



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Etude de l'activation de HIF-1 par différentes stimulations en conditions normoxiques

Marlet, Jacques

Award date:
2007

[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 DE L'ACTIVATION DE HIF-1 PAR DIFFERENTES STIMULATIONS EN
CONDITIONS NORMOXIQUES**

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

Jacques Marlet

Juin 2007

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 de l'activation de HIF-1 par différentes stimulations en conditions normoxiques

MARLET Jacques

Résumé

Le facteur de transcription HIF-1 est l'élément régulateur central de la réponse cellulaire à l'hypoxie. HIF-1 peut également être activé par d'autres stimuli, en normoxie. Le rôle que joue ce facteur de transcription dans la plupart des cancers fait que la compréhension des mécanismes impliquant celui-ci est un élément essentiel de la lutte contre le cancer.

Ce travail montre qu'il existe des différences entre les réponses cellulaires liées à HIF-1 selon différentes conditions de stimulations en normoxie, par rapport à l'hypoxie.

Nous avons tout d'abord montré que la réponse est dépendante du type cellulaire : lors d'une stimulation avec de l'IGF, les lignées cellulaires RD et MCF-7 n'ont pas montré d'augmentation de l'abondance de la sous-unité alpha de HIF-1, contrairement aux cellules HepG2.

Nous avons ensuite montré que les cellules HepG2 pouvaient également induire HIF-1 α suite à des stimulations avec l'insuline ou l'IL-1 β en normoxie. L'étude de l'abondance des transcrits de quatre gènes cibles de HIF-1 dans ces conditions a montré que seul l'ARNm du VEGF, dans le cas d'une stimulation avec l'insuline ne voyait pas son abondance augmenter et ce malgré la présence de HIF-1 fonctionnel. Nous avons également observé que HIF-1 est lié sur les séquences HRE des promoteurs de ses gènes cibles par la technique d'immunoprécipitation de chromatine lors des stimulations hypoxique et normoxique, aussi bien dans le promoteur du VEGF lors d'une stimulation avec l'insuline. Ceci nous permet de poser l'hypothèse qu'il existe des facteurs dans l'environnement de ce promoteur qui inhibent l'activité de HIF-1 alors que celui-ci est lié sur la séquence HRE du promoteur du VEGF.

Une étude portant sur un nombre plus important de gènes cibles de HIF-1 est toutefois nécessaire à la compréhension des mécanismes induisant une réponse différentielle de HIF-1 lors de stimulations en normoxie.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 2007

Promoteur: C. Michiels

Une année s'achève, un travail également. Je ne pouvais pas finir ça sans remercier quelques personnes.

Tout d'abord, je voudrais remercier Martine Raes d'avoir mis à ma disposition son laboratoire et ses locaux.

Un grand merci également à Carine Michiels, ma promotrice. Je ne saurais qu'être reconnaissant de l'opportunité qui m'a été offerte de travailler dans son équipe. Merci aussi pour son aide qui me fut plus que précieuse, ses corrections judicieuses lors de la construction de ce mémoire et de sa patience (je sais qu'il en faut avec moi).

Merci également à Benjamin, mon tuteur, dont son plus grand tour de magie aura été de se faire disparaître à chaque fois que je voulais lui demander quelque chose. Merci de m'avoir montré/aidé/répété/entraîné, bref tutorisé lorsque c'était possible. Je te souhaite une bonne continuation dans ton travail et je suppose qu'on se reverra encore un de ces jours entre 21h30 et 2h30 à l'occasion.

Merci à toute l'équipe HIF et plus spécialement à Lio, Jean-Phi et les 2 Seb pour l'aide fournie au laboratoire, le plus souvent à la recherche des produits perdus. Plus généralement, merci à tous les chercheurs, techniciens et doctorants de l'URBC.

J'ai apprécié également travailler avec mes 2 co-mémorantes : Audrey, jamais stressée et toujours zen (hem-hem) et Marie-les-bons-ragots que je n'aurai malheureusement jamais battue à l'escalade. Merci à toutes les deux.

Merci aux autres mémorants de l'URBC d'avoir mis l'ambiance dans la salle des mémorants. Merci à Lolo l'embrouille, compagnons des premières heures et de guindailles et possédant 360 comptes Yacado. Je te remercie également de l'hébergement qui m'a été offert à chaque fois que j'en avais besoin. Merci Sophie : oui, on y ira un jour, t'en fais pas, ça se fera dés qu'on a une voiture. Merci à Guillaume-râle-comme-je-te-pousse dont la phrase que j'aurai entendue le plus souvent aura été « Je hais les Macs ». Merci Gwendo-chef, tu as sans doute permis à notre local de rester à peu près rangé (mais vraiment à peu près hein). Merci à Doro, je sais bien que t'aurais voulu un photomontage mais désolé. Merci à LN-Western-Blot et de ses histoires de romances aux goûts mélodramatiques. Enfin, merci à Tom-Tommy de Fleurus : j'espère qu'on continuera à se voir à l'occasion.

C'est aussi l'occasion de remercier les autres 2èmes licences et surtout (par ordre aléatoire d'apparition) Chale, Lio, Thibault, Aude, Kathleen, Andréa, Buch', Fanélie, Pauline, Francis, Sophie et Mel et Mel. Je ne citerai pas les autres (DATA NOT SHOWN comme on dit chez nous) mais j'ai apprécié les quatre ans d'études passés dans cette classe. Vous me manquerez. Bonne merde à tous pour ce mémoire.

Je n'aurai jamais fini de remercier tout le monde moi. Merci à ceux qui m'ont soutenu et qui m'ont permis de passer un peu de bon temps. Je citerai Nano et Jolie Blonde, Greg, Youcky et Fred, Jean-If, Gaïa, B-52's, MelBush' et Chimay, Photoshop, Warcraft et Fable, HP7, LOST, Prison Break etc... Enfin, une spéciale dédicace à Norbert que je n'aurai pas vu beaucoup (hibernation ?).

Je voudrais remercier mes parents et beaux-parents. C'est grâce à eux que je suis aujourd'hui en train de mettre un point final aux études que j'ai toujours voulu faire. Merci de votre soutien (« Tu vas rater ton année si tu continues comme ça » ; « Je pense pas que tu réussiras comme ça » ; « C'est pas comme ça que tu vas réussir ! »). Merci à Juliette, Robin, Madeleine, Charlotte et Constance. Merci également à mes grands-parents.

Enfin, je remercie quiconque lira cet ouvrage. Merci de l'intérêt que vous lui portez.

A tous, bonne lecture !

Table des abbréviations

4E-BP	4E-Binding Protein
5'-TOP	5'-Terminal OligoPyrimidine
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADP	Adénosine DiPhosphate
AKT	Protein kinase B
AMP	Adénosine MonoPhosphate
AMPK	Adénosine MonoPhosphate Kinase
APS	Ammonium PerSulphate
ARN	Acide RiboNucléique
ARNT	Arylhydrocarbon Receptor Nuclear Translocator
ATF-1	Activating Transcription Factor 1
ATP	Adenosine TriPhosphate
Bcl-2	B-Cell Leukemia/Lymphoma 2
bHLH	basic Helix-Loop-Helix
BNIP-3	BCL2/adeNovirus E1B 19kDa Interacting Protein 3
BSA	Bovine Serum Albumin
Ca ⁺⁺	Ion calcium
CBP	CREB Binding Protein
CDK	Cycline Dependant Kinase
ChIP	Chromatin ImmunoPrecipitation
Cited2	CBP/p300-Interacting Transactivator with ED-rich tail 2
COX-2	Cyclo-Oxygénase 2
CREB	cAMP Response Element Binding protein
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
eEF	Elongation Factor
EGF	Epidermal Growth Factor or EGF
eIF	Initiation Factor
EPO	ErythroPOïetine
ERK	Extracellular signal-Regulated Kinase
FIH	Factor Inhibiting Hypoxia-inducible factor
GDP	Guanine DiPhosphate
GLUT	GLUcose Transporter
Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2
GTP	Guanine TriPhosphate
HAS	HIF-1 Ancillary Sequence
HIF	Hypoxia-Inducible Factor
HRE	Hypoxia Response Element
IGF	Insulin-like Growth Factor
IGFBP	Insulin-like Growth Factor Binding protein
IGFR	IGF Receptor
IL-1 β	InterLeukine-1 β
iNOS	inducible Nitric Oxide Synthase

IPAS	Inhibitory PAS domain protein
IREs	Insulin Response Elements
IRS	Insulin Receptor Substrate
I κ B	Inhibitor of NF κ B
kDa	kiloDalton
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MEK	MAPK/ERK Kinase
mTOR	mammalian Target Of Rapamycin
NF κ B	Nuclear Factor κ B
NLS	Nuclear Localisation Sequence
NO	Nitric Oxide
ODD	Oxygen Dependent Degradation
p70S6K	70-kDa ribosomal protein S6 kinase
PAS	PER/ARNT/SIM
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polymerase Chain reaction
PDGF	Platelet-Derivated Growth Factor
PHD	Prolyl HyDroxylases
PI3K	Phosphatidyl Inositol-3-Kinase
PIB	Phosphatase Inhibitor Buffer
PIC	Protease Inhibitor Cocktail
PKA	Protéine Kinase A
Pro	Proline
PVDF	PolyVinylidene DiFluoride
pVHL	protéine de Von Hippel Lindau
ROS	Reactive Oxygen Species
RPM	Rotation Par Minute
SDS	Sodium Dodécyl Sulfate
SP-1	Specificity Protein 1
TAD	TransActivation Domain
TEMED	NNN'N'-TEtraMethylEthylneDiamine
TGF- β	Transforming Growth Factor- β
Thr	Thréonine
TNF- α	Tumor Necrosis Factor α
TSC	Tuberous Sclerosing Complex
VEGF	Vascular Endothelium Growth Factor

Table des matières

INTRODUCTION	1
AVANT-PROPOS	1
L'HYPOXIE	2
1. Généralités	2
1.1 Définition	2
1.2 Réponse cellulaire à l'hypoxie	2
2. Le facteur de transcription HIF-1	3
2.1 Découverte	3
2.2 Structure	3
2.3 Importance de HIF-1 α	4
3. Les mécanismes de régulation de HIF-1	4
3.1 Répression de l'activité en normoxie	4
3.2 Formation du facteur de transcription fonctionnel en hypoxie	5
3.3 Régulation négative de HIF-1	5
4. Les différentes familles des gènes cibles de HIF-1	6
4.1 Disponibilité en oxygène	6
4.2 Contrôle du système vasculaire	6
4.3 Métabolisme du glucose	6
4.4 Activité mitogénique et apoptotique	7
4.5 Autres gènes cibles	7
5. La séquence consensus HRE	7
6. La synthèse protéique en hypoxie	8
6.1 Les mécanismes effecteurs de la traduction	8
6.2 Régulation de l'initiation de la traduction	8
6.3 Régulation de l'élongation lors de la synthèse protéique	9
6.4 Traduction des protéines importantes pour l'adaptation à l'hypoxie	9
LES STIMULI INDUISANT L'ACTIVATION DE HIF-1 EN NORMOXIE	10
1. Généralités	10
2. Les cytokines et facteurs de croissance	11
2.1 IL-1 β	11
2.2 Insuline	12
2.3 IGF-I	12
3. Les voies d'activation annexes de HIF-1	13
3.1 La voie des MAPK	14
3.2 La voie PI3K/AKT	14
4. Des différences entre l'hypoxie et l'induction normoxique	15
LE RÔLE DE HIF-1 DANS LES TUMEURS	16
1. L'hypoxie dans les tumeurs	16
2. HIF-1 est activé en normoxie dans les cancers	17
2.1 Activation de HIF-1 par mutation de pVHL	17
2.2 Activation de HIF-1 par des stimuli extracellulaires	17
OBJECTIFS DE LA RECHERCHE	18
MATÉRIEL ET MÉTHODES	20
1. Culture cellulaire	20
1.1 Lignées cellulaires utilisées	20
1.2 Le repiquage cellulaire	20
1.3 Incubation en hypoxie	20
2. Stimulation des cellules	20
2.1 Matériel	20
2.2 Méthode	21
3. Extraction de protéines	21
3.1 Matériel	21
3.2 Méthode	21
4. Dosage de Bradford	21
4.1 Principe	21
4.2 Matériel	21
4.3 Méthode	21
5. Western Blot	22
5.1 Principe	22
5.2 Matériel	22
5.3 Méthode	22
6. Immunofluorescence	24

6.1	Principe	24
6.2	Matériel	24
6.3	Méthode	24
7.	<i>RT PCR en temps réel</i>	25
7.1	Principe	25
7.2	Matériel	25
7.3	Méthode	26
8.	<i>Système rapporteur</i>	27
8.1	Principe	27
8.2	Matériel	27
8.3	Méthode	27
9.	<i>Immunoprécipitation de chromatine (ChIP)</i>	28
9.1	Principe	28
9.2	Matériel	28
9.3	Méthode	29
RESULTATS ET DISCUSSION		32
ETUDE DE L'INDUCTION DE HIF-1 α DANS DIFFERENTS TYPES CELLULAIRES		32
1.	<i>Détection de IGFR par marquage en immunofluorescence</i>	32
2.	<i>Analyse de l'induction de HIF-1α</i>	33
2.1	Effet de l'hypoxie sur l'expression protéique de HIF-1 α	33
2.2	Effet de l'IGF sur l'expression protéique de HIF-1 α	33
2.3	Discussion	34
ETUDE DE L'ACTIVITE DE HIF-1 EN REPONSE A DIFFERENTES STIMULATIONS		35
1.	<i>Activation d'une cascade de transduction du signal dans les cellules HepG2 stimulées avec l'insuline ou l'IL-1β</i>	35
1.1	Etude de l'abondance d'AKT phosphorylé	35
1.2	Etude de l'abondance d'I κ B phosphorylé	36
1.3	Discussion	36
2.	<i>Effet de l'IL-1β et de l'insuline sur l'expression protéique de HIF-1α en normoxie</i>	37
2.1	Effet de l'insuline	37
2.2	Effet de l'IL-1 β	37
2.3	Discussion	38
3.	<i>Effet de l'insuline et de l'IL-1β sur l'abondance des ARNm de certains gènes cibles de HIF-1</i>	39
3.1	Effet de l'hypoxie	39
3.2	Effet de l'insuline	39
3.3	Effet de l'IL-1 β	40
3.4	Discussion	40
4.	<i>Effet de l'insuline et de l'IL-1β sur l'activité transcriptionnelle de HIF-1 mesurée par système rapporteur</i>	41
4.1	Effet de l'hypoxie	41
4.2	Effet de l'insuline	41
4.3	Effet de l'IL-1 β	41
4.4	Discussion	42
5.	<i>Etude de la liaison de HIF-1 dans un environnement natif</i>	42
5.1	Caractérisation de la liaison HIF-1/HRE en hypoxie	43
5.2	Caractérisation de la liaison HIF-1/HRE après stimulation avec l'insuline	43
5.3	Caractérisation de la liaison HIF-1/HRE après stimulation avec l'IL-1 β	44
5.4	Discussion	44
CONCLUSION ET PERSPECTIVES		45
BIBLIOGRAPHIE		47

INTRODUCTION

Avant-propos

Dérivé du grec '*carcin*' signifiant 'crabe', le cancer est une maladie mortelle dont personne ne peut prétendre n'avoir jamais entendu parler aujourd'hui tant elle présente dans notre société.

En effet, de nos jours, le cancer est une cause majeure de mortalité dans les pays développés. Cette maladie est responsable effectivement de 25% de tous les cas de morts. Le cancer est également un véritable fléau de notre société car chaque année, 1 personne sur 200 est diagnostiquée comme étant atteinte d'un cancer. Bien que cette maladie soit connue depuis Hippocrate, elle s'est majoritairement développée durant les derniers siècles pour arriver à l'incidence qu'on lui connaît aujourd'hui. Elle est la deuxième cause de mortalité dans le monde et commence même à surpasser les maladies cardiovasculaires aux Etats-Unis.

Développer un cancer est un évènement relativement aléatoire mais il existe certains facteurs de risque augmentant sa probabilité d'occurrence : le tabac, l'alcool ou l'exposition prolongée à des radiations comme les rayons ultra-violet sont les facteurs de risque les plus connus. Certains virus, par exemple le papillomavirus ou le virus d'Epstein-Barr, sont la cause de 15% des cancers humains. Certains cancers sont aussi transmis héréditairement.

La majorité des cancers sont dus à des mutations ponctuelles dans l'ADN génomique de gènes oncogènes ou suppresseurs de tumeurs. Ces mutations entraînent souvent une perte de l'activité des enzymes réparatrices de l'ADN, la perte de la capacité d'apoptose, une prolifération anarchique des cellules, des réponses désordonnées aux facteurs de croissances et l'évasion à la surveillance par le système immunitaire.

La recherche médicale contre le cancer a pris son essor au siècle dernier avec l'avènement de la biologie moderne. Bien qu'une partie importante de la communauté scientifique travaille sur la lutte contre le cancer, il n'existe pas encore aujourd'hui de 'remède miracle' contre cette maladie. En effet, la difficulté de trouver un traitement efficace dirigé contre des cellules du soi spécifique ainsi que la grande diversité dans les différentes formes de cancer en fait une maladie difficile à cerner et dont tous les mécanismes en découlant sont loin d'être compris.

C'est dans le cadre de la recherche contre le cancer que s'inscrit ce travail. Nous verrons par la suite que l'hypoxie est un phénomène qui est étroitement lié au cancer. La compréhension des mécanismes liés à l'hypoxie semble nécessaire pour continuer à assembler les pièces du puzzle de la lutte contre le cancer.

L'hypoxie

1. Généralités

1.1. Définition

Chez les mammifères et donc, chez l'être humain, l'oxygène est un facteur environnemental nécessaire à la survie et dont la diminution persistante de son abondance dans l'environnement proche d'un tissu entraîne inévitablement la mort de l'individu. Signifiant littéralement 'sous-oxygéné', l'hypoxie est de ce fait un état pathologique dans une majorité des tissus animaux. L'hypoxie peut être considérée comme un stress qui entraînera une réponse cellulaire spécifique et adaptative afin de combler la déficience en oxygène à laquelle est exposé l'organisme.

Afin de distribuer l'oxygène dans tous leurs tissus, les organismes complexes acheminent ce dernier par le système circulatoire sanguin qui le véhicule par le biais des globules rouges chargés en oxygène au niveau des poumons. La proximité directe d'un capillaire sanguin à moins d'une distance critique de 200 μm est nécessaire à la distribution de l'oxygène à toutes les cellules d'un tissu. Cette proximité étant inversement proportionnelle à la pression partielle en oxygène, un tissu est caractérisé en hypoxie lorsque cette pression partielle devient inférieure aux moyennes physiologiques situées entre 40 et 50 mmHg (*Hopfl, Ogunshola et al., 2004*).

Alors qu'il est nécessaire pour une cellule ou un tissu d'obtenir une quantité d'oxygène suffisante à sa survie, il ne faut pas oublier qu'un excès d'oxygène entraîne la génération de ROS (Reactive Oxygen Species), hautement nocifs pour l'organisme. Le maintien d'un équilibre entre le manque et l'excès d'oxygène est régulé par une série de mécanismes d'homéostasie, tant au niveau systémique qu'au niveau cellulaire (*Ruas and Poellinger, 2005*).

1.2. Réponse cellulaire à l'hypoxie

L'oxygène est utilisé dans les réactions d'oxydoréduction au niveau du métabolisme cellulaire. Il est aussi l'accepteur final d'électrons au niveau de la chaîne respiratoire dont l'activité consiste à régénérer l'ATP via la chaîne de transport des électrons (respiration cellulaire aérobie). La dégradation d'une molécule de glucose peut fournir jusqu'à la régénération de 36 molécules d'ATP dans les cellules en présence d'oxygène. Lorsque ce dernier est absent, seule la glycolyse permet la production d'énergie, ce qui n'apportera plus que 2 molécules d'ATP par molécule de glucose.

Restreinte dans ses capacités à produire son énergie, une cellule en hypoxie devra obligatoirement réorganiser ses grandes voies d'utilisation de l'ATP afin d'assurer sa survie. Le maintien de l'homéostasie garantissant la stabilité d'une cellule face aux variations du milieu extérieur est de loin le facteur essentiel à cette survie et de ce fait, sera la cible prioritaire des dépenses en ATP au dépend des grands processus hautement énergétiques comme par exemple la synthèse des acides aminés, des acides gras ou la traduction des protéines (*Connolly, Braunstein et al., 2006*).

Cependant, cette seule réponse des cellules au manque d'oxygène ne suffit pas car le tissu qui contient les cellules ne serait alors plus capable de continuer son développement à long terme. C'est pour cela qu'il existe une réponse beaucoup plus spécifique à l'hypoxie qui passe notamment par l'induction de la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (néo-angiogenèse), de l'augmentation de la production de globules rouges (érythropoïèse) ou encore l'induction du métabolisme du glucose (glycolyse).

L'hypoxie initie une série de réponses adaptatives. La plupart d'entre elles sont médiées par un facteur de transcription activé spécifiquement par la diminution de la concentration d'oxygène. Il s'agit du facteur de transcription HIF-1 dont le rôle prépondérant dans la réponse à l'hypoxie a été abondamment démontré.

2. Le facteur de transcription HIF-1

2.1. Découverte

Découvert en 1992 (*Semenza and Wang, 1992*), le facteur de transcription HIF-1 (Hypoxia-Inducible Factor-1) a été identifié comme tel car il se lie à une séquence consensus dans la séquence 3'-*enhancer* du gène de l'érythropoïétine nommée HRE dans la lignée cellulaire Hep3B lors d'une hypoxie prolongée. Bien qu'elle soit nécessaire, une séquence HRE présente dans la séquence promotrice d'un gène n'est cependant pas suffisante pour induire une transcription efficace en hypoxie. Il peut exister en effet d'autres facteurs de transcription dont la régulation peut être indépendante de la concentration en oxygène dans la cellule et pouvant jouer un rôle dans l'induction de la transcription.

Aujourd'hui, il est reconnu que ce facteur de transcription est présent dans une multitude de types cellulaires différents (*Wang and Semenza, 1993*) et plus d'une centaine de gènes ont été découverts comme étant la cible de HIF-1 (*Pouyssegur, Dayan et al., 2006*) comme, par exemple, ceux codant pour des enzymes glycolytiques (aldolase, lactate déshydrogénase A, hexokinase), des transporteurs du glucose (GLUT-1, GLUT-3), ou encore le gène codant pour le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF).

Malgré sa nomination équivoque, HIF-1 ne sert cependant pas uniquement à activer la transcription de ses gènes en hypoxie : il existe, et nous le verrons ultérieurement, d'autres stimuli pouvant activer ce facteur de transcription.

2.2. Structure

HIF-1 est sans doute la protéine la plus importante impliquée dans la réponse à l'hypoxie. C'est un complexe hétérodimérique composé de deux sous-unités : HIF-1 α et HIF-1 β /ARNT. ARNT est exprimée constitutivement et séquestrée dans le noyau. Alors que ces deux protéines sont constamment traduites, HIF-1 α est cependant extrêmement labile en normoxie (avec une pression partielle en oxygène physiologique). Stabilisée lorsque la concentration en oxygène dans les tissus est faible, c'est grâce à elle que la réponse adaptative à l'hypoxie se met en place.

Les deux sous-unités présentent une homologie relativement bien conservée. Nous notons la présence de deux séquences spécifiques : un domaine bHLH et un domaine PAS. Alors que la partie basique du domaine bHLH et la moitié carboxy-terminale du domaine

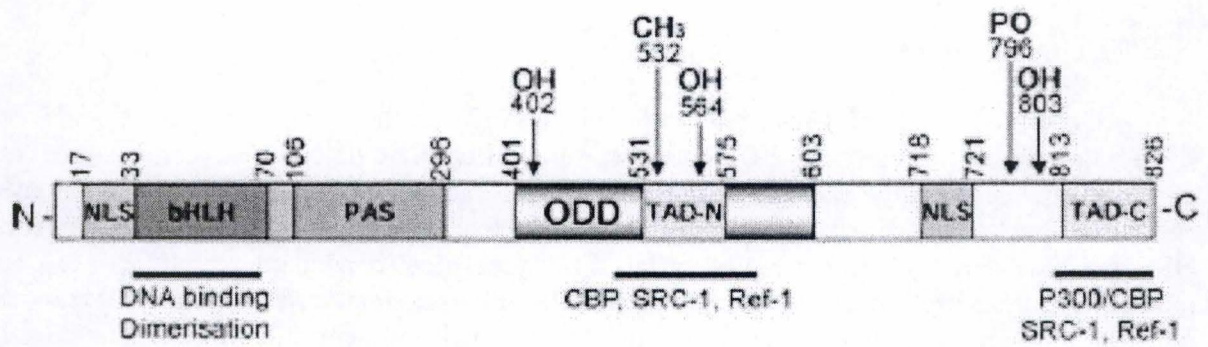


FIGURE 1 : Représentation schématique de la sous-unité alpha du facteur de transcription HIF-1 avec la position de ses différents domaines. (Déry, Michaud et al, 2004)

PAS sont responsables de la liaison à l'ADN, la seconde partie du domaine bHLH et la moitié amino-terminale du domaine PAS sont les motifs d'hétérodimérisation. Ces deux sous-unités possèdent encore chacune un domaine TAD. Ces domaines ont pour rôle d'interagir avec des coactivateurs tels que CBP ou p300. De plus, dans le cas de la sous-unité alpha, le domaine TAD, bien que séparés en deux sous-domaines (TAD-N et TAD-C), permet la régulation de la transcription des gènes cibles de HIF-1. Il subit également certaines modifications post-traductionnelles (hydroxylation, phosphorylation,...) qui modulent son activité transactivatrice.

Précisons qu'il existe également 2 autres facteurs de transcription, paralogues de HIF-1 et sensibles à l'oxygène : HIF-2 et HIF-3. Ce sont également des hétérodimères constitués d'une part de la sous-unité HIF-1 β mais aussi des sous-unités respectivement HIF-2 α et HIF-3 α . Alors que le facteur transcriptionnel HIF-2 joue le rôle d'activateur de ses gènes cibles et que sa sous-unité alpha est dégradée en normoxie tout comme HIF-1 α , le rôle de HIF-3 est beaucoup moins clair mais un de ses variants issu d'un épissage alternatif de HIF-3 α nommé IPAS est fonctionnel en tant que répresseur transcriptionnel en hypoxie (*Wenger, 2002*).

2.3. Importance de HIF-1 α

L'activité du facteur de transcription HIF-1 est finement régulée par la présence d'oxygène intracellulaire, ce qui en fait l'acteur principal de la réponse au manque d'oxygène dans les tissus (*Ruas and Poellinger, 2005*). Toutefois, des deux sous-unités de HIF-1, c'est sans nul doute la sous-unité alpha qui est la plus importante. En effet, comme mentionné précédemment, sa capacité à être dégradé en normoxie ou stabilisé en hypoxie permet à la cellule d'induire une réponse rapide et spécifique en réponse à l'hypoxie. Cette réponse est possible grâce à un domaine senseur de l'oxygène, le domaine ODD (*Huang, Gu et al., 1998*). La sous-unité HIF-1 α possède en outre deux séquences NLS permettant sa translocation dans le noyau (*figure 1*).

3. Les mécanismes de régulation de HIF-1

Alors que le niveau d'oxygène n'affecte pas la stabilité de la sous-unité ARNT présente dans le noyau grâce à sa séquence NLS, celui-ci affecte par contre la disponibilité de la protéine HIF-1 α . Malgré le fait que celle-ci soit constitutivement traduite, il existe néanmoins un mécanisme de régulation de l'abondance de cette dernière : les cellules contrôlent la stabilité de la protéine par dégradation de cette dernière lorsque la pression partielle en oxygène est proche d'un niveau physiologique.

3.1. Répression de l'activité en normoxie

Les mécanismes impliqués dans la régulation de la disponibilité de HIF-1 α sont maintenant bien compris. Ainsi, il a été montré qu'en normoxie, la grande majorité de la sous-unité alpha cytosolique était dégradée par le protéasome 26S (*Huang, Gu et al., 1998*) endéans les 5 minutes. Cette dégradation est médiée grâce à la poly-ubiquitination de HIF-1 α par un complexe E3-ligase spécifique incluant HIF-1 α elle-même, les élongines B et C, la culline-2, rbx-1 et pVHL (*Kamura, Sato et al., 2000*). La formation de ce complexe dépend uniquement de l'interaction de pVHL avec le domaine ODD de HIF-1 α : il contient 2 sous-

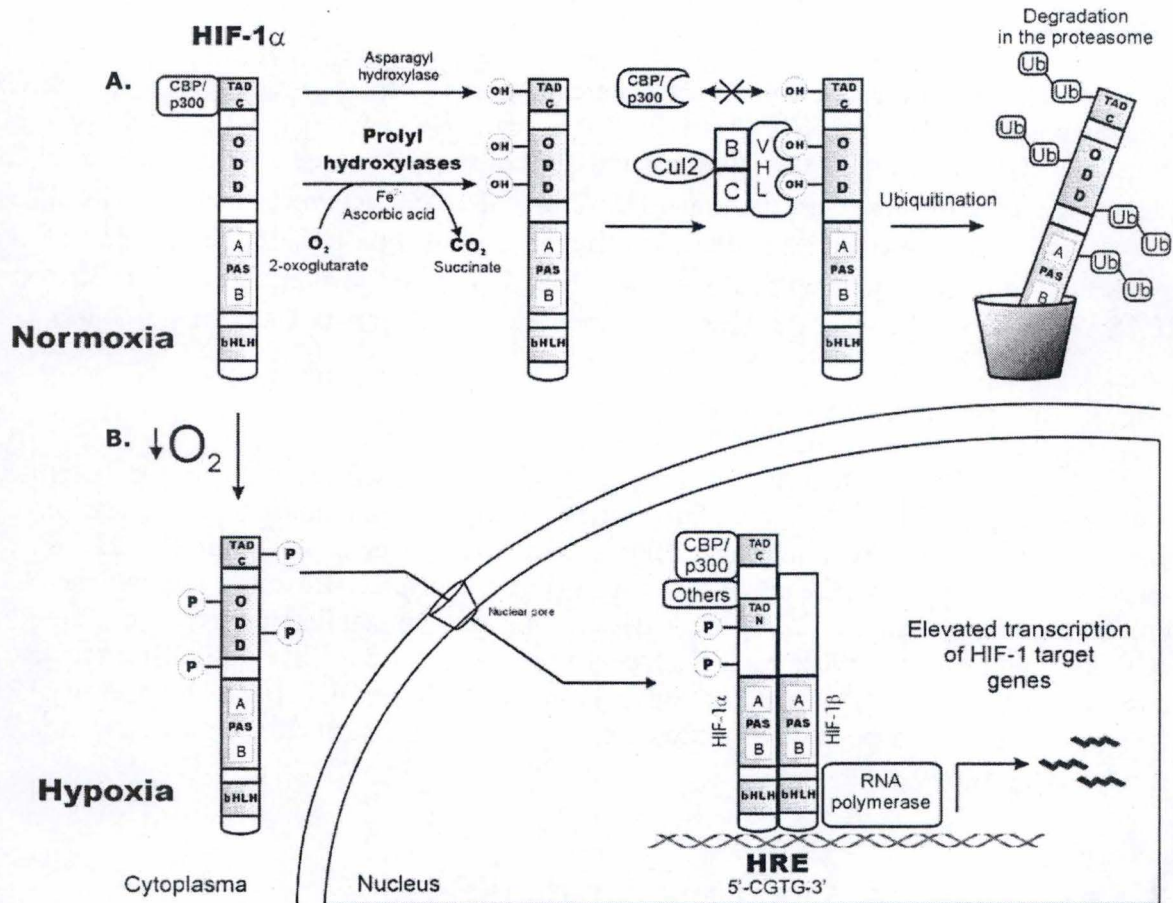


FIGURE 2: (A) Régulation de la sous-unité alpha de HIF-1 en normoxie : après son hydroxylation sur deux prolines du domaine ODD, HIF-1 α interagit avec pVHL ce qui mènera au final à sa poly-ubiquitination et sa dégradation par le protéasome. (B) Quand la quantité d'oxygène intracellulaire diminue, HIF-1 α n'est plus hydroxylé ; il peut alors transloquer dans le noyau et former le facteur de transcription fonctionnel. (*Hopfl, Ogunshola et al., 2004*)

domaines contenant chacun un résidu proline (Pro402 et Pro564) qui, à eux seuls, peuvent moduler l'affinité de HIF-1 α avec pVHL.

