF-1 α était colocalisé avec la forme phosphorylée sur les tyrosines 279/216 de la GSK3 α/β dans ces mêmes conditions (Figure III.21 B). On observe les mêmes résultats que précédemment pour la sous-unité HIF-1 α . La forme phosphorylée de la GSK3 β est peu abondante en normoxie et présente une localisation cytosolique. Par contre, on retrouve celle-ci en quantité plus importante dans le noyau des cellules incubées en hypoxie. Lorsqu'on superpose ces deux "images", on remarque que HIF-1 α et la GSK3 colocalisent dans le noyau des cellules incubées en hypoxie.

CONCLUSION
ET
PERSPECTIVES

Conclusions et perspectives

Les maladies cardio-vasculaires et les cancers présentent l'une des causes majeures de décès aux Etats-Unis.

Ces maladies engendrent des troubles circulatoires plaçant les cellules en condition d'hypoxie. Même si les mécanismes déclenchant ces pathologies ne sont pas encore totalement élucidés, on sait que dans ces conditions hypoxiques, la cellule développe des mécanismes de compensation permettant de s'adapter à ce déficit en oxygène en réorientant par exemple le métabolisme énergétique vers la voie de la glycolyse, en stimulant la néo-vascularisation et l'érythropoïèse.

De plus, en hypoxie, Wang et Semenza (1994) ont démontré qu'un facteur de transcription HIF-1 (Hypoxia inducible factor-1) hétérodimérique constitué des sous-unités HIF-1 α et ARNT était spécifiquement activé et que la fixation de celui-ci à sa séquence consensus (HRE : Hypoxia Responsive element) était capable d'activer la transcription de gènes cibles comme par exemple l'EPO (érythropoïétine), le VEGF (Vascular endothelial growth factor)... A ce jour, on sait qu'il existe différents mécanismes intervenant dans la régulation du facteur de transcription HIF-1 impliquant notamment la stabilisation de la protéine HIF-1 α mais aussi la phosphorylation de HIF-1 α par des voies impliquant différentes kinases: les kinases GSK3 β et ERK ont été décrites dans la littérature comme pouvant réguler l'abondance de la sous-unité HIF-1 α en hypoxie et son activité transcriptionnelle (Minet *et al.*, 2000 ; Mottet *et al.*, 2003). Si on sait que ces kinases sont importantes dans la régulation de l'activité de HIF-1, on ne sait cependant pas si elles agissent directement sur HIF-1 α ou si un ou plusieurs intermédiaires sont requis.

Le mémoire s'inscrit donc dans les études de la régulation de l'activation du facteur de transcription HIF-1 et plus spécifiquement dans les études des interactions directes potentielles entre les kinases ERK1 ou GSK3 β et HIF-1 α . A cette fin, nous avons mis en oeuvre une méthode de double hybride en cellules de mammifère.

Dans un premier temps, nous avons voulu confirmer que les kinases ERK et GSK3 β avaient bien un rôle dans la régulation de l'activité du facteur de transcription HIF-1. Pour se faire, nous avons suivi l'activité de HIF-1 en utilisant un système rapporteur dans les cellules HepG2. L'effet de deux mutants dominants négatifs de la GSK3 β et de ERK1 a ainsi été étudié. Lors de la surexpression du dominant négatif de la GSK3 β , nous avons observé une augmentation de l'activité transcriptionnelle de HIF-1. La GSK3 β active diminue la quantité de HIF-1 α en hypoxie et donc son inhibition a un effet positif sur l'activité de HIF-1. D'autre part, l'utilisation d'un dominant négatif de ERK a montré une diminution de l'activité transcriptionnelle de HIF-1 en hypoxie démontrant donc que ERK1 est nécessaire à l'activité de HIF-1. Ces résultats suggèrent donc que ces deux kinases jouent bien un rôle dans la régulation de l'activité transcriptionnelle de HIF-1 mais aucun argument ne laisse supposer une interaction directe entre ces kinases et HIF-1 α .

