



## THESIS / THÈSE

### MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

#### Régulation de la transcription génique par l'hypoxie sur un modèle de cellules endothéliales en culture. Mise en évidence de l'activation de HIF-1

Parmentier, Benoit

*Award date:*  
1998

[Link to publication](#)

#### General rights

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

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

#### Take down policy

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

FACULTES UNIVERSITAIRES  
NOTRE-DAME DE LA PAIX



NAMUR

**Faculté des Sciences**

**Régulation de la transcription génique par l'hypoxie  
sur un modèle de cellules endothéliales en culture  
Mise en évidence de l'activation de HIF-1**

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

Benoît PARMENTIER

Juin 1998

**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 41 11 - Téléfax: + 32(0)81.72 44 20  
E-mail: Jonetde la réponse cellulaire .joelle@fundp.ac.be -  
<http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

**Régulation de la transcription génique par l'hypoxie sur un modèle de cellules endothéliales en culture et mise en évidence de l'activation de HIF-1**

PARMENTIER Benoît

Résumé

Un arrêt local ou un ralentissement de la circulation qui se produit en cas d'infarctus, d'insuffisance veineuse, ou de thrombose place l'endothélium en condition d'hypoxie. Notre travail consiste en une approche de l'adaptation des cellules à une situation d'hypoxie en abordant l'aspect moléculaire de la réponse cellulaire car ce dernier reste peu exploré à ce jour. Par des expériences de retard sur gel, nous avons mis en évidence dans les cellules endothéliales microvasculaires humaines (HMEC-1) incubées sous hypoxie, l'activation du facteur de transcription HIF-1 (Hypoxia-Inducible Factor-1). La quantification par RT-PCR, en conditions normales ou hypoxiques, des ARNm exprimés pour ce facteur ne souligne aucune augmentation marquée sous hypoxie. Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature. Nous avons également montré que la transcription du VEGF est bien augmentée en conditions d'hypoxie. Enfin, les cellules HMEC-1 seraient capable de s'adapter aux conditions hypoxiques puisque nos observations montrent que leur contenu en ATP retrouve les valeurs contrôles après 2h d'hypoxie. Ces différents résultats permettent de mieux comprendre l'adaptation moléculaire et métabolique des cellules endothéliales à l'hypoxie.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Juin 1998

**Promoteur:** C. Michiels

*À l'issue de ce mémoire, je tiens à remercier les nombreuses personnes qui m'ont aidé, d'une manière ou d'une autre, à mener à bien ce travail.*

*Je remercie tout d'abord le professeur J. Remacle de m'avoir accueilli dans son laboratoire.*

*Mes remerciements vont ensuite à madame Carine Michiels. Sa grande disponibilité, sa compétence ainsi que sa volonté de travail m'ont beaucoup aidé.*

*Berthe, je te remercie pour ta bonne humeur omniprésente, tes encouragements et ton aide technique qui, plus que précieuse, fut indispensable (merci également pour les judicieuses remarques concernant la pièce radioactive ; j'espère que celles-ci auront servi à préserver ma future progéniture...).*

*C'est ensuite un drôle de personnage que j'aimerais remercier : Manu. Merci pour tes cours, tes nombreux conseils et ton aide technique.*

*Isabelle E., merci pour tes remarques et conseils lors des réunions.*

*Merci à toi Maggy, pour m'avoir initié à la RT-PCR. Merci pour ta disponibilité et ta patience.*

*Je ne risque pas d'oublier François, toujours présent pour la préparation des sérums, Edouard, pour la sympathie et les conseils techniques, Martine, Noëlle, ainsi que tous les autres membres du laboratoire qui m'ont permis de travailler dans une ambiance inoubliable, et qui, à un moment ou un autre, m'ont été d'une aide précieuse.*

*Je n'oublie pas non plus tous mes amis et amies avec lesquels j'ai partagé d'inoubliables années d'étude.*

*C'est du fond du cœur que je remercie mes parents sans qui rien n'aurait été possible.*

*Benoît*

## Liste des abréviations

AA	Acide Arachidonique
Ac	Anticorps
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
Ahr	Aryl hydrocarbon récepteur
AMPC	Adénosine monophosphate cyclique
AMV	Avian myeloblastosis virus
ARNT	Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator
ARNt	Acide ribonucléique de transfert
ATF	Acétyltransférase
ATP	Adénosine triphosphate
bHLH	basic Helix Loop Helix
bp	Paire de bases
CBP	Creb Binding Protein
COX	Cyclooxygénase
CPM	coups par minute
CREB	cAMP Response Element Binding
D.O.	Densité optique
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DTT	Dithiotréitol
ECDFG	Endothelial-cell-derived growth factor
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Acide éthylènedinitrilotétraacétique
EGTA	Ethylène glycol-bis (b-aminoethyl ether) N,N',N'-tetraacetic acid
ELAM-1	Endothelial leucocyte adhesion molecule-1
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
Epo	Erythropoïétine
FGF	Fibroblast growth factor
GLUT-1	Glucose transporteur-1
HBSS	Hank's balanced salt solution
HIF-1	Hypoxia inducible factor-2
HMEC-1	Human microvascular endothelial cells-1
HRE	Hypoxia response element
HSP 90	Heat shock protein 90
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells
CAM-1	Intercellular adhesion molecule
IGF-1like	Insuline like growth factor
L-1	Interleukine-1

IL-8	Interleukine-8
kb	Kilobase
Kda	Kilodalton
LOX	Lipoxygénase
LTB4	Leucotriène B4
lyso-PAF	lyso-Platelet Activating Factor
MCP-1	Monocytes chemoattractant protein-1
MOPS	Acide 3-morpholino-propanesulfonique
NADPH	Nicotinamide adénosine diphosphate
NO syntase	Nitric oxyde synthase
ORPs	Oxygen respons proteins
PAF	Platelet Activating Factor
PAS	Per Ahr/ARNT SIM
PDGF	Platelet -derived growth factor
PER	Period
PG	Prostaglandine
PGD2	Prostaglandine D2
PGE2	Prostaglandine E2
PGF2	Prostaglandine F2
PGI2	Prostaglandine I2
PL	Phospholipide
PLA2	Phospholipase A2
PMN	Polymorphonucléaire neutrophile
RLU	Relative light unit
rpm	Rotation par minute
RT-PCR	Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction
SAB	Serum albumin bovine
SDS-PAGE	Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SIM	Singel minded
TEMED	N,N,N'-Tetra-methyl-ethylènediamine
t-PA	Activateur tissulaire du plasminogène
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
XRE	Xenobiotic response element

# Table des matières

<b>I. INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
<b>I. 1. LA CELLULE ENDOTHELIALE</b>	<b>2</b>
<i>I.1.1. Les caractéristiques cytologiques de la cellule endothéliale</i>	2
<i>I.1.2. Les fonctions de l'endothélium</i>	3
◆ Endothélium en tant que barrière à perméabilité sélective	4
◆ L'endothélium dans le contrôle de la thromborésistance	4
◆ Endothélium et vasomotricité	5
◆ Endothélium et facteurs de croissance	6
◆ Endothélium et molécules d'adhérence	7
<b>I.2. REPONSE DES CELLULES ENDOTHELIALES A L'HYPOXIE</b>	<b>9</b>
<i>I.2.1. Effets à court terme</i>	9
<i>I.2.2. Effets à long terme</i>	11
<b>I.3. ADAPTATION MOLECULAIRE A L'HYPOXIE</b>	<b>12</b>
<i>I.3.1. Expression du gène Epo et découverte de HIF-1</i>	12
◆ Modèle cellulaire	13
◆ Identification des séquences régulatrices du gène EPO	13
<i>I.3.2. Structure et régulation de HIF-1</i>	15
<i>I.3.3. Gènes régulés par l'oxygène (Bunn &amp; Poyton, 1996)</i>	18
◆ Vascular endothelial growth factor (VEGF)	18
◆ Gènes responsables du métabolisme du glucose	19
<b>I.4. BUT DU MEMOIRE</b>	<b>22</b>