En effet, c'est l'hydroxylation de ces deux résidus qui va fortement augmenter l'affinité de HIF-1 α pour pVHL afin d'aboutir à la formation du complexe E3-ligase. Cette hydroxylation est en quelque sorte le point critique de la régulation de HIF-1 α par l'oxygène car seuls 3 membres de la famille des PHDs peuvent médier cette activité (*Bruick and McKnight, 2001*). La réaction provoquant l'hydroxylation est catalysée en présence de Fe(II) et utilise comme substrat l'oxygène et le 2-oxoglutarate et libère en outre du dioxyde de carbone et du succinate (*Stolze, Mole et al., 2006*).

Un autre type d'enzyme, dont le mécanisme d'action est identique aux PHDs, le *factor inhibiting HIF* (FIH) joue aussi un rôle important dans la répression de la cascade de transduction du signal de HIF. Son activité asparaginyl hydroxylase en normoxie sur le domaine TAD-C de HIF-1 α (et plus précisément sur son résidu conservé N803) empêche le recrutement des coactivateurs de HIF-1 comme p300 ou son homologue CBP par inhibition stérique (*Peet and Linke, 2006*).

Nous comprenons donc que lorsque la concentration d'oxygène cytosolique est suffisante, la sous-unité HIF-1 α est constamment inactivée et dégradée par le protéasome 26S. Elle ne peut donc pas contribuer à la formation du facteur de transcription HIF-1 menant à la réponse à l'hypoxie ce qui mène globalement à une répression totale de l'activité de HIF-1 en normoxie (*figure 2.A*).

3.2. Formation du facteur de transcription fonctionnel en hypoxie

La configuration remarquable de ce mécanisme laisse entrevoir un puissant contrôle de la disponibilité de la sous-unité alpha du facteur transcriptionnel HIF-1 : l'augmentation de la transcription des gènes cibles de HIF-1 en hypoxie repose en fait sur une régulation de la stabilité de la sous-unité HIF-1 α dans le cytosol.

Effectivement, les prolyl-hydroxylases sont en quelque sorte le point d'orgue de cette régulation ; ce sont elles qui envoient HIF-1 α vers la dégradation par le protéasome. Seulement, ces dernières ne peuvent fonctionner qu'en présence d'oxygène, oxygène qui, lorsqu'il est absent ou du moins peu abondant, réduit voire même inhibe purement et simplement l'hydroxylation des prolines. Nous pouvons déduire aisément ce qu'il advient alors de HIF-1 α : n'étant presque plus dégradée par le protéasome, la protéine s'accumule dans le cytoplasme. HIF-1 α transloque alors dans le noyau grâce à ses deux séquences NLS. A l'intérieur de ce dernier, les deux sous-unités (HIF-1 α et ARNT) pourront former l'hétérodimère HIF-1 (*Dery, Michaud et al., 2005*).

La diminution de la concentration en oxygène ayant aussi un effet inhibiteur sur l'activité asparaginyl-hydroxylase de la FIH, HIF-1 pourra alors interagir avec ses coactivateurs et se liera à l'ADN sur les séquences HRE en amont de ses gènes cibles afin d'en augmenter la transcription (*figure 2.B*).

3.3. Régulation négative de HIF-1

Il existe différents mécanismes de régulation négative de HIF-1 menant à une limitation de la réponse à l'hypoxie. La suppression de son activité peut survenir à différents

Table 1. Transcriptionally activated genes by HIF-1.

Function	Genes
Cell proliferation	Cyclin G2, IGF2, IGF-BP1, IGF-BP-2, IGF-BP-3, WAF-1, TGF- α , TGF- β 3
Cell survival	ADM, EPO, IGF2, IGF-BP1, IGF-BP-2, IGF-BP-3, NOS2, TGF- α , VEGF
Apoptosis	NIP3, NIX, RTP801
Motility	ANF/GPI, c-MET, LRP1, TGF- α
Cytoskeletal structure	KRT14, KRT18, KRT19, VIM
Cell adhesion	MIC2
Erythropoiesis	EPO
Angiogenesis	EG-VEGF, ENG, LEP, LRP1, TGF- β 3, VEGF
Vascular tone	α_{1B} -adrenergic receptor, ADM, ET1, Haem oxygenase-1, NOS2
Transcriptional regulation	DEC1, DEC2, ETS-1, NUR77
pH regulation	Carbonic anhydrase 9
Regulation of HIF-1 activity	P35srj
Epithelial homeostasis	Intestinal trefoil factor
Drug resistance	MDR1
Nucleotide metabolism	Adenylate kinase 3, Ecto-5'-nucleotidase
Iron metabolism	Ceruloplasmin, Transferrin, Transferrin receptor
Glucose metabolism	HK1, HK2, AMF/GPI, ENO1, GLUT1, GAPDH, LDHA, PFKFB3, PFKL, PGK1, PKM, TPI, ALDA, ALDC
Extracellular-matrix metabolism	CATHD, Collagen type V (α 1), FN1, MMP2, PAI1, Prolyl-4-hydroxylase α (1), UPAR
Energy metabolism	LEP
Amino-Acid metabolism	Transglutaminase 2

TABLE 1 : Classement selon leur fonction des différents gènes cible de HIF-1. (Lee, Bae et al., 2004)

niveaux tels que la transcription, la traduction, la stabilisation ou l'activation de HIF-1 (Zagorska and Dulak, 2004).

Par exemple, Cited2 est un inhibiteur compétitif de l'interaction de HIF-1 avec ses cofacteurs CBP/p300 car ils interagissent tous deux avec une région riche en histidines et en cystéines, la région CH1 de ces derniers (Leung, Jones et al., 1999). Remarquons que l'expression de Cited2 est induite par HIF-1. Ce dernier induit également la synthèse des PHDs qui seront responsables de la dégradation rapide de sa sous-unité alpha lors d'une réoxygénation fructueuse et de l'Hème-oxygénase-1 pouvant augmenter la quantité d'ions ferreux, un des cofacteurs des PHDs.

Certains variants issus de l'épissage alternatif des sous-unités alpha de HIF peuvent agir en tant qu'antagonistes. IPAS, le variant issu de l'épissage alternatif de HIF3- α fut le premier découvert mais il en existe d'autres tels qu'une isoforme de HIF-1 α dans laquelle les exons 11 et 12 manquent (Zagorska and Dulak, 2004).

4. Les différentes familles des gènes cibles de HIF-1

L'adaptation cellulaire à l'hypoxie requiert une réponse prompte et directe afin de pouvoir régir d'un point de vue métabolique la répartition optimale de l'énergie d'une part et d'aider les tissus hypoxiques à retrouver une source d'oxygène afin de pouvoir continuer à proliférer d'autre part. Dans cette optique, les gènes dont la transcription est régulée par le facteur de transcription HIF-1 peuvent se regrouper en familles dont les différents acteurs possèdent les mêmes objectifs globaux. La table 1 représente les différents gènes cibles de HIF-1 classés selon leurs effets dans la cellule.

4.1. Disponibilité en oxygène

Une des façons les plus évidentes d'une réponse adaptative à un manque d'oxygène est bien évidemment de trouver un système par lequel l'oxygène pourrait être acheminé plus facilement ou du moins en plus grande quantité.

Le premier gène cible de HIF-1 découvert, l'EPO, est un facteur de croissance qui va stimuler au niveau de la moelle osseuse la production d'hématies dont le rôle majeur consiste au transport de l'oxygène des poumons vers les tissus. Ce mécanisme est particulièrement important lors d'hypoxies modérées comme lors d'un séjour en haute altitude par exemple.

L'expression de la transferrine et de son récepteur est aussi régulée par HIF-1 : une carence en transferrine entraîne en effet une diminution de la synthèse d'hémoglobine, le transporteur principal de l'oxygène, dont les groupements 'hème' sont constitués en leur centre d'un atome de fer.

4.2. Contrôle du système vasculaire

L'augmentation du tonus vasculaire et du diamètre des vaisseaux sanguins permet un apport accru en oxygène. Ceci se fait grâce à l'induction de différents gènes codant pour différentes protéines impliquées dans le contrôle vasomoteur tels que iNOS, l'Endothéline-1 ou encore l'Hème oxygénase.

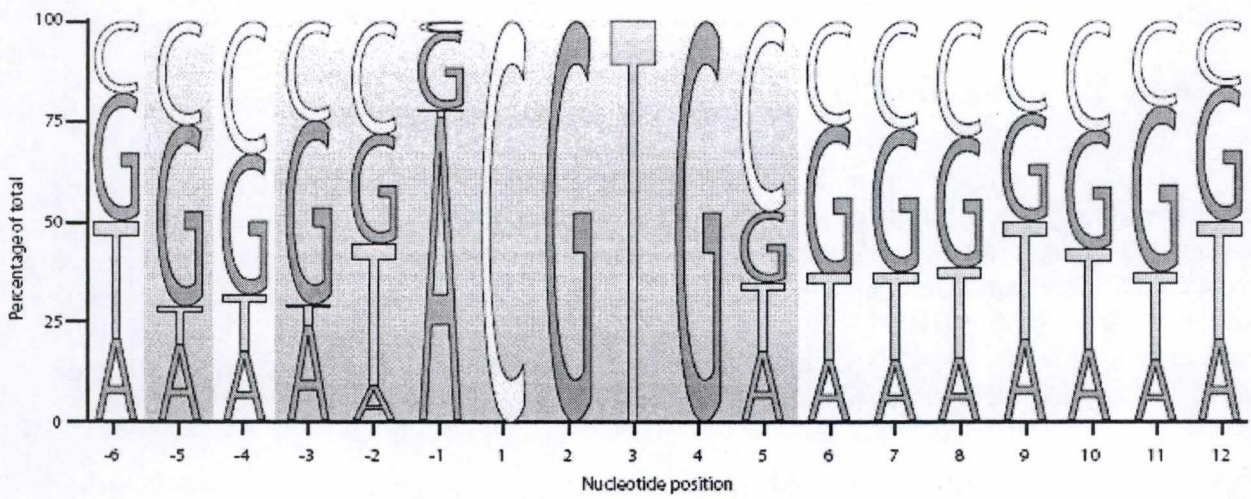


FIGURE 3: Fréquence d'apparition des nucléotides à proximité directe de la séquence conservée HRE noyau. (Wenger, Stiehl et al., 2005)

HIF-1 est aussi et surtout l'activateur transcriptionnel du VEGF : le facteur de croissance qui va induire la formation de nouveaux vaisseaux sanguins afin de dispenser l'oxygène dans les tissus moins bien irrigués. Signalons encore que HIF-1 est aussi le facteur de transcription pour un des deux récepteurs du VEGF.

4.3. Métabolisme du glucose

Afin de faire face au manque d'oxygène, les tissus hypoxiques vont privilégier la respiration anaérobie comme source d'énergie provisoire principale. A court terme, ceci est possible par l'activation de la glycolyse s'effectue via une régulation allostérique et est indépendante de HIF-1. A plus long terme, nous retrouvons sous le contrôle de HIF-1 une batterie de gènes impliqués dans le métabolisme du glucose. Tout d'abord, la plupart des enzymes de la glycolyse se retrouvent transactivés par HIF-1 (Aldolase A, GAPDH, Enolase,...). Une assimilation accrue du glucose par l'augmentation de la transcription des gènes encodant ses transporteurs (GLUT-1) est également une des conséquences de l'hypoxie. La capacité du flux glycolytique en est par conséquent augmentée.

4.4. Activité mitogénique et apoptotique

L'hypoxie étant un état pathologique résultant d'une déficience en oxygène, il est bénéfique pour l'organisme d'induire l'arrêt du cycle cellulaire, processus hautement énergétique et relativement inutile dans le cas où un tissu n'aurait pas même assez d'énergie à sa disposition afin d'assurer la synthèse de la plupart des constituants cellulaires. Ceci est possible grâce à l'induction de p21, un inhibiteur des cyclines dépendant kinases inhibant donc l'activité des kinases CDK2 et CDK4 et empêchant ainsi la cellule de dépasser le stade G1 du cycle cellulaire.

Une hypoxie persistante sera cependant la cause d'une conséquence plus grave. En effet, HIF-1 est capable d'induire l'apoptose (mort cellulaire programmée) notamment en augmentant la transcription du gène codant pour BNIP-3, facteur pro-apoptotique appartenant à la famille de Bcl-2.

Par opposition, nous retrouvons sous le contrôle de HIF-1 certains gènes liés à la prolifération tels que des facteurs de croissance. La présence de protéines pro- et anti-apoptotique dont les gènes sont transactivés par HIF-1 peut paraître surprenante mais nous verrons les différentes implications de ce phénomène dans la suite de cette introduction.

4.5. Autres gènes cibles

Nous retrouvons également des cibles de HIF-1 qui ne sont pas spécifiques des familles citées précédemment. L'anhydrase carbonique 9 par exemple permet une régulation du pH et l'adénylate cyclase 3 joue un rôle dans le métabolisme des nucléotides.

5. La séquence consensus HRE

La séquence HRE à laquelle se lie le facteur de transcription HIF-1 est d'une importance capitale pour l'activation de la transcription de ses gènes cibles. Celle-ci possède une séquence consensus nommée 'noyau' (5'-XRCGTG-3' où R peut être soit A, soit G et X n'importe lequel des 4 nucléotides) qui est l'élément régulateur minimal requis pour une

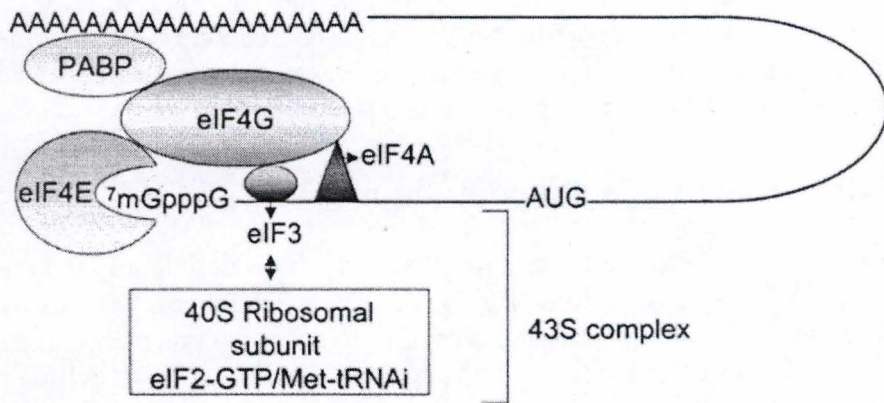


FIGURE 4 : Formation du complexe d'initiation de la traduction coiffe-dépendant recruté sur un ARNm. (Lopez-Lastra, Rivas et al., 2005)

induction en conditions hypoxiques (*figure 3*). Initialement découverte dans la région 3'-*enhancer* du gène de l'EPO, sa position n'est cependant pas déterminante pour être fonctionnelle : nous la retrouvons aussi bien dans le promoteur des gènes cibles que dans la partie 5'-*enhancer*. La sous-unité bêta interagit spécifiquement avec la moitié 3' de la séquence tandis que son partenaire, HIF-1 α interagit plutôt avec la moitié 5' (*Wenger, Stiehl et al., 2005*). La structure du promoteur et l'environnement direct de la séquence HRE peuvent jouer sur une régulation beaucoup plus spécifique que la simple transactivation des gènes cibles de HIF-1 en hypoxie par différents mécanismes.

Par exemple, les séquences promotrices dans lesquelles nous retrouvons le motif HRE peuvent aussi contenir d'autres sites de liaison pour différents facteurs de transcription qui ne sont pas forcément inductibles en hypoxie mais qui peuvent amplifier la réponse ou lui procurer une activité transcriptionnelle spécifique à un tissu. Il a été démontré par exemple que HIF-1 interagissait avec ATF-1 et CREB-1 pour transactiver le gène de la lactate déshydrogénase A dans les cellules HeLa (*Ebert and Bunn, 1998*) ou encore avec le facteur de transcription AP-1 pour transactiver le gène codant pour le VEGF dans les cellules gliomales C6 (*Damert, Ikeda et al., 1997*). Plusieurs séquences HRE noyaux adjacentes peuvent aussi former un HRE fonctionnel : ces séquences alignées ont été retrouvées notamment dans le promoteur des gènes codant pour des enzymes glycolytiques ou pour GLUT-1 (*Wenger, Stiehl et al., 2005*).

Il peut également exister des séquences HRE dont l'efficacité de liaison à HIF-1 est plus faible et dont la réponse transcriptionnelle en hypoxie est plus faible. C'est le cas par exemple de la séquence 5'-CACGTG-3' qui peut lier l'homodimère de ARNT, diminuant alors l'activité de transactivation par HIF-1 du gène concerné (*Wenger, Stiehl et al., 2005*).

Enfin, HIF-1 pourrait distinguer les séquences HRE fonctionnelles grâce à la présence d'une séquence HAS, 8 nucléotides en amont de la séquence HRE noyau (*Zagorska and Dulak, 2004*). Cette séquence HAS n'étant pas bien conservée, il est probable que d'autres facteurs de transcription pouvant se lier à proximité de la séquence HRE interagissent avec HIF-1, induisant une réponse spécifique du tissu ou du gène régulé par HIF-1 (*Wenger, Stiehl et al., 2005*).

6. La synthèse protéique en hypoxie

6.1. Les mécanismes effecteurs de la traduction

Dans les cellules eucaryotes, le passage d'un transcrit génétique composé d'une suite de codons à la synthèse d'une protéine constituée d'une suite d'acides aminés est un processus complexe et hautement énergétique. Le pré-ARNm, produit de la transcription d'un gène doit tout d'abord subir une maturation par un épissage des introns et ensuite par l'ajout d'une coiffe 5'm⁷GpppN et d'une queue polyA. L'ARNm ainsi formé peut alors se faire traduire par la machinerie ribosomale dans le cytoplasme.

L'initiation de la traduction chez les mammifères implique le recrutement du ribosome sur l'ARNm dans le cytosol (*figure 4*). Ceci se passe via un complexe d'initiation coiffe-dépendant, dans lequel eIF4E, un facteur d'initiation, joue un rôle prépondérant. Ce complexe peut interagir avec les coiffes 5'm⁷GpppN des ARNm. Le complexe dont fait partie eIF4E a pour rôle de ponter l'ARNm, le ribosome et la machinerie d'initiation afin d'initier la traduction (*Connolly, Braunstein et al., 2006*). Le complexe d'initiation est aussi constitué

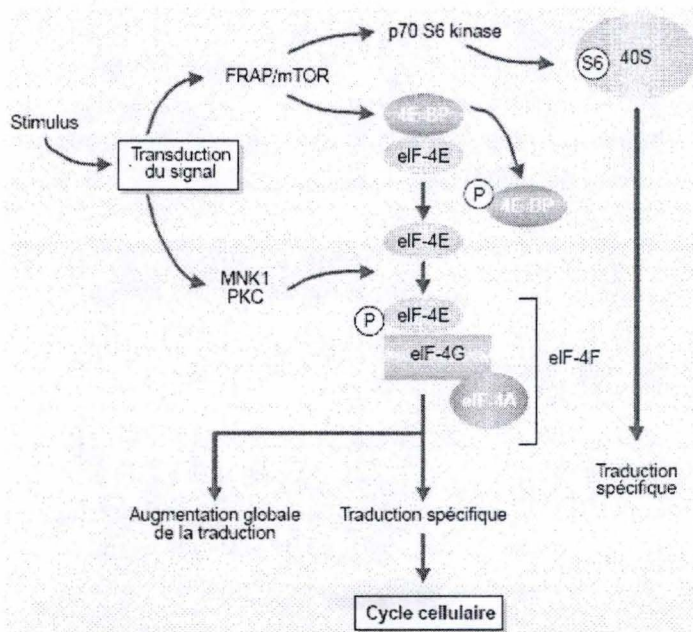


FIGURE 5 : Schéma général illustrant la formation des complexes d'initiation de la traduction médiée par mTOR. (Cormier, 2000)

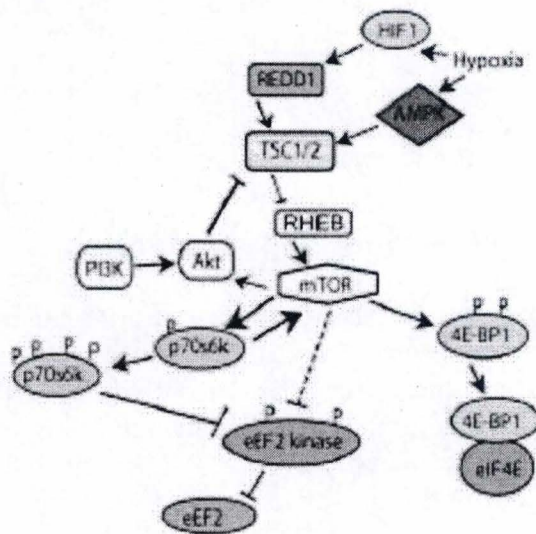


FIGURE 6 : Mécanismes menant globalement à l'inhibition de la synthèse protéique suite à une hypoxie. (Connolly, Braunstein et al., 2006)

entre autre de eIF3 chargé de l'interaction avec la sous-unité 40S du ribosome, de eIF4G liant eIF4E, d'une hélicase eIF4A et de PABP stimulant la traduction (*Lopez-Lastra, Rivas et al., 2005 ; Connolly, Braunstein et al., 2006*). La formation de ce complexe avec les ARNm et les ribosomes entraîne une augmentation globale de la synthèse protéique mais aboutit aussi à une augmentation plus spécifique de la synthèse de protéines impliquées dans le cycle cellulaire par le biais d'une induction particulière avec eIF4G (*Cormier, 2000*).

L'élongation est un autre mécanisme lié à la synthèse des protéines qui permet au ribosome de se déplacer le long de l'ARNm afin de continuer à traduire la séquence des codons en acides aminés. Moins bien connue que l'étape d'initiation, elle implique l'interaction avec des facteurs d'élongation tels qu'eEF-1 et eEF-2.

6.2. Régulation de l'initiation de la traduction

Nous avons expliqué précédemment comment l'hypoxie pouvait entraîner l'augmentation de la transcription de certains de ses gènes cibles. Cependant, ne perdons pas de vue que la réponse hypoxique d'un tissu passe aussi par l'inhibition des grandes voies cellulaires consommatrices d'ATP afin de préserver ce dernier presque exclusivement pour la conservation du potentiel de membrane, l'élément le plus essentiel de la survie cellulaire. La synthèse protéique est une de ces voies consommant une quantité importante d'ATP et doit donc être régulée en hypoxie.

Il existe 3 protéines spécifiques, 4E-BP1, -2 et -3 impliquées dans la régulation de la formation du complexe d'initiation. Ces protéines dont 4E-BP1 est le membre le plus représentatif sont des inhibiteurs compétitifs de eIF4G en venant se lier avec une plus haute affinité sur eIF4E. Ceci aura pour conséquence d'empêcher la formation du complexe d'initiation et ainsi réduire la synthèse protéique.

Dans des conditions physiologiques habituelles, les cellules ayant besoin d'effectuer la synthèse protéique, 4E-BP1 est inactivé grâce à son hyper-phosphorylation par mTOR, ce qui déréprime eIF4E, la protéine de régulation de la traduction, en inhibant leur interaction (*Bilton and Booker, 2003*). Ce mécanisme permet de rétablir l'interaction avec eIF4G et déclenche ainsi la traduction des protéines (*figure 5*).

6.3. Régulation de l'élongation lors de la synthèse protéique

L'élongation est un mécanisme pouvant être également régulé afin de diminuer la synthèse des protéines : eEF2 peut être phosphorylé sur son résidu Thr-56 par eEF2 kinase. Ceci aura pour conséquence d'aboutir à une inhibition de eEF2 et donc de l'élongation. La kinase mTOR est encore impliquée au niveau de la régulation de l'élongation mais il existe aussi p70^{S6K} ; toutes deux permettent la dérépression d'eEF2 en inhibant par phosphorylation sa kinase.

L'hypoxie aboutit globalement à la répression de la traduction par deux voies principales : la première est initiée par le facteur de transcription HIF-1 qui est l'activateur transcriptionnel de REDD1 tandis que la seconde implique AMPK, une protéine sensible à la quantité d'AMP présent dans la cellule (*Winder, 2001*). Cette dernière régule négativement la synthèse protéique lorsque la quantité d'AMP augmente. Les activités de REDD1 et d'AMPK aboutissent toutes deux à la formation du complexe TSC1/2 qui aboutit lui-même à l'inhibition de mTOR. Si ce dernier est inhibé, ni l'élongation, ni l'initiation de la traduction

ne peuvent se dérouler, ce qui mènera effectivement à l'inhibition globale de la traduction en hypoxie (*figure 6*).

6.4. Traduction des protéines importantes pour l'adaptation à l'hypoxie

Bien que la traduction générale soit réprimée en hypoxie, les ARNm des gènes importants pour l'adaptation spécifique à l'hypoxie comme par exemple les gènes codant pour le VEGF ou encore pour HIF-1 α et HIF-1 β doivent continuer à être traduits. Le mécanisme décrit à la page précédente était, rappelons-le, initié par la reconnaissance spécifique de la coiffe propre à tous les ARNm. Il existe cependant d'autres mécanismes, indépendants de la reconnaissance de la coiffe, pouvant initier la traduction de gènes cibles particuliers. Ces mécanismes impliquent majoritairement la présence d'une séquence IREs dans la région 5' non-traduite de l'ARNm qui outrepassa la traduction coiffe-dépendante en liant directement les facteurs de traduction eIF4G et eIF3 aux sous-unités ribosomiales (*Lang, Kappel et al., 2002*). Etant donné que les ARNm encodant les protéines impliquées dans la réponse à l'hypoxie possèdent une telle séquence IREs, c'est donc par ce biais détourné que, même en hypoxie, la traduction des produits de certains gènes spécifiques peut être maintenue.

Stimulus**Proteins**

Insulin
IGF-1
IGF-2
bFGF
EGF
HGF
PDGF
TGF- β
IL-1 β
TNF- α
Angiotensin II
Endothelin-1
Thrombin
Heregulin
Nur77
Antigens (T cell receptor)

Small molecules

Androgens
Thyroid hormone
Acetylcholine
FSH
Serotonin
NO
ROS (junD⁺ cells)
LPS

Viral infection

Epstein-Barr virus
Hepatitis B virus
Herpes virus 8

Physical stimuli

Heat
Mechanical stress

Ions

Fe²⁺ chelation
Co²⁺
Ni²⁺
Ca²⁺
Cu²⁺
Zn²⁺
As^{III}
V^V
Cr^{VI}
H⁺ (pH)

TABLE 2: Liste des différents stimuli pouvant induire l'activation du facteur de transcription HIF-1 en normoxie. (Wenger, Stiehl et al., 2005)

Les stimuli induisant l'activation de HIF-1 en normoxie

1. Généralités

L'hypoxie n'est pas la seule condition dans laquelle nous observons une activation de HIF-1 peut être observée. Certaines études ont montré que HIF-1 α pouvait être stabilisé aussi en normoxie (*Stroka, Burkhardt et al., 2001*) bien que l'amplitude de la réponse soit, de loin, fortement inférieure à celle observée lors d'une induction hypoxique (*Bilton and Booker, 2003*). Il existe en effet un nombre impressionnant de stimuli permettant la régulation de la sous-unité alpha de ce facteur de transcription et ce, à différents niveaux. Une des caractéristiques majeures de l'activation de HIF-1 par différents stimuli est que la réponse varie d'un type cellulaire à l'autre et n'est pas forcément identique pour chaque stimulus (*Bilton and Booker, 2003*) : il est ainsi très difficile de caractériser une réponse générale de l'activation de HIF-1 pour tous les stimuli et tous les types cellulaires.