Pour tester les interactions entre les kinases ERK ou GSK3 β et HIF-1 α , nous avons décidé de développer un test d'interaction double hybride en cellules de mammifère. Le choix du modèle cellulaire utilisé s'est porté sur des cellules CHO (Chinese Hamster Ovary) car de nombreuses interactions protéine-protéine ont été mises en évidence au sein de ces cellules. D'une part et d'autre part, nous avons pu montrer que ces cellules répondent bien à une diminution de concentration en oxygène en activant le facteur de transcription HIF-1. Cette réponse indique que l'interaction potentielle entre ERK ou GSK3 β et HIF-1 α peut se produire dans des conditions adéquates nécessitant par exemple des modifications post-traductionnelles

comme une phosphorylation, une hydroxylation ou une glycosylation résultant par exemple de l'incubation en hypoxie.

Avant de réaliser les interactions avec les protéines d'intérêt, nous avons mis au point les conditions expérimentales de mise en oeuvre du test d'interaction utilisé et validé la fonctionnalité de ce test. De nombreux paramètres ont été testés et modifiés afin d'optimiser l'efficacité de transfection dans les cellules. La mesure de l'activité β -galactosidase permettant de "moucharder" les interactions entre protéines avec le système que nous avons utilisé a également été optimisée. Les résultats ont montré que les conditions optimales utilisées pour détecter des interactions protéiques étaient d'ensemencer les cellules à une densité cellulaire de 150.000 cellules par puits, de transférer celles-ci à des concentrations de 0,4 μ g de plasmide «proie» et «appât» et 0,5 μ g de plasmide rapporteur pendant une durée de 24 heures scindées en 8 heures de transfection et 16 heures de récupération et de mesurer l'activité β -Gal à une densité optique de 420 nm. Ces conditions peuvent également être utilisées pour visualiser les interactions entre protéines au sein des cellules par un marquage cytochimique de l'activité β -Gal. La validation du système en utilisant les contrôles d'interaction positive et négative a de plus montré la fonctionnalité du système.

Afin d'étudier les interactions entre protéines impliquées dans la régulation de l'activité de HIF-1, quatre protéines de fusion ont été construites. Ainsi, nous avons réalisé la construction des protéines de fusion entre GSK3 β ou ERK et le domaine de liaison du facteur de transcription GAL4 (GAL4 DNA-BD) ainsi que la construction des protéines de fusion entre Akt ou HIF-1 α et le domaine d'activation de VP16 (VP16 AD).

Ces constructions permettraient donc de tester l'interaction entre HIF-1 α et ERK, HIF-1 α et GSK3 β . Les constructions contenant AKT et ERK seront utilisées en tant que contrôle négatif et les constructions contenant Akt et GSK3 β comme contrôle positif.

L'utilisation de ces protéines de fusion à travers des expériences de transfection transitoire nous permettraient donc de tirer des informations sur l'interaction entre ces protéines.

Dans la première partie du travail, nous avons cherché à cloner les gènes d'intérêt Akt et HIF-1 α avec les domaines d'activation de VP16 (VP16 AD) ainsi que ERK et GSK3 β avec les domaines de liaison à l'ADN du facteur de transcription GAL4 (GAL4 DNA-BD). Cette première stratégie de clonage utilisée (Invitrogen) consiste à générer des protéines de fusion "appât" et "proie" dans des constructions d'ADN linéaires comprenant le gène d'intérêt inséré entre un promoteur SV40 et un domaine de liaison à l'ADN ou un domaine d'activation. La construction de ces protéines comprend plusieurs étapes successives dont la ou les deux dernières ont échoué malgré de nombreux essais en modifiant certains paramètres expérimentaux de ligation et/ou de PCR.

En tant qu'alternative, la seconde partie du mémoire s'est donc portée sur une autre stratégie de clonage (Clontech) ne faisant plus appel à de l'ADN linéaire mais à des plasmides circulaires.