<b>II.1. ASPECT CELLULAIRE</b> .....	23
II.1.1. <i>Culture cellulaire</i> .....	23
A. Matériel.....	23
B. Méthode.....	23
II.1.2. <i>Incubation sous hypoxie et extraction des protéines nucléaires</i> .....	24
A. Matériel.....	24
B. Méthode.....	25
II.1.3. <i>Dosage des protéines selon la méthode de Bradford</i> :.....	26
A. Matériel .....	26
B. Méthode.....	27
II.1.4. <i>Mesure de la viabilité cellulaire</i> .....	27
A. Matériel.....	27
B. Méthode.....	28
II.1.5. <i>Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)</i> .....	28
II.1.5.1. Marquage et purification des sondes .....	29
A. Matériel .....	29
B. Méthode.....	30
II.1.5.2. Liaison sonde - protéine.....	31
A. Matériel .....	31
B. Méthode.....	32
II.1.5.3. Supershift .....	32
A. Matériel.....	32
B. Méthode.....	32
II.1.5.4. Electrophorèse.....	33
A. Matériel.....	33
B. Méthode.....	33
II.1.5.5. Quantification et révélation.....	34
A. Matériel.....	34
B. Méthode.....	34
II.1.6. <i>Western - Blot</i> .....	35
II.1.6.1. Electrophorèse.....	36
A. Matériel .....	36
B. Méthode.....	38
II.1.6.2. Transfert .....	39
A. Matériel.....	39
B. Méthode.....	39
II.1.6.3. Traitement et révélation .....	41
A. Matériel .....	41
B. Méthode.....	42
II.1.6.4. Révélation du film.....	43
A. Matériel.....	43



B. Méthode.....	43
II.1.7. <i>Dosage de l'adénosine triphosphate (ATP)</i> .....	44
II.1.7.1. Principe .....	44
A. Matériel.....	45
B. Méthode.....	45
II.1.7.2 Dosage des protéines selon Lowry .....	46
A. Matériel.....	46
B. Méthode.....	47
<b>II.2 ASPECT MOLECULAIRE</b> .....	48
II.2.1. <i>Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)</i> .....	48
II.2.1.1. Culture et incubation des cellules sous hypoxie .....	49
II.2.1.2. Extraction de l'ARN total .....	49
A. Matériel.....	49
B. Méthode.....	50
II.2.1.3 Vérification de la qualité de l'ARN sur gel d'agarose .....	52
A. Matériel .....	52
B. Méthode.....	53
II.2.1.4. RT-PCR.....	54
A. Matériel.....	54
B. Méthode.....	54
II.2.1.5. Analyse des produits de PCR.....	56
II.2.1.5.1 Electrophorèse en gel d'agarose .....	56
A. Matériel.....	57
B. Méthode.....	58
II.2.1.5.2. Gel de polyacrylamide .....	58
A. Matériel .....	59
B. Méthode .....	59
II.2.1.6. Révélation et quantification .....	60
A. Matériel .....	60
II.2.2 <i>Le séquençage</i> .....	61
II.2.2.1 Préparation de la PCR.....	62
A. Matériel .....	62
B. Méthode .....	62
II.2.2.2 Préparation des échantillons pour l'analyse sur gel.....	63
A. Matériel .....	63
B. Méthode.....	63

<b>III.1. ETUDE DE L'ACTIVATION DE HIF-1</b> .....	64
<i>III.1.1. Mise au point de l'EMSA</i> .....	64
III.1.1.1. Utilisation de la sonde W18.....	64
◆ Description de l'expérience réalisée .....	64
◆ Résultats .....	65
◆ Discussion .....	65
III.1.1.2. Utilisation de la sonde mutée M18 .....	66
◆ Description de l'expérience réalisée .....	66
◆ Résultats .....	66
◆ Discussion .....	67
III.1.1.3. Viabilité des cellules HMEC-1 dans l'HBSS .....	67
◆ Description de l'expérience réalisée .....	67
◆ Résultats .....	67
◆ Discussion .....	68
III.1.1.4. Comparaison HBSS-milieu modifié.....	68
◆ Description de l'expérience réalisée .....	68
◆ Résultats .....	69
◆ Discussion .....	69
<i>III.1.2. Etude de l'activation de HIF-1</i> .....	69
◆ Description de l'expérience réalisée .....	70
◆ Résultats .....	70
◆ Discussion .....	71
III.1.3 Reconnaissance de l'anticorps.....	72
◆ Description de l'expérience réalisée .....	72
◆ Résultats .....	72
◆ Discussion .....	72
<i>III.1.4. Cinétique d'activation de HIF-1 par l'hypoxie</i> .....	73
◆ Description de l'expérience réalisée .....	73
◆ Résultats/Discussion.....	73
<i>III.1.5. Dosage de l'adénosine triphosphate (ATP)</i> .....	74
◆ Description de l'expérience réalisée .....	74
◆ Résultats .....	74
<b>III.2 ETUDE DE L'EXPRESSION DES GENES HIF-1<math>\alpha</math> ET VEGF</b> ..	76
<i>III.2.1 Mise au point des conditions de RT-PCR</i> .....	77
III.2.1.1 RT-PCR non radioactive .....	77
◆ Description de l'expérience réalisée .....	77
◆ Résultats .....	78
◆ Discussion .....	78

III.2.1.2 Détermination du nombre de cycles : RT-PCR radioactives .....	79
♦ Description des expériences réalisées .....	79
♦ Résultats .....	79
III.2.2 <i>Expression des gènes HIF-1<math>\alpha</math> et VEGF</i> .....	81
♦ Description de l'expérience réalisée .....	81
♦ Résultats .....	82
♦ Discussion .....	83

---

**IV. CONCLUSION ET PERSPECTIVES** **85**

---

**V. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES** **90**

# **Introduction**

## I : INTRODUCTION

La paroi vasculaire n'est pas simplement une barrière physique mais aussi une machine biochimique où chaque constituant cellulaire a son rôle propre. Les cellules endothéliales de l'intima, situées à l'interface sang-tissu sont en contact direct avec les éléments du sang et sont également en interaction continue avec les cellules musculaires lisses de la média. Outre le fait de constituer une barrière physique entre le sang et les tissus, l'endothélium remplit de nombreuses fonctions physiologiques. Un arrêt local ou un ralentissement de la circulation qui se produit en cas d'infarctus, d'insuffisance veineuse ou de thrombose place l'endothélium en conditions d'ischémie. Lorsqu'un tel phénomène se déroule dans une veine ou une artère, il provoque le déclenchement de modifications fonctionnelles et structurelles indésirables au niveau de la paroi vasculaire des vaisseaux sanguins affectés. Si ces modifications sont aujourd'hui bien connues au niveau biochimique, les aspects moléculaires des effets de l'ischémie sont peu connus et constituent l'objet de ce travail.

L'introduction de ce mémoire se compose de trois parties :

- Dans un premier temps, nous nous familiariserons avec l'endothélium en évoquant ses caractéristiques morphologiques et ses rôles physiologiques.
- En second lieu, nous caractériserons l'effet de l'ischémie non seulement à court terme mais aussi à long terme sur les cellules endothéliales.
- Enfin, la dernière partie décrira les caractéristiques de HIF-1 (Hypoxia-Inducible Factor-1), un facteur de transcription induit et activé par l'hypoxie.

## I. 1. LA CELLULE ENDOTHELIALE

Le terme "endothélium vasculaire" décrit l'unique couche de cellules polygonales et aplaties recouvrant la surface interne de tous les vaisseaux sanguins (Borsum, 1991). La surface qu'il couvre atteint ainsi chez l'homme une superficie supérieure à 1000 m<sup>2</sup>.