Parmi ces nombreux stimuli, nous retrouvons certaines cytokines comme par exemple l'IL-1 β ou le TNF- α mais aussi des facteurs de croissance tels que l'insuline, l'IGF-1 ou encore le TGF- β . Les ROS sont également des facteurs susceptibles de mener à une stabilisation de HIF-1 α aussi bien que certaines infections virales (virus d'Epstein-Barr) ou de stimuli physiques comme la chaleur ou des stress mécaniques (*Lee, Bae et al., 2004*). Le NO est aussi capable de mener à l'activation de HIF-1 mais il a aussi été démontré qu'il pouvait également interférer avec son activité (*Sogawa, Numayama-Tsuruta et al., 1998*). Cet effet différentiel en normoxie pourrait être expliqué par le fait qu'un traitement court et un traitement prolongé au NO induisaient respectivement une augmentation et une diminution de la quantité de HIF-1 α (*Genius and Fandrey, 2000 ; Wenger, 2002*). L'effet serait néanmoins dépendant du modèle cellulaire utilisé et des conditions expérimentales, illustrant, une fois encore, la grande complexité des mécanismes cellulaires impliquant HIF-1. La table 2 reprend une liste des différents stimuli pouvant mener à la stabilisation de HIF-1 α en normoxie.

Les mécanismes utilisés pour pouvoir induire l'hétérodimérisation des sous-unités alpha et bêta du facteur de transcription HIF-1 afin de le rendre fonctionnel en conditions de normoxie ne passent pas par une régulation dépendante de l'oxygène via les différentes PHDs. D'autres mécanismes sont mis en jeu : nous les décrirons ci-après.

2. Les cytokines et facteurs de croissance

On désigne une cytokine comme une petite protéine (de 8 à 30 kDa) ou un peptide qui sert de signal entre les cellules d'un organisme. Elles jouent un rôle prédominant dans la réponse à l'infection, l'inflammation ou la réponse immunitaire plus généralement et possèdent également un rôle non-négligeable durant l'embryogénèse. Nous savons aujourd'hui que les cytokines sont importantes dans la régulation de beaucoup de processus cellulaires car elles interagissent avec une grande partie des voies de transduction du signal dans un nombre impressionnant de types cellulaires différents.

Les facteurs de croissance, comme leur nom l'indique, sont un type de cytokines capables d'induire la prolifération et la différenciation d'un tissu. Ces molécules agissent

comme un signal envoyé aux cellules concernées. Il existe plusieurs dizaines de facteurs de croissance : chacun est spécifique à un tissu ou un type cellulaire particulier. Quelques exemples non-exhaustifs : le PDGF, sécrété par les plaquettes, est responsable de la prolifération de différents types cellulaires, l'EGF stimule la différenciation de l'épiderme ou encore le VEGF qui permet la formation de l'endothélium des vaisseaux sanguins. Sans la présence des facteurs de croissance appropriés, les cellules d'un tissu resteraient bloquées dans la phase G1 du cycle cellulaire et seraient donc incapables de se diviser.

2.1. IL-1 β

Cette petite protéine multifonctionnelle fut une des premières cytokines à être découverte. Elle fait partie de la superfamille des interleukines. Comme son nom ne l'indique pas réellement, l'IL-1 β ne sert pas uniquement comme d'un composé signalétique entre les leucocytes, fonction qui lui a été découverte en premier.

L'IL-1 β est produite et sécrétée par les macrophages, les monocytes et les cellules dendritiques. Elle est un acteur important dans la réponse à l'inflammation lors d'infections car elle permet particulièrement le recrutement d'autres leucocytes sur les lieux de l'infection en augmentant l'expression des facteurs d'adhérence des cellules endothéliales. L'action de l'IL-1 β sur l'expression de la COX-2 a pour autre effet de contribuer à l'hypersensibilité de la douleur due à l'inflammation. Cependant, l'IL-1 β induit aussi une grande diversité d'effets physiologiques dans une multitude de types cellulaires (*Qian, Lin et al., 2004*) comme la prolifération, la différenciation et l'apoptose.

La plupart des effets biologiques de l'IL-1 β sont médiés par le facteur de transcription NF κ B qui régule l'expression de gènes impliqués dans la régulation de l'inflammation. Son activation résulte d'une voie de signalisation impliquant la dégradation de son inhibiteur, I κ B qui le séquestre initialement dans le cytoplasme. Une activation alternative de NF κ B par l'IL-1 β est possible grâce à certaines kinases telles que la PKA ou la voie de signalisation PI3K/AKT.

2.2. Insuline

Le taux de glucose sanguin reste toujours dans une gamme étroite de valeurs. Cet effet homéostatique est dû à l'action de plusieurs hormones : certaines augmentent la quantité de glucose sanguin comme le glucagon ou les catécholamines, d'autres la diminuent. C'est le cas de l'insuline, une hormone de 5.8 kDa produite par les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas. Très conservée durant l'évolution, l'insuline a pour particularité d'agir sur presque toutes les cellules de l'organisme en augmentant la pénétration et la consommation de glucose dans les cellules. Elle incite au stockage d'énergie en convertissant le glucose en glycogène dans le foie et les muscles (*Zelzer, Levy et al., 1998*) ainsi qu'à la synthèse des lipides dans les tissus adipeux.

L'insuline est donc sécrétée par le pancréas lorsque la concentration de glucose dans le sang augmente. Les cellules β des îlots de Langerhans possèdent un transporteur de glucose, GLUT-2 qui a pour particularité de ne pas être saturable (contrairement aux autres transporteurs tels que GLUT-1 ou GLUT-4). La présence d'une grande quantité de glucose dans ces cellules stimule la glycolyse et la respiration, ce qui augmente la production d'ATP et lorsque le rapport ATP/ADP est suffisamment grand, une dépolarisation de la membrane plasmique va entraîner l'entrée d'un flux d'ions Ca⁺⁺ qui initiera le relargage de l'insuline dans le sang, produite et stockée précédemment dans des vésicules sécrétoires.

Les récepteurs à l'insuline présents en surface des cellules sont formés de deux sous-unités possédant des domaines tyrosine-kinase. En présence d'insuline, ces sous-unités se dimérisent et se phosphorylent l'une l'autre. La partie interne du récepteur pourra alors interagir avec les IRS 1 et 2 qui activeront à leur tour deux cascades de phosphorylation : la voie des MAPK et la voie PI3K/AKT. Alors que la première induit à long terme la prolifération cellulaire, la seconde va, à court terme cette fois et via AKT, activer la glycogène synthase et phosphoryler des intermédiaires qui aboutiront à la fusion des vésicules de stockage contenant les transporteurs GLUT-4 avec la membrane plasmique. La cellule pourra ainsi incorporer le glucose présent dans le liquide plasmatique.

2.3. IGF-I

L'IGF-1 fait partie de la famille des IGF (Insulin-like Growth Factor). Cette famille est composée de deux ligands principaux, les facteurs de croissance IGF-I et IGF-II, de deux récepteurs, les glycoprotéines transmembranaires IGF-IR et IGF-IIR et de six protéines de liaison (IGFBP-1 à IGFBP-6) (*Yu and Rohan, 2000*).

La séquence peptidique de IGF-I possède 62% d'homologie avec IGF-II et est également extrêmement proche de celle de l'insuline (*Yu and Rohan, 2000*). Produit essentiellement par le foie, l'IGF-I est présent à haute concentration dans le sang et peut agir sur une grande majorité des cellules : os, cartilage, reins, foie, peau et même et surtout les nerfs pourtant insensibles aux effets de l'insuline.

L'IGF-I est capable d'induire dans les cellules des effets à court terme augmentant dans l'immédiat la prise d'acides aminés et de glucose et stimulant aussi la glycogénèse et la synthèse protéique. A long terme, l'IGF-I exerce son action mitogénique en augmentant la synthèse d'ADN par la stimulation de l'expression de la cycline D1 accélérant le passage de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire (*Dufourny, Alblas et al., 1997*). L'IGF-I est également capable de stimuler la production de Bcl, supprimant ainsi l'effet de Bax par une augmentation de la quantité de l'hétérodimère Bcl/Bax, bloquant ainsi l'apoptose (*Wang, Ma et al., 1998*).

Les récepteurs à l'IGF sont des tétramères composés de deux sous-unités alpha et deux sous-unités bêta identiques deux à deux (*Sepp-Lorenzino, 1998*). Les deux ligands IGF peuvent se lier sur IGF-IR mais aussi sur le récepteur à l'insuline possédant 60% d'homologie avec IGF-IR ou sur un récepteur hybride. Par contre, seul IGF-II peut se lier sur IGF-IIR : cette liaison a de particulier qu'elle n'induit aucune voie de signalisation en aval mais sert juste à séquestrer IGF-II et ainsi à empêcher son action (*Oates, Schumaker et al., 1998*). Malgré le fait que l'IGF-I et l'insuline partagent les mêmes récepteurs, la spécificité de la réponse cellulaire est assurée parce que l'affinité de l'IGF-I pour son récepteur natif est beaucoup plus élevée que celle pour le récepteur à l'insuline, l'inverse étant vrai également. L'abondance du récepteur hybride dépend du type cellulaire et sa fonction biologique reste inconnue même si l'on a pu observer une affinité plus forte pour IGF-IR. L'activation des récepteurs conduit à la phosphorylation d'IRS-1 et d'IRS-2 menant à terme à la stimulation de 2 voies de signalisation principales : la voie des MAPK et la voie PI3K/AKT (*Jenkins and Bustin, 2004*), tout comme l'insuline.

L'action de l'IGF peut aussi être modulée par les 6 protéines de liaison, IGFBP1-6. Ces dernières, en fonction de leur nature, peuvent soit avoir un effet négatif en inhibant l'action de l'IGF-I par la prévention de la liaison de ce dernier sur son récepteur par inhibition

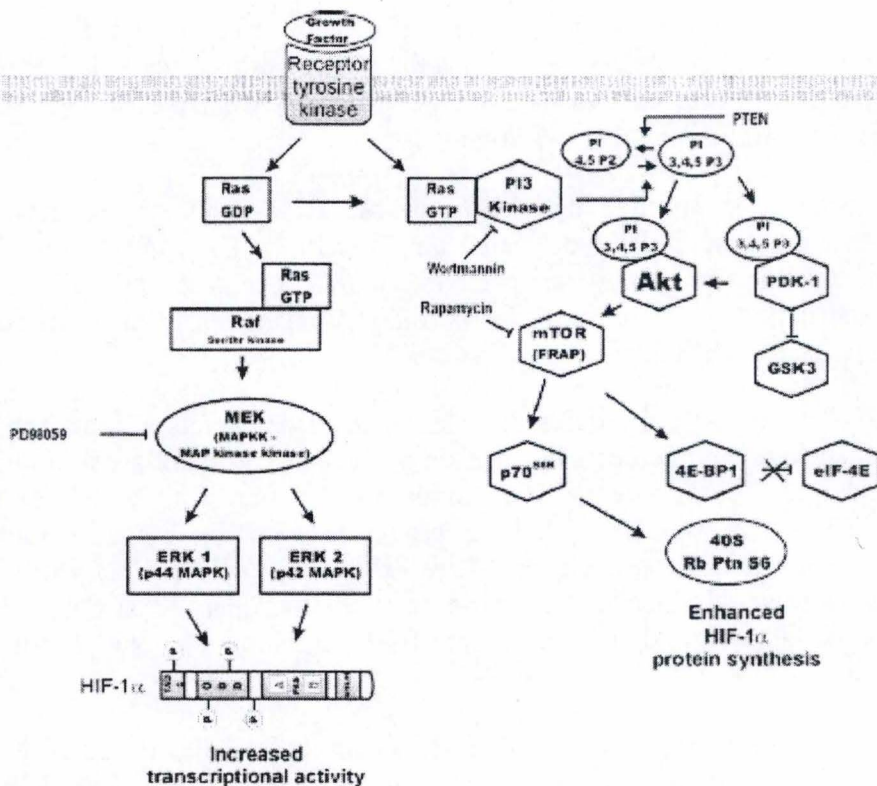


FIGURE 7 : Vue schématique des deux principales voies d'activation intracellulaires de HIF-1 en normoxie via la stabilisation de HIF-1 α par l'augmentation de sa synthèse (droite) et via une augmentation de son activité transcriptionnelle (gauche). (Hopfl, Ogunshola et al., 2004)

allostérique (exemple : l'IGFBP-3), soit avoir un effet positif en aidant la liaison IGF-I/IGF-IR ou en augmentant le temps de demi-vie de l'IGF-I.

Finalement, il existe aussi des protéases des IGFBP, ces dernières étant un facteur déterminant pour l'impact régulateur des IGFBP sur l'IGF-I. Par exemple, la PSA réduit l'affinité de liaison de l'IGFBP-3 à l'IGF-I restaurant de ce fait l'activité mitogénique de ce dernier (Yu and Rohan, 2000).

3. Les voies d'activation annexes de HIF-1

Les trois peptides décrits ci-avant sont tous capables d'activer HIF-1 même lorsque la concentration en oxygène dans les tissus se situe dans les limites physiologiques. Cet effet est réalisé principalement par deux importantes cascades de transduction du signal : la voie des MAPK et la voie de la PI3K (*figure 6*). Nous verrons que ces deux voies mènent toutes les deux à l'activation de HIF-1 mais par des processus intracellulaires très différents. Précisons encore que ces deux voies de signalisation ne doivent pas forcément être induites en même temps bien que, en tandem, leur effet soit renforcé : l'activation d'une voie et/ou de l'autre dépend tant du type cellulaire que du stimulus employé.

3.1. La voie des MAPK

La voie des MAPK est une cascade de transduction du signal intracellulaire permet, à partir de la liaison d'un facteur de croissance sur son récepteur membranaire menant ultimement à la division cellulaire (*figure 7 ; partie gauche*).

Bien que cette voie de signalisation soit complexe et inclut un nombre important de molécules, seules quelques unes sont impliquées dans l'activation de HIF-1. La liaison d'un facteur de croissance (tel que l'IGF par exemple) sur son récepteur va induire la dimérisation de ce dernier et mener à l'activation de l'activité tyrosine kinase des deux sous-unités permettant ainsi leur transphosphorylation. Des protéines de pontage contenant un domaine SH2 telles que Grb2 vont venir interagir avec le récepteur phosphorylé. Il s'ensuit le recrutement de SOS via le domaine SH3 de Grb2 qui va finalement mener à l'activation de RAS en échangeant son GDP par un GTP. Il s'ensuit alors une cascade de kinases : RAS peut activer RAF, une sérine/thréonine kinase qui pourra activer à son tour MEK par phosphorylation qui phosphorylera elle-même ERK1 et ERK2, deux MAPK.

L'effet d'ERK1 et d'ERK2 sur la sous-unité alpha de HIF-1 est de phosphoryler certains de ses résidus situés dans le domaine C-TAD (Minet, Arnould et al., 2000). La conséquence directe de cette phosphorylation est la dérégulation du domaine d'inhibition de HIF-1 α situé entre les deux domaines de transactivation (Bilton and Booker, 2003). La phosphorylation de ce domaine aurait pour but de prévenir la liaison de l'inhibiteur FIH sur son résidu asparagyl afin d'empêcher son hydroxylation (Lancaster, McDonough et al., 2004). Ceci aura pour conséquence finale de déréguler l'activité transcriptionnelle de HIF-1 en permettant aux cofacteurs CBP et p300 de s'associer avec HIF-1.

3.2. La voie PI3K/AKT

La cascade de la PI3K est une voie de phosphorylation qui est toute aussi importante pour HIF-1 que celle des MAPK. Activée via les récepteurs tyrosine kinase membranaires,

cette voie de transduction du signal a pour cibles certains acteurs impliqués dans l'apoptose, la croissance cellulaire ou encore la traduction des protéines (*figure 7* ; partie droite).

L'activation d'AKT par cette voie entraîne à son tour l'activation de mTOR puis de p70^{S6k}. Alors que le premier permet l'augmentation globale de la traduction, p70^{S6k}, lorsqu'il est phosphorylé, est un activateur de la traduction ARNm 5'-TOP. Ces ARNm possèdent une séquence constituées de 4 à 14 pyrimidines dans leurs régions 5' non-traduites. Cette structure secondaire particulière agit grâce à un mécanisme homologue de la séquence IREs (voir ci-avant) : elle va permettre à l'ARNm d'interagir en particulier avec des facteurs d'initiation de la traduction afin de déclencher celle-ci sans passer par l'activation coiffe-dépendante. Etant donné que l'ARNm de HIF-1 α possède une telle séquence, sa traduction sera effectivement augmentée (*Page, Robitaille et al., 2002*).

Il a été prouvé que l'augmentation de la synthèse de HIF-1 α menait effectivement à la stabilisation de cette dernière. Ceci est possible car la quantité de PHDs dans les cellules n'excède pas de beaucoup l'abondance de la sous-unité alpha dans des conditions naturelles : elle suffit donc à dégrader suffisamment de HIF-1 α afin d'éviter le déclenchement d'une réponse hypoxique en normoxie. Au contraire, l'équilibre délicat entre les abondances de HIF-1 α et des PHDs suffit à saturer l'activité de ces dernières lors de l'augmentation de la traduction de la sous-unité alpha (*Wenger, Stiehl et al., 2005*) et permet alors la translocation d'une petite quantité de HIF-1 α dans le noyau. Précisons également que la voie des MAPK peut aussi être impliquée dans l'augmentation de la traduction de HIF-1 α chez certains types cellulaires (*Fukuda, Hirota et al., 2002*). Ceci est possible grâce à la protéine RAS qui peut conduire à l'activation de la voie de la PI3K (*Treins, Giorgetti-Peraldi et al., 2005*).

4. Des différences entre l'hypoxie et l'induction normoxique

La présence d'une petite quantité du facteur de transcription fonctionnel HIF-1 dans le noyau suite à certains stimuli comme des cytokines et des facteurs de croissance (voir ci-avant) permet la transcription de certains de ses gènes cibles mais cette dernière est néanmoins beaucoup moins importante qu'en hypoxie et n'est pas corrélée avec l'affinité de liaison de HIF-1 sur la séquence HRE (*Bilton and Booker, 2003*). De plus, HIF-1 n'est jamais totalement fonctionnel en normoxie car bien que l'activité des PHDs soit outrepassée, un équilibre entre les activités de phosphorylation des MAPK et de la FIH se met en place. Même si cette dernière ne peut hydroxyler toutes les sous-unités HIF-1 α , elle permet encore d'empêcher la fixation des coactivateurs sur HIF-1 mais dans une moindre mesure. La fixation de HIF-1 à ses coactivateurs devient donc en quelque sorte le facteur limitant de la transactivation des gènes cibles de HIF-1 dans des conditions normoxiques.

Cependant, bien que le facteur de transcription HIF-1 soit activé aussi bien en hypoxie qu'en normoxie par certains stimuli particuliers, il est cependant peu probable que ce facteur agisse de la même façon dans ces deux conditions. Il existe bien entendu des similarités : ainsi, c'est parce que la croissance cellulaire est associée à une augmentation de la consommation en oxygène que des stimuli comme des facteurs de croissance sont capables d'anticiper l'augmentation des besoins des cellules en oxygène (*Wenger, Stiehl et al., 2005*). La glycolyse et les transporteurs du glucose sont tous deux la cible de régulations par l'hypoxie et par l'insuline.

Par contre, le concept général d'une régulation des mécanismes cellulaires lors d'un manque d'oxygène passe par un effet de ralentissement de l'activité en général, alors que par

exemple, la présence d'un facteur de croissance, aura plutôt tendance à stimuler le métabolisme et, bien entendu, induire à terme la division cellulaire et la prolifération des cellules.

L'activation de HIF-1 médiée par des cascades de transduction du signal comme la voie des MAPK ou celle de PI3K/AKT joue donc un rôle dans la réponse indépendante de l'oxygène de HIF-1. Cette activité peut procurer un avantage biologique alors que le petit ensemble des gènes activés en normoxie par HIF-1 pourrait conduire à la croissance ou encore à la réponse inflammatoire, plaçant les tissus dans un état de 'surcharge métabolique' (*Bilton and Booker, 2003*). Par exemple, la cytokine TNF- α va augmenter l'expression du VEGF lors de blessures ouvertes : cet effet est médié par HIF-1.

Précisons encore qu'il peut exister des différences dans l'expression des gènes cibles de HIF-1 lorsque d'autres éléments régulateurs interviennent. C'est le cas par exemple des enzymes glycolytiques où l'intensité de la transcription sera la résultante de la synergie entre ces différents éléments.

Le rôle de HIF-1 dans les tumeurs

1. L'hypoxie dans les tumeurs

L'hypoxie est un phénomène relativement peu fréquent lorsque l'organisme se trouve dans un état physiologique satisfaisant. La disponibilité de l'oxygène est cependant limitée lors de certains processus physiologiques comme, par exemple, le développement embryonnaire, l'adaptation aux hautes altitudes ou encore l'inflammation (*Wenger, Stiehl et al., 2005*).

Elle est par contre un phénomène ordinaire dans la plupart des tumeurs solides. En effet, l'inhibition des mécanismes de régulation du cycle cellulaire dans ces dernières entraîne une prolifération anarchique des cellules cancéreuses et la formation d'un nodule tumoral. Le centre de ce nodule devient hypoxique à un stade précoce du développement de la tumeur, c'est-à-dire lorsque son volume devient supérieur à 1 mm³ (*Choi, Bae et al., 2003*). Elle repousse alors les vaisseaux sanguins environnants à une distance supérieure à la distance limite de diffusion de l'oxygène. La pression partielle en oxygène chute en conséquence entre 5 et 10 mmHg dans les tumeurs (*Hopfl, Ogunshola et al., 2004*), ce qui est suffisant pour déclencher à l'intérieur des cellules tumorales une réponse adaptative afin de lutter contre cette faible disponibilité en oxygène. Le facteur de transcription HIF-1 constitue le facteur de survie essentiel pour surpasser le manque d'oxygène durant la prolifération (*Mabjeesh and Amir, 2007*).

L'hypoxie présente dans l'environnement direct d'une tumeur a plusieurs effets, tant sur les cellules tumorales que sur les cellules saines permettant globalement à la tumeur de grossir et de s'étendre par destruction locale et dissémination (*Hockel and Vaupel, 2001*). Ainsi, l'hypoxie permet l'arrêt du cycle cellulaire, la quiescence et l'apoptose des cellules saines. Le même phénomène existe également dans les cellules tumorales où l'arrêt de la croissance cellulaire peut être la cause de micrométastases dormantes (*Holmgren, O'Reilly et al., 1995*). Par contraste, l'hypoxie permet également aux cellules tumorales de s'adapter à leur environnement. La transcription active des gènes encodant des transporteurs de glucose, de facteurs angiogènes (VEGF), de croissance (IGF-1) ou de survie (TGF- α) favorise grandement la survie des cellules cancéreuses (*Hockel and Vaupel, 2001*).

2. HIF-1 est activé en normoxie dans les cancers

L'abondance de HIF-1 α a souvent été mise en avant comme un outil diagnostique pour le dépistage des cancers (*Shibaji, Nagao et al., 2003 ; Fillies, Werkmeister et al., 2005*). A ce jour, cet outil diagnostique est assez controversé car tous les cancers ne possèdent cependant pas une augmentation significative du taux d'activité de HIF-1 (*Mabjeesh and Amir, 2007*). Certains d'entre eux sont en effet plus susceptibles d'exprimer HIF-1 comme c'est le cas par exemple de la plupart des cancers rénaux où l'on retrouve l'expression la plus forte de HIF-1 à cause de l'inactivation fonctionnelle de pVHL. Ceci explique que la détection de l'abondance de HIF-1 α peut entraîner un diagnostic erroné dans le dépistage des tumeurs.

L'hypoxie n'est pas la seule cause de l'activation de HIF-1 dans les tumeurs (*Stoeltzing, McCarty et al., 2004*). Ces dernières profitent d'autres mécanismes pour

augmenter l'abondance de la sous-unité alpha de ce facteur de transcription. Parmi celles-ci, citons entre autre des mutations fonctionnelles de pVHL ou encore des stimuli extracellulaires comme des facteurs de croissance ou des cytokines.

2.1. Activation de HIF-1 par mutation de pVHL

Dans certaines formes de cancer rénal, nous observons une hypervascularisation des tumeurs. Cela est dû à une mutation dans le gène codant pour la protéine pVHL, rendant cette dernière non-fonctionnelle (Miller, Kentsis et al., 2005). L'hydroxylation de HIF-1 par les PHDs n'entraîne dès lors plus sa dégradation, même lorsque la concentration d'oxygène dans les tumeurs est suffisante (Kaelin, 2004) et aura pour conséquence l'activation directe de la transcription des gènes cibles de HIF-1 et notamment du VEGF déclenchant la néo-angiogenèse. Cette dernière est fortement amplifiée car le VEGF est sécrété par toutes les cellules tumorales, y compris, celles en normoxie. Elle aura pour conséquence de contribuer très fortement à la dispersion des cellules tumorales dans l'entièreté de l'organisme et donc aussi à l'apparition de métastases (Stoeltzing, McCarty et al., 2004) qui, à long terme, entraîneront la mort de l'individu.

2.2. Activation de HIF-1 par des stimuli extracellulaires

Le rôle des facteurs de croissance dans le développement d'un cancer semble évident. De part leurs effets mitogéniques et anti-apoptotiques, ils contribuent à la croissance et à la progression des tumeurs tout en entrant en compétition avec des facteurs antiprolifératifs. Ainsi, il a été démontré qu'une grande concentration d'IGF circulant, souvent corrélée avec une diminution de la concentration d'IGFBP-3, par exemple suite à un régime particulier, augmentait la probabilité de développement d'un cancer (Yu and Rohan, 2000 ; Jenkins and Bustin, 2004).

Le lien reliant le développement d'un cancer et l'IL-1 β n'a pas encore été clairement établi. L'implication de l'IL-1 β dans l'inflammation et le fait que HIF-1 puisse être activé par d'autres facteurs pro-inflammatoires tels que le NO (Sogawa, Numayama-Tsuruta et al., 1998 ; Callapina, Zhou et al., 2005) ou le TNF- α (Zhou, Callapina et al., 2004) suggère un lien entre l'inflammation et l'hypoxie. Des études ont également montré que l'IL-1 β pouvait transformer une réponse inflammatoire en une réponse oncogène en induisant HIF-1 α dans des cellules issues d'épithélium des voies respiratoires (Jung, Isaacs et al., 2003) et que cette cytokine jouait donc un rôle important pour la croissance tumorale (Saijo, Tanaka et al., 2002 ; Voronov, Shouval et al., 2003).

Objectifs de la recherche

Les connaissances actuelles montrent que HIF-1 est souvent activé dans différents types de cancer soit directement par les conditions d'hypoxie régnant au sein de la tumeur, soit via la présence de différentes cytokines. La signification de la présence de ce facteur en termes de survie pour les cellules cancéreuses n'est cependant pas claire et c'est dans ce cadre que se situe notre travail. Le but de notre travail est d'identifier quels gènes cibles de HIF-1 voient leur expression augmenter de manière dépendante de HIF-1 dans différentes conditions de stimulation. En fonction de la nature de ceux-ci, un impact sur la viabilité des cellules pourra en être déduit.

Dans ce mémoire nous tenterons donc de caractériser les réponses différentielles de l'activité du facteur de transcription HIF-1 en fonction du stimulus qui l'active. Nous essayerons de détecter dans un premier temps si différents types cellulaires répondent à un stimulus indépendant de la diminution de la concentration en oxygène par rapport aux conditions d'hypoxie. Ensuite, nous caractériserons l'effet de différents stimuli sur l'activité de HIF-1 en normoxie dans une même lignée cellulaire. Notre étude portera sur la caractérisation de la réponse sur plusieurs niveaux tels que l'abondance de la sous-unité alpha de HIF-1, l'activité de liaison de celui-ci sur une séquence HRE particulière ou encore la mesure de l'activité transcriptionnelle de HIF-1 à l'aide d'un système rapporteur.

Par la suite, nous pousserons notre étude à un niveau supérieur afin de pouvoir détecter une corrélation entre l'abondance de la sous-unité HIF-1 α et une réponse dépendante de HIF-1. Pour ce faire, nous étudierons l'abondance des ARNm de certains gènes cible de HIF-1 suite à une stimulation en normoxie et prendrons soin de comparer également cette abondance avec celle observée en conditions hypoxiques.

Ensuite, afin de montrer que l'induction de l'expression de ces messagers est bien due à une transactivation des gènes médiée par HIF-1, nous analyserons la capacité de liaison au promoteur naturel des gènes cibles transactivés par l'hypoxie via la technique de l'immunoprécipitation chromatidienne. Ces expériences sont réalisées en hypoxie et lors des différentes stimulations en normoxie afin de pouvoir déceler des différences fines d'induction induites par l'environnement naturel et proche des promoteurs.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Culture cellulaire

1.1. Lignées cellulaires utilisées

Lors des expériences, nous avons utilisé trois types cellulaires différents. Les cellules HepG2 proviennent d'un hépatocarcinome tandis que les cellules MCF7 sont issues de cellules de cancer du sein et les cellules RD d'un rhabdomyosarcome. Ces différentes lignées doivent être cultivées dans des milieux différents ; respectivement du D-MEM (Gibco 31885-023), du DHG-L1 (Gibco 41966-029) et du RPMI (Gibco 21875-034) auxquels 10% de sérum de veau fœtal sont ajoutés.

1.2. Le repiquage cellulaire

Les lignées cellulaires sont incubées dans des boîtes T75 à 37°C et sous une atmosphère humide avec 5% de CO₂. Lorsque les cellules arrivent à confluence, elles sont repiquées. Pour ce faire, le milieu de culture des boîtes est décanté en conditions stériles, sous hotte à flux laminaire et est remplacé par 5 ml de PBS stérile (Biowhittaker BE17-516F). Ce milieu de rinçage est ensuite décanté pour être remplacé par 2 ml de trypsine-EDTA (Gibco 253.00-054). Lorsque le tapis cellulaire est détaché, 5 ml de milieu de culture contenant 10% de sérum foetal de veau sont ajoutés afin d'inhiber l'activité enzymatique de la trypsine. La suspension cellulaire est récoltée dans un tube et centrifugée durant 4 minutes à 1000 RPM. Le surnageant est décanté et le culot resuspendu dans une quantité de milieu correspondant ajouté de 10% de sérum dépendant de la quantité de boîtes et de la dilution désirées. Une fraction de cette suspension cellulaire est répartie dans des nouvelles boîtes T75 et du milieu complet est ajouté afin d'obtenir un volume final de 15 ml avec une quantité de milieu de culture précédemment ajoutée.