Les gènes d'intérêt GSK3 β et ERK sont insérés à l'intérieur des plasmides pM/GAL4BD et les gènes d'intérêt Akt et HIF-1 α ont été insérés dans le plasmide pVP16 AD afin d'obtenir respectivement des plasmides "appât" et des plasmides "proie".

Après clonage, des études préliminaires en Western Blot ont ensuite été réalisées afin de déterminer si chacune de ces protéines de fusion était surexprimée correctement dans les cellules CHO.

A l'exception de la protéine de fusion contenant HIF-1 α qui ne semble pas être exprimée, les trois autres protéines de fusion sont bien présentes dans les cellules.

Ceci limite donc fortement les interactions que nous pouvons tester avec *a priori* par double hybride puisque HIF-1 α n'étant pas exprimé correctement, on ne pourra tester son interaction ni avec ERK ni avec GSK3 β . L'une des explication que nous pourrions apporter pour expliquer le fait que HIF-1 n'est pas exprimé dans la cellules est que la surexpression de la sous-unité HIF-1 α est régulée de manière très précise par la cellule. Ce genre d'observation a déjà été faite au sein du laboratoire lorsque nous avons tenté de construire une lignée stable exprimant un dominant négatif de la sous-unité HIF-1 α (tronquée au niveau du domaine basique et du domaine C-terminal) et une lignée surexprimant la forme sauvage de HIF-1 α . Ces lignées régulaient la quantité de HIF-1 α exprimé au cours des passages successifs et ne présentaient pas un facteur de transcription actif de manière constante.

Une autre explication serait que le fait d'introduire dans la cellule une protéine "artificielle"(protéine de fusion) pourrait provoquer sa dégradation rapide car la cellule pourrait reconnaître celle-ci comme étrangère. Ce n'est cependant pas le cas pour les trois autres protéines de fusion.

Le deuxième test préliminaire à réaliser avant de tester les interactions proprement dites était de vérifier que les protéines de fusion Akt-VP16 AD, GSK3 β -GAL4 DNA-BD et ERK-GAL4 DNA-BD ne présentaient pas un effet auto-activateur. Les résultats montrent qu'aucune des protéines de fusion ne montre un effet auto-activateur ; indiquant que les protéines de fusion d'intérêt ne sont pas capables d'induire par elle-même la transcription du gène rapporteur *lacZ*.

En fonction de ces résultats, la seule interaction intéressante que nous pouvions dès lors réaliser était de tester GSK3 β -GAL4 DNA-BD contre Akt-VP16 AD. Les résultats observés montrent que le test d'interaction double hybride n'a pas permis de détecter une interaction entre ces kinases dans les conditions envisagées, c'est-à-dire en normoxie.

Alors qu'il est bien décrit dans la littérature que Akt phosphoryle la GSK3 β et que ces kinases doivent impérativement interagir à un moment donné, une hypothèse pourrait expliquer le fait que nous n'avons pas mis en évidence d'interaction entre la GSK3 β -GAL4 DNA-BD et Akt-VP16 AD. L'interaction entre ces deux kinases peut dépendre du niveau de phosphorylation de Akt. Or, on sait que l'activation de Akt est dépendante des conditions expérimentales (par exemple, de la présence de sérum) et du type cellulaire. Il est donc possible que dans les cellules CHO, Akt n'est pas actif en normoxie et ne peut alors pas interagir avec la GSK3 β . Il serait dès lors intéressant de tester l'interaction entre les deux protéines en soumettant les cellules à des conditions hypoxiques.

Une autre explication serait que la technique du double hybride génère beaucoup de faux négatifs car la structure des protéines testées est souvent modifiée (protéine de fusion, conditions de repliement différentes, glycosylation accrue,...).

La dernière hypothèse serait que l'interaction entre une kinase et son substrat est souvent transitoire. Il est donc possible que l'association des protéines BD-X et AD-Y soit trop brève pour aboutir à la reconstitution d'un facteur GAL4 nous permettant d'observer une transactivation des gènes rapporteurs.