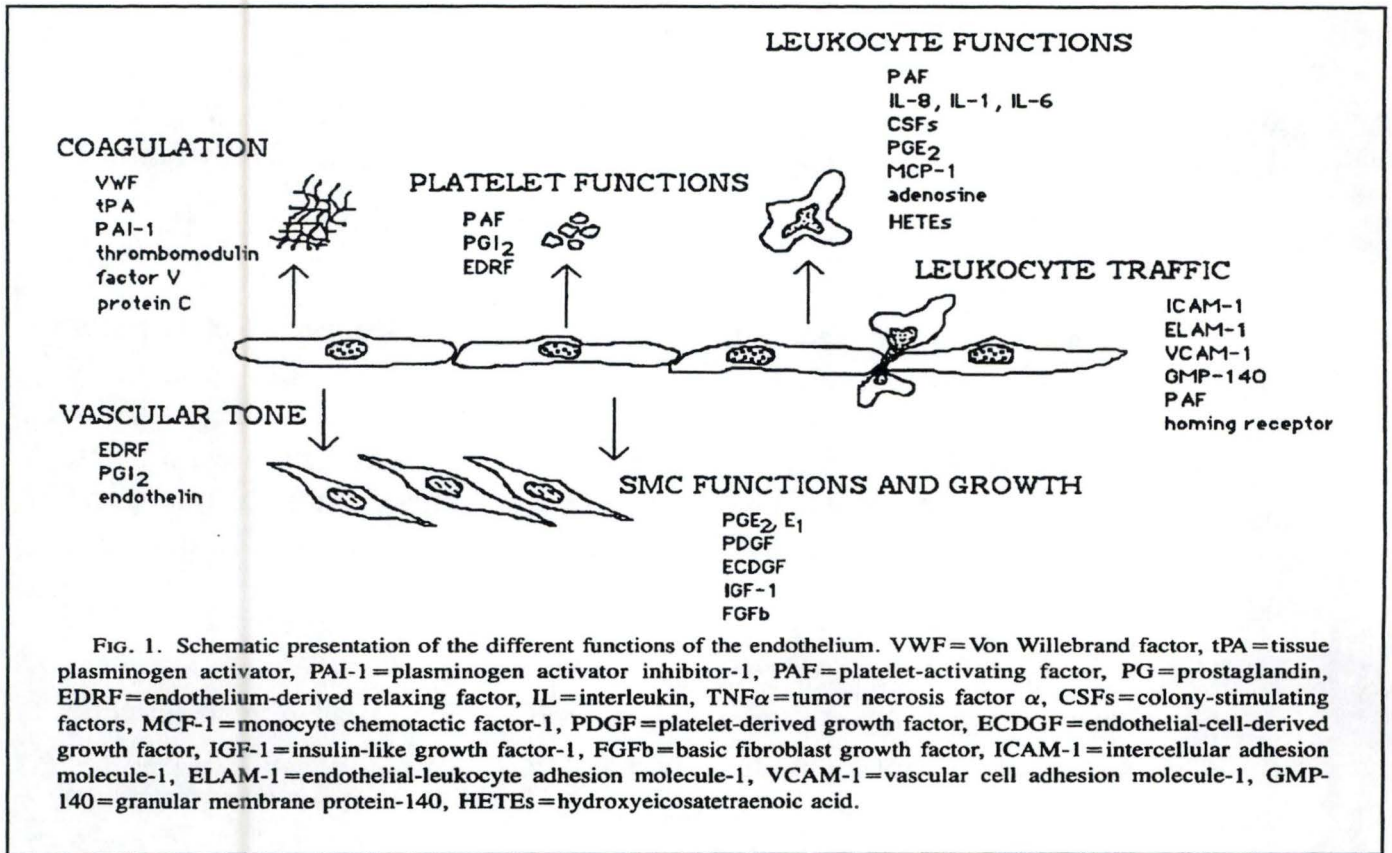
Sa localisation à l'interface entre le sang circulant d'une part et la paroi vasculaire et les tissus interstitiels d'autre part, implique des propriétés structurelles et fonctionnelles spécialisées (Gimbrone *et al.*, 1995). L'endothélium détermine les compartiments intra- et extravasculaires, agit en tant que barrière à perméabilité sélective et fournit une surface non thrombogène et non inflammatoire. Il s'agit donc d'une interface biologiquement significative.

Dès lors, on comprend aisément que toute perturbation au niveau de cette monocouche cellulaire peut engendrer une série de modifications structurelles et fonctionnelles de la paroi vasculaire. Ces modifications vont aussi moduler en retour les fonctions des plaquettes et des leucocytes circulants.

Afin de mieux comprendre les effets de ces perturbations, nous étudierons les caractéristiques morphologiques des cellules endothéliales ainsi que les substances qu'elles synthétisent.

### I.1.1. Les caractéristiques cytologiques de la cellule endothéliale.

Rappelons très brièvement que l'endothélium est un épithélium pavimenteux simple tapissant la lumière de tous les vaisseaux sanguins. L'endothélium vasculaire se compose en effet d'une monocouche, aplatie et uniforme, de cellules endothéliales ; elle représente une véritable mosaïque de cellules polygonales, allongées et orientées parallèlement à la direction du flux sanguin (Herman & Castellot, 1987).



**Figure I.1 :** Représentation schématique des différentes fonctions de l'endothélium (D'après Michiels *et al.*, 1993).

La grande caractéristique morphologique des cellules endothéliales est la présence d'inclusions appelées corps de Weibel-Palade. Ces granules ovoïdes sont un véritable critère pour la reconnaissance de la cellule endothéliale. Il s'agit d'une inclusion intra-cytoplasmique composée de tubules parallèles à l'axe du corps. L'ensemble est entouré d'une matrice dense et d'une membrane. Ils sont probablement formés à partir du complexe de Golgi (Thorgeirsson, 1983). Il est admis que ces granules stockent le facteur de Von Willebrand (facteur VIII de la coagulation), responsable de l'adhésion plaquettaire (Jaffe, 1986).

En culture, les cellules endothéliales forment également une monocouche, conservent leur morphologie polygonale et répondent à l'inhibition de contact. En effet, lorsqu'elles arrivent à confluence, elles cessent de se diviser pour former alors une monocouche de cellules jointives. Il faut cependant noter que des passages successifs en culture peuvent induire un processus de dédifférenciation faisant perdre une partie des caractéristiques propres à ce type de cellules.

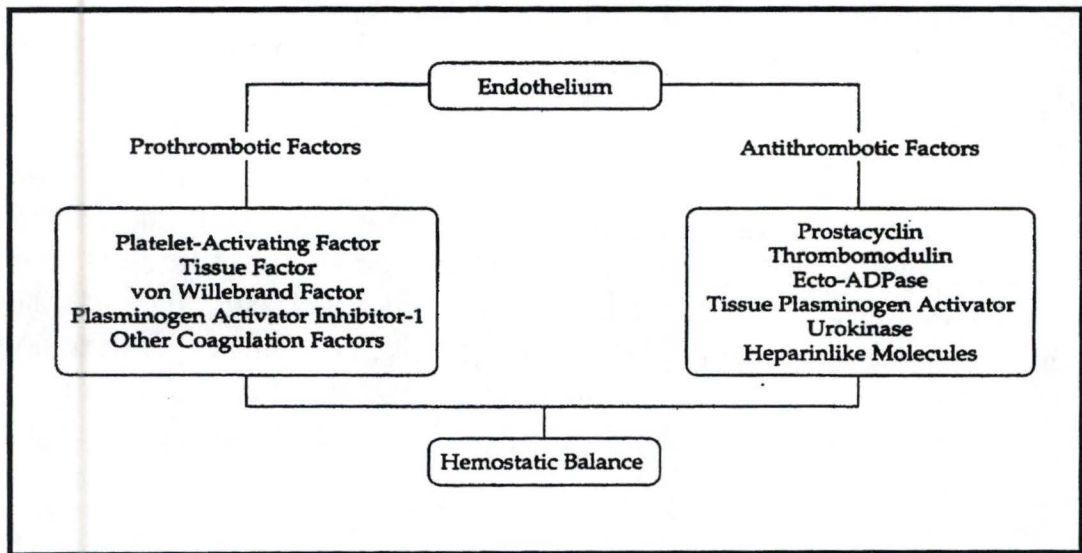
### **I.1.2. Les fonctions de l'endothélium**

Vu sa position anatomique, l'endothélium remplit de nombreuses fonctions physiologiques (figure I.1), notamment la régulation du tonus et de la perméabilité vasculaire, la formation d'une surface non inflammatoire et anti-thrombogène, la synthèse, l'activation ou l'inactivation d'hormones vasoactives et la régulation du transport des nutriments.

De plus, on parle parfois de l'endothélium comme "senseur" de la structure vasculaire pour faire référence à sa capacité de percevoir et de transmettre des signaux aux cellules musculaires lisses sous-jacentes, tels que des changements dans les concentrations de médiateurs vaso-actifs et des perturbations dans les conditions hémodynamiques (Ager, 1990).

Nous allons passer en revue les principales fonctions remplies par l'endothélium dans les conditions physiologiques normales.





**Figure I.2 :** Représentation de la balance prothrombotique-antithrombotique engendrée par l'endothélium (D'après Grimbrone *et al.*, 1995).

◆ *Endothélium en tant que barrière à perméabilité sélective*

L'endothélium forme une barrière physique à l'interface entre le sang et les tissus. Il est doté d'une perméabilité sélective contrôlant le flux de solutés (nutriments, hormones, électrolytes) qui sont acheminés par pinocytose ou par des canaux trans-endothéliaux aux cellules sous-jacentes.