1.3. Incubation en hypoxie

Lorsque les cellules doivent être incubées en hypoxie, le milieu de culture traditionnel est alors remplacé par un milieu CO₂-indépendant (Invitrogen 18045-054) contenant 5 mM de L-glutamine (Sigma G8548). Les boîtes sont ensuite ouvertes et placées dans un incubateur à 37°C sous une atmosphère à 99% d'azote et 1% O₂. Une boîte de cellules contrôles dites normoxiques est incubée avec ce même milieu mais sous atmosphère normale.

2. Stimulation des cellules

2.1. Matériel

- Insuline (Actrapid®, Nove Nordisk A/S)
- Il-1 β humaine recombinante (R&Dsystems RD-201-LB)
- IGF humain recombinant (R&Dsystems RD-291-G1)
- Milieux de culture
- BSA purifiée (Sigma A8806-56)
- Filtre 20 μ m (Sarstedt 83.1826.001)

TAMPON DE LYSE		pH 7.5
Composition	Concentration	
EDTA - Titriplex (Merck 1.08417.0250)	1 mM	
KCl (Merck 1.04936.0500)	150 mM	
PIB - Phostop (Roche 04906837001)	10%	
PIC - Complete (Roche 11697498001)	10%	
Tris (Merck 1.08382.0500)	40 mM	
Triton X-100 (Merck 1.12298.0101)	1%	

TABLEAU 1 : Composition de la solution tampon pour la lyse des cellules lors d'une extraction de protéines.

2.2. Méthode

Dans le cas d'une stimulation à l'insuline ou à l'IGF, un milieu de culture contenant 0.1% de BSA purifiée doit être préparé afin de saturer les sites de liaison aspécifique. Pour ce faire, la quantité adéquate de BSA est pesée à l'aide d'une balance de précision. En conditions stériles, le milieu de culture est rajouté et la solution est homogénéisée. Cette dernière est ensuite filtrée avec un filtre de 20 μm . Les quantités adéquates d'hormones sont alors ajoutées dans les nouveaux milieux de culture. Les cellules sont incubées en présence de ces solutions à 37°C et sous atmosphère humide avec 5% de CO₂.

3. Extraction de protéines

3.1. Matériel

- Tampon de lyse (*tableau 1*)

3.2. Méthode

Le milieu de culture de boîtes T25 est décanté et remplacé par 150 μl de tampon de lyse à 4° C. Les cellules sont ensuite raclées avec un racloir approprié et le lysat est récupéré dans un microtube. Après une centrifugation à 13.000 RPM durant 5 minutes, le surnageant est aliquoté dans 3 nouveaux microtubes : deux fois avec une quantité de 75 μl et une fois avec 10 μl . Les deux aliquots de 75 μl sont conservés à - 80°C tandis que le dernier tube est gardé pour le dosage de la concentration en protéines.

4. Dosage de Bradford

4.1. Principe

La méthode de Bradford est une méthode d'analyse spectroscopique permettant de mesurer la concentration des protéines dans un échantillon particulier. Celle-ci se base sur l'absorbance de la Coomassie. Cette substance devient anionique lorsqu'elle se lie à un acide aminé hydrophobe : son spectre d'absorption maximum passera alors à 595 nm. L'augmentation de la forme anionique de la Coomassie, et de ce fait de la quantité globale de protéines, sera corrélée à une augmentation de l'absorbance à 595 nm.

4.2. Matériel

- Bleu de Coomassie - BioRad Protein Assay (BioRad 500.006)
- Etalon BSA 2 $\mu\text{g/ml}$ (Sigma)

4.3. Méthode

Toutes les mesures sont effectuées en duplicats. Toutes les 30 secondes, 2 μl des aliquots sont ajoutés à 1 ml de solution de Bradford. Le mélange est vortexé et gardé 5 minutes à température ambiante avant la lecture. Afin de pouvoir quantifier les concentrations de protéines des extraits, les valeurs sont rapportées à celles obtenues pour un étalon de BSA à 2

$$\text{Concentration (mg/ml)} = \frac{\text{DO}_{\text{échantillon}} - \text{DO}_{\text{blanc tampon de lyse}}}{\text{DO}_{\text{étalon}} - \text{DO}_{\text{blanc eau}}} \times \frac{\text{quantité de BSA chargée (mg)}}{\text{volume d'échantillon chargé (ml)}}$$

FIGURE 1 : Formule générale permettant de calculer la concentration en protéines présentes dans un lysat cellulaire par la méthode de Bradford.

	Composition	Concentration
TAMPON GEL SEPARATEUR	SDS (MP Biomedicals 811030)	4 µg/ml
	Tris (Merck 1.08382.0500) pH 8.8	1.5 M -
TAMPON GEL CONCENTRATEUR	SDS (MP Biomedicals 811030)	2 µg/ml
	Tris (Merck 1.08382.0500) pH 6.8	0.5M -
TAMPON D'ELECTROPHORESE	Glycine (Merck 1.04201.1000)	40 µg/ml
	SDS (MP Biomedicals 811030)	10 µg/ml
	Tris (Merck 1.08382.0500)	63.2 µg/ml
	Concentré 10 X	-
TAMPON DE TRANSFERT	Glycine (Merck 1.04201.1000)	23 µg/ml
	Méthanol Acros Organic 176840025	20%
	Tris (Merck 1.08382.0500)	4.8 µg/ml
TBS	NaCl (Merck 1.06404.1000)	80.06 µg/ml
	Tris (Merck 1.08382.0500)	24.22 µg/ml
	Concentré 10 X - pH 7.6	-

TABLEAU 2 : Composition des différentes solutions tampons utilisées pour réaliser un Western Blot.

$\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Les mesures d'absorbance de l'eau distillée et du tampon de lyse seul doivent être soustraites respectivement des valeurs des échantillons et de l'étalon afin de ne pas prendre en compte l'absorbance naturelle des solutions.

Les valeurs d'absorbance ont été lues 5 minutes après le mélange au spectrophotomètre (Ultrospec 2100 pro), calibré préalablement avec une valeur de référence (eau distillée). Les solutions sont versées dans une cuvette adaptée au spectrophotomètre de 10 mm de longueur. Entre chaque mesure, la cuvette est rincée à l'acétone puis deux fois à l'eau distillée avant d'être séchée.

La concentration en protéines dans les échantillons peut être calculée grâce à la formule ci-contre (*figure 1*).

5. Western Blot

5.1. Principe

Le Western Blot est une technique d'analyse protéique semi-quantitative visant à déterminer l'abondance d'une protéine d'intérêt dans un extrait cellulaire. Après une séparation des protéines selon leur poids moléculaire grâce à une électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS, celles-ci sont transférées sur une membrane pour pouvoir ensuite être exposées à un anticorps spécifique de la protéine d'intérêt. Cet anticorps est reconnu par un anticorps secondaire couplé à un système de révélation. La quantification du signal obtenu rapporté à celui d'un contrôle de charge (typiquement, l' α -tubuline) permet l'estimation du niveau d'expression d'une protéine dans les limites de la zone de linéarité d'exposition.

5.2. Matériel

- Acrylamide/bisacrylamide (Biorad Laboratories 161-0158)
- Acrylamide/bisacrylamide (Biorad Laboratories 161-0158)
- Agent bloquant (Amersham NIF833)
- APS (Amersham Bioscience 17-1311-01)
- Bleu de charge
- Etalon See Blue ® Plus 2 Prestained Standard (Invitrogen LC5825)
- Isobutanol (Merck 822262)
- Méthanol (Acros Organic 176840025)
- Solution ECL (Amersham RPN2135)
- Solution de fixation (Ilford Imaging)
- Solution de révélation (Ilford Imaging)
- Tampons (tableau 2)
- TEMED (Amersham Bioscience 17-1312-01)
- Tween (SIGMA-ALDRICH P1379)

5.3. Méthode

5.3.1 Préparation des gels séparateur et concentrateur

Une solution pour le gel séparateur est préparée contenant 40% d'acrylamide/bisacrylamide, 37% d'eau distillée et 23% de tampon du gel de séparation. A

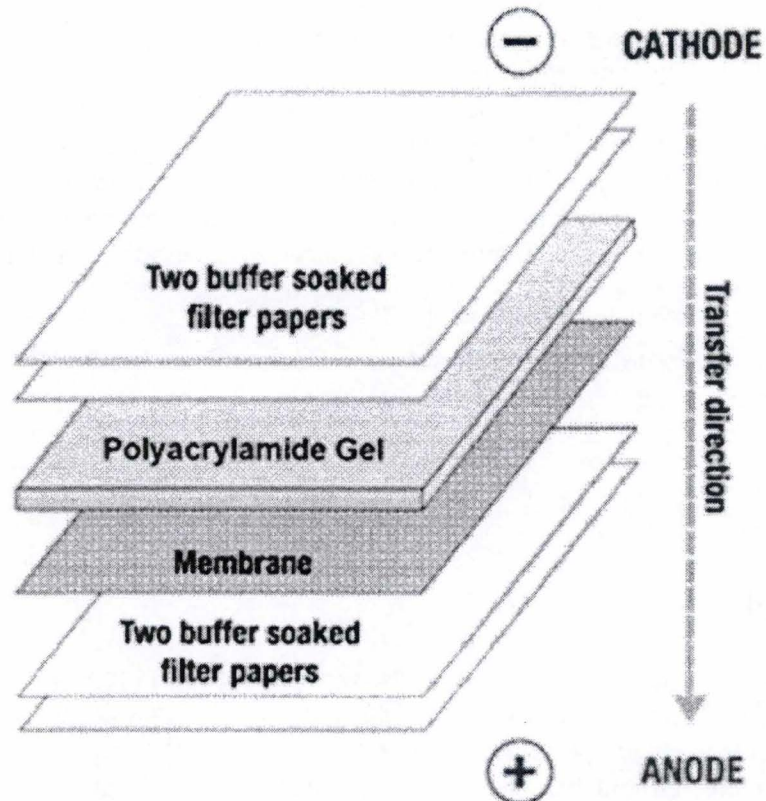


FIGURE 2 : Schéma illustrant le système sandwich utilisé lors du transfert des protéines d'un gel de polyacrylamide sur une membrane de PVDF lors d'un Western Blot.

	AKT-P	AKT total	HIF-1 α	I κ B total	I κ K total	Tubuline- α
Blocking	2H à RT	2H à RT	2H à RT	2H à RT	2H à RT	O/N à 4°C
Anticorps primaire	Dil. 1.000 X Durant 2H	Dil. 1.000 X Durant 2H	Dil. 1.000 X Durant 2H	Dil. 1.000 X Durant 2H	Dil. 1.000 X Durant 2H	Dil. 40.000 X Durant 20 min
Lavages	3 fois 20 min.	3 fois 20 min.	3 fois 20 min.	3 fois 20 min.	3 fois 20 min.	3 fois 7 min.
Anticorps secondaires	Dil. 150.000 X Durant 1H Anti-lapin	Dil. 150.000 X Durant 1H Anti-lapin	Dil. 150.000 X Durant 45 min. Anti-souris	Dil. 150.000 X Durant 1H Anti-lapin	Dil. 150.000 X Durant 1H Anti-lapin	Dil. 200.000 X Durant 20 min Anti-souris
Lavages	3 fois 10 min.	3 fois 10 min.	3 fois 10 min.	3 fois 10 min.	3 fois 10 min.	3 fois 7 min.
Temps d'exposition	Approx. 3 min.	Approx. 3 min.	Approx. 5 min.	Approx. 3 min.	Approx. 3 min.	Approx. 2 sec.

TABLEAU 3 : Protocole de révélation selon la protéine à détecter. Les valeurs pour les temps d'exposition du film autoradiographique sur la membrane sont approximatives.

cette solution sont rajoutés 2% d'APS et 0.03% de TEMED pour déclencher la polymérisation. Ce mélange est rapidement coulé entre deux plaques de verre dont l'étanchéité est assurée par des spacers disposés en dessous et sur les côtés des deux plaques. 1 ml d'isobutanol est rajouté sur le dessus du gel pour permettre la polymérisation pendant une heure.

La solution pour le gel concentrateur est constituée de 17% d'acrylamide/bisacrylamide, 58% d'eau distillée et 25% de tampon du gel de concentration. Afin de déclencher la polymérisation, 2% d'APS ainsi que 0.03% de TEMED sont rajoutés. La solution est rapidement coulée au-dessus du gel séparateur, après élimination de la couche d'isobutanol. Le gel est laissé polymériser durant 1 heure, un peigne placé juste au dessus afin de former les puits de chargement.

5.3.2 *Chargement et migration des échantillons*

Une quantité équivalente de protéines est chargée sur le gel pour chaque échantillon. Les protéines sont mélangées avec de l'eau distillée afin d'obtenir un volume entre 20 et 40 μ l selon la taille du gel. Du bleu de charge concentré 5 fois est ajouté pour une dilution finale de 1 fois. Les plaques de verre contenant les gels polymérisés sont placés dans une cuve adéquate et du tampon d'électrophorèse est ajoutée de part et d'autre des gels. Les échantillons sont ensuite chargés dans chaque puits avec un puits réservé pour l'étalon.

L'appareil est branché à un générateur durant 1 à 3 heures selon la taille des gels à un voltage de 200 V.

5.3.3 *Transfert des protéines sur membrane*

Une membrane de PVDF (PolyVinylidène Fluoride, Amersham) ainsi que 2 papiers Whatman sont découpés de la taille du gel de séparation. La membrane est réhydratée durant 1 minutes dans du méthanol puis est équilibrée dans du tampon de transfert durant 5 minutes. Les gels sont démoulés et le système de sandwich est préparé (*figure 2*). Les bulles d'air entre chaque couche sont éliminées et une petite quantité de tampon de transfert est ajoutée au système afin de le maintenir suffisamment humide. L'appareil de transfert est branché à un générateur réglé sur 150 mA pendant 2 heures.

5.3.4 *Saturation des sites spécifiques et incubation avec les anticorps*

Après le transfert, la membrane est disposée dans un biberon avec les protéines exposées vers l'intérieur et est bloquée avec du TBS-Tween 0.1% + 2% d'agent bloquant pendant 2 heures à température ambiante ou 16 heures à 4°C. Ensuite, les membranes sont mises à incuber à température ambiante avec l'anticorps primaire à la dilution correspondante dans du TBS-Tween + 2% d'agent bloquant. Après 3 rinçages à température ambiante dans du TBS-T, la membrane est exposée à une solution de TBS-Tween 0.1% + 2% d'agent bloquant contenant l'anticorps secondaire à la dilution adéquate (*tableau 3*).

5.3.5 *Révélation*

Après 3 rinçages supplémentaires, les protéines de la membrane sont exposées à 2 ml de la solution de révélation ECL pendant 5 minutes. Ensuite, un film autoradiographique (Hyperfilm, Amersham) est disposé face à la membrane durant un certain temps, dépendant de la protéine révélée. Ce dernier est ensuite trempé dans le bain de révélation jusqu'à

	Cible	Concentration stock	Dilution	Marque et référence
Anticorps primaire	anti HIF-1a	250 mg/ml	100 x	BD Transduction Laboratories 610958
	anti IGF-1R	500 ng/ml		R&D MAB391
Anticorps secondaire	anti-souris vert	-	1000 x	Alexa 438 #MP. A-11001

TABLEAU 4 : Liste détaillée des anticorps primaires et secondaires utilisés pour le marquage en immunofluorescence.

PBS		pH7.4
Composition		Concentration
NaCl (Merck 1.06404.1000)		150 mM
Tampon PO4		10 mM

TABLEAU 5 : Composition du tampon phosphate standard.

l'apparition de bandes puis, après un rinçage dans de l'eau, est fixé dans le bain de fixation puis rincé abondamment.

6. Immunofluorescence

6.1. Principe

L'immunofluorescence est une technique permettant de visualiser une protéine spécifique au sein d'une cellule. Le principe repose sur l'utilisation de deux anticorps : le premier, appelé anticorps primaire est dirigé contre un épitope de la protéine d'intérêt tandis que l'anticorps secondaire, couplé à un fluorochrome, est dirigé contre l'anticorps primaire. Les noyaux des cellules sont également marqués grâce au TO-PRO 3, un agent intercalant de l'ADN. La détection au microscope confocal permet une analyse de l'échantillon sur un unique plan optique et réduit considérablement le bruit de fond engendré par l'épaisseur des cellules.

6.2. Matériel

- Anticorps (tableau 4)
- BSA (PAA Laboratories GmbH)
- Mowiol (Kal Biochem 4088)
- Paraformaldéhyde (Merck 1.04005.1000)
- PBS (tableau 5)
- RNase (ICN Biomedicals 9001-9-4)
- TO-PRO 3 (Molecular Probes T-3605)
- Triton X-100 (Merck 1.12298.0101)

6.3. Méthode

6.3.1 Préparation des boîtes de culture et stimulation

Après stérilisation à l'alcool-éther, des lamelles en verre (Assistent VWR 1001/13) sont placées dans des puits de plaques 24-puits destinés à recevoir des cellules. Les cellules sont ensuite repiquées à 50% de leur confluence et incubées durant 6 heures en présence de leur milieu respectif + 10% de sérum. Le milieu est alors remplacé par du milieu sans sérum pendant 16 heures. Les cellules sont incubées durant 6 heures avec 1 ml de milieu de stimulation (voir partie stimulation).

6.3.2 Fixation et perméabilisation des cellules

Tous les puits sont rincés 3 fois à 4°C dans du PBS à l'exception des puits provenant des conditions de normoxie et d'hypoxie. Les cellules sont fixées en décantant le milieu présent dans chaque puits puis en ajoutant 500 µl d'une solution de PBS/paraformaldéhyde 4% pendant 10 minutes à température ambiante. Les puits sont ensuite rincés 3 fois au PBS. Si l'épitope à détecter est intracellulaire, une perméabilisation des cellules se fait dans 1 ml de solution de PBS/triton X-100 1% pendant 5 minutes.

Composition du kit RNAgents
Acétate de Sodium 2M
Eau dépourvue de RNase
Isopropanol
Tampon de dénaturation

TABLEAU 6 : Liste des différents composants fournis dans le Kit RNAgents Total RNA Isolation System (Promega Z5111) utilisés lors d'une extraction d'ARN.

MELANGE REACTIONNEL	
Composition	Concentration
Mélange dNTP (Eurogentec DM2-104C)	22%
DTT 0.1 M (Invitrogen y00147)	22%
RNAsin (40 U/μl) (Promega N2511)	11%
Tampon pour RT 5X (Invitrogen y00146)	45%

TABLEAU 7 : Composition du mélange réactionnel utilisé lors de la transcription inverse d'extraits d'ARN totaux en ADNc des ARNm.

6.3.3 Saturation des sites aspécifiques et incubation avec les anticorps

Les sites aspécifiques sont saturés grâce à 3 rinçages à l'aide d'une solution de PBS/BSA 2%. Ceci permet de réduire les sites de liaison aspécifique de l'anticorps primaire. Dans une chambre humide, les cellules sur lamelle sont mises en contact avec 30 µl d'anticorps primaires dilués durant 16 heures à 4°C ou 2 heures à température ambiante. Les lamelles sont ensuite rincées 3 fois pendant 10 minutes avec une solution de PBS/BSA. Les cellules sont alors mises en présence de 30 µl d'anticorps secondaire dilué, pendant 1 heure à température ambiante et à l'abri de la lumière.

6.3.4 Marquage des noyaux

Après 3 autres rinçages au PBS, les noyaux des cellules sont marqués grâce à une incubation de 35 minutes à température ambiante, dans l'obscurité et avec 30 µl de la solution de TO-PRO 3 dilué 80 fois dans une solution de RNase à 2 mg/ml dans du PBS.

6.3.5 Montage des lamelles sur lame et observation

Après 3 derniers rinçages au PBS, les lamelles couvre-objets sont montées sur lame avec 1 goutte de Mowiol préchauffé à 57°C, la face de la lamelle présentant les cellules contre la lame. Ces lames sont conservées à 4°C avant l'analyse au microscope confocal avec un photomultiplicateur constant.

7. RT PCR en temps réel

7.1. Principe

L'analyse de l'activité d'un facteur de transcription dans différentes conditions peut se faire par l'analyse du niveau d'expression des ARNm de ses gènes cibles. Ainsi, après stimulation des cellules, l'ARN total des cultures cellulaires est récupéré et les ARNm sont transformés en ADNc grâce à une rétrotranscriptase et une amorce d'oligo(dT). Ensuite, une PCR en temps réel permet de suivre l'accumulation d'amplicons sélectionnés via des amorces spécifiques par leur marquage au SYBR Green, un agent intercalant. La quantification repose sur le concept de cycle seuil (ou CT pour Cycle Threshold), lorsque la fluorescence émise par les amplicons se distingue du bruit de fond. Le CT est inversement proportionnel à la quantité d'ADNc, elle-même proportionnelle à la proportion des ARNm cibles. Enfin, les valeurs sont normalisées par un contrôle endogène, dans notre cas, la protéine ribosomiale issue du gène de maintenance rpl13a.

7.2. Matériel

- Couples d'amorces 'avant' et 'arrière'
- Ethanol absolu (Merck 1.00983.1000)
- Kit RNAgents Total RNA Isolation System (Promega Z5111) (*tableau 6*)
- Mélange réactionnel pour transcription inverse (*tableau 7*)
- Oligo(dT) (Invitrogen y01212)
- Phénol/Chloroforme/isoamyl (Promega Z5112)
- RNaseH (Invitrogen 18021-071)

- SDS (ICN Biomedicals)
- Superscript II (Invitrogen 18021-014)
- SYBR Green PCR Mix (Applied Biosystems 4367659)

7.3. Méthode

7.3.1 *Extraction de l'ARN total*

Afin de préserver l'ARN extraits des cultures cellulaires, toutes les manipulations se font avec du matériel et sur un espace de travail préalablement nettoyés avec une solution de SDS 1% afin de dégrader les RNases.

Après 16 heures de stimulation, le milieu des boîtes T75 repiquées avec 10.000.000 de cellules est décanté puis les cellules sont raclées avec 600 µl de tampon de dénaturation. Le lysat est récupéré et mélangé à 60 µl d'acétate de sodium 2M puis à 600 µl de phénol/chloroforme/isoamyl. Les échantillons sont vortexés puis incubés à 4°C durant 15 minutes avant d'être centrifugés pendant 15 minutes à 13.000 RPM et à 4°C. Les ARNm se trouvant dans la phase supérieure des échantillons sont alors récupérés. La solution est alors incubée pendant 30 minutes à -20°C avec une quantité équivalente d'isopropanol afin de précipiter les ARN des échantillons. Ces ARN sont ensuite centrifugés à 13.000 RPM et à 4°C durant 10 minutes. Le culot est resuspendu dans 1 ml d'éthanol 75% froid et centrifugé à nouveau dans les mêmes conditions. Le surnageant est décanté et le culot séché à l'air libre jusqu'à ce qu'il devienne transparent puis resuspendu dans 50 µl d'eau dépourvue de RNase. Le dosage de l'ARN est effectué au spectrophotomètre à 260 nm.

7.3.2 *Transcription inverse*

Une quantité des fractions d'ARN total équivalant à 2 µg est mélangée avec 2 µl d'oligo(dT) 500 ng/µl pour un volume total de 9.5 µl. Ce mélange est incubé durant 10 minutes à 70°C puis pendant 5 minutes à 4°C. 9 µl du mélange réactionnel est alors ajouté puis le tout est incubé 5 minutes à température ambiante. Ensuite, 1.5 µl de SuperScript II (200 U/µl) est introduit et les échantillons sont alors incubés pendant 1h30 à 42°C. Une seconde incubation de 15 minutes à 70°C est nécessaire afin d'inactiver la reverse transcriptase. Les hybrides ARN/ADN sont éliminés grâce à l'ajout d'1 µl de RNaseH (2U/µl) pendant 20 minutes à 37°C.

7.3.3 *PCR en temps réel*

Pour chaque gène étudié, un mélange réactionnel est préparé contenant 5 µl d'eau distillée, 2,5 µl d'amorces gauche et droite et 12,5 µl de SYBR Green. On dispose 20 µl de ce mix dans les puits d'une plaque 96-puits avec 5 µl d'ADNc préparé précédemment et dilué 100 fois. Des blancs sont également préparés en remplaçant les 5 µl d'ADNc par de l'eau. Les puits sont alors recouverts hermétiquement par un film plastique. Après une centrifugation de 5 minutes à 2000 RPM, la plaque est introduite dans l'appareil de PCR en temps réel (Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System) afin de réaliser l'amplification PCR de 40 cycles. Une courbe de dissociation est réalisée en fin d'amplification afin de s'assurer de la spécificité des couples d'amorces utilisés.

$$\text{Fold d'induction} = 2^{(-\delta\delta\text{CT})}$$

FIGURE 3 : Formule utilisée pour le calcul du fold d'induction de différents ARNm de gènes cibles et pour certaines conditions lors d'une PCR en temps réel. Le CT représente la moyenne des valeurs de CT pour un même ARNm dans une même condition et est calculé automatiquement par l'appareil (Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System).

7.3.4 Interprétation des résultats

L'appareil de PCR en temps réel calcule automatiquement les valeurs de CT pour chaque condition étudiée. Les valeurs de CT obtenues pour un gène spécifique doivent être soustraites aux valeurs de CT obtenues avec le gène de maintenance, *rpl13a* (δ CT). Ces valeurs sont ensuite soustraites aux valeurs de la condition constituant le contrôle négatif ($\delta\delta$ CT). Enfin, le fold d'induction est calculé selon la formule présentée à la *figure 3*.

Selon cette formule, les valeurs de fold d'induction pour les conditions contrôles seront rapportées à $2^{(-0)}$, soit 1. Les valeurs obtenues pour les autres conditions représenteront le changement de l'expression du gène étudié par rapport au contrôle.

8. Système rapporteur

8.1. Principe

Un système rapporteur est une méthode permettant d'estimer quantitativement l'abondance d'un transcrit placé sous le contrôle d'un promoteur créé artificiellement. Pour cela, les cellules sont transfectées avec 2 plasmides. Le premier encode le gène de la β -Galactosidase, une enzyme dont le substrat devient jaune lorsqu'il est clivé. Ce gène est placé sous le contrôle d'un promoteur constitutif ; son expression ne change donc pas au sein d'un même type cellulaire ; il servira à la normalisation des valeurs. Le second plasmide contient le gène de la luciférase qui oxyde la luciférine, lui procurant une émission à une longueur d'onde particulière. Ce gène est sous le contrôle d'une séquence promotrice dont nous voulons étudier l'activité.

8.2. Matériel

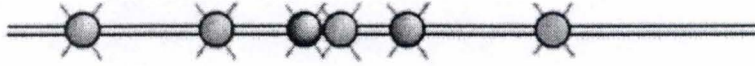
- Bright Glow™ Luciferase Assay Substrate (Promega E263B)
- Glo Lysis Buffer (Promega E266A)
- PBS (tableau 4)
- PBS stérile (Biowhittaker BE17-516F)
- Plasmide pCMV β (Promega)
- Plasmide pGL3(PGK HRE)₆-tK-Luc (Maxwell et al. 1999)
- Substrat β -Galactosidase (tableau 9)
- Superfect Transfection reagent (Qiagen 301307)

8.3. Méthode

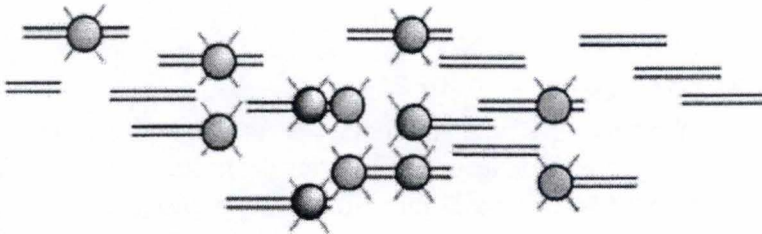
8.3.1 Transfection des cellules

Les cellules sontensemencées à 50% de leur confluence dans les puits de plaques 24-puits. Un jour après, les puits sont décantés et rincés avec 1 ml de PBS. Ensuite, les milieux sont remplacés par 500 μ l d'un milieu contenant 12 μ l/ml de PBS stérile, 1,8 μ g/ml du plasmide d'intérêt, 1,2 μ g/ml du plasmide pCMV β et 6 μ g/ml de Superfect. Après 6 heures de transfection, celle-ci est arrêtée en rinçant les puits au PBS puis en remplaçant le milieu par du milieu sans sérum pendant 16 heures, contenant éventuellement 0,1% de BSA si les cellules doivent ensuite être stimulées avec de l'insuline.

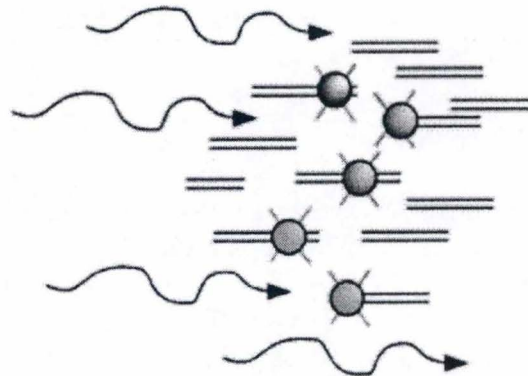
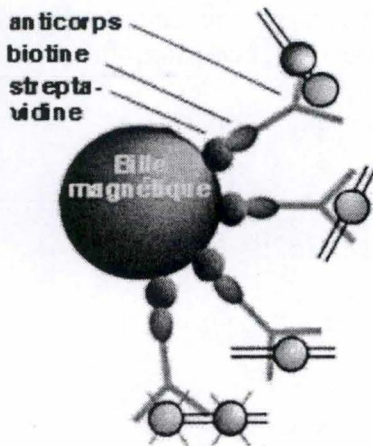
Pontage des protéines à l'ADN à l'aide de formaldéhyde.



Fractionnement de l'ADN en petits morceaux par sonication



Capture de la cible protéique pontée à l'ADN avec un anticorps spécifique biotinylé; capture du complexe anticorps-protéine-ADN avec une bille magnétique streptavidine



Lavage de ce qui n'est pas retenu par l'anticorps

FIGURE 4 : Illustration schématique de la technique d'immunoprécipitation de chromatine. Les deux droites parallèles représentent les doubles-brins d'ADN et les cercles apposés dessus représentent les protéines en interaction avec cet ADN.