Dans la première partie du mémoire, nous nous sommes vérifiés que les protéines d'intérêt sont effectivement susceptibles d'interagir c'est-à-dire qu'elles sont localisées dans le même compartiment subcellulaire au même moment. Les expériences d'immunofluorescence ont permis de mettre en évidence que ces deux protéines HIF-1 α et la GSK3 β co-localisaient à un moment donné dans un certain compartiment cellulaire, c'est-à-dire dans le noyau des cellules incubées en hypoxie.

Pour conclure, le test d'interaction double hybride en cellules de mammifère s'avère être fonctionnel et reproductible. Il peut permettre de mettre en évidence des interactions entre protéines partenaires potentielles. Dans le cadre de notre thématique de recherche, c'est-à-dire afin de comprendre les mécanismes de régulation de l'activité du facteur de transcription HIF-1, il conviendrait de continuer les expériences. Une voie d'approche possible afin de circonvenir le fait que la protéine de fusion entre HIF-1 α et VP16 AD ne s'exprime pas dans les cellules CHO serait de tester cette sous-unité complète c'est-à-dire non tronquée comme nous l'avons fait ici. Par la suite, d'autres méthodes comme la co-immunoprécipitation ou un test de transcription/traduction *in vitro* pourraient être employées afin de confirmer ou d'infirmier les interactions éventuelles.

BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie

- Arnould T, C. Michiels, I., Alexandre and J. Remacle (1992), Effect of hypoxia upon intracellular calcium concentration of human endothelial cells, *J Cell Physiol*, **152**, 215-21.
- Berra, E., Richard, D.E., Gothie, E. and Pouyssegur, J. (2001) HIF-1-dependent transcriptional activity is required for oxygen-mediated HIF-1 α degradation. *FEBS Lett*, **491**, 85-90.
- Bournat J. C., A. M. Brown and A. P. Soler (2000), Wnt-1 dependent activation of the survival factor NF-kappaB in PC12 cells, *J Neurosci Res*, **61**, 21-32.
- Boyle W. J., T. Smeal, L. H. Defize, P. Angel, J. R. Woodgett, M. Karin and T. Hunter (1991), Activation of protein kinase C decreases phosphorylation of c-Jun at sites that negatively regulates its DNA-binding activity, *Cell*, **64**, 573-84.
- Bruick, R.K. and McKnight, S.L. (2002) Transcription. Oxygen sensing gets a second wind. *Science*, **295**, 807-808.
- Chun Y., Kim M., Park J. (2002), Oxygen-Dependant and -Independent Regulation of HIF-1 α , *J Korean Med Sci*, **17**, 581-586.
- Datta S. R., A. Brunet and M. E. Greenberg, (1999) Cellular survival: a play in three Akts, *Genes Dev*, **13**, 2905-27
- Ema M., K. Hirota, J. Mimura, H. Abe, J. Yodoi, K. Sogawa, L. Poellinger and Y. Fujii-Kuriyama (1999), Molecular mechanisms of transcription activation by HLF and HIF1 α in response to hypoxia: their stabilization and redox signal-induced interaction with CBP/p300, *Embo J*, **18**, 1905-14.
- Fearon E. R., Finkel T., Gillison M. L., Kennedy S. P., Casella J. F., Tomaselli G. F., Morrow J. S., Dang C. (1992), Karyoplasmic interaction selection strategy: A general strategy to detect protein-protein interactions in mammalian cells, *Genetics*, **89**, 7958-7962.
- Gothié and Pouyssegur (2002), HIF-1: régulateur central de l'hypoxie, *Medecine/Sciences*, **18**, 70-78.,
- Gradin, K., Takasaki, C., Fujii-Kuriyama, Y. and Sogawa, K. (2002) The transcriptional activation function of the HIF-like factor requires phosphorylation at a conserved threonine. *J Biol Chem*, **277**, 23508-23514.
- Grimes C. A. and R. S. Jope (2001), The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3 β in cellular signaling, *Prog Neurobiol*, **65**, 391-426.
- Huang L. E., J. Gu, M. Schau and H. F. Bunn (1998), Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α is mediated by an O₂- dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 7987-92.