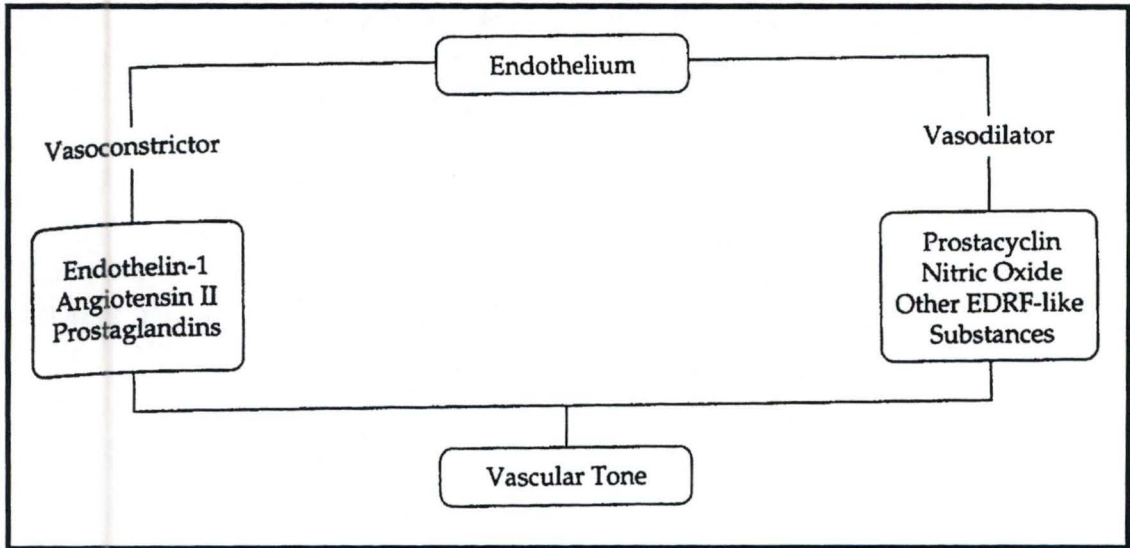
Les cellules endothéliales élaborent entre autres des glycoprotéines, des glycoaminoglycans, de la laminine, de l'élastine et plusieurs types de collagènes (surtout le collagène de type IV) (Duance & Bailey, 1983) qui constituent la membrane basale et la matrice extra-cellulaire du sous-endothélium. Cette membrane constitue une barrière secondaire pour le passage des liquides et des éléments formés dans le compartiment extra-vasculaire.

◆ *L'endothélium dans le contrôle de la thromborésistance*

En plus de son rôle de barrière à perméabilité sélective, l'endothélium est responsable de l'homéostasie vasculaire. Les cellules endothéliales jouent en effet un rôle actif dans la régulation de la fibrinolyse et de la coagulation par la synthèse et sécrétion de substances maintenant la fluidité sanguine ou favorisant la thrombose et l'hémostase (figure I.2).

Les propriétés anticoagulantes de l'endothélium sont essentiellement assurées par la synthèse de l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA) et par l'expression à sa surface de la thrombomoduline (Crossman & Tuddenham, 1990). Le t-PA est une sérine protéase très spécifique catalysant la conversion du plasminogène en plasmine par hydrolyse d'un lien peptidique. La thrombomoduline quant à elle, fixe la thrombine et lui fait perdre sa fonction pro-coagulante par une diminution de son affinité pour le fibrinogène.

L'action anti-thrombogène est aussi renforcée par la présence de nombreuses molécules sur la surface cellulaire. Par exemple, on remarque la présence d'inhibiteurs de protéases de la coagulation (anti-thrombine III) ainsi que de nombreux glycoaminoglycans (héparan-sulfate).



**Figure I.3 :** Représentation de la balance vasoconstrictrice-vasodilatatrice engendrée par l'endothélium (D'après Grimbrone *et al.*, 1995).

Inversément, en réponse à certains stimuli (lipopolysaccharides bactériens, les cytokines, l'histamine, ...), l'endothélium peut se transformer en une surface pro-coagulante conduisant à la formation d'un thrombus (Harker, 1987).

Les cellules endothéliales sécrètent alors de nombreuses substances à activités pro-coagulantes. Parmi celles-ci, il y a le facteur de Von Willebrand. Cette glycoprotéine libérée dans le sang s'associe rapidement au facteur VIII de la coagulation. Ce complexe joue un rôle important dans le phénomène d'interaction entre les plaquettes sanguines et les cellules endothéliales de la paroi vasculaire.

Mais l'adhésion des plaquettes est surtout favorisée par les collagènes sous-endothéliaux de types IV et V ainsi que la synthèse, par les cellules endothéliales, du thromboxane A<sub>2</sub> (vasoconstricteur stimulant l'agrégation des plaquettes).

#### ◆ *Endothélium et vasomotricité*

Parmi les nombreuses fonctions qu'assure l'endothélium vasculaire, celle de production et de métabolisme de produits vaso-actifs est essentielle pour le contrôle du tonus vasculaire et de la structure de la paroi artérielle (Corvol *et al.*, 1993) (figure I. 3).

L'endothélium module en effet l'état de contraction des vaisseaux par la libération de substances vasorelaxantes (prostacycline, monoxyde d'azote, et peut être la bradykinine) et de substances vasoconstrictrices (endothéline-1, angiotensine II).

L'endothéline-1 produite par les cellules endothéliales est un exemple de synthèse d'un peptide vasoactif. L'endothéline exerce tout d'abord un effet vasodilatateur bref. Cette action est ensuite suivie d'un effet vasoconstricteur et hypertenseur très puissant et prolongé. L'angiotensine II exerce également un effet vasoconstricteur puissant sur les cellules musculaires lisses.

Il est important de souligner ici que les molécules vasoactives se comportent également très souvent comme des facteurs de croissance qui exercent des effets prolifératifs et qu'elles partagent des signaux de transduction

communs avec les molécules mitogènes (Gibbon & Dzau, 1990). Il a été décrit en effet que des molécules vasoactives comme l'angiotensine II, l'endothéline I, le thromboxane A<sub>2</sub>, les leucotriènes, la substance P et la sérotonine induisent une prolifération des cellules musculaires lisses via l'activation des phospholipases C et l'expression des proto-oncogènes c-fos et c-myc.

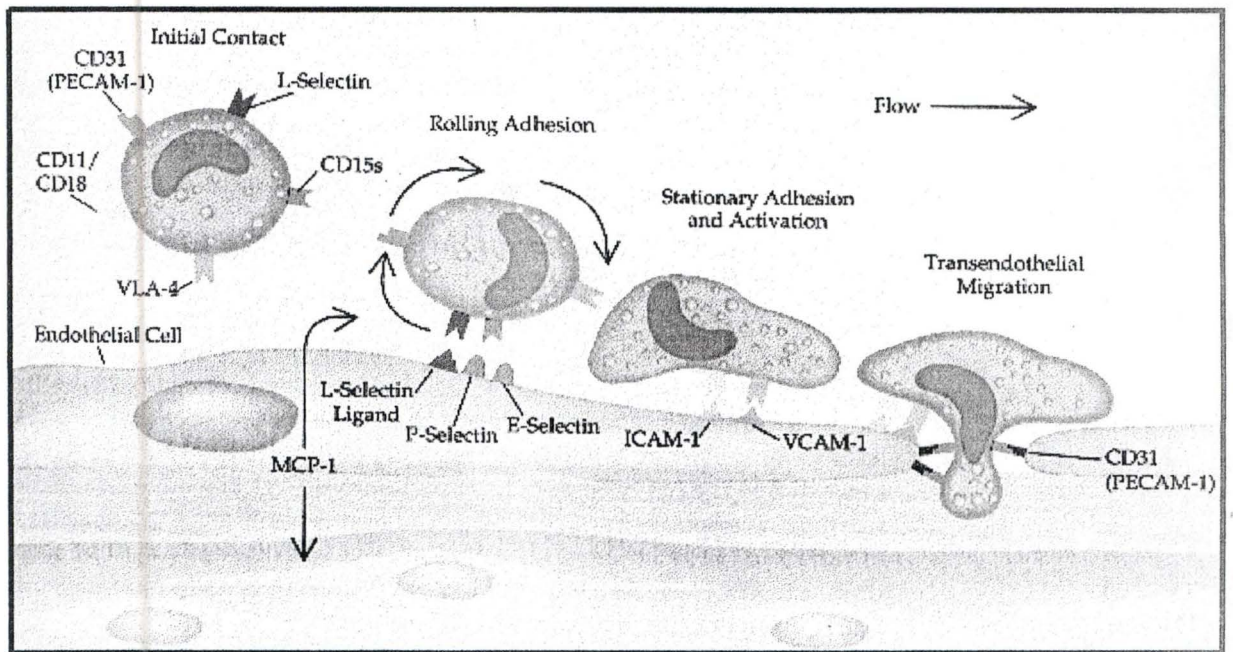
Au contraire, certains vasodilatateurs tels que les prostaglandines et le monoxyde d'azote auraient un effet inhibiteur sur la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires.

Par ailleurs, l'endothélium vasculaire capte et décode différents messages hémodynamiques, chimiques et biochimiques présents dans le sang, les transforme et les transmet à la paroi vasculaire par la synthèse de molécules qui exercent des effets à court et à long terme. A court terme, l'endothélium module notamment le tonus vasculaire par la production de substances vasorelaxantes (prostacycline, monoxyde d'azote et peut-être bradykinine) et vasoconstrictrices (endothéline-1, angiotensine II). A long terme, il influence la structure de la paroi artérielle en produisant ces mêmes facteurs qui peuvent stimuler (endothéline, angiotensine II) ou inhiber (monoxyde d'azote, prostaglandines) la croissance des cellules musculaires lisses de la média. Ainsi, la cellule endothéliale joue-t-elle un double rôle en contrôlant à la fois l'état de tension du vaisseau, et donc le débit sanguin, et la structure de la paroi du vaisseau.