8.3.2 Révélation de la transfection

Après 24 heures de stimulation, les cellules sont rincées avec 1 ml de PBS (excepté la stimulation hypoxique et le contrôle en normoxie) puis le PBS est décanté et remplacé par 200 μ l de Glo Lysis Buffer. Après 10 minutes à température ambiante, le milieu des puits est prélevé dans un microtube en ayant pris soin de récupérer le maximum de cellules.

L'activité de la β -Galactosidase est mesurée dans les puits de plaques 96-puits après 1 heure d'incubation à l'obscurité de 50 μ l du substrat de la β -Galactosidase et 50 μ l d'extrait cellulaire. La mesure de l'activité se fait par mesure de l'absorbance de chaque puits à 405 nm.

La révélation de l'activité de la luciférase se fait en mesurant la lumière émise directement après le mélange de 100 μ l d'extrait cellulaire avec 100 μ l de Bright Glow.

Pour chaque échantillon, l'activité de la luciférase est rapportée à celle de la β -Galactosidase afin d'obtenir une estimation quantitative de l'activité du promoteur étudié.

9. Immunoprécipitation de chromatine (ChIP)

9.1. Principe

L'immunoprécipitation de chromatine (*figure 4*) consiste en l'étude de la liaison de protéines à l'ADN dans un environnement natif. Cette méthode permet notamment d'étudier la fréquence de liaison d'un facteur de transcription sur un promoteur donné et dans un environnement natif. Pour ce faire, les protéines sont d'abord pontées à l'ADN grâce à la formaldéhyde. La chromatine des cellules est ensuite fragmentée par une série de pulses dans un bain à sonication afin de générer des fragments d'ADN dont la taille approxime 200 à 1500 pb. A ce stade, les protéines sont toujours liées à l'ADN : nous pouvons donc immunosélectionner des fragments d'ADN liés à certaines protéines à l'aide d'anticorps dirigés contre ces dernières. L'ADN des complexes anticorps-protéines-chromatine ainsi formés peut ensuite être purifié. L'ADN récolté pourra alors être utilisé pour analyse par PCR en temps réel.

9.2. Matériel

- Anticorps anti-HIF-1 α lapin (Abcam ab2185-100)
- Anticorps Normal Rabbit IgG (Upstate 12-370)
- Protein A Agarose/Salmon Sperm DNA (Upstate 16-157)
- Couples d'amorces 'avant' et 'arrière'
- Ethanol absolu (Merck 1.00983.1000)
- Formaldéhyde (Sigma F-1268)
- Glycine 1.25 M (Merck 1.04201.1000)
- PBS (tableau 4)
- PIC - Complete (Roche 11697498001)
- Protéinase K (Sigma P6556)
- Résine Chelex-100 (BioRad 142-1253)
- SYBR Green PCR Mix (Applied Biosystems 4367659)
- Tampons (*tableau 10*)

	Composition	Concentration
TAMPON A	EDTA - Titriplex (Merck 1.08417.0250)	10 mM
	EGTA - Titriplex (Merck 8435)	0.5 mM
	HEPES (Acros Organic 172572500)	10 mM
	Triton X-100 (Merck 1.12298.0101)	0.25%
	pH 6.5	-
TAMPON B	EDTA - Titriplex (Merck 1.08417.0250)	1 mM
	EGTA - Titriplex (Merck 8435)	0.5 mM
	HEPES (Acros Organic 172572500)	10 mM
	NaCl (Merck 1.06404.1000)	200 mM
	pH 6.5	-
TAMPON DE LYSE	EDTA - Titriplex (Merck 1.08417.0250)	10 mM
	Nonidet® P40 Substitute (Fluka 74385)	0.50%
	SDS (MP Biomedicals 811030)	1%
	Tris (Merck 1.08382.0500)	50 mM
	pH 8.0	-
TAMPON DE CHIP	EDTA - Titriplex (Merck 1.08417.0250)	5 mM
	NaCl (Merck 1.06404.1000)	150 mM
	Nonidet® P40 Substitute (Fluka 74385)	0.50%
	Tris (Merck 1.08382.0500)	50 mM
	Triton X-100 (Merck 1.12298.0101)	1%
	pH 7.5	-
TAMPON DE COLLECTION	DTT	100 mM
	Tris (Merck 1.08382.0500)	100 mM
	pH 9.4	-

TABLEAU 10 : Composition des différentes solutions tampons utilisées pour réaliser une immunoprécipitation de chromatine.

9.3. Méthode

9.3.1 *Fixation et récolte des cellules*

De la formaldéhyde à une concentration finale de 1,5% est ajouté au milieu des boîtes de culture T75 préalablement stimulées durant 6 heures afin de fixer les cellules. Après 5 minutes d'incubation à 37°C avec une légère agitation, la formaldéhyde est quenchée par l'ajout de 10% de glycine 1,25 M durant 5 minutes à température ambiante. Les boîtes de culture sont rincées 2 fois avec 10 ml de PBS à 4°C puis les cellules sont raclées dans 1 ml de PBS/PIC 4% et récoltées dans des microtubes. Afin de culotter les cellules, celles-ci sont centrifugées à 5.000 RPM durant 5 minutes et à 4°C puis le culot obtenu est resuspendu dans 1 ml de tampon de collection et incubé pendant 15 minutes à 30°C. Les cellules sont ensuite vortexées légèrement et après une nouvelle centrifugation à 5.000 RPM durant 5 minutes et à 4°C, le surnageant est éliminé et le culot est conservé à -80°C.

9.3.2 *Lyse cellulaire*

Pour supprimer les membranes plasmiques, le culot est resuspendu dans 1 ml de Tampon A/PIC 4% et est centrifugé à 5.000 RPM durant 5 minutes à 4°C. Le surnageant est éliminé et la même opération est répétée avec 1 ml de Tampon B/PIC 4% afin cette fois-ci d'enlever les membranes nucléaires. Le culot obtenu est resuspendu dans 300 µl de Tampon de lyse/PIC 4%. Un prélèvement de 6 µl du lysat cellulaire est effectué et conservé à -80°C : ceci constituera l'INPUT.

9.3.3 *Sonication de la chromatine*

Afin de fragmenter l'ADN, le lysat cellulaire est soniqué au bain à ultrasons (Branson) grâce à 15 pulses de 30 secondes entrecoupés de 30 secondes de repos dans un bain à 4°C. Le lysat est ensuite centrifugé à 13.000 RPM durant 5 minutes à 4°C et le surnageant, contenant les fragments d'ADN, est récupéré dans un nouveau microtube.

9.3.4 *Immunosélection*

Pour chaque condition d'immunoprécipitation, 280 µl de Tampon de ChIP/PIC 4% à 4°C sont dispensés dans un microtube. La quantité d'anticorps adéquate est ensuite ajoutée et tous les tubes sont alors incubés pendant 30 minutes dans un bain à ultrasons (Branson) à 4°C.

En parallèle, un volume correspondant à 42 µl, multiplié par le nombre d'immunoprécipitations, de billes de protéines A est lavé par sédimentation dans 10,5 ml de tampon de ChIP à 4°C dans un tube de 15 ml. Après avoir déposé les billes au sommet du tampon de ChIP et attendu la sédimentation (environ 2 minutes), le tube est centrifugé durant 3 minutes à 2.000 RPM et à 4°C. Le surnageant est éliminé et les billes sont resuspendues dans un volume correspondant à 525 µl de tampon de ChIP multiplié par le nombre d'immunoprécipitations réalisées. De cette solution, 500 µl est aliquote par nouveau microtube. Ces microtubes sont alors centrifugés durant 2 minutes à 3.000 RPM et à 4°C et les surnageants ainsi obtenu sont décantés afin de ne garder que les culots contenant les billes.

9.3.5 Immunoprécipitation

Après la sonication des microtubes contenant les complexes anticorps-chromatine, ceux-ci sont centrifugés à 12.000 RPM durant 10 minutes et à 4°C. 250 µl du surnageant sont prélevés et ajoutés dans un microtube contenant les billes. Tous les microtubes sont alors incubés durant 1 heure sur roue à 4°C. Les échantillons sont alors centrifugés à 2.500 RPM durant 2 minutes à 4°C. Le culot contenant les complexes billes-anticorps-protéine-ADN immunoprécipité est gardé et resuspendu dans 1 ml de tampon de ChIP à 4°C. Après 2 inversions, les microtubes sont à nouveau centrifugés à 2.500 RPM durant 2 minutes à 4°C et les surnageants sont éliminés.

Le dernier rinçage s'effectue comme suit : pour chaque immunoprécipitation, le culot de billes est prélevé dans 1 ml de tampon de ChIP à 4°C et déposé au sommet d'une colonne de 11 ml de tampon de ChIP à 4°C dans un tube de 15 ml. Ces tubes sont alors incubés pendant 5 minutes à 4°C puis centrifugés à 2.000 RPM durant 3 minutes à 4°C. Une partie du surnageant est éliminée afin de ne garder qu'1 ml de tampon dans lequel les billes sont resuspendues puis transférées dans de nouveaux microtubes. Ces derniers sont centrifugés à 3.000 RPM durant 2 minutes à 4°C puis, le culot est gardé et séché à l'air libre et à température ambiante.

9.3.6 Purification de l'ADN

Les échantillons INPUT (préparés au point 9.3.2) sont additionnés de 30 µl d'éthanol absolu et incubés durant 10 minutes à 4°C afin de précipiter l'ADN. Après une centrifugation à 10.000 RPM durant 10 minutes et à 4°C. Le culot est ensuite resuspendu dans 50 µl d'éthanol 75% puis centrifugé directement à 10.000 RPM durant 10 minutes et à 4°C. Les surnageants sont éliminés et les culots sont laissés à l'air libre et à température ambiante afin de sécher. Le culot est resuspendu dans 100 µl d'eau.

Pour les échantillons INPUT et les échantillons immunoprécipités, 100 µl de Chelex-100 10% est dispensé dans chaque microtube. Tous les tubes sont inversés 2 fois et incubés durant 10 minutes dans de l'eau bouillante. Ensuite, lorsque les échantillons sont revenus à température ambiante, ils sont additionnés d'1 µl de protéinase K (20 µg/µl) afin de casser les complexes bille-anticorps-protéine-ADN et vortexés à moyenne puissance pendant 2 secondes. Les échantillons sont alors mis en agitation durant à 1.000 RPM durant 30 minutes à 55°C avant d'être à nouveau incubés durant 10 minutes dans de l'eau bouillante pour inhiber la protéinase K. Les tubes sont centrifugés à 12.000 RPM durant 1 minute à 4°C et 70 µl des surnageants sont transférés dans des nouveaux microtubes. Les échantillons sont resuspendus dans 130 µl d'eau puis vortexés durant 10 secondes à moyenne puissance avant d'être centrifugés à 12.000 RPM durant 1 minute et à 4°C. 130 µl des surnageants sont récupérés et sont ajoutés à leurs 70 µl respectifs prélevés auparavant. Les échantillons contenant l'ADN purifié sont conservés à -20°C avant l'analyse par PCR en temps réel.

9.3.7 PCR en temps réel

Pour chaque séquence d'ADN étudiée, un mélange réactionnel est dispensé dans les puits d'une plaque 96-puits comprenant 10 µl de SYBR Green, 4,4 µl d'eau et 0,3 µl de chaque solution du couple d'amorces. Ensuite, 5 µl des échantillons contenant l'ADN purifié sont introduits dans les puits correspondants. Les échantillons INPUT sont cependant dilués 10 fois avant d'être utilisés. Une courbe de dilution standard est également effectuée sur

l'INPUT d'une condition pour chaque couple d'amorces à des dilutions de 10, 100, 1.000 et 10.000 fois. Les puits sont alors recouverts hermétiquement par un film plastique. Après une centrifugation de 5 minutes à 2000 RPM, la plaque est introduite dans l'appareil de PCR en temps réel (Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System) afin de réaliser l'amplification PCR de 40 cycles. Une courbe de dissociation est réalisée en fin d'amplification afin de s'assurer de la spécificité des couples d'amorces utilisés.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

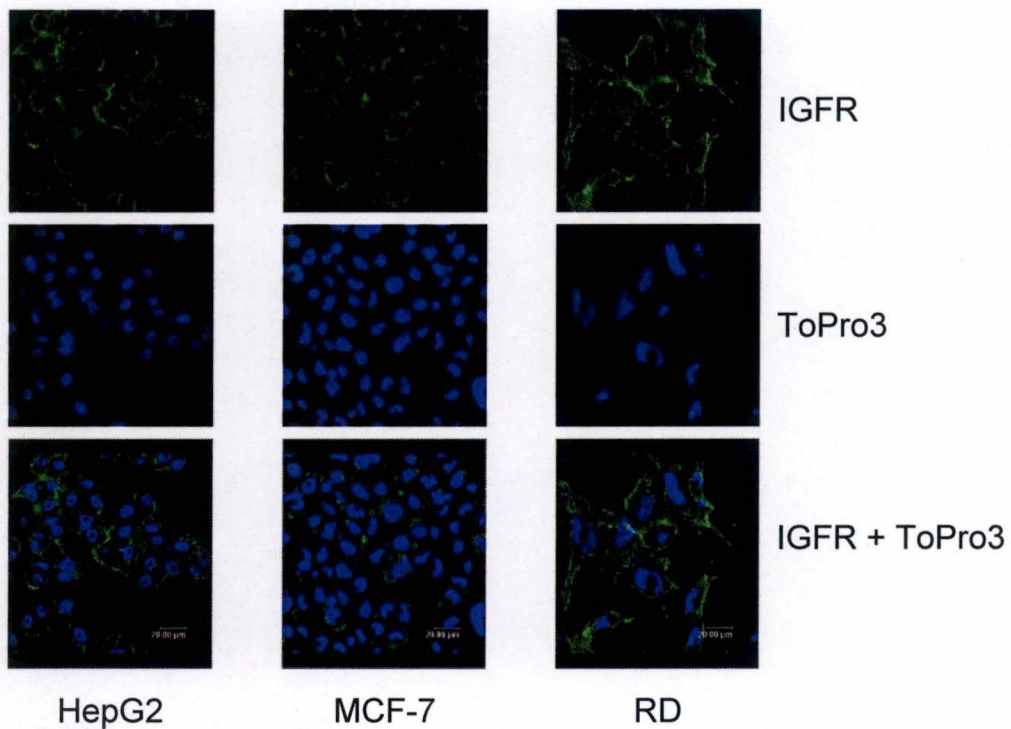


FIGURE 1 : Localisation des récepteurs à l'IGF dans les cellules HepG2, MCF-7 et RD. Les récepteurs à l'IGF sont marqués à l'aide d'anticorps primaires puis secondaires couplés au fluorochrome Alexa488 (vert) et les noyaux sont marqués au ToPro3 (bleu).

Etude de l'induction de HIF-1 α dans différents types cellulaires

Le facteur de transcription HIF-1 est activé en hypoxie mais également suite à d'autres stimuli tels que, par exemple, des facteurs de croissance. Il a cependant été montré que l'activation de HIF-1 suite à des stimuli non-hypoxiques n'est pas identique dans tous les types cellulaires en termes d'intensité et en termes de répercussion sur l'expression de ses gènes cibles.

Dans un premier temps, nous allons donc étudier la capacité de différentes lignées cellulaires à activer HIF-1 après une stimulation hypoxique ou avec l'IGF.

Nous avons décidé de travailler sur trois lignées cellulaires humaines tumorales : des cellules HepG2 d'hépatocarcinome du foie, des cellules RD de rhabdomyosarcome et des cellules MCF7 issues d'un cancer du sein.

1. Détection de IGFR par marquage en immunofluorescence

Afin de pouvoir agir sur une cellule, l'IGF doit se lier à son récepteur localisé dans la membrane plasmique. Ainsi, nous avons vérifié que les trois lignées cellulaires choisies expriment effectivement ces récepteurs car leur absence empêcherait le déclenchement de la cascade de signalisation menant aux réponses cellulaires.

Pour ce faire, nous avons réalisé un marquage de ces récepteurs en immunofluorescence dans les différentes lignées. Le marquage a été visualisé à l'aide d'un microscope confocal. Les IGFR ont été marqués par un système d'anticorps primaires dirigés contre la protéine d'intérêt et secondaires couplés à un fluorochrome Alexa488 tandis que l'ADN des noyaux est marqué par un agent intercalant, le ToPro3.

Les illustrations (*figure 1*) montrent séparément la localisation des récepteurs de l'IGF et le marquage des noyaux ainsi que leur superposition dans un même plan de coupe à photomultiplicateur constant. Bien que l'intensité du marquage soit beaucoup plus forte pour les cellules HepG2 et RD, nous pouvons observer dans chaque type cellulaire un anneau de fluorescence verte émise par le fluorochrome Alexa488 au-delà des noyaux marqués en bleu, suggérant ainsi la localisation spécifique des récepteurs dans la membrane plasmique des cellules.

Ces résultats montrent la présence de ces récepteurs en périphérie des cellules des trois types cellulaires et nous permettent de penser que les trois lignées sont capables de répondre à l'IGF. Cela concerne-t-il HIF-1 ? Afin de voir si l'IGF peut induire une augmentation de l'abondance de sa sous-unité alpha dans chacun des trois types cellulaires, nous avons évalué l'abondance de cette protéine par un marquage en immunofluorescence et par une analyse en Western Blot.

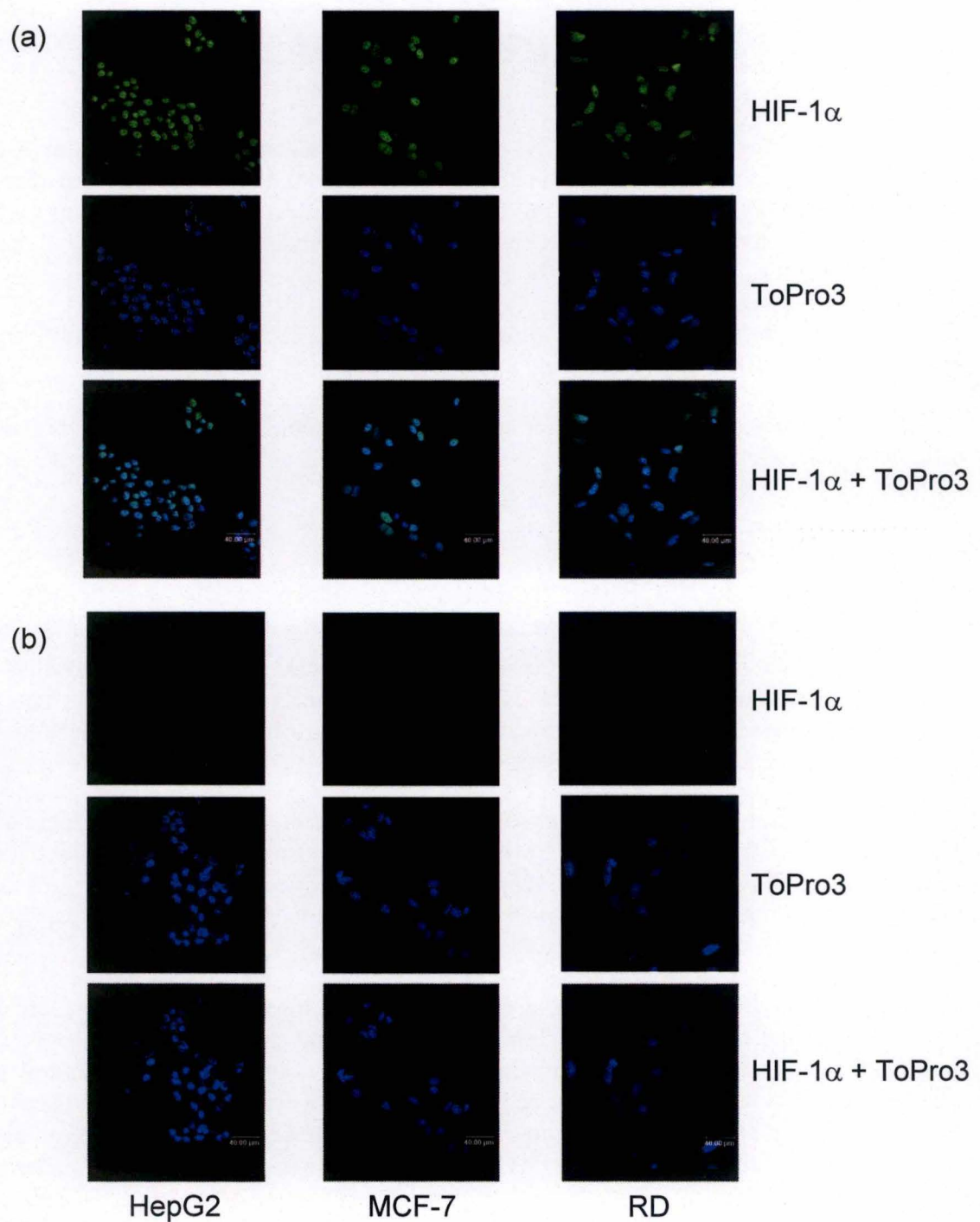


FIGURE 2 : Effet de l'hypoxie sur l'abondance de la protéine HIF-1 α dans les cellules HepG2, MCF-7 et RD. Les cellules sont incubées en hypoxie (a) ou en normoxie (b) pendant 6 heures. Elles sont ensuite fixées, perméabilisées et la protéine HIF-1 α est révélée par immunomarquage (vert). Les noyaux sont marqués au ToPro3 (bleu).

2. Analyse de l'induction de HIF-1 α

2.1. Effet de l'hypoxie sur l'expression protéique de HIF-1 α

La sous-unité alpha du facteur de transcription HIF-1 est extrêmement labile et elle n'est pas détectable dans ces conditions, en normoxie. Par contre, en hypoxie, l'inhibition de sa dégradation par le protéasome (Huang, Gu et al., 1998) permet son accumulation dans les cellules et rend donc sa détection possible. Ces conditions nous serviront tout au long du travail respectivement comme contrôles négatif et positif.

2.1.1. Analyse qualitative par marquage en immunofluorescence

Nous avons tout d'abord visualisé l'augmentation de la quantité de HIF-1 α lors d'une stimulation hypoxique durant six heures dans les trois types cellulaires par un marquage en immunofluorescence. Un contrôle normoxique a également été effectué, il constitue le contrôle négatif.

Les illustrations (figure 2) montrent séparément la détection de HIF-1 α et des noyaux ainsi qu'une superposition des deux dans un même plan de coupe à photomultiplicateur constant. Nous observons, pour les trois types cellulaires, un signal pour HIF-1 α qui se superpose à celui du ToPro3 lors de la stimulation hypoxique. Ceci laisse entendre que HIF-1 α a bien été stabilisé en hypoxie et que sa localisation est exclusivement nucléaire. Il n'est en effet pas présent dans le cytoplasme. Les illustrations du contrôle normoxique ne montrent pas de marquage de HIF-1 α , comme attendu.

2.1.2. Analyse semi-quantitative par Western Blot

Nous avons ensuite effectué une analyse par Western Blot de l'abondance de la protéine HIF-1 α à partir de lysats cellulaires totaux obtenus immédiatement après six heures d'hypoxie sur chaque lignée cellulaire, ceci afin de confirmer nos observations. Un contrôle négatif en normoxie a également été effectué pour chaque type cellulaire.

Nous pouvons observer (figure 3) une bande à 120 kDa en conditions d'hypoxie pour chacun des trois types cellulaires. Nous observons également que dans le cas des cellules HepG2, ce signal semble plus faible pour les autres types cellulaires et que cette bande est aussi observable mais dans une moindre mesure pour en normoxie. Cette bande correspond au signal provenant de la protéine HIF-1 α et illustre le fait que la protéine a bien été stabilisée en hypoxie.

2.2. Effet de l'IGF sur l'expression protéique de HIF-1 α

Afin d'étudier l'effet de l'IGF sur l'abondance de HIF-1 α dans les trois types cellulaires, nous avons récupéré des lysats cellulaires totaux provenant de cellules incubées durant six heures avec des concentrations croissantes d'IGF et effectué une analyse par Western Blot de l'abondance de HIF-1 α (figure 4). Les différentes concentrations d'IGF utilisées sont de 10, 50 et 100 nM. Un contrôle négatif, dépourvu d'IGF, a également été réalisé (0 nM) pour chaque type cellulaire.

Nous n'observons une stabilisation de HIF-1 α que dans les cellules HepG2 incubées en présence d'IGF. Aucun effet clair de la concentration d'IGF n'est cependant observé.

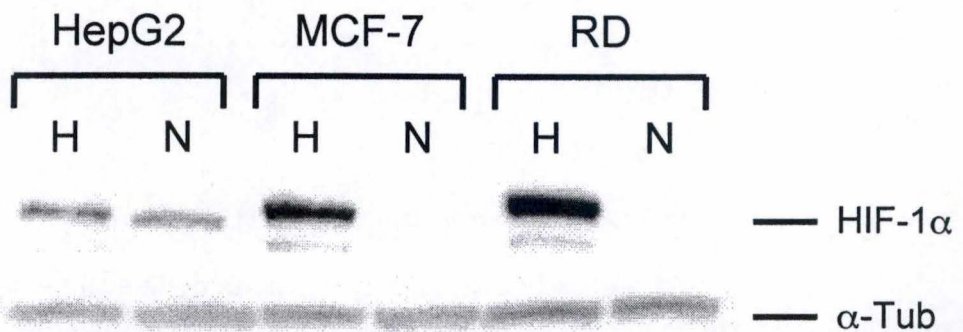


FIGURE 3 : Effet de l'hypoxie sur l'abondance de HIF-1 α dans les cellules HepG2, MCF-7 et RD. Les cellules sont incubées en normoxie ou en hypoxie pendant 6 heures. Des lysats protéiques totaux sont ensuite récupérés et analysés par Western Blot en révélant la protéine HIF-1 α à l'aide d'anticorps spécifiques. La tubuline- α est utilisée comme contrôle de charge.

(H) Hypoxie (N) Normoxie

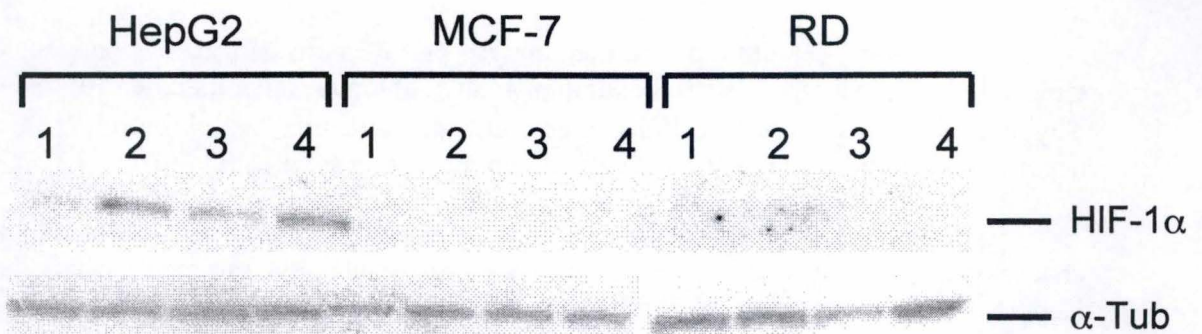


FIGURE 4 : Effet de l'IGF sur l'abondance de HIF-1 α dans les cellules HepG2, MCF-7 et RD. Les cellules sont incubées avec des concentrations croissantes d'IGF pendant 6 heures. Des lysats protéiques totaux sont ensuite récupérés et analysés par Western Blot en révélant la protéine HIF-1 α à l'aide d'anticorps spécifiques. La tubuline- α est utilisée comme contrôle de charge.

(1) Contrôle négatif (0 nM d'IGF) (2) 10 nM d'IGF (3) 50 nM d'IGF (4) 100 nM d'IGF

D'autre part, l'IGF ne semble pas induire d'augmentation de l'abondance de HIF-1 α dans les lignées MCF-7 et RD puisqu'aucune bande à 120 kDa n'est détectée dans ces conditions.

2.3. Discussion

L'ensemble des résultats présentés ci-dessus indiquent qu'une stimulation en présence d'IGF n'induit pas une augmentation de la quantité de HIF-1 α dans tous les types cellulaires. En effet, les cellules MCF-7 et RD, bien que possédant les récepteurs à l'IGF et étant capables d'exprimer HIF-1 α en hypoxie, ne répondent pas à l'IGF en induisant HIF-1 α .

Etude de l'activité de HIF-1 en réponse à différentes stimulations

Le but de ce travail consiste à étudier l'activité transcriptionnelle de HIF-1 en fonction des conditions de stimulation.

En effet, les promoteurs de plus d'une centaine de gènes possèdent une séquence HRE capable de lier le facteur de transcription HIF-1 sur l'ADN. Ces gènes cibles de HIF-1 codent pour des protéines possédant des effets variés qui peuvent également s'opposer. Ainsi, nous retrouvons des gènes codant pour des protéines pro-mitogéniques ou pro-apoptotiques. Ceci nous force à poser l'hypothèse que selon la stimulation, nous pourrions observer une réponse différentielle de l'expression des transcrits de certains gènes cible de HIF-1.

Etant donné que l'IGF n'induit pas d'activation du facteur de transcription HIF-1 dans tous les types cellulaires étudiés, nous avons décidé de nous focaliser sur les cellules HepG2 et d'étudier l'effet d'autres stimuli que l'IGF sur l'abondance de HIF-1 α et l'activité de HIF-1 en normoxie.

1. Activation d'une cascade de transduction du signal dans les cellules HepG2 stimulées avec l'insuline ou l'IL-1 β

Dans la littérature, de nombreux facteurs de croissance ou de cytokines sont décrits comme étant capables d'induire une augmentation de l'abondance de HIF-1 α en normoxie. Parmi ceux-ci, nous avons choisi l'insuline et l'IL-1 β car ces deux protéines sont capables théoriquement d'induire une cascade de transduction du signal différente. Il était donc intéressant de les comparer.

En effet, lorsque l'insuline interagit avec son récepteur en membrane, elle permet le recrutement de la protéine IRS au niveau des tyrosines phosphorylées dans le domaine intracellulaire du récepteur. Ce recrutement conduit ensuite à l'activation de la voie de PI3K/AKT et de la voie des MAPK. Nous pouvons donc détecter un effet de l'insuline sur les cellules HepG2 en suivant la phosphorylation d'AKT suite à la stimulation.