- Humar, B., Graziano, F., Cascinu, S., Catalano, V., Ruzzo, A.M., Magnani, M., Toro, T., Burchill, T., Futschik, M.E., Merriman, T. and Guilford, P. (2002) Association of CDH1 haplotypes with susceptibility to sporadic diffuse gastric cancer. *Oncogene*, **21**, 8192-8195.
- Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., Kim, W., Valiando, J., Ohh, M., Salic, A., Asara, J.M., Lane, W.S. and Kaelin, W.G., Jr. (2001) HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science*, **292**, 464-468.
- Jaakkola, P., Mole, D.R., Tian, Y.M., Wilson, M.I., Gielbert, J., Gaskell, S.J., Kriegsheim, A., Hebestreit, H.F., Mukherji, M., Schofield, C.J., Maxwell, P.H., Pugh, C.W. and Ratcliffe, P.J. (2001) Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science*, **292**, 468-472.
- Jiang B. H., J. Z. Zheng, S. W. Leung, R. Roe and G. L. Semenza (1997), Transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor 1 α . Modulation of transcriptional activity by oxygen tension, *J Biol Chem*, **272**, 19253-60.
- Lando, D., Peet, D.J., Gorman, J.J., Whelan, D.A., Whitelaw, M.L. and Bruick, R.K. (2002a) FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev*, **16**, 1466-1471.
- Lando, D., Peet, D.J., Pongratz, I. and Whitelaw, M.L. (2002b) Mammalian two-hybrid assay showing redox control of HIF-like factor. *Methods Enzymol*, **353**, 3-10.
- Lando, D., Peet, D.J., Whelan, D.A., Gorman, J.J. and Whitelaw, M.L. (2002c) Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science*, **295**, 858-861.
- Lando, D., Pongratz, I., Poellinger, L. and Whitelaw, M.L. (2000) A redox mechanism controls differential DNA binding activities of hypoxia-inducible factor (HIF) 1 α and the HIF-like factor. *J Biol Chem*, **275**, 4618-4627.
- Li C., Zhu N., Tan R. C., Ballard P. L., Derynck R. and Mino P. (2002), Transforming Growth Factor- β Inhibits Pulmonary Surfactant Protein B Gene Transcription through SMAD3 Interactions with NKX2.1 and HNF-3 Transcription Factors, *The Journal Of Biological Chemistry*, **277**, 38399-38408.
- Maeda T., Chapman D. L., and Stewart A. F. R. (2002), Mammalian Vestigial-like 2, a Cofactor of TEF-1 and MEF-2 Transcription Factors That Promotes Skeletal Muscle Differentiation, *The Journal Of Biological Chemistry*, **277**, 48889-48898.
- Mahon, P.C., Hirota, K. and Semenza, G.L. (2001) FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1 α and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes Dev*, **15**, 2675-2686.
- Mazure N. M., E. Y. Chen, K. R. Laderoute and A. J. Giaccia (1997), Induction of vascular endothelial growth factor by hypoxia is modulated by a phosphatidylinositol 3-