Ces données suggèrent que les substances vasoactives circulantes ou produites localement peuvent influencer la croissance des cellules musculaires lisses vasculaires et par ce fait jouer un rôle dans le remodelage vasculaire.

#### ◆ *Endothélium et facteurs de croissance*

Les cellules endothéliales libèrent également plusieurs substances peptidiques stimulant la croissance des cellules musculaires lisses telles que le PDGF, un facteur d'abord découvert dans les plaquettes; l'ECDGF, un facteur de croissance dérivé des cellules endothéliales; l'IGF-1 like, un facteur de croissance analogue à l'insuline; le FGF, un facteur de croissance ressemblant à celui sécrété par les fibroblastes; et l'interleukine-1 (Inagami *et al.*, 1995). L'ensemble de ces facteurs de croissance agit le plus souvent de manière concomitante après l'agression de l'endothélium.



**Figure I.4 :** Schéma reprenant les différentes molécules d'adhérence exprimées par les cellules endothéliales et les leucocytes ainsi que les différentes étapes conduisant à l'infiltration des leucocytes (d'après Gimbrone, 1995).

Dans une réaction inflammatoire, la présence de nombreux effecteurs moléculaires conduit à l'infiltration des leucocytes par un processus dynamique qui nécessite plusieurs phases : lors de la marginalisation ("rolling"), les leucocytes quittent le courant central des cellules circulantes et roulent le long de l'endothélium en engageant les L-sélectines constitutivement exprimées à la surface des neutrophiles non activés et les P-sélectines vasculaires. Le second événement consiste en l'activation des leucocytes par les facteurs chimiotactiques ou des signaux résultant du contact cellulaire, ce qui augmente alors l'expression des intégrines  $\beta 2$ . L'interaction entre ces récepteurs et les contre-récepteurs de l'endothélium (ICAM) conduit à une adhérence des leucocytes. La diapédèse est le processus qui assure le transfert des leucocytes séquestrés du compartiment vasculaire vers le tissu interstitiel par un passage transendothélial.

◆ *Endothélium et molécules d'adhérence*

Les molécules d'adhérence sont des molécules transmembranaires, qui permettent à deux cellules voisines d'interagir entre elles. Ce sont souvent des glycoprotéines transmembranaires, liées au cytosquelette, que la cellule va utiliser comme point d'ancrage sur d'autres cellules ou sur la matrice extracellulaire pour s'ancrer ou pour pouvoir se déplacer.

L'adhérence est un phénomène très important chez les neutrophiles (PMN). Dans les conditions physiologiques, il existe une interaction continue entre les neutrophiles et les cellules endothéliales de la paroi des vaisseaux sanguins.

Lors d'une réponse inflammatoire, cette adhérence augmente fortement et le premier contact des leucocytes avec l'endothélium est médié par les interactions entre les molécules d'adhérence exprimées à la surface de ceux-ci et les contre-récepteurs exprimés par les cellules endothéliales.

L'adhérence des leucocytes est un processus en trois étapes : la première étape ou marginalisation est induite par des facteurs chémotactiques (fragment C5a du complément, PAF ou platelet-activating factor, leucotriène B<sub>4</sub>). Le premier contact modifierait l'expression ou l'affinité de glycoprotéines spécifiques (CD11/CD18) présentes à la surface des neutrophiles pour assurer leur adhérence ferme aux cellules endothéliales. Enfin, la diapédèse proprement dite a lieu via une migration des leucocytes entre les cellules endothéliales (Springer, 1995) (figure I.4).

Les intégrines dont fait partie CD11 / CD18 sont des hétérodimères formés de deux glycoprotéines transmembranaires,  $\alpha$  et  $\beta$  dont la partie cytoplasmique est généralement courte (environ 50 acides aminés). Les sous-unités  $\alpha$  varient de 120 à 180 kDa et sont associées de manière non covalente à une sous-unité  $\beta$  commune de 90 à 110 kDa. Les molécules CD11 / CD18 seraient préformées et stockées dans des granules spécifiques intracellulaires pour être rapidement redistribuées dans la membrane cytoplasmique lors d'une stimulation des PMN (Springer, 1995).

Parallèlement au CD11 / CD18 des PMN, il existe des contre-récepteurs exprimés par les cellules endothéliales. Parmi ceux-ci on retrouve :

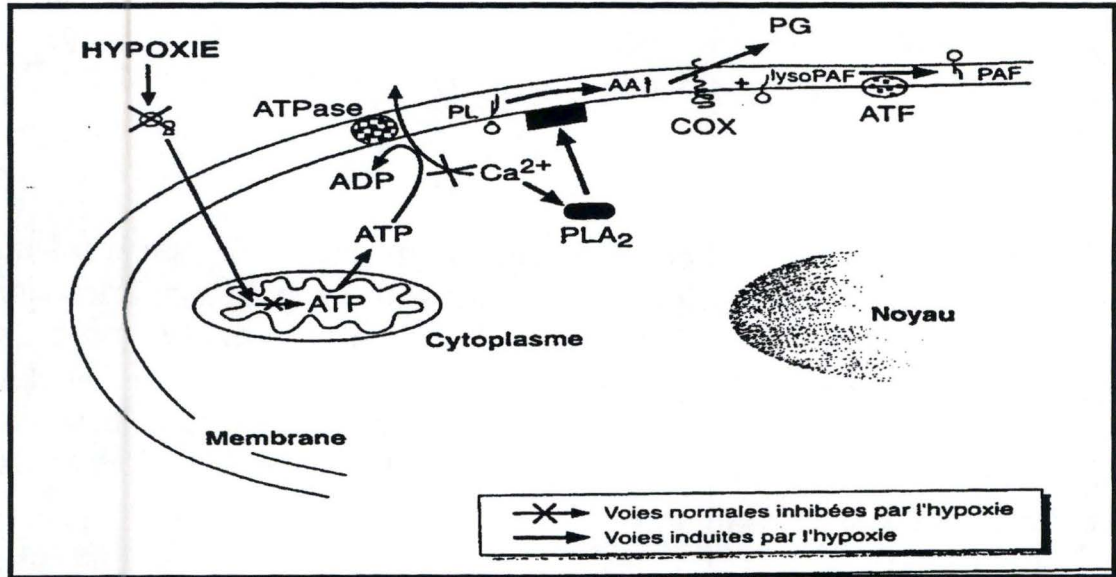
- ICAM-1 (InterCellular Adhesion Molecule-1) est une molécule d'adhérence exprimée à la surface de nombreuses cellules. C'est une glycoprotéine spécifique de 90 kDa appartenant à la super famille des immunoglobulines et qui sert de contre-récepteur pour les intégrines CD11 / CD18 exprimées par les leucocytes. ICAM-1 peut de plus être induite suite à une stimulation des cellules endothéliales par des cytokines comme l'IL-1. Une autre molécule apparentée et nommée ICAM-2 (InterCellular Adhesion Molecule-2), dont l'expression est constitutive et non inductible par les cytokines, jouerait également un rôle important dans la liaison PMN-cellules endothéliales.

- ELAM-1 (Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule-1) ou E-sélectine est une glycoprotéine monomérique transmembranaire appartenant à la famille des sélectines. Elle n'est pas exprimée de façon constitutive, mais son expression est induite transitoirement suite à la stimulation par des cytokines comme l'IL-1 ou les lipopolysaccharides bactériens. Cette molécule pourrait, lorsqu'elle se lie à son ligand, agir comme un stimulus activateur des PMN et induire l'expression des intégrines CD11 / CD18.

En conclusion, en raison des nombreuses fonctions qu'il est amené à remplir par l'intermédiaire des nombreux médiateurs qu'il synthétise, l'endothélium est bien plus qu'une simple barrière physique entre les éléments du sang et les tissus sous-jacents. Il est capable de répondre à de nombreux stimuli et variations de son environnement et ainsi de moduler les fonctions des cellules avec lesquelles il entre en contact. Une de ces variations souvent observées dans les vaisseaux sanguins est une altération de la circulation sanguine, conduisant à l'apparition de conditions ischémiques.

Après cette brève présentation des cellules endothéliales avec leurs caractéristiques morphologiques et fonctionnelles dans les conditions physiologiques normales, nous allons donc nous intéresser aux changements cellulaires et moléculaires observés en conditions d'ischémie.





**Figure I.5 :** Schéma illustrant certaines modifications du métabolisme des cellules endothéliales en réponse à l'hypoxie. Les réactions sont indiquées suivant leur suite logique par des flèches montrant les réactions inhibées ou activées après l'hypoxie (d'après Michiels *et al.*, 1994).