D'autre part, rappelons que l'IL-1 β entraîne l'activation du facteur de transcription NF κ B suite à une cascade de transduction du signal passant par la phosphorylation d'I κ B séquestrant NF κ B dans le cytoplasme. Cette phosphorylation libère NF κ B, ce qui lui permet de transloquer dans le noyau où il active la transcription de ses gènes cibles. Nous pouvons donc vérifier si l'IL-1 β peut déclencher un effet dans les HepG2 en étudiant la quantité d'I κ B phosphorylé suite à une stimulation avec l'IL-1 β .

1.1. Etude de l'abondance d'AKT phosphorylé

Les cellules HepG2 ont été incubées en présence deux concentrations différentes d'insuline (0,2 et 2 UI/ml) ou d'IL-1 β (100 et 1000 pg/ml) et la phosphorylation d'AKT a été analysée par Western Blot. Ces conditions sont comparées avec leurs contrôles négatifs respectifs constitués d'une incubation dans des milieux dépourvus de stimulants. Un temps

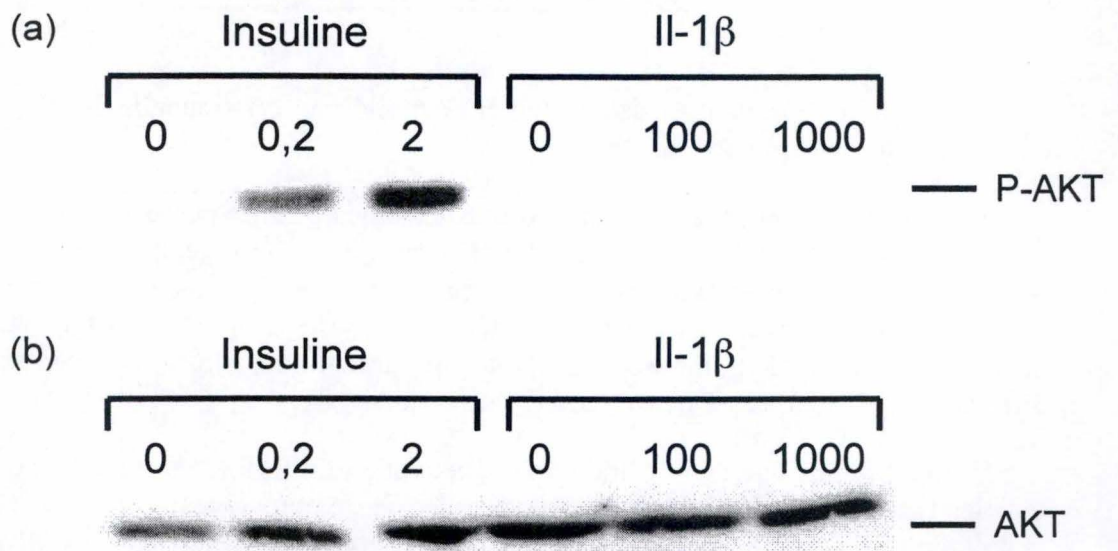


FIGURE 5 : Effet de l'insuline et de l'IL-1 β sur la phosphorylation d'AKT. Les cellules HepG2 sont incubées en présence de différentes concentrations d'insuline (0 ; 0,2 et 2 UI/ml) ou d'IL-1 β (0, 100 et 1.000 pg/ml) pendant 30 minutes. Des lysats totaux ont ensuite été récupérés et analysés par Western Blot en révélant la forme phosphorylée d'AKT (a) ou toutes les formes d'AKT (b), à l'aide d'anticorps spécifiques. La tubuline- α est utilisée comme contrôle de charge.

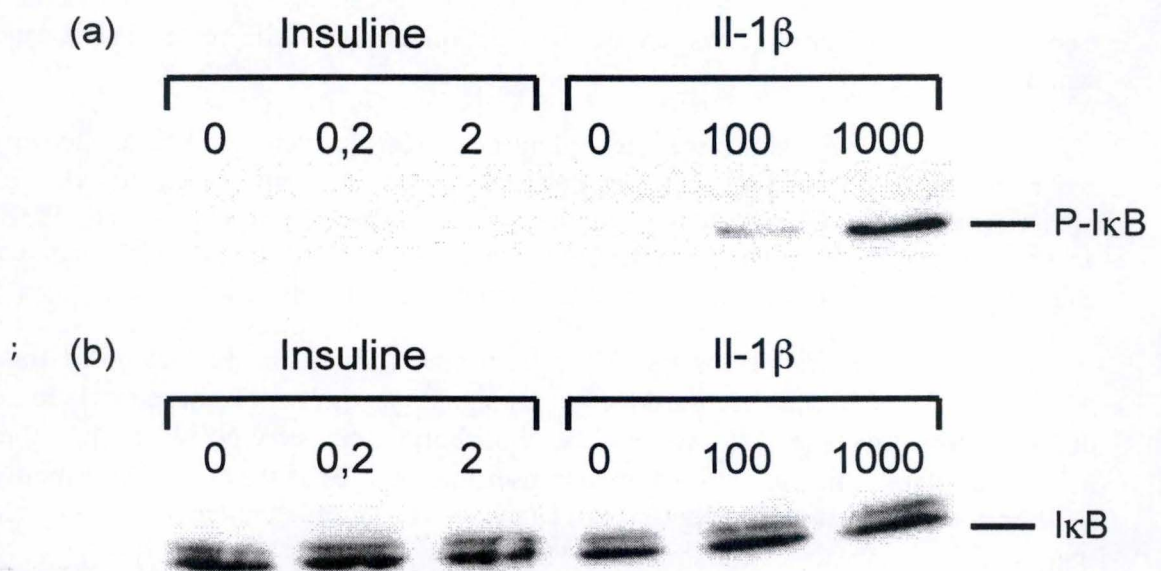


FIGURE 6 : Effet de l'insuline et de l'IL-1 β sur la phosphorylation d'IκB. Les cellules HepG2 sont incubées en présence de différentes concentrations d'insuline (0 ; 0,2 et 2 UI/ml) ou d'IL-1 β (0, 100 et 1.000 pg/ml) pendant 30 minutes. Des lysats totaux ont ensuite été récupérés et analysés par Western Blot en révélant la forme phosphorylée d'IκB (a) ou toutes les formes d'IκB (b), à l'aide d'anticorps spécifiques. La tubuline- α est utilisée comme contrôle de charge.

d'incubation de trente minutes a été choisi car cet évènement est précoce dans la cascade de signalisation.

Parallèlement, les mêmes conditions ont été testées avec des anticorps dirigés contre toutes les formes d'AKT (phosphorylé ou non) afin de nous assurer qu'une augmentation de l'abondance d'AKT phosphorylé n'était pas due simplement à une différence dans les quantités d'AKT total. Cette vérification a été effectuée sur une membrane différente car le poids moléculaire d'AKT phosphorylé et celui d'AKT non-phosphorylé sont très proches.

Les résultats (*figure 5.a*) lorsqu'un anticorps est dirigé spécifiquement contre la forme phosphorylée d'AKT montrent une bande à 60 kDa, correspondant au poids moléculaire d'AKT, uniquement pour les deux conditions de stimulation avec l'insuline. Aucun signal n'est détecté dans les contrôles et pour une stimulation avec l'IL-1 β . Le signal augmente lorsque la concentration en insuline augmente.

Nous constatons aussi qu'AKT est bien présent dans toutes les conditions (*figure 5.b*).

1.2. Etude de l'abondance d'I κ B phosphorylé

De la même façon que dans l'expérience précédente, nous avons suivi la phosphorylation d'I κ B par Western Blot. Des lysats de cellules stimulées durant trente minutes aux mêmes concentrations d'insuline et d'IL-1 β et d'un contrôle négatif ont été réalisés.

Les résultats du Western Blot pour la forme phosphorylée d'I κ B (*figure 6.a*) montrent une bande située aux environs de 40 kDa, ce qui correspond au poids moléculaire d'I κ B. Cette bande est présente seulement pour les lysats de cellules incubées en présence des deux concentrations d'IL-1 β testées. De plus, le signal est plus intense à 1000 pg/ml qu'à 100 pg/ml ce qui semble montrer un effet de la concentration en IL-1 β . Aucun signal n'est détecté dans les cellules contrôles, ni dans les cellules incubées en présence d'insuline.

La détection de la forme totale d'I κ B (*figure 6.b*) montre la présence d'un signal pour chaque condition et dont l'intensité reste constante.

1.3. Discussion

Les résultats montrent que les cellules HepG2 sont capables de répondre à une stimulation induite par l'IL-1 β ou l'insuline de manière spécifique. La première cytokine est liée dans la réponse pro-inflammatoire et induit effectivement la phosphorylation d'I κ B tandis que la seconde permet d'activer la voie de signalisation dépendante de PI3K/AKT.

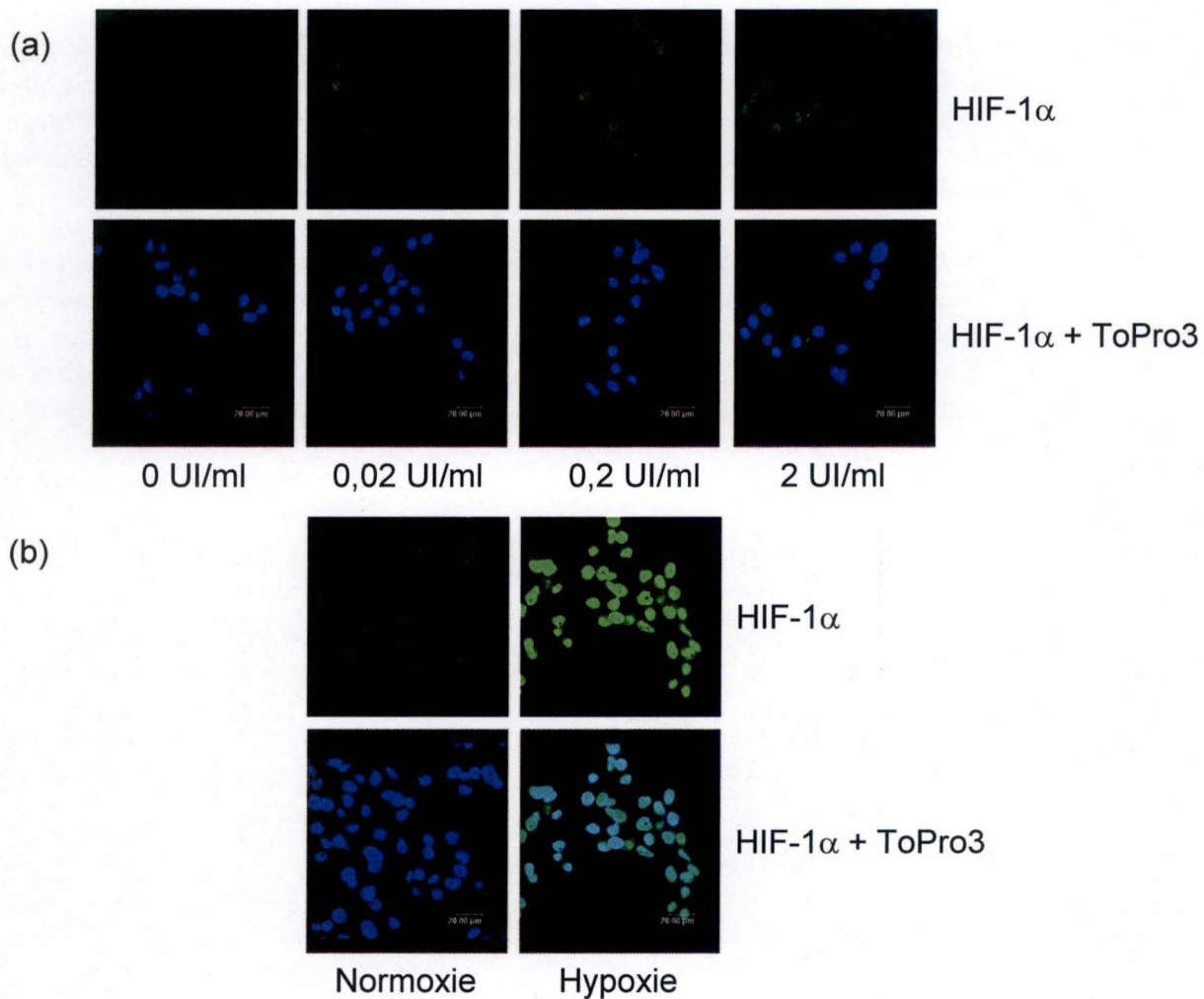


FIGURE 7 : Effet de l'insuline (a) et de l'hypoxie (b) sur l'abondance de la protéine HIF-1 α dans les cellules HepG2. Les cellules sont incubées en présence de différentes concentrations d'insuline (0 ; 0,02 ; 0,2 et 2 UI/ml) ou en hypoxie pendant 6 heures. Elles sont ensuite fixées, perméabilisées et la protéine HIF-1 α est révélée par immunomarquage (vert). Les noyaux sont marqués au ToPro3 (bleu).

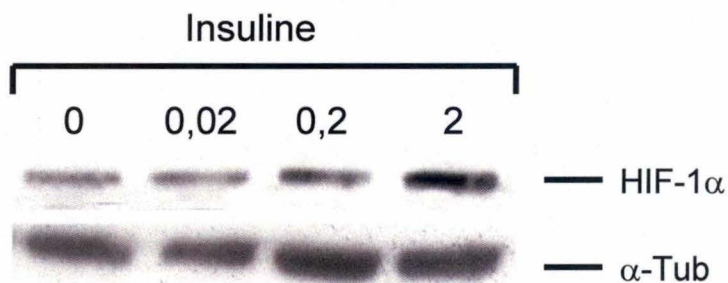


FIGURE 8 : Effet de l'insuline sur l'abondance de la protéine HIF-1 α . Les cellules HepG2 sont incubées en présence de différentes concentrations d'insuline (0 ; 0,02 ; 0,2 et 2 UI/ml) pendant 6 heures. Des lysats totaux ont ensuite été récupérés et analysés par Western Blot en révélant la protéine HIF-1 α , à l'aide d'anticorps spécifiques. La tubuline- α est utilisée comme contrôle de charge.

2. Effet de l'IL-1 β et de l'insuline sur l'expression protéique de HIF-1 α en normoxie

2.1. Effet de l'insuline

2.1.1. Analyse par marquage en immunofluorescence

Nous avons décidé dans un premier temps de visualiser la protéine HIF-1 α par un marquage en immunofluorescence. Les cellules HepG2 ont été stimulées pendant six heures à différentes concentrations en insuline (0,02 ; 0,2 et 2 UI/ml), ceci afin de mettre en évidence un éventuel effet dépendant de la concentration. La protéine HIF-1 α a été marquée en immunofluorescence tandis que les noyaux ont été marqués grâce au ToPro3. Un contrôle négatif constitué d'une incubation dans du milieu de culture seul ainsi qu'un contrôle positif dans lequel les cellules sont incubées pendant six heures en hypoxie (et son contrôle normoxique) ont également été réalisés. Les cellules ont été observées au microscope confocal à photomultiplicateur constant.

Les résultats obtenus (*figure 7.a*) suggèrent une légère induction de la quantité d'HIF-1 α dans les cellules par rapport au contrôle négatif. L'induction de HIF-1 α dans ces conditions reste bien inférieure à celle observée en hypoxie (*figure 7.b*). Nous pouvons également observer que le marquage est exclusivement nucléaire.

2.1.2. Analyse semi-quantitative par Western Blot

Afin de confirmer ces résultats, nous avons étudié l'abondance de HIF-1 α dans les cellules HepG2 de manière semi-quantitative à l'aide d'un Western Blot. Nous avons détecté HIF-1 α à partir de lysats cellulaires issus des mêmes conditions de stimulation que lors du marquage en immunofluorescence (voir point 2.1.1).

Les résultats (*figure 8*) montrent la présence d'une bande à 120 kDa correspondant à HIF-1 α dans tous les puits. Le signal issu de la bande pour l'hypoxie est saturé (non montré). Il aurait été difficile de pouvoir détecter un signal pour les autres conditions et au même temps d'exposition. Une légère quantité de HIF-1 α est détectée en normoxie. Concernant les différentes concentrations en insuline, nous observons un effet dépendant de la concentration bien que ce dernier ne soit pas très prononcé.

2.1.3. Discussion

Les résultats suggèrent que l'insuline, au moins à 0,02 UI/ml, augmente la quantité de HIF-1 α après six heures d'incubation. Cet effet reste toutefois nettement inférieur à celui de l'hypoxie.

2.2. Effet de l'IL-1 β

2.2.1. Analyse qualitative par marquage en immunofluorescence

Tout comme pour l'insuline, nous avons tout d'abord visualisé la localisation cellulaire de la protéine HIF-1 α après six heures de stimulation en présence de différentes concentrations en IL-1 β (100, 500 et 1.000 pg/ml). Un contrôle négatif, sans IL-1 β , a également été réalisé ainsi qu'un contrôle positif en hypoxie (avec son contrôle négatif correspondant, en

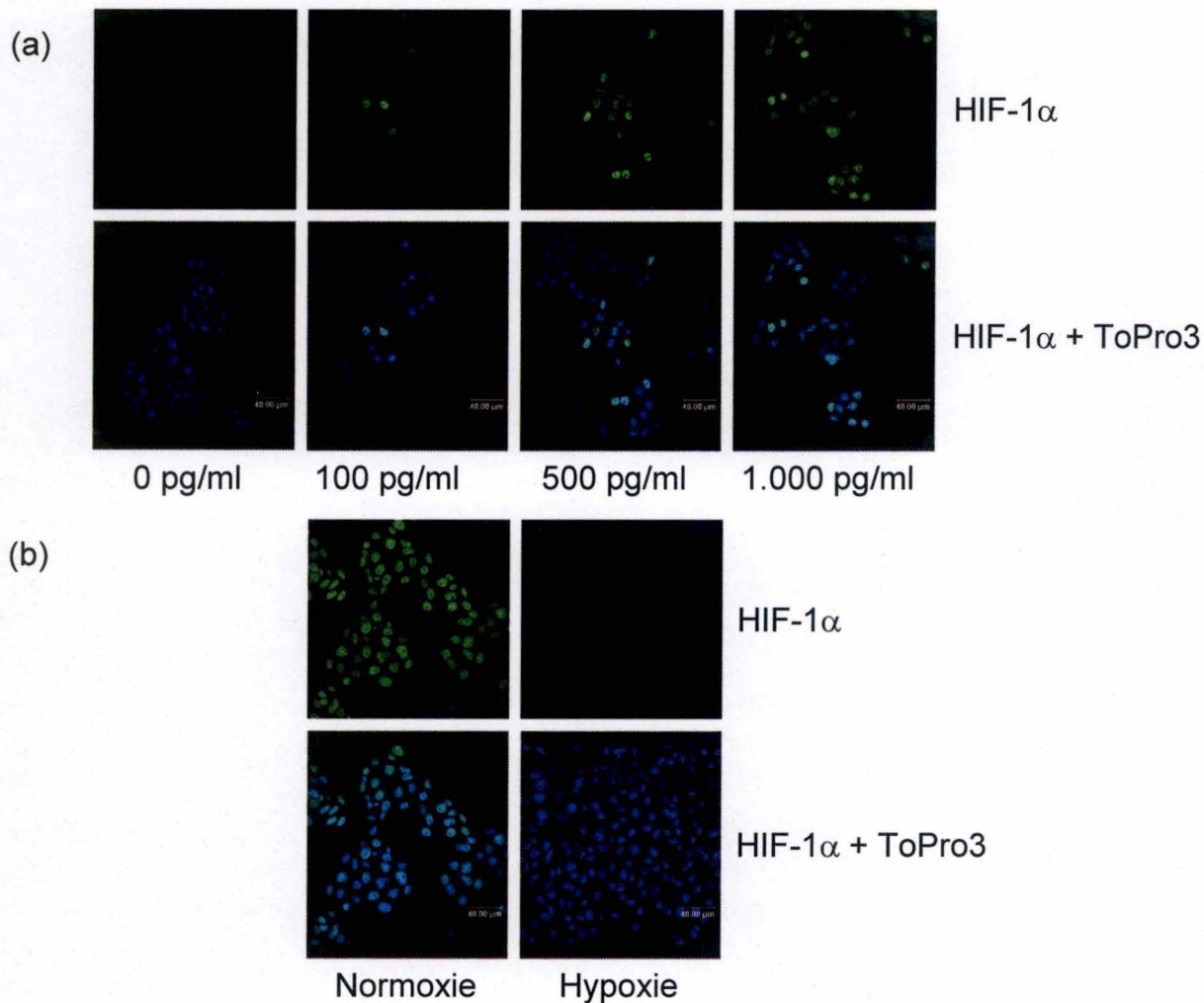


FIGURE 9 : Effet de l'IL-1 β (a) et de l'hypoxie (b) sur l'abondance de la protéine HIF-1 α dans les cellules HepG2. Les cellules sont incubées en présence de différentes concentrations d'IL-1 β (0, 100, 500 et 1.000 pg/ml) ou en hypoxie pendant 6 heures. Elles sont ensuite fixées, perméabilisées et la protéine HIF-1 α est révélée par immunomarquage (vert). Les noyaux sont marqués au ToPro3 (bleu).

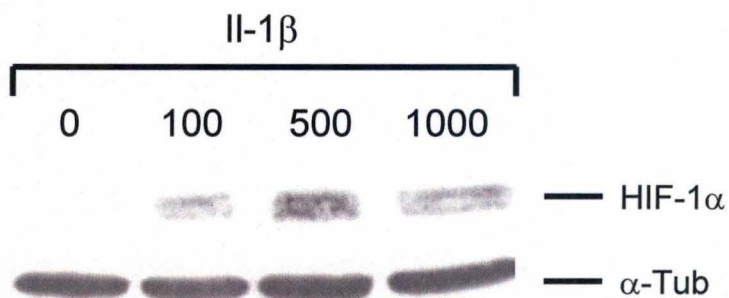


FIGURE 10 : Effet de l'insuline sur l'abondance de la protéine HIF-1 α . Les cellules HepG2 sont incubées en présence de différentes concentrations d'IL-1 β (0, 100, 500 et 1.000 pg/ml) pendant 6 heures. Des lysats totaux ont ensuite été récupérés et analysés par Western Blot en révélant la protéine HIF-1 α , à l'aide d'anticorps spécifiques. La tubuline- α est utilisée comme contrôle de charge.

normoxie). La protéine HIF-1 α a été marquée en immunofluorescence tandis que les noyaux sont marqués avec le ToPro3.

Les photos prises au microscope confocal et à photomultiplicateur constant (*figure 9.a*) illustrent une augmentation de l'abondance de la protéine HIF-1 α dans les cellules HepG2 suite à une stimulation avec l'IL-1 β . De plus, la quantité de signal pour HIF-1 α augmente en fonction de la concentration de la cytokine. L'hypoxie (*figure 9.b*) induit une stabilisation plus importante de d'HIF-1 α dans les cellules que l'IL-1 β . Précisons également que, pour toutes les conditions, la totalité du signal de cette protéine est nucléaire, montrant que HIF-1 α est présent dans le noyau.

2.2.2. Analyse semi-quantitative par Western Blot

Afin de confirmer ces observations, nous avons effectué un Western Blot sur des échantillons protéiques issus de cellules stimulées durant six heures avec les mêmes trois concentrations d'IL-1 β que précédemment (100, 500 et 1.000 pg/ml). Nous avons également effectué un contrôle négatif (sans IL-1 β) ainsi qu'un contrôle hypoxique (et la normoxie).

Les résultats (*figure 10*) montrent que la protéine HIF-1 α est présente dans les cellules après une stimulation de six heures en présence d'IL-1 β . Bien que cet effet semble s'accroître d'une manière dépendante de la concentration jusqu'à 500 pg/ml d'IL-1 β , il diminue légèrement à 1.000 pg/ml. A l'instar de l'insuline, nous pouvons constater que l'abondance de HIF-1 α s'avère fortement supérieure lors de l'hypoxie comparée aux stimulations avec l'IL-1 β . Le contrôle négatif ne présente pas de signal pour HIF-1 α .

2.2.3. Discussion

Tant le marquage en immunofluorescence que l'analyse par Western Blot montrent que la protéine HIF-1 α est induite après une stimulation de six heures en présence d'IL-1 β . Nous observons une augmentation de l'abondance de cette protéine jusqu'à 500 pg/ml d'IL-1 β mais une stabilisation voire une légère diminution à 1.000 pg/ml.

2.3. Discussion

L'ensemble de ces résultats indique que l'insuline et l'IL-1 β induisent une augmentation de l'abondance de HIF-1 α dans les cellules HepG2. De plus, les marquages en immunofluorescence montrent que cette protéine se localise dans le noyau des cellules et est donc susceptible de se lier à ARNT afin de former un régulateur transcriptionnel HIF-1 fonctionnel.

Nous avons aussi pu constater que ces stimulants n'arrivaient cependant pas à provoquer une induction de HIF-1 α d'une intensité égale à celle provoquée par l'hypoxie. Rappelons que ce sont des mécanismes tout à fait différents qui influent sur l'abondance de cette protéine dans ces différentes conditions : alors que l'hypoxie empêche sa dégradation par le protéasome et donc stabilise la protéine, les stimuli en normoxie comme l'insuline et l'IL-1 β augmentent la quantité de protéine traduite, ce qui outrepassé le contrôle imposé les prolyl hydroxylases. Celles-ci sont cependant toujours fonctionnelles, ce qui nous permet d'expliquer pourquoi nous n'obtenons pas les mêmes niveaux d'abondance protéique qu'en hypoxie.

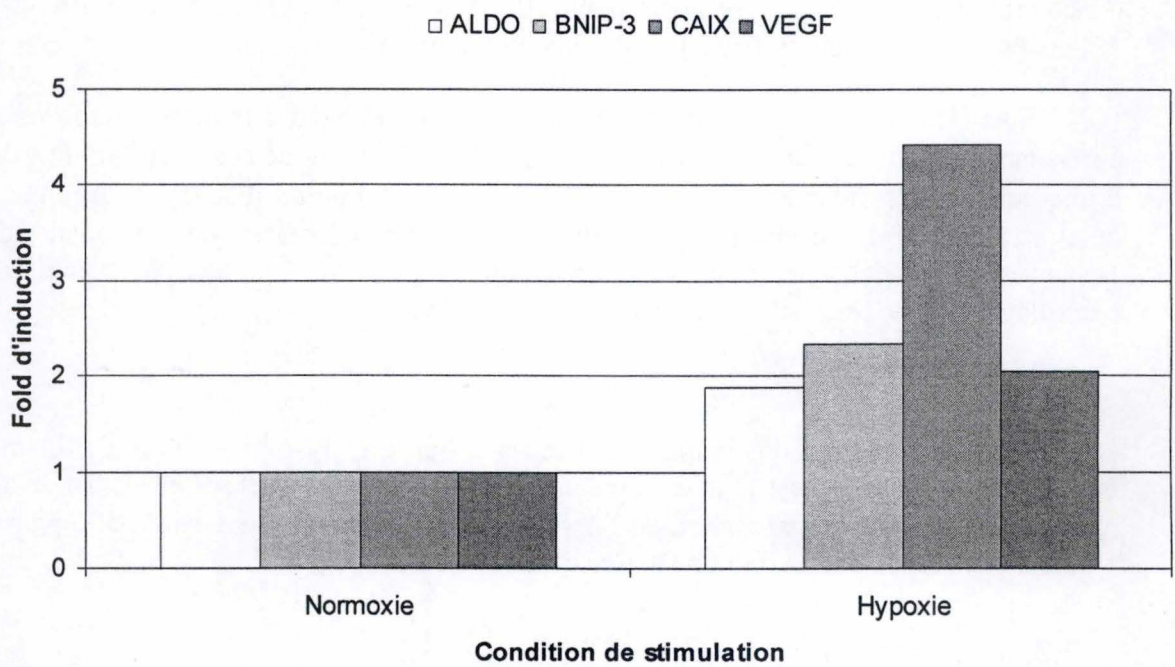


FIGURE 11 : Effet de l'hypoxie sur l'expression des ARNm de quatre gènes cibles de HIF-1 (Aldolase, BNIP-3, CAIX et VEGF). Les cellules HepG2 ont été incubées en normoxie ou en hypoxie pendant 16 heures avant qu'une extraction de l'ARN total n'ait été réalisée. Après rétrotranscription, l'expression des ARNm des gènes d'intérêt a été réalisée par PCR en temps réel. Les valeurs sont normalisées à la normoxie.

3. Effet de l'insuline et de l'IL-1 β sur l'abondance des ARNm de certains gènes cibles de HIF-1

Nous avons vu précédemment que la sous-unité alpha du facteur de transcription HIF-1 était présente dans les noyaux des cellules HepG2 suite à une stimulation avec l'insuline ou l'IL-1 β mais nous ne savons pas si celle-ci peut interagir avec ARNT pour augmenter la transcription des gènes cibles de HIF-1. Dans la suite du travail, nous avons mesuré l'activité transcriptionnelle de HIF-1 en évaluant la quantité de transcrits de certains de ses gènes cibles. Nous avons choisi quatre transcrits de protéines cibles caractéristiques des différentes familles de gènes activées par HIF-1 : l'aldolase qui est une enzyme de la glycolyse, BNIP-3 qui appartient à la famille Bcl-2 et est impliqué dans l'initiation de l'apoptose, CAIX (ou l'anhydrase carbonique IX) qui est une enzyme régulatrice du pH extracellulaire et le VEGF, protéine clé qui permet l'initiation de la néo-angiogénèse.

3.1. Effet de l'hypoxie

Les gènes de ces différentes protéines ont été caractérisés dans la littérature comme étant transactivés en hypoxie via l'activité du facteur HIF-1. Nous avons, dans un premier temps, quantifié l'induction de leurs ARNm dans les cellules HepG2 en hypoxie par rapport à un contrôle maintenu en normoxie. Nous comparerons la quantité de transcrits en évaluant le 'fold d'induction' de chacun : cela signifie que nous déterminons le nombre de fois que l'ARNm de ces gènes est surexprimé dans les cellules en hypoxie normalisé par rapport à la situation contrôle (la normoxie).

A la suite de deux expériences indépendantes pendant lesquelles les cellules ont été incubées en hypoxie et en normoxie pendant seize heures, nous avons réalisé sur chacune une PCR en temps réel avec les d'ADNc obtenus de la rétrotranscription des ARNm provenant de cellules HepG2, et ceci pour les quatre gènes d'intérêt. Afin de nous assurer que la quantité d'ADNc chargé était la même, nous avons également quantifié l'ADNc issu de l'ARNm du gène RPL13A, un gène de maintenance dont l'abondance ne varie pas lors des différentes stimulations.