- kinase/Akt signaling pathway in Ha-ras- transformed cells through a hypoxia-inducible factor-1 transcriptional element, *Blood*, **90**, 3322-31.
- Metzen, E., Berchner-Pfannschmidt, U., Stengel, P., Marxsen, J.H., Stolze, I., Klinger, M., Huang, W.Q., Wotzlaw, C., Hellwig-Burgel, T., Jelkmann, W., Acker, H. and Fandrey, J. (2003) Intracellular localisation of human HIF-1 alpha hydroxylases: implications for oxygen sensing. *J Cell Sci*, **116**, 1319-1326.
 - Minet, E., Arnould, T., Michel, G., Roland, I., Mottet, D., Raes, M., Remacle, J. and Michiels, C. (2000) ERK activation upon hypoxia: involvement in HIF-1 activation. *FEBS Lett*, **468**, 53-58.
 - Minet, E., Michel, G., Mottet, D., Raes, M. and Michiels, C. (2001) Transduction pathways involved in Hypoxia-Inducible Factor-1 phosphorylation and activation. *Free Radic Biol Med*, **31**, 847-855.
 - Mottet, D., Michel, G., Renard, P., Ninane, N., Raes, M. and Michiels, C. (2002) ERK and calcium in activation of HIF-1. *Ann N Y Acad Sci*, **973**, 448-453.
 - Mottet, D., Michel, G., Renard, P., Ninane, N., Raes, M. and Michiels, C. (2003) Role of ERK and calcium in the hypoxia-induced activation of HIF-1. *J Cell Physiol*, **194**, 30-44.
 - Pandey A., and Mann M. (2000), Proteomics to study genes and genomes, *Nature*, **405**, 837-846.
 - Plyte S. E., K. Hughes, E. Nikolakaki, B. J. Pulverer and J. R. Woodgett (1992), Glycogen synthase kinase-3: functions in oncogenesis and development, *Biochim Biophys Acta*, **1114**, 147-62.
 - Sang, N., Stiehl, D.P., Bohensky, J., Leshchinsky, I., Srinivas, V. and Caro, J. (2003) MAPK Signaling Up-regulates the Activity of Hypoxia-inducible Factors by Its Effects on p300. *J Biol Chem*, **278**, 14013-14019.
 - Sears R., F. Nuckolls, E. Haura, T. Taya, K. Tamai and J. R. Nevins (2000), Multiple Ras-dependent phosphorylation pathways regulate Myc protein stability, *Genes Dev*, **14**, 2501-14.
 - Semenza, G. (2002a) Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Pharmacol*, **64**, 993-998.
 - Semenza, G.L. (2002b) HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. *Trends Mol Med*, **8**, S62-67.
 - Semenza, G.L. (2002c) Physiology meets biophysics: visualizing the interaction of hypoxia-inducible factor 1 alpha with p300 and CBP. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 11570-11572.
 - Shaw M., P. Cohen and D. R. Alessi (1997), Further evidence that the inhibition of glycogen synthase kinase-3beta by IGF-1 is mediated by PDK1/PKB-induced

phosphorylation of ser-9 and not by dephosphorylation of Tyr-216, *Febs Lett*, **416**, 307-11.

- Sodhi A., S. Montaner, H. Miyazaki and J. S. Gutkind (2001), MAPK and Akt act cooperatively but independently on hypoxia inducible factor-1alpha in rasV12 upregulation of VEGF, *Biochem Biophys Res Commun*, **287**, 292-300.
- Stagljar I., and Fields S., (2002), Analysis of membrane protein interactions using yeast-based technologies, *Trends in Biochemical Sciences*, **27**, 559-563.
- Stiehl, D.P., Jelkmann, W., Wenger, R.H. and Hellwig-Burgel, T. (2002) Normoxic induction of the hypoxia-inducible factor 1alpha by insulin and interleukin-1beta involves the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *FEBS Lett*, **512**, 157-162.
- Treins, C., Giorgetti-Peraldi, S., Murdaca, J., Semenza, G.L. and Van Obberghen, E. (2002) Insulin stimulates hypoxia-inducible factor 1 through a phosphatidylinositol 3-kinase/target of rapamycin-dependent signaling pathway. *J Biol Chem*, **277**, 27975-27981.
- Wang G. L., B. H. Jiang, E. A. Rue and G. L. Semenza (1995a) Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 5510-4.
- Wenger, R.H. (2002) Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *Faseb J*, **16**, 1151-1162.
- Whitelaw M. L., M. Gottlicher, J. A. Gustaffsson and L. Poellinger (1993), Definition of a novel ligand binding domain of a nuclear bHLH receptor: co-localization of ligand and hsp90 binding activities within the regulable inactivation domain of the dioxin receptor, *Embo J*, **12**, 4169-79.
- Woodgett J. R. (1990), Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A, *Embo J*, **9**, 2431-8.
- Zhu H. and Bunn H. F. (2001), How do cells sense oxygen?, *Signal transduction*, **292**, 449-451.