- AA : Acide Arachidonique
- ATF : Acétyl Transférase
- Cox : Cyclooxygénase
- PAF : Platelet-Activating Factor
- PG : Prostaglandine
- PL : Phospholipide
- PLA<sub>2</sub> : Phospholipase A<sub>2</sub>

## **I.2. REPOSE DES CELLULES ENDOTHELIALES A L'HYPOXIE**

A l'interface sang-tissu, les cellules endothéliales sont particulièrement exposées aux variations de la tension en oxygène. Un arrêt local ou un ralentissement de la circulation qui se produit en cas d'infarctus, d'insuffisance veineuse ou de thrombose place l'endothélium en conditions d'hypoxie.

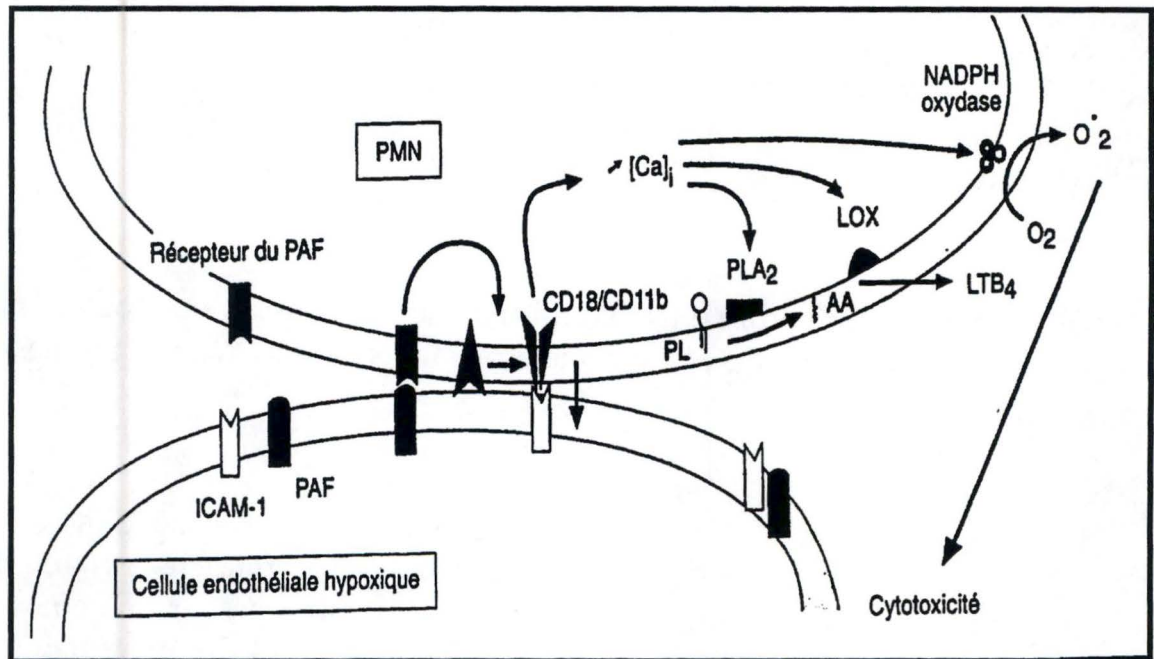
L'hypoxie sévère entraîne une souffrance de ces cellules qui doivent alors modifier leur comportement et leur métabolisme afin de réagir au manque d'oxygène.

Une réduction de la pression partielle en oxygène conduit à une diminution de l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale. Les phosphorylations oxydatives ralentissent, ce qui diminue la régénération d'adénosine triphosphate (ATP) et, comme mécanisme de compensation, la glycolyse est stimulée (Janssens *et al.*, 1995). Si la cellule ne peut pas satisfaire tous ses besoins en ATP, les modifications métaboliques qui en résultent peuvent conduire à sa mort. Cependant, avant que ne surviennent ces altérations irréversibles, l'hypoxie peut influencer les fonctions de ces cellules entraînant une cascade d'événements qui impliquent leucocytes, cellules musculaires lisses, ainsi que l'activation de la transcription d'une série de gènes.

Dans un premier temps, nous considérerons les aspects biochimiques de ce phénomène ; ensuite, nous étudierons plus particulièrement la réponse moléculaire des cellules endothéliales à l'hypoxie.

### **I.2.1. Effets à court terme**

Durant l'hypoxie, la première modification métabolique observée est la diminution de la concentration en ATP résultant de la diminution des phosphorylations mitochondriales due au déficit en oxygène (Arnould *et al.*, 1992). Cette carence en ATP conduit à une modification de l'activité des pompes ioniques, ce qui entraîne une perturbation de l'homéostasie ionique de la cellule (figure I.5).



**Figure I.6 :** Schéma illustrant les interactions entre cellules endothéliales hypoxiques et polymorphonucléaires neutrophiles (PMN).

Le PAF (Platelet Activating Factor), exprimé à la surface de la cellule endothéliale hypoxique interagit avec son récepteur, exprimé à la surface du PMN, ce qui provoque l'activation des intégrines CD18/CD11b qui se lient à ICAM-1. Le PMN s'active en adhérant à la cellule endothéliale : l'élévation de la concentration en Ca<sup>++</sup> stimule l'activité de la PLA<sub>2</sub> (phospholipase A<sub>2</sub>), de la lipoxigénase (LOX) et de la NADPH oxydase, avec pour conséquence la production de leucotriènes et radicaux libres.

AA : acide arachidonique, LTB<sub>4</sub> : leucotriène B<sub>4</sub>, O<sub>2</sub><sup>•-</sup> : radical superoxyde  
 PL : phospholipide, (d'après Michiels *et al.*, 1994).

On observe alors une augmentation de la concentration en calcium cytosolique : celle-ci passe de 33 à 230 nM après 2 heures d'hypoxie (Arnould *et al.*, 1992). Cette augmentation de la concentration en calcium intracellulaire, même si elle n'est pas suffisante pour induire la mort des cellules sous hypoxie, pourrait avoir plusieurs conséquences : l'ion calcium est en effet, un messager secondaire important capable d'activer de nombreuses enzymes (Jacobs *et al.*, 1990). Parmi celles-ci, la phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) est une enzyme qui remplit une fonction importante dans les cellules endothéliales. Son activité conduit en effet à la formation de précurseurs utilisés pour la synthèse de médiateurs de l'inflammation.

Il a été montré que la PLA<sub>2</sub> était activée lorsque des cellules endothéliales de cordons ombilicaux humain (HUVEC) étaient incubées sous hypoxie. Cette activité conduit au relargage d'acide arachidonique et de lyso-PAF à partir des phospholipides membranaires (Michiels *et al.*, 1993b).

L'acide arachidonique libéré peut être ensuite métabolisé dans les cellules endothéliales par une enzyme, la cyclooxygénase, qui génère différents types de prostaglandines (PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub> α, PGI<sub>2</sub>).

Le lyso-PAF est, quant à lui, transformé en PAF par l'acétyltransférase. Le PAF présent à la surface des cellules endothéliales contribue à augmenter l'adhésivité des cellules endothéliales pour les leucocytes (Arnould *et al.*, 1993). Cette adhérence est directement induite par le PAF et est ensuite médiée par l'intégrine CD18 /CD11b exprimée par les polymorphonucléaires neutrophiles. Cette intégrine interagit avec ICAM-1, exprimée de manière constitutive par les cellules endothéliales (Arnould *et al.*, 1993).

L'adhérence des PMN aux cellules endothéliales activées par l'hypoxie conduit à une activation subséquente des PMN eux-mêmes, à la suite de la liaison entre CD18/CD11b et ICAM-1. Il en résulte une augmentation de la concentration en calcium cytosolique, ce qui stimule la lipoxygénase et la NADPH oxydase avec pour effets la formation de leucotriènes proinflammatoires et la production de radicaux libres (figure I.6).

L'hypoxie perturbe donc fortement les interactions normales entre les cellules endothéliales et les PMN, ce qui engendre une réaction typiquement inflammatoire avec adhérence et activation des PMN.

### **I.2.2. Effets à long terme**

A long terme, la diminution de la tension en oxygène conduit à des changements de l'expression de certaines protéines au sein des cellules endothéliales.

Des analyses qualitatives et quantitatives de protéines réalisées sur des gels 2D ont permis de montrer que l'hypoxie chronique module la synthèse de nombreuses protéines. Par analogie avec un stress thermique, l'exposition des cellules à l'hypoxie inhibe la synthèse totale des protéines mais conduit à renforcer ou à induire la synthèse de protéines de stress spécifiques qui sont modulées par l'absence d'oxygène (ORPs). Ces dernières pourraient être impliquées dans la résistance, la tolérance et l'adaptation des cellules à l'hypoxie (Zimmerman *et al.*, 1991).