Les résultats (*figure 11*) montrent une augmentation de l'abondance des ARNm des quatre gènes cibles de HIF-1. Dans le cas de l'aldolase, BNIP-3 et le VEGF, l'augmentation s'élève aux alentours de 2 'fold d'induction'. Pour l'anhydrase carbonique, nous obtenons un 'fold d'induction' d'environ 4,5.

3.2. Effet de l'insuline

Les cellules HepG2 ont été incubées pendant seize heures en présence d'insuline à quatre concentrations différentes (0,002 ; 0,02 ; 0,2 et 2 UI/ml). L'expérience a été répétée deux fois de manière indépendante. Les valeurs obtenues ont été normalisées par rapport à un contrôle négatif correspondant à une incubation sans insuline. L'ARNm des quatre gènes d'intérêt a été quantifié par RT-PCR en temps réel.

Les résultats (*figure 12*) montrent une augmentation de l'abondance de trois des quatre gènes d'intérêt par rapport au contrôle : l'aldolase, BNIP-3 et l'anhydrase carbonique IX. Cet accroissement augmente avec concentration en insuline pour arriver à des valeurs égales à 1,80 (aldolase), 1,77 (BNIP-3) et 1,94 (CAIX) lorsque les cellules sont stimulées avec 2 UI/ml d'insuline.

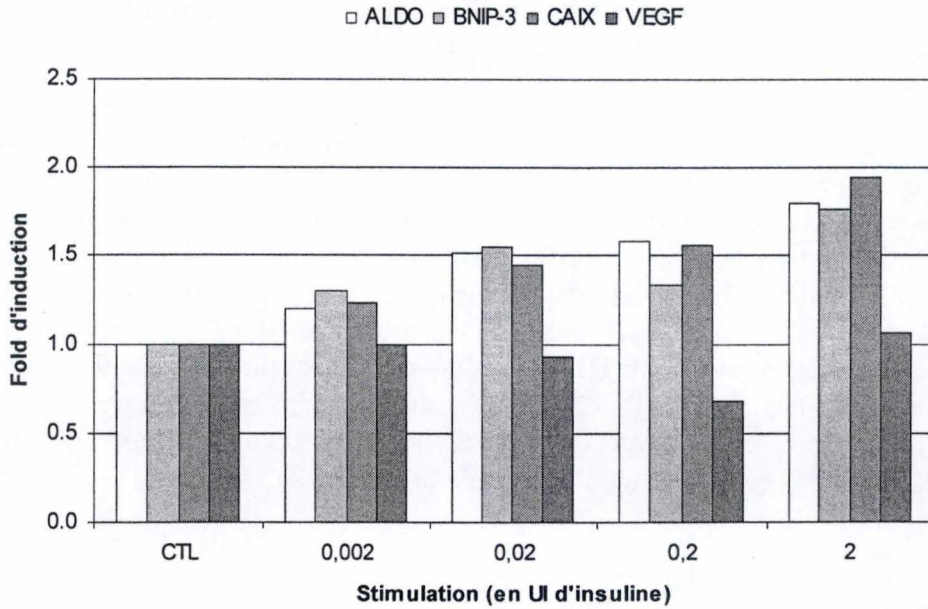


FIGURE 12 : Effet de l'insuline sur l'expression des ARNm de quatre gènes cibles de HIF-1 (Aldolase, BNIP-3, CAIX et VEGF). Les cellules HepG2 ont été incubées en présence de différentes concentrations d'insuline (0 ; 0,002 ; 0,02 ; 0,2 et 2 UI/ml) pendant 16 heures avant qu'une extraction de l'ARN total n'ait été réalisée. Après rétrotranscription, l'expression des ARNm des gènes d'intérêt a été réalisée par PCR en temps réel. Les valeurs sont normalisées à la normoxie.

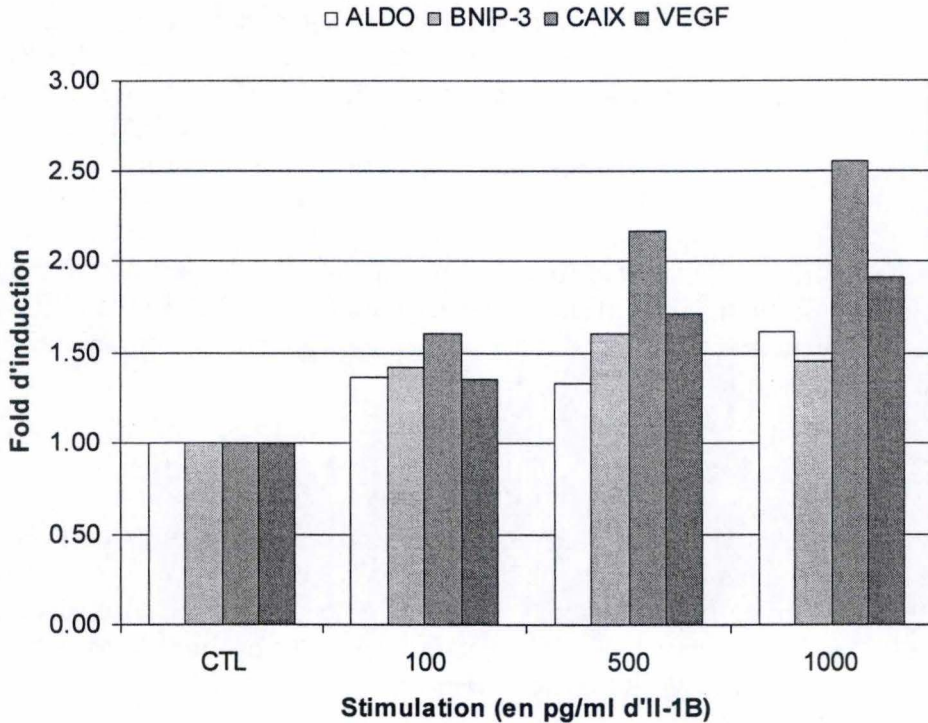


FIGURE 13 : Effet de l'IL-1 β sur l'expression des ARNm de quatre gènes cibles de HIF-1 (Aldolase, BNIP-3, CAIX et VEGF). Les cellules HepG2 ont été incubées en présence de différentes concentrations d'IL-1 β (0, 100, 500 et 1.000 pg/ml) pendant 16 heures avant qu'une extraction de l'ARN total n'ait été réalisée. Après rétrotranscription, l'expression des ARNm des gènes d'intérêt a été réalisée par PCR en temps réel. Les valeurs sont normalisées à la normoxie.

En ce qui concerne le VEGF, nous observons que l'abondance de son ARNm n'augmente pas comme pour les autres gènes. Elle semble au contraire être stable et a même tendance à diminuer à 0,02 et 0,2 UI/ml d'insuline.

3.3. Effet de l'IL-1 β

Enfin, deux expériences indépendantes ont été effectuées pour des cellules HepG2 stimulées pendant 16 heures à trois concentrations différentes d'IL-1 β (100, 500 et 1.000 pg/ml). La quantification des ARNm a été réalisée pour les quatre gènes d'intérêt ainsi que sur le gène de maintenance encodant RPL13A. A l'instar de l'insuline, un contrôle négatif (non-stimulé) a également été réalisé à chaque fois.

Nous observons que dans le cas d'une stimulation avec l'IL-1 β , l'abondance des quatre gènes cibles augmente (*figure 13*). A part pour BNIP-3, l'abondance de l'ARNm des gènes cibles de HIF-1 augmente en fonction de la concentration en IL-1 β . A la concentration maximale (1.000 pg/ml), les valeurs de 'fold d'induction' sont situées entre 1,45 (BNIP-3) et 2,55 (CAIX).

3.4. Discussion

L'hypoxie induit la transcription des quatre gènes cibles de HIF-1 que nous avons choisis d'étudier. Par ailleurs, l'insuline et l'IL-1 β augmentent également l'abondance de l'ARNm de ces mêmes gènes, à l'exception du VEGF en présence d'insuline. Il est à noter que l'augmentation de l'abondance de ces gènes cibles en hypoxie est pour chacun d'eux supérieure aux augmentations que l'on observe dans le cas d'une stimulation avec l'insuline ou l'IL-1 β , même aux concentrations les plus élevées que nous avons testées. Cette constatation est à mettre en parallèle avec l'observation que l'hypoxie induit une abondance de la protéine HIF-1 α plus grande que lors des stimulations avec l'insuline ou l'IL-1 β (voir point 2.3).

Il est également intéressant de constater qu'aux plus fortes concentrations en insuline et en IL-1 β ainsi qu'en hypoxie, c'est l'ARNm de l'anhydrase carbonique IX qui semble être le plus induit par rapport aux conditions contrôles correspondantes.

Lors des stimulations avec l'insuline ou l'IL-1 β , nous avons observé une augmentation de l'abondance de l'ARNm des quatre gènes cibles de HIF-1 hormis un cas particulier discuté ci-après. Les résultats suggèrent qu'après ces stimulations, il s'est formé un facteur de transcription HIF-1 fonctionnel qui aurait servi à transactiver ces gènes.

Le cas du VEGF lors d'une stimulation avec l'insuline n'obéit pas à cette constatation étant donné que l'expression de son ARNm ne change pas. Ceci est une observation intéressante signifiant qu'il existe un effet différentiel lors d'une stimulation avec l'insuline. Dans la mesure où HIF-1 serait actif, il ne ferait pas la même chose s'il était activé par des stimuli différents et plus particulièrement lors d'une stimulation avec l'insuline dans notre cas.

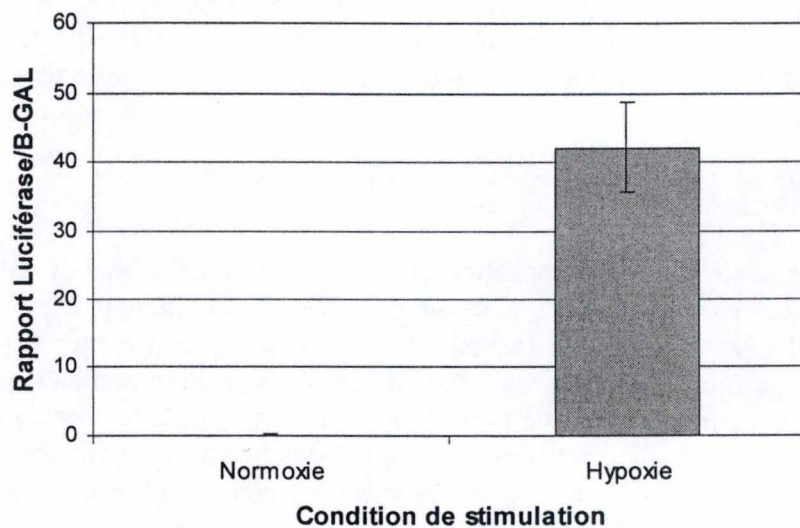


FIGURE 14 : Effet de l'hypoxie sur l'activité transcriptionnelle de HIF-1. Les cellules HepG2 sont transfectées avec le plasmide rapporteur et le plasmide de normalisation avant d'être incubées pendant 24 heures en normoxie ou en hypoxie. Après l'incubation, les activités de la luciférase et de la β -Galactosidase sont mesurées. Les résultats sont exprimés en tant que rapport de l'activité luciférase sur l'activité β -Galactosidase, en tant que moyennes \pm 1 écart-type (n=4).

4. Effet de l'insuline et de l'IL-1 β sur l'activité transcriptionnelle de HIF-1 mesurée par système rapporteur

Les résultats précédents montrent que l'expression des gènes cibles de HIF-1 est augmentée en présence d'insuline ou d'IL-1 β . Ces résultats suggèrent que HIF-1 serait effectivement transcriptionnellement actif dans ces conditions. Nous avons voulu confirmer cette hypothèse en mesurant directement l'activité de HIF-1 à l'aide d'un système rapporteur. Cette approche permet de mesurer l'activité d'une protéine, la luciférase, dont le gène l'encodant est sous le contrôle d'un promoteur possédant uniquement six séquences HRE. Nous pourrions ainsi voir si HIF-1 est actif suite aux stimulations dans les cellules HepG2 et est capable de transactiver un gène placé sous son contrôle. Le gène ainsi que sa séquence promotrice artificielle sont préalablement transfectés dans les cellules sous forme de plasmide avant que ces dernières ne soient stimulées.

4.1. Effet de l'hypoxie

Des cellules HepG2 préalablement transfectées par le plasmide rapporteur ainsi que le plasmide de normalisation ont été incubées en hypoxie pendant 24 heures. L'activité de luciférase a ensuite été mesurée en luminescence. Les valeurs sont rapportées avec les valeurs d'absorbance du substrat de la β -galactosidase, dont l'expression est constitutive car sous le contrôle d'un promoteur fort.

Les résultats représentés graphiquement (*figure 14*) présentent les moyennes des valeurs du rapport de l'activité de la luciférase avec celle de la β -galactosidase obtenues pour les conditions de normoxie et d'hypoxie. Nous observons que la valeur moyenne de ces rapports pour la normoxie est de 0,14. Par comparaison, la valeur obtenue en hypoxie est très élevée et culmine à 42,24. Ces résultats indiquent que le facteur HIF-1 est bien transcriptionnellement actif en hypoxie.

4.2. Effet de l'insuline

La même expérience a été répétée lors de stimulations durant 24 heures avec quatre concentrations différentes d'insuline (0,002 ; 0,02 ; 0,2 et 2 UI/ml). Ces valeurs étaient comparées à un contrôle négatif comprenant des cellules transfectées et incubées dans les mêmes conditions en absence d'insuline.

Les résultats (*figure 15*) montrent une augmentation du rapport de l'activité de la luciférase sur celle de la β -galactosidase pour toutes les conditions stimulées à l'insuline par rapport au contrôle. Ces valeurs présentent en plus une augmentation progressive dépendant de la concentration d'insuline jusqu'à 2 UI/ml où elle atteint 20,65 sauf, lors d'une stimulation avec 0,2 UI/ml d'insuline où cette valeur est étrangement faible (4,74).

4.3. Effet de l'IL-1 β

A l'instar de l'insuline, cette expérience a été également réalisée après 24 heures de stimulation avec cinq concentrations d'IL-1 β différentes (10, 50, 100, 500 et 1.000 pg/ml) et sont comparées à un contrôle négatif (avec des cellules HepG2 non-stimulées).

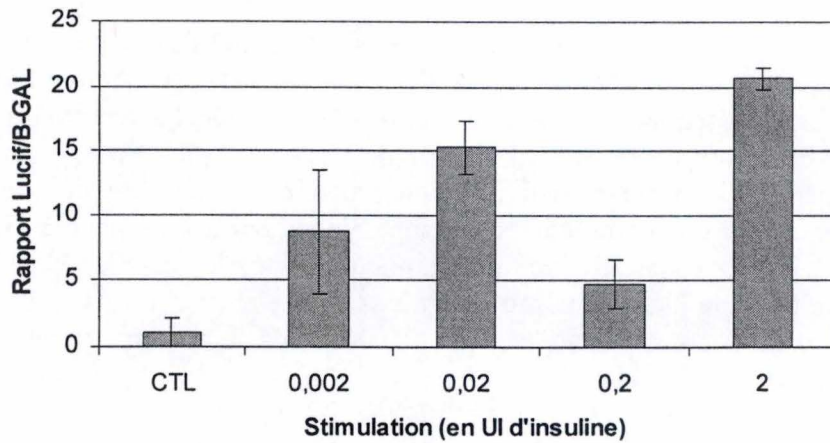


FIGURE 15 : Effet de l'insuline sur l'activité transcriptionnelle de HIF-1. Les cellules HepG2 sont transfectées avec le plasmide rapporteur et le plasmide de normalisation avant d'être incubées pendant 24 heures en présence de différentes concentrations d'insuline (0 ; 0,002 ; 0,02 ; 0,2 et 2 UI/ml). Après l'incubation, les activités de la luciférase et de la β -Galactosidase sont mesurées. Les résultats sont exprimés en tant que rapport de l'activité luciférase sur l'activité β -Galactosidase, en tant que moyennes \pm 1 écart-type (n=4). (CTL) Contrôle négatif

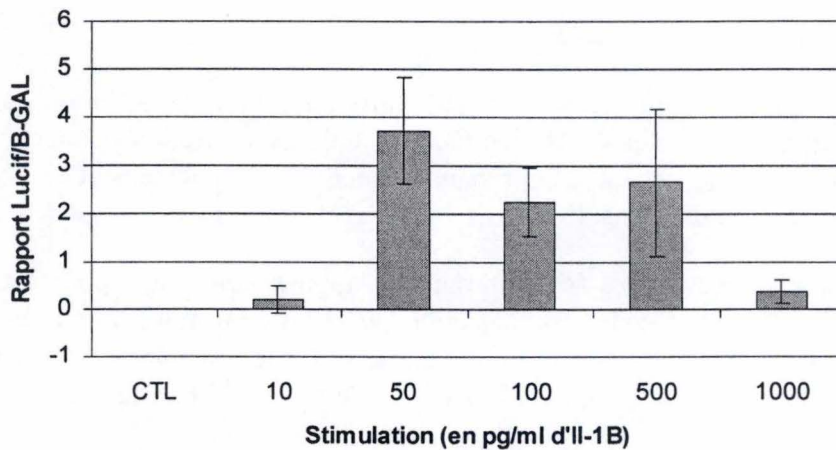


FIGURE 16 : Effet de l'IL-1 β sur l'activité transcriptionnelle de HIF-1. Les cellules HepG2 sont transfectées avec le plasmide rapporteur et le plasmide de normalisation avant d'être incubées pendant 24 heures en présence de différentes concentrations d'IL-1 β (0, 10, 50, 100, 500 et 1.000 pg/ml). Après l'incubation, les activités de la luciférase et de la β -Galactosidase sont mesurées. Les résultats sont exprimés en tant que rapport de l'activité luciférase sur l'activité β -Galactosidase, en tant que moyennes \pm 1 écart-type (n=4). (CTL) Contrôle négatif

Les résultats obtenus (*figure 16*) montrent qu'à faible concentration d'IL-1 β (10 pg/ml), cette cytokine ne possède pas d'effet sur l'activité transcriptionnelle de HIF-1 car les valeurs du rapport de l'activité de la luciférase sur celle de la β -galactosidase à cette condition (0,20) sont proches des valeurs contrôle (0). Par contre, aux concentrations intermédiaires, soit entre 50 et 500 pg/ml d'IL-1 β , nous observons un effet plateau de l'activité transcriptionnelle de HIF-1 dont les valeurs du rapport de l'activité de la luciférase sur celle de la β -galactosidase sont proche de 3. A plus forte concentration, la valeur de ce rapport est plus faible (0,35). Nous supposons que 1.000 pg/ml d'IL-1 β est une concentration trop forte pour les cellules car nous avons également constaté une diminution de l'abondance protéique de HIF-1 α par Western Blot à cette concentration (voir point 2.2.2).

4.4. Discussion

Lors de stimulations avec l'insuline ou l'IL-1 β , nous constatons une augmentation de l'activité transcriptionnelle de HIF-1. Cet effet est détecté jusqu'au moins 2 UI/ml d'insuline et jusqu'à 500 pg/ml d'IL-1 β .

Cependant, nous constatons que l'activité transcriptionnelle de HIF-1 lors de stimulations en normoxie avec l'insuline ou l'IL-1 β reste plus faible en comparaison avec celle observée en hypoxie. De nouveau, ces résultats sont à mettre en parallèle avec les observations montrant une abondance protéique de HIF-1 (voir point 2.3) et une expression de ses quatre gènes cibles (voir point 3.4) nettement plus forte en hypoxie.

5. Etude de la liaison de HIF-1 dans un environnement natif

Alors que nous avons observé que les ARNm de certains gènes cibles de HIF-1 sont induits lors des stimulations avec l'insuline ou l'IL-1 β , que la sous-unité alpha de ce facteur de transcription est présente dans le noyau lors de ces mêmes stimulations et que, en parallèle, HIF-1 était transcriptionnellement actif (résultats obtenus à l'aide du système rapporteur), nous ne pouvons cependant pas déterminer un lien de cause à effet direct entre ces deux phénomènes. L'augmentation de l'abondance de la protéine HIF-1 α ne représente sans doute qu'une partie de la réponse cellulaire à des stimulations avec l'insuline ou l'IL-1 β . De même, HIF-1 ne doit pas être le seul facteur de transcription capable d'induire la transcription des gènes de l'aldolase, de BNIP-3, de CAIX ou du VEGF.

La suite de notre travail a pour but de montrer que HIF-1 est présent sur le promoteur des gènes dont nous observons une augmentation de leur expression dans les différentes conditions. Pour cela, nous utiliserons la technique d'immunoprécipitation chromatinienne (ChIP).

Nous avons donc décidé d'étudier la fréquence de liaison du facteur de transcription HIF-1 suite à différentes stimulations (hypoxie, insuline ou IL-1 β) sur les séquences HRE présents dans les promoteurs de trois des gènes cibles étudiés auparavant : l'aldolase, CAIX et le VEGF.

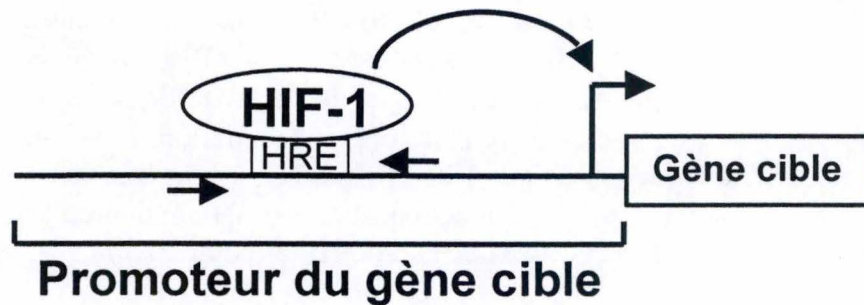


FIGURE 17 : Représentation schématique des sites de localisation de chaque couple d'amorces sur le promoteur de chacun des gènes cibles de HIF-1. Les flèches droites s'opposant au niveau de la séquence HRE représentent le couple d'amorce. Comme l'environnement des séquences HRE diffère selon le promoteur du gène cible étudié, les couples d'amorce sont également différents et permettent de sélectionner et d'amplifier la séquence présente dans le seul promoteur d'intérêt.

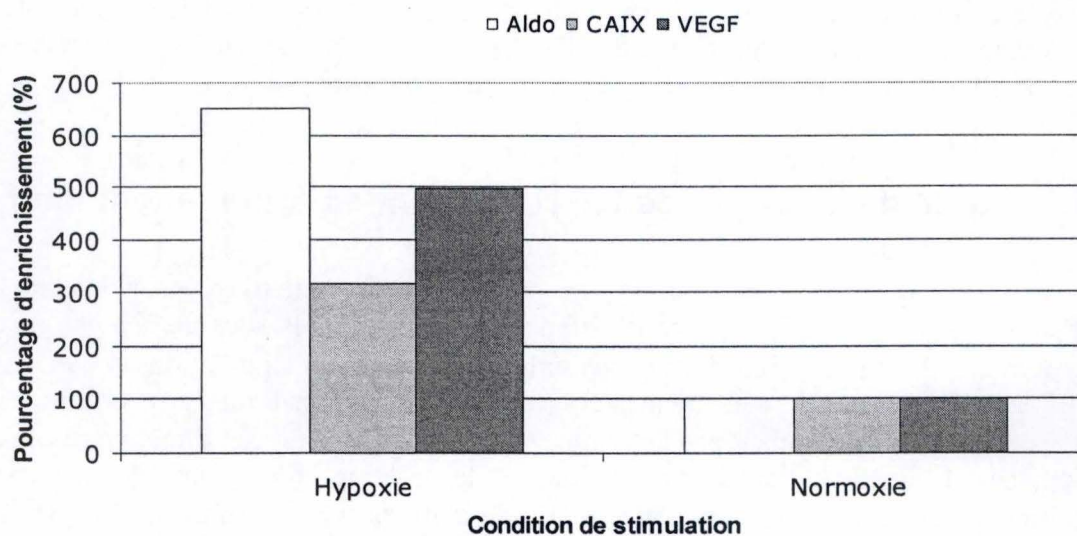


FIGURE 18 : Effet de l'hypoxie sur la liaison de HIF-1 sur la séquence HRE de trois gènes cibles de HIF-1. Après une incubation de 6 heures en hypoxie ou en normoxie, une immunoprécipitation de chromatine a été réalisée à l'aide d'anticorps anti-HIF-1 α . Le pourcentage d'enrichissement a ensuite été calculé comme expliqué dans le texte.

5.1. Caractérisation de la liaison HIF-1/HRE en hypoxie

L'ADN de cellules HepG2 stimulées durant 6 heures en hypoxie après 'crosslinking' et fragmentation est immunoprécipité à l'aide d'anticorps anti-HIF-1 α . Une autre immunoprécipitation avec des IgG de lapins non-spécifiques a été réalisée en parallèle. Nous avons réalisé la même expérience pour une condition de normoxie à laquelle les valeurs obtenues pour l'hypoxie seront comparées. Après la purification de l'ADN immunosélectionné, une PCR en temps réel a été effectuée sur les échantillons. Nous avons amplifié la séquence HRE présente dans le promoteur des trois gènes cibles d'intérêt avec des paires d'amorces caractéristiques de ces séquences (*figure 17*). Comme l'ADN a été précédemment immunosélectionné, le nombre de ces séquences présentes dans les échantillons est directement proportionnel à la quantité de facteur de transcription HIF-1 lié à celle-ci. En plus d'un couple d'amorces pour chaque HRE des gènes cibles, un couple d'amorces spécifiques à l'exon 2 de la myoglobine est également utilisé afin de déterminer la quantité d'ADN récupéré de manière non-spécifique.

Nous pouvons caractériser la proportion de HIF-1 lié aux HRE des gènes cibles en calculant tout d'abord le pourcentage par rapport à l'input de chaque gène cible. Celui-ci représente la purification des séquences HRE sélectionnées par rapport à l'échantillon input constitué des fragments d'ADN totaux non immunosélectionnés. Il peut être calculé par la formule suivante :

$$\text{Pourcentage d'input} = EA^{(\text{CT input} - \text{CT HIF-1})} \times 100$$

EA représente l'efficacité d'amplification et peut être calculé à partir des valeurs de CT obtenue lors de dilutions sériées d'un échantillon input. Ce calcul est effectué pour chaque gène cible et pour l'exon 2 de la myoglobine. Ensuite, ces valeurs sont rapportées sur la valeur de l'exon 2 de la myoglobine afin de dissocier les valeurs avec le bruit de fond. Ce dernier est représenté par l'exon 2 de la myoglobine car il n'est pas sensé avoir été immunosélectionné lors de l'expérience. Finalement, les valeurs sont normalisées par rapport au contrôle négatif, dans ce cas la normoxie.

Les résultats obtenus (*figure 18*) montrent qu'en hypoxie, nous observons effectivement une augmentation de la liaison de HIF-1 à la séquence HRE présente dans le promoteur des 3 gènes d'intérêt. Nous constatons un enrichissement de la liaison de HIF-1 sur les séquences HRE des gènes de l'aldolase, du CAIX et du VEGF de respectivement 651%, 316% et 497% par rapport au contrôle normoxique.

5.2. Caractérisation de la liaison HIF-1/HRE après stimulation avec l'insuline

Nous avons choisi de stimuler pendant 6 heures des cellules HepG2 avec 2 UI/ml d'insuline. Cette concentration a été choisie en fonction des résultats obtenus lors des précédentes expériences visant à quantifier l'abondance des ARNm des gènes cibles de HIF-1 (voir point 3.2) et à déterminer l'activité transcriptionnelle de HIF-1 à l'aide d'un système rapporteur (voir point 4.2). Les valeurs de pourcentage d'input des séquences HRE de chaque gène ont été rapportées à celle de l'exon 2 de la myoglobine puis ont été normalisées au contrôle négatif (sans stimulation).