L'hypoxie est aussi capable de moduler les interactions entre les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses en perturbant la synthèse et/ou la libération, par les cellules endothéliales, de molécules actives sur les cellules musculaires lisses. A court terme, l'hypoxie induit la libération, par les cellules endothéliales de bFGF et de prostaglandines, molécules mitogènes pour les cellules musculaires lisses. (Michiels *et al.*, 1994). L'hypoxie chronique augmente de plus la transcription des gènes codant pour le PDGF, la NO synthase et l'endothéline-1 (Fandrey, 1995). L'effet de l'hypoxie sur cette dernière est cependant très controversé et semble dépendre de l'origine cellulaire.

A plus long terme (24 heures et plus), la réponse hypoxique se manifeste par l'expression spécifique de plusieurs protéines : c'est notamment le cas de cytokines comme l'IL-1, l'IL-8 ou le MCP-1, de certaines enzymes glycolytiques et de facteurs de croissance tels que le VEGF (vascular endothelial growth factor). Le VEGF intervient dans l'angiogenèse et est responsable de la néovascularisation des tissus hypoxiques (Liu *et al.*, 1995).

L'ensemble de ces mécanismes joue donc un rôle adaptateur pour la cellule et le tissu soumis à l'hypoxie, orientant son métabolisme énergétique vers la voie de la glycolyse et favorisant l'oxygénation du tissu par néovascularisation.

Cette expression différentielle de certains gènes lors d'une exposition à une hypoxie est médiée par l'activation d'un facteur transcriptionnel spécifique : **HIF-1** (Hypoxia Inducible Factor-1). L'étude de ce facteur est l'objet du point suivant.

### **I.3. ADAPTATION MOLECULAIRE A L'HYPOXIE**

Pour pouvoir fonctionner correctement, une cellule doit être capable de réagir de manière dynamique aux changements survenant dans son environnement. Un des changements le plus fréquent est la variation de la pression partielle en oxygène.

Comme nous venons de le signaler, une diminution de la tension en oxygène va conduire la cellule à modifier de façon drastique l'expression de plusieurs gènes (Fandrey, 1995).

Parmi ceux-ci, nous étudierons d'abord plus particulièrement l'expression du gène de l'érythropoïétine (Epo), qui a conduit à la découverte du facteur de transcription HIF-1. Nous préciserons ensuite les caractéristiques moléculaires de ce facteur ainsi que les hypothèses concernant sa régulation. Enfin, nous terminerons par la description de quelques gènes dont l'expression est augmentée par l'hypoxie.

#### **I.3.1. Expression du gène Epo et découverte de HIF-1**

En temps qu'accepteur terminal d'électrons dans la chaîne respiratoire mitochondriale, l'oxygène est essentiel à la vie des organismes supérieurs. Un des mécanismes d'adaptation d'un organisme à l'hypoxie le plus étudié est l'augmentation de la production d'érythrocytes, conduisant à une élévation de la capacité de transport de l'oxygène.

Cette réponse est médiée par l'érythropoïétine, une hormone glycoprotéique synthétisée au niveau du rein et du foie et qui est responsable chez les mammifères de la genèse des érythrocytes (Semenza, 1994). Le stimulus déclenchant cette expression du gène Epo n'est pas la concentration en hémoglobine elle-même mais le résultat d'une diminution de l'approvisionnement des tissus en oxygène, c'est-à-dire l'hypoxie (Fandrey, 1995).

#### ◆ *Modèle cellulaire*

L'étude moléculaire des mécanismes déclenchant la production d'érythropoïétine a nécessité la mise au point d'un modèle adéquat de culture cellulaire. Parmi les nombreuses lignées cellulaires dérivées des reins, aucune ne montrait une expression d'Epo régulée par l'oxygène. Cependant, deux lignées cellulaires hépatiques humaines (Hep3B et HepG2) démontraient cette propriété (Semenza, 1994).

Des extraits nucléaires préparés à partir de cellules Hep3B hypoxiques montrent en effet un taux de transcription du gène Epo plus élevé que ceux préparés à partir de cellules normoxiques. De plus, cette induction transcriptionnelle est bloquée par un pré-traitement des cellules à la cycloheximide, un inhibiteur de la traduction (Semenza & Wang, 1992). Ces résultats suggèrent qu'en réponse à l'hypoxie, au moins un facteur nucléaire est activé, et ceci par un processus nécessitant la synthèse de nouvelles protéines.

L'étude de ce facteur nucléaire modulant la transcription du gène Epo passe tout d'abord par l'identification des séquences régulatrices de ce gène.

#### ◆ *Identification des séquences régulatrices du gène EPO*

L'utilisation de souris transgéniques exprimant le gène Epo humain ainsi que la construction de gènes rapporteurs ont permis à Semenza et ses collaborateurs de mettre en évidence un site "hypersensible" à la DNase I au niveau d'une région activatrice en position 3' du gène de l'érythropoïétine (Guillemin & Krasnow, 1997).

Ces sites hypersensibles, caractérisés par un réarrangement de la chromatine, constituent des éléments cis, cibles potentielles pour les facteurs de transcription. L'étape suivante a donc été la localisation exacte de ce site.

L'induction du gène de l'érythropoïétine par l'hypoxie est liée à la présence d'une séquence de 50 paires de bases situées en amont du site de polyadénylation. Cette séquence HRE (Hypoxia Response Element) possède trois sites de liaison pour des facteurs nucléaires.

Il fut ensuite montré, par mutagenèse, que les motifs 4-12 et 19-23 de ce fragment de 50 pb étaient absolument nécessaires à la réponse hypoxique, tandis qu'une délétion des motifs 34-50 réduisait seulement d'une moitié cette activité "enhancer" (Semenza & Wang, 1992).

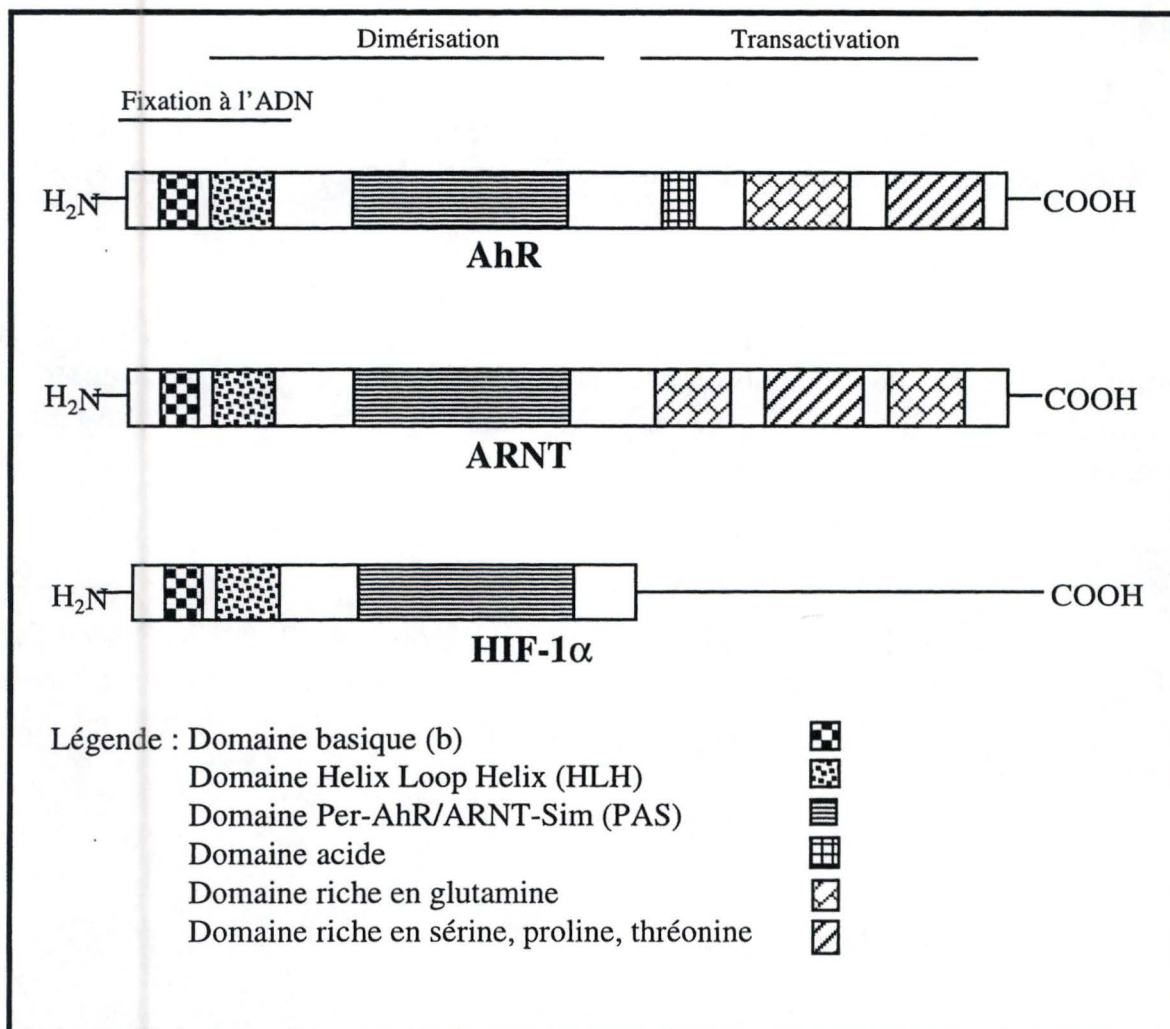
Les facteurs de transcription se liant aux motifs 4-12 et 19-23 sont donc indispensables pour une expression de Epo lors d'une diminution de la tension en oxygène. Par contre, le facteur se liant aux motifs 26-48 modulerait cette réponse hypoxique.