La valeur du pourcentage d'enrichissement pour chacun des gènes d'intérêt (*figure 19*) montre qu'après une stimulation avec l'insuline, nous observons une augmentation de la fré-

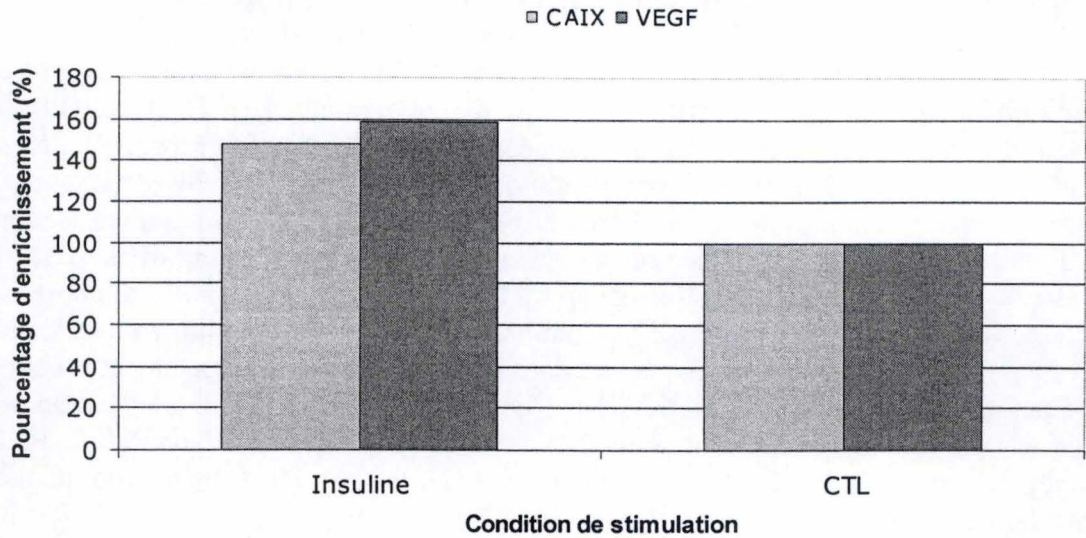


FIGURE 19 : Effet de l'insuline sur la liaison de HIF-1 sur la séquence HRE de deux gènes cibles de HIF-1. Après une incubation de 6 heures avec 2 UI/ml d'insuline et avec un contrôle négatif, une immunoprécipitation de chromatine a été réalisée à l'aide d'anticorps anti-HIF-1 α . Le pourcentage d'enrichissement a ensuite été calculé comme expliqué dans le texte.
(CTL) Contrôle négatif

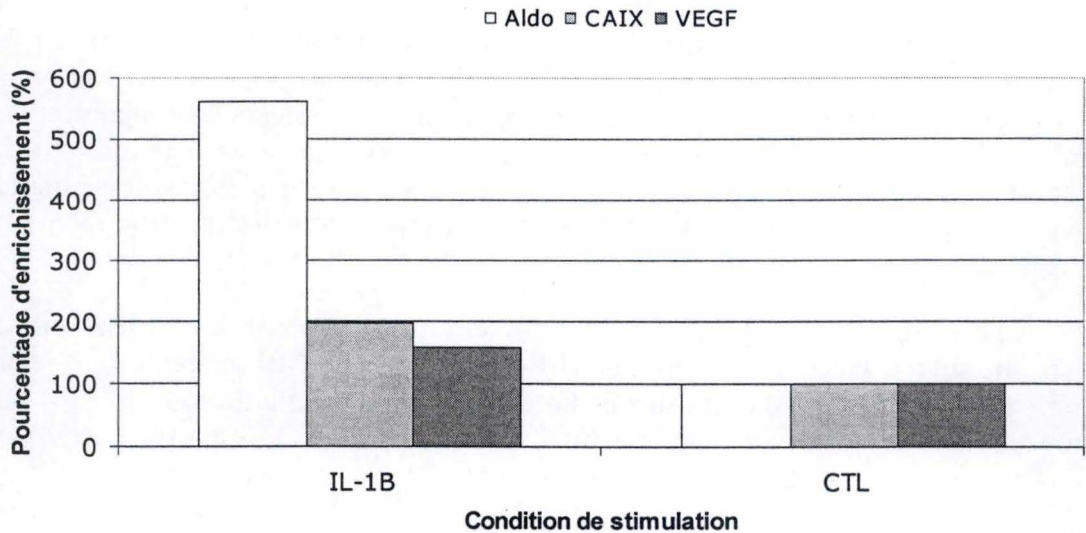


FIGURE 20 : Effet de l'IL-1 β sur la liaison de HIF-1 sur la séquence HRE de deux gènes cibles de HIF-1. Après une incubation de 6 heures avec 500 pg/ml d'IL-1 β et avec un contrôle négatif, une immunoprécipitation de chromatine a été réalisée à l'aide d'anticorps anti-HIF-1 α . Le pourcentage d'enrichissement a ensuite été calculé comme expliqué dans le texte.
(CTL) Contrôle négatif

quence de liaison entre HIF-1 et la séquence HRE présente dans le promoteur du VEGF (159% par rapport au contrôle négatif). Il en est de même pour la fréquence de liaison avec la séquence HRE présente dans le promoteur de l'anhydrase carbonique pour laquelle nous obtenons une valeur pour le pourcentage d'enrichissement dans la même gamme de valeurs (148%). L'échantillon pour l'aldolase a malheureusement été perdu.

5.3. Caractérisation de la liaison HIF-1/HRE après stimulation avec l'IL-1 β

De façon similaire à l'expérience précédente, nous avons effectué une immunoprécipitation de chromatine sur des cellules HepG2 stimulées pendant 6 heures avec 500 pg/ml d'IL-1 β . Cette concentration a été choisie en fonction des résultats obtenus lors des précédentes expériences visant à quantifier l'abondance des ARNm des gènes cibles de HIF-1 (voir point 3.3) et à déterminer l'activité transcriptionnelle de HIF-1 à l'aide d'un système rapporteur (voir point 4.3). Encore une fois, la PCR en temps réel a été effectuée sur les séquences HRE présentes dans le promoteur des trois gènes d'intérêt et sur l'exon 2 de la myoglobine.

Les pourcentages d'enrichissement obtenus lors de cette stimulation avec l'IL-1 β (*figure 20*) montrent une augmentation de la liaison de HIF-1 sur la séquence HRE présente dans chacun des gènes cibles. Alors que les valeurs d'enrichissement de la liaison de HIF-1 sur les séquences HRE des gènes de l'anhydrase carbonique et du VEGF sont situées entre 150 et 200% (respectivement 197% et 158%), celle de l'aldolase monte à 561% par rapport au contrôle non stimulé.

5.4. Discussion

Concernant la stimulation hypoxique, nous constatons que HIF-1 est bien lié aux séquences HRE présentes dans les promoteurs des gènes cibles car nous observons une augmentation du pourcentage d'enrichissement entre l'hypoxie et la normoxie. Cet effet est également observé dans les cas de stimulations non-hypoxiques, avec l'insuline et l'IL-1 β . En effet, pour celles-ci, les valeurs d'enrichissement sont plus grandes comparées au contrôle négatif.

Constatons également que c'est la stimulation hypoxique qui, dans tous les cas, présente la plus grande quantité de HIF-1 lié à sa séquence HRE. Ce fait est à mettre en parallèle avec les observations effectuées précédemment où tant les valeurs d'abondance de HIF-1 α que celles de l'expression des ARNm des gènes cibles de HIF-1 ou encore de son activité transcriptionnelle étaient toujours plus élevées en hypoxie par rapport aux stimulations non-hypoxiques.

**CONCLUSION ET
PERSPECTIVES**

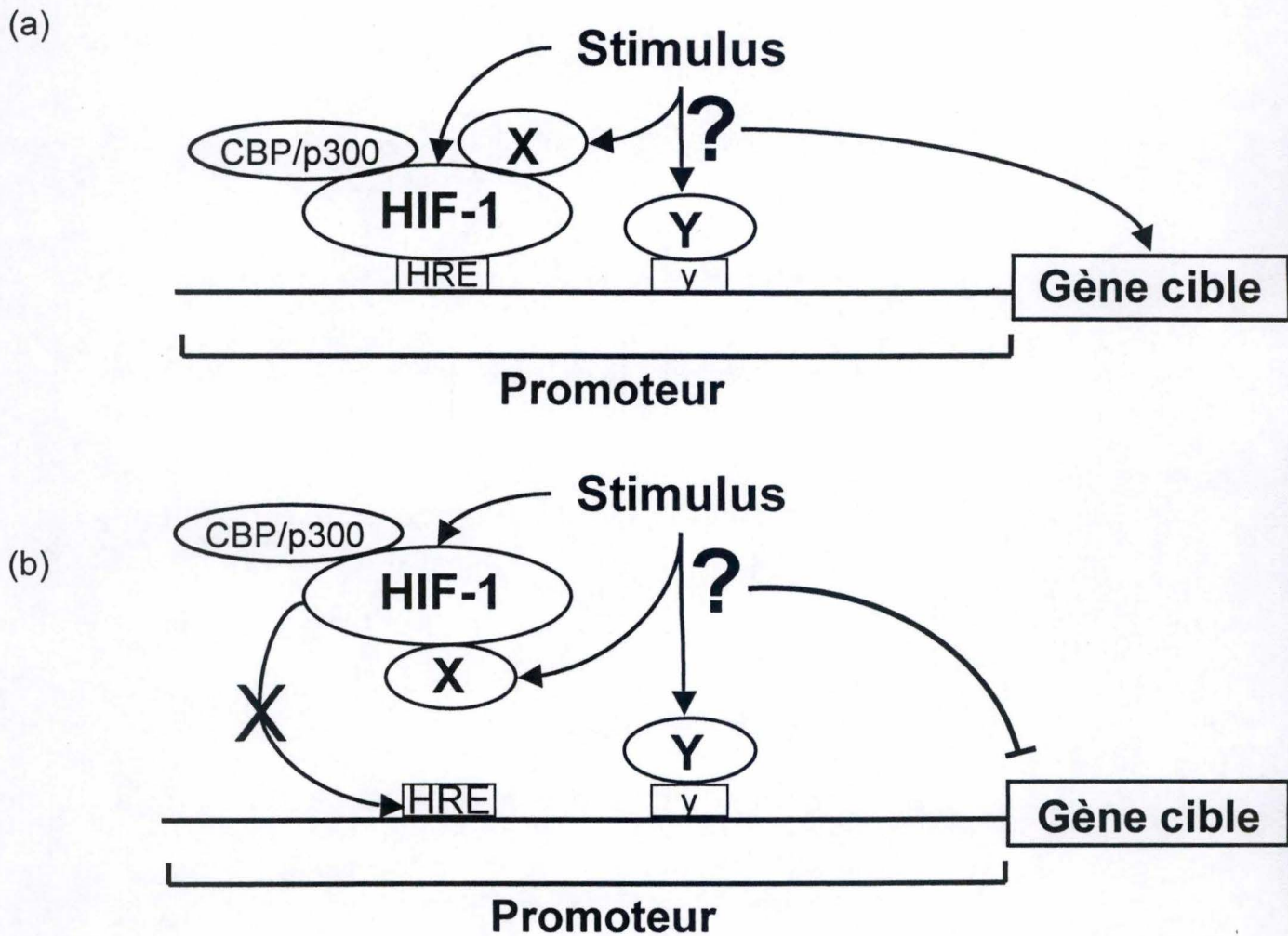


FIGURE 1 : Représentation schématique des deux principales hypothèses pouvant expliquer l'existence d'une réponse différentielle dans l'expression des gènes cibles de HIF-1. (a) Le stimulus provoquant l'activation de HIF-1 active des co-facteurs venant se lier à HIF-1 (X) ou d'autres facteurs de transcription (Y) se liant sur des séquences sur le promoteur (y). Ces facteurs peuvent favoriser l'activité de HIF-1 et le taux de transcription du gène cible correspondant à ce promoteur. (b) Comme pour (a), le stimulus provoquant l'activation de HIF-1 peut également activer différents facteurs. Ceux-ci empêcheraient cependant HIF-1 de se lier sur la séquence HRE. HIF-1 ne pourra pas transactiver l'expression du gène cible présent en aval de ce promoteur.

Le facteur de transcription HIF-1 est considéré comme un acteur essentiel dans la réponse cellulaire à l'hypoxie. Depuis sa découverte, HIF-1 est étudié par beaucoup d'équipes scientifiques car il joue également un rôle central dans de nombreux cancers. La compréhension de l'ensemble des mécanismes qui lui sont liés est donc importante dans le cadre plus général de la lutte contre le cancer.

A la fin du siècle dernier, la communauté scientifique a découvert que HIF-1 n'était pas seulement un facteur de transcription activé pendant l'hypoxie et aujourd'hui, nous savons qu'il existe beaucoup d'autres stimuli pouvant mener à l'augmentation de son activité transcriptionnelle. Ces stimuli sont relativement nombreux et de nature variée. Ainsi, nous savons par exemple que l'IGF (*Feldser, Agani et al., 1999*), le TNF- α (*Hellwig-Burgel, Rutkowski et al., 1999*) ou l'IL-1 β (*Stiehl, Jelkmann et al., 2002*) sont des protéines pouvant entraîner l'activation de HIF-1. Certaines molécules organiques peuvent également jouer un rôle dans cette activation comme c'est le cas des ROS (*Haddad, 2002 ; Biswas, Gupta et al., 2007*) ou du NO (*Sogawa, Numayama-Tsuruta et al., 1998*).

Alors que les mécanismes d'activation de HIF-1 étaient connus en hypoxie, la découverte d'une activation non-hypoxique remettait en question ces mécanismes. Aujourd'hui, nous savons que ceux-ci diffèrent selon le stimulus et implique deux voies principales : la cascade des MAPK qui régule l'activité transcriptionnelle de HIF-1 et la voie de transduction du signal PI3K/AKT qui conduit à une augmentation de la traduction de la protéine HIF-1 α (*Hopfl, Ogunshola et al., 2004*).

Malgré ces découvertes, le rôle joué par HIF-1 au cours de ces différentes stimulations reste incompris. Par exemple, en fonction de l'ensemble des gènes surexprimés par HIF-1 lorsqu'il est activé par les cytokines ou les facteurs de croissance, en fonction de la nature de ceux-ci et de l'intensité avec laquelle ils sont surexprimés, les conséquences en termes de survie et de régulation métabolique peuvent être largement différentes. De plus, d'autres facteurs de transcription sont également activés par ces stimuli, facteurs qui peuvent moduler l'activité de HIF-1. A ce niveau, si nous savons que HIF-1 est transcriptionnellement actif, nous pouvons poser deux hypothèses pouvant expliquer comment l'activité de HIF-1 pourrait être modulée. Soit, HIF-1 est formé, se lie sur la séquence HRE des promoteurs de ses gènes cibles mais, d'autres facteurs de transcription ou co-facteurs peuvent également être activés selon la condition de stimulation. Ces éléments non-identifiés pourraient agir en synergie avec HIF-1 afin d'augmenter ou de diminuer l'activité de HIF-1 (*figure 1.a*). Par exemple, une étude a montré que l'expression de la CAIX dépendait fortement d'un autre facteur de transcription : SP-1 (*Kaluz, Kaluzova et al., 2003*). Soit, d'autres facteurs présents dans l'environnement des promoteurs de gènes cibles de HIF-1 et également induits selon la condition de stimulation viendraient interagir avec HIF-1 empêchant ce dernier de se lier sur les séquences HRE, par encombrement stérique par exemple (*figure 1.b*). Cette dernière hypothèse provoquerait alors la suppression de l'activité transcriptionnelle de HIF-1.

Le travail présenté ici s'inscrit dans le cadre de la recherche de réponses différentielles du facteur de transcription HIF-1 après différentes stimulations. Ainsi, les objectifs de notre travail étaient doubles :

Une première approche consistait à caractériser la réponse cellulaire au niveau de l'activation de HIF-1 suite à une stimulation avec l'IGF dans différents types cellulaires. Nous avons montré que l'induction de la sous-unité alpha de HIF-1 avec l'IGF était différente selon le type cellulaire. En effet, bien que chaque lignée était capable de percevoir le signal dû à l'IGF et d'exprimer HIF-1 α en hypoxie, une seule lignée cellulaire a montré une

		Fold d'induction des ARNm	Pourcentage d'enrichissement
Hypoxie	<i>Aldolase</i>	1.88	651%
	<i>CAIX</i>	4.43	346%
	<i>VEGF</i>	2.05	497%
Insuline (2 UI/ml)	<i>Aldolase</i>	1.8	-
	<i>CAIX</i>	1.94	148%
	<i>VEGF</i>	1.06	159%
IL-1β (500 pg/ml)	<i>Aldolase</i>	1.33	561%
	<i>CAIX</i>	2.17	197%
	<i>VEGF</i>	1.72	158%

Tableau 1 : Tableau comparatif des 'fold d'induction' des transcrits d'ARNm et des pourcentages d'enrichissement de la liaison de HIF-1 sur les séquences HRE présente dans le promoteur de chacun des gènes étudiés et pour chaque condition de stimulation.

augmentation de l'abondance de HIF-1 α ; il s'agit des cellules HepG2. Il serait maintenant intéressant de montrer à quel niveau, entre la liaison de l'IGF sur son récepteur et l'hypothétique augmentation de l'abondance de HIF-1 α , le signal a été interrompu.

La deuxième partie de notre étude consistait à étudier s'il existait une réponse différentielle entre différents stimuli non-hypoxiques (l'insuline et l'IL-1 β) et l'hypoxie dans un même type cellulaire. Nous avons montré que HIF-1 α était induit dans ces différentes conditions. Nous observons également un effet positif sur l'abondance des transcrits de gènes cibles de HIF-1 lors de ces stimulations sauf dans le cas de l'ARNm du VEGF lors d'une stimulation avec l'insuline où nous n'observons pas de changements de l'abondance. Nous avons ensuite montré que HIF-1 était transcriptionnellement actif après les différentes stimulations par un système rapporteur. D'une manière générale, nous avons constaté que, dans chaque cas, l'hypoxie menait à la plus forte augmentation de l'abondance de HIF-1 α , de l'expression des gènes cibles et de l'activité transcriptionnelle de HIF-1 par rapport aux stimulations normoxiques. Il ne s'agit pas ici d'une réponse différentielle à proprement parler. Cet effet est dû aux deux modes d'induction de HIF-1 dans les cellules par hypoxie et lors des stimulations normoxiques : l'hypoxie empêche la dégradation de la protéine alors que l'insuline et l'IL-1 β augmentent sa traduction, saturant le système de dégradation mais ne l'inhibant pas.

Afin de quantifier la présence du facteur sur le promoteur des gènes étudiés, nous avons utilisé la technique d'immunoprécipitation de chromatine. Ces expériences avaient pour but de vérifier si HIF-1 était bien impliqué dans l'augmentation de l'expression de ces gènes. Les résultats montrent que l'hypoxie ainsi que l'insuline et l'IL-1 β sont capables d'induire le recrutement de HIF-1 sur les séquences HRE présentes dans le promoteur des trois gènes étudiés. Le *tableau 1* compare les valeurs de 'fold d'induction' des transcrits d'ARNm aux valeurs de pourcentage d'enrichissement obtenues pour caractériser la fréquence de liaison de HIF-1 sur les séquences de HRE pour chaque gène et pour chaque condition. Il ne semble pas exister de rapport direct entre la fréquence de liaison de HIF-1 et la quantité d'ARNm transcrits pour un gène donné.

Entre la transcription d'un gène et son expression sous forme protéique, il existe plusieurs étapes intermédiaires. La régulation de la maturation et de la traduction des ARNm peut entraîner des différences d'abondance entre le transcrit et la protéine bien que ce soit des événements moins fréquents. Il serait dès lors utile, afin de compléter cette étude de quantifier l'abondance protéique du VEGF ou de l'aldolase par exemple.

De plus, dans la continuité de ce travail, nous observons une liaison de HIF-1 sur la séquence HRE du promoteur du VEGF lors d'une stimulation avec l'insuline alors que l'expression de son ARNm n'augmente pas dans ces conditions. Nous pouvons supposer que c'est la première hypothèse (*figure 1.a*) qui est observée dans ce cas. Des expériences complémentaires sont nécessaires afin de confirmer cette observation. A plus long terme, il serait intéressant d'analyser une plus large gamme de gènes cibles de HIF-1, tant au niveau de l'abondance de leur transcrit que de la liaison de HIF-1 sur les séquences HRE de leurs promoteurs. Il existe plus d'une centaine de gènes sous le contrôle transcriptionnel de HIF-1 et n'étudier que quatre de ceux-ci n'est pas très représentatif de l'ensemble des réponses différentielles que peut induire HIF-1. Finalement, l'identité des protéines modulant positivement ou négativement la liaison de HIF-1 aux différents promoteurs pourrait être étudiée.

BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie

- Bilton, R. L. and G. W. Booker, The subtle side to hypoxia inducible factor (HIF α) regulation, *Eur J Biochem* **270** (5), 791-8 (2003).
- Biswas, S., M. K. Gupta, et al., Insulin-induced activation of hypoxia-inducible factor-1 requires generation of reactive oxygen species by NADPH oxidase, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **292** (2), H758-66 (2007).
- Bruick, R. K. and S. L. McKnight, A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF, *Science* **294** (5545), 1337-40 (2001).
- Callapina, M., J. Zhou, et al., NO restores HIF-1 α hydroxylation during hypoxia: role of reactive oxygen species, *Free Radic Biol Med* **39** (7), 925-36 (2005).
- Choi, K. S., M. K. Bae, et al., Hypoxia-induced angiogenesis during carcinogenesis, *J Biochem Mol Biol* **36** (1), 120-7 (2003).
- Connolly, E., S. Braunstein, et al., Hypoxia inhibits protein synthesis through a 4E-BP1 and elongation factor 2 kinase pathway controlled by mTOR and uncoupled in breast cancer cells, *Mol Cell Biol* **26** (10), 3955-65 (2006).
- Cormier, P., Facteurs de traduction : du contrôle de la synthèse des protéines au cycle cellulaire et à la tumorigenèse, *médecine/sciences* **16**, 378-85 (2000).
- Damert, A., E. Ikeda, et al., Activator-protein-1 binding potentiates the hypoxia-inducible factor-1-mediated hypoxia-induced transcriptional activation of vascular endothelial growth factor expression in C6 glioma cells, *Biochem J* **327** (Pt 2), 419-23 (1997).
- Dery, M. A., M. D. Michaud, et al., Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators, *Int J Biochem Cell Biol* **37** (3), 535-40 (2005).
- Dufourny, B., J. Alblas, et al., Mitogenic signaling of insulin-like growth factor I in MCF-7 human breast cancer cells requires phosphatidylinositol 3-kinase and is independent of mitogen-activated protein kinase, *J Biol Chem* **272** (49), 31163-71 (1997).
- Ebert, B. L. and H. F. Bunn, Regulation of transcription by hypoxia requires a multiprotein complex that includes hypoxia-inducible factor 1, an adjacent transcription factor, and p300/CREB binding protein, *Mol Cell Biol* **18** (7), 4089-96 (1998).
- Feldser, D., F. Agani, et al., Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1 α and insulin-like growth factor 2, *Cancer Res* **59** (16), 3915-8 (1999).
- Fillies, T., R. Werkmeister, et al., HIF1- α overexpression indicates a good prognosis in early stage squamous cell carcinomas of the oral floor, *BMC Cancer* **5**, 84 (2005).
- Fukuda, R., K. Hirota, et al., Insulin-like growth factor 1 induces hypoxia-inducible factor 1-mediated vascular endothelial growth factor expression, which is dependent on MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling in colon cancer cells, *J Biol Chem* **277** (41), 38205-11 (2002).
- Genius, J. and J. Fandrey, Nitric oxide affects the production of reactive oxygen species in hepatoma cells: implications for the process of oxygen sensing, *Free Radic Biol Med* **29** (6), 515-21 (2000).
- Haddad, J. J., Recombinant human interleukin (IL)-1 β -mediated regulation of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) stabilization, nuclear translocation and activation requires an antioxidant/reactive oxygen species (ROS)-sensitive mechanism, *Eur Cytokine Netw* **13** (2), 250-60 (2002).
- Hellwig-Burgel, T., K. Rutkowski, et al., Interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1, *Blood* **94** (5), 1561-7 (1999).

- Hockel, M. and P. Vaupel, Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects, *J Natl Cancer Inst* **93** (4), 266-76 (2001).
- Holmgren, L., M. S. O'Reilly, et al., Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression, *Nat Med* **1** (2), 149-53 (1995).
- Hopfl, G., O. Ogunshola, et al., HIFs and tumors--causes and consequences, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **286** (4), R608-23 (2004).
- Huang, L. E., J. Gu, et al., Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway, *Proc Natl Acad Sci U S A* **95** (14), 7987-92 (1998).
- Jenkins, P. J. and S. A. Bustin, Evidence for a link between IGF-I and cancer, *Eur J Endocrinol* **151 Suppl 1**, S17-22 (2004).
- Jung, Y. J., J. S. Isaacs, et al., IL-1beta-mediated up-regulation of HIF-1alpha via an NFkappaB/COX-2 pathway identifies HIF-1 as a critical link between inflammation and oncogenesis, *Faseb J* **17** (14), 2115-7 (2003).
- Kaelin, W. G., Jr., The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene and kidney cancer, *Clin Cancer Res* **10** (18 Pt 2), 6290S-5S (2004).
- Kaluz, S., M. Kaluzova, et al., Expression of the hypoxia marker carbonic anhydrase IX is critically dependent on SP1 activity. Identification of a novel type of hypoxia-responsive enhancer, *Cancer Res* **63** (5), 917-22 (2003).
- Kamura, T., S. Sato, et al., Activation of HIF1alpha ubiquitination by a reconstituted von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor complex, *Proc Natl Acad Sci U S A* **97** (19), 10430-5 (2000).
- Lancaster, D. E., M. A. McDonough, et al., Factor inhibiting hypoxia-inducible factor (FIH) and other asparaginyl hydroxylases, *Biochem Soc Trans* **32** (Pt 6), 943-5 (2004).
- Lang, K. J., A. Kappel, et al., Hypoxia-inducible factor-1alpha mRNA contains an internal ribosome entry site that allows efficient translation during normoxia and hypoxia, *Mol Biol Cell* **13** (5), 1792-801 (2002).
- Lee, J. W., S. H. Bae, et al., Hypoxia-inducible factor (HIF-1)alpha: its protein stability and biological functions, *Exp Mol Med* **36** (1), 1-12 (2004).
- Leung, M. K., T. Jones, et al., Molecular cloning and chromosomal localization of the human CITED2 gene encoding p35srj/Mrg1, *Genomics* **61** (3), 307-13 (1999).
- Lopez-Lastra, M., A. Rivas, et al., Protein synthesis in eukaryotes: the growing biological relevance of cap-independent translation initiation, *Biol Res* **38** (2-3), 121-46 (2005).
- Mabjeesh, N. J. and S. Amir, Hypoxia-inducible factor (HIF) in human tumorigenesis, *Histol Histopathol* **22** (5), 559-72 (2007).
- Miller, F., A. Kentsis, et al., Inactivation of VHL by tumorigenic mutations that disrupt dynamic coupling of the pVHL.hypoxia-inducible transcription factor-1alpha complex, *J Biol Chem* **280** (9), 7985-96 (2005).
- Minet, E., T. Arnould, et al., ERK activation upon hypoxia: involvement in HIF-1 activation, *FEBS Lett* **468** (1), 53-8 (2000).
- Oates, A. J., L. M. Schumaker, et al., The mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor 2 receptor (M6P/IGF2R), a putative breast tumor suppressor gene, *Breast Cancer Res Treat* **47** (3), 269-81 (1998).
- Page, E. L., G. A. Robitaille, et al., Induction of hypoxia-inducible factor-1alpha by transcriptional and translational mechanisms, *J Biol Chem* **277** (50), 48403-9 (2002).
- Peet, D. and S. Linke, Regulation of HIF: asparaginyl hydroxylation, *Novartis Found Symp* **272**, 37-49; discussion 49-53, 131-40 (2006).
- Pouyssegur, J., F. Dayan, et al., Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression, *Nature* **441** (7092), 437-43 (2006).

- Qian, D., H. Y. Lin, et al., Normoxic induction of the hypoxic-inducible factor-1 alpha by interleukin-1 beta involves the extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway in normal human cytotrophoblast cells, *Biol Reprod* **70** (6), 1822-7 (2004).
- Ruas, J. L. and L. Poellinger, Hypoxia-dependent activation of HIF into a transcriptional regulator, *Semin Cell Dev Biol* **16** (4-5), 514-22 (2005).
- Saijo, Y., M. Tanaka, et al., Proinflammatory cytokine IL-1 beta promotes tumor growth of Lewis lung carcinoma by induction of angiogenic factors: in vivo analysis of tumor-stromal interaction, *J Immunol* **169** (1), 469-75 (2002).
- Semenza, G. L. and G. L. Wang, A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation, *Mol Cell Biol* **12** (12), 5447-54 (1992).
- Sepp-Lorenzino, L., Structure and function of the insulin-like growth factor I receptor, *Breast Cancer Res Treat* **47** (3), 235-53 (1998).
- Shibaji, T., M. Nagao, et al., Prognostic significance of HIF-1 alpha overexpression in human pancreatic cancer, *Anticancer Res* **23** (6C), 4721-7 (2003).
- Sogawa, K., K. Numayama-Tsuruta, et al., Inhibition of hypoxia-inducible factor 1 activity by nitric oxide donors in hypoxia, *Proc Natl Acad Sci U S A* **95** (13), 7368-73 (1998).
- Stiehl, D. P., W. Jelkmann, et al., Normoxic induction of the hypoxia-inducible factor 1alpha by insulin and interleukin-1beta involves the phosphatidylinositol 3-kinase pathway, *FEBS Lett* **512** (1-3), 157-62 (2002).
- Stoeltzing, O., M. F. McCarty, et al., Role of hypoxia-inducible factor 1alpha in gastric cancer cell growth, angiogenesis, and vessel maturation, *J Natl Cancer Inst* **96** (12), 946-56 (2004).
- Stolze, I. P., D. R. Mole, et al., Regulation of HIF: prolyl hydroxylases, *Novartis Found Symp* **272**, 15-25; discussion 25-36 (2006).
- Stroka, D. M., T. Burkhardt, et al., HIF-1 is expressed in normoxic tissue and displays an organ-specific regulation under systemic hypoxia, *Faseb J* **15** (13), 2445-53 (2001).
- Treins, C., S. Giorgetti-Peraldi, et al., Regulation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 activity and expression of HIF hydroxylases in response to insulin-like growth factor I, *Mol Endocrinol* **19** (5), 1304-17 (2005).
- Voronov, E., D. S. Shouval, et al., IL-1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis, *Proc Natl Acad Sci U S A* **100** (5), 2645-50 (2003).
- Wang, G. L. and G. L. Semenza, General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia, *Proc Natl Acad Sci U S A* **90** (9), 4304-8 (1993).
- Wang, L., W. Ma, et al., Insulin-like growth factor I modulates induction of apoptotic signaling in H9C2 cardiac muscle cells, *Endocrinology* **139** (3), 1354-60 (1998).
- Wenger, R. H., Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression, *Faseb J* **16** (10), 1151-62 (2002).
- Wenger, R. H., D. P. Stiehl, et al., Integration of oxygen signaling at the consensus HRE, *Sci STKE* **2005** (306), re12 (2005).
- Winder, W. W., Energy-sensing and signaling by AMP-activated protein kinase in skeletal muscle, *J Appl Physiol* **91** (3), 1017-28 (2001).
- Yu, H. and T. Rohan, Role of the insulin-like growth factor family in cancer development and progression, *J Natl Cancer Inst* **92** (18), 1472-89 (2000).
- Zagorska, A. and J. Dulak, HIF-1: the knowns and unknowns of hypoxia sensing, *Acta Biochim Pol* **51** (3), 563-85 (2004).
- Zelzer, E., Y. Levy, et al., Insulin induces transcription of target genes through the hypoxia-inducible factor HIF-1alpha/ARNT, *Embo J* **17** (17), 5085-94 (1998).
- Zhou, J., M. Callapina, et al., Functional integrity of nuclear factor kappaB, phosphatidylinositol 3'-kinase, and mitogen-activated protein kinase signaling allows tumor necrosis

factor alpha-evoked Bcl-2 expression to provoke internal ribosome entry site-dependent translation of hypoxia-inducible factor 1alpha, *Cancer Res* **64** (24), 9041-8 (2004).