#### ◆ *Identification de HIF-1*

Semenza et son équipe ont mis en évidence la liaison de deux facteurs nucléaires au site 1 (nt 4-12) et au site 2 (nt 19-23). Un de ces facteurs (celui se liant au site 2) semble être exprimé de façon constitutive. Par contre l'autre n'est présent que dans les extraits nucléaires de cellules incubées sous hypoxie et fut nommé HIF-1 (Hypoxia-Inducible Factor-1). Cependant, la réponse hypoxique nécessite la coopération de ces deux facteurs. Le site 3 (nt 34-50) montre une homologie de séquence avec la famille des récepteurs à hormones stéroïdiennes (Semenza & Wang, 1992).

La réponse hypoxique est bloquée lorsque les cellules sont pré-traitées avec de la cycloheximide, indiquant qu'une synthèse protéique est nécessaire à





**Figure I.7 :** Représentation schématique des domaines fonctionnels de protéines de la famille bHLH-PAS (D'après Wang *et al.*, 1995).

l'activité du facteur HIF-1 (Wang & Semenza, 1993a). Les inhibiteurs de kinases tel que l'aminopurine ainsi que le traitement aux phosphatases suppriment également l'induction hypoxique, soulignant le rôle d'une ou plusieurs protéines kinases lors de l'activation de HIF-1.

La liaison de HIF-1 à sa séquence cible est détectable quinze minutes après le début de l'hypoxie (1% O<sub>2</sub>) et atteint un maximum après quatre heures. La dégradation post-hypoxique est très rapide : l'activité liante de HIF-1 est indécélable après quinze minutes d'oxygénation (20% O<sub>2</sub>). Cette cinétique montre l'importance de l'absence de l'oxygène pour l'activité de ce facteur (Wang & Semenza, 1993a).

Il est important de préciser à ce moment que HIF-1 a non seulement été mis en évidence dans les cellules du foie mais aussi dans toute une série de types cellulaires n'exprimant pas Epo, y compris les cellules endothéliales (Wang & Semenza, 1993b).

N.B. : Un autre moyen que l'hypoxie d'induire l'activation de HIF-1 et ainsi d'augmenter la production d'érythropoïétine est l'utilisation de certains métaux de transition. Ainsi, lorsque les cellules sont stimulées en présence de quantités croissantes de CoCl<sub>2</sub>, on observe une expression de plus en plus grande du gène Epo similaire à celle observée lors d'une situation hypoxique (Wang & Semenza, 1993b). Le mécanisme par lequel le cobalt active HIF-1 est encore une énigme. Il semblerait que le senseur à oxygène en aval de HIF-1 soit une protéine à groupement hémique. Le cobalt substituerait le fer dans la protéine, la bloquant ainsi dans une conformation déoxy mimant de ce fait l'hypoxie.

### I.3.2. Structure et régulation de HIF-1

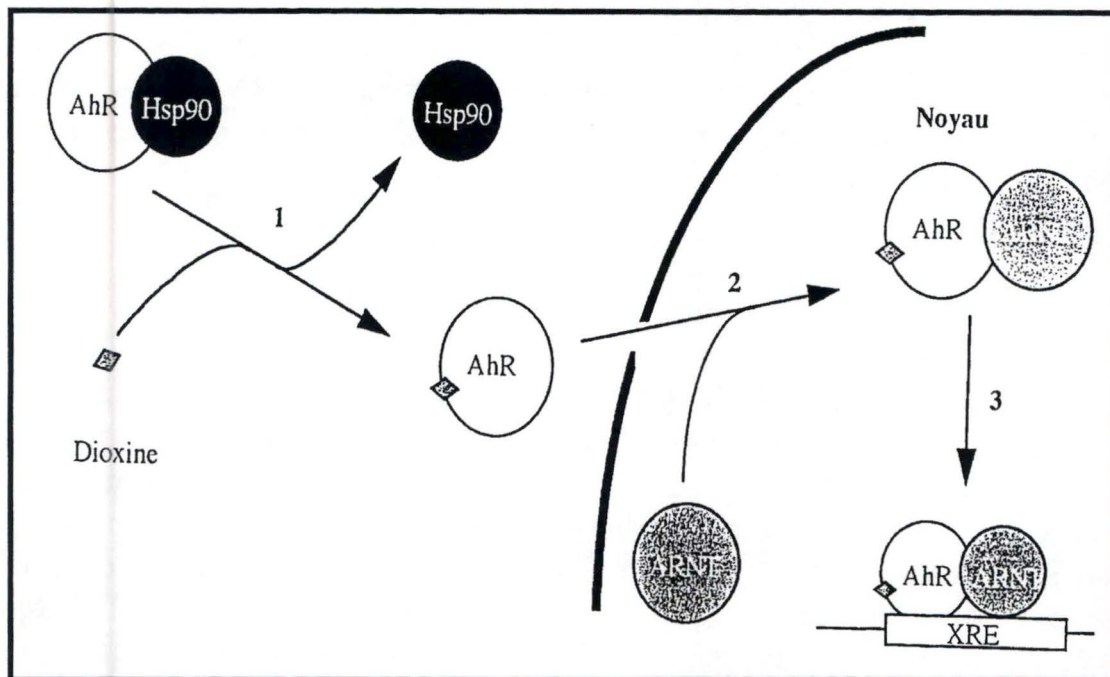
HIF-1 est un hétérodimère composé de deux sous-unités : HIF-1 $\alpha$  et ARNT (Aryl Receptor Nuclear Translocator), toutes deux appartenant à la famille des facteurs trans **bHLH** (basic Helix Loop Helix)-**PAS** (Per Ahr /ARNT Sim) (Wang *et al.*, 1995) (figure I.7).

Les résidus basiques sont responsables de l'interaction avec l'ADN tandis que la région HLH joue un rôle dans la formation de dimères. Le domaine PAS participe quant à lui, aussi bien à la dimérisation qu'à la liaison avec d'autres ligands. Cette famille comprend les protéines PER (period) et SIM (single minded) identifiées chez la drosophile, ainsi que deux facteurs de transcription de mammifères : Ahr (Aryl hydrocarbon receptor) et ARNT (Aryl Receptor Nuclear Translocator) modulant la réponse aux xénobiotiques (Withlock *et al.*, 1996).

L'élément-cis cible de HIF-1 correspond à la séquence consensus suivante : 5'(G/C/T)-ACGTGC-(G/T) 3' (Arany *et al.*, 1996) que l'on retrouve, par exemple au sein des enhancers des régions 3' et 5' respectivement des gènes de l'érythropoïétine et du VEGF. Ce motif cis cible tel qu'on le trouve dans la région 3' du gène de l'érythropoïétine est proche physiquement d'une séquence cis du coactivateur transcriptionnel CBP (CREB Binding Protein) connu pour ses interactions avec les facteurs trans de la famille CREB (cAMP Response Element Binding Protein) mais aussi avec d'autres facteurs appartenant à la famille des protéines bHLH-PAS (Arany *et al.*, 1996).

Ainsi, Arany et son équipe ont démontré que l'extrémité C-terminal de HIF-1 $\alpha$  se lie spécifiquement à P300 (Arany *et al.*, 1996). Ce dernier et CBP sont deux adaptateurs transcriptionnels homologues participant à de nombreux processus biologiques tels que l'arrêt du cycle cellulaire, la différenciation et l'activation transcriptionnelle. P300/CBP joueraient un rôle dans le réarrangement de la chromatine et pourraient, par ce fait, faciliter l'accessibilité de HIF-1 à sa séquence cible.

Le facteur nucléaire ARNT partenaire de HIF-1 $\alpha$  interagit avec d'autres facteurs trans dans diverses voies d'activation transcriptionnelle. Ainsi, l'hétérodimère AhR/ARNT est un activateur de la transcription de gènes codant pour des protéines impliquées dans la détoxification des xénobiotiques. Parmi ces gènes, on trouve par exemple CYP1A1 de la famille des cytochromes P450 (Whitlock *et al.*, 1996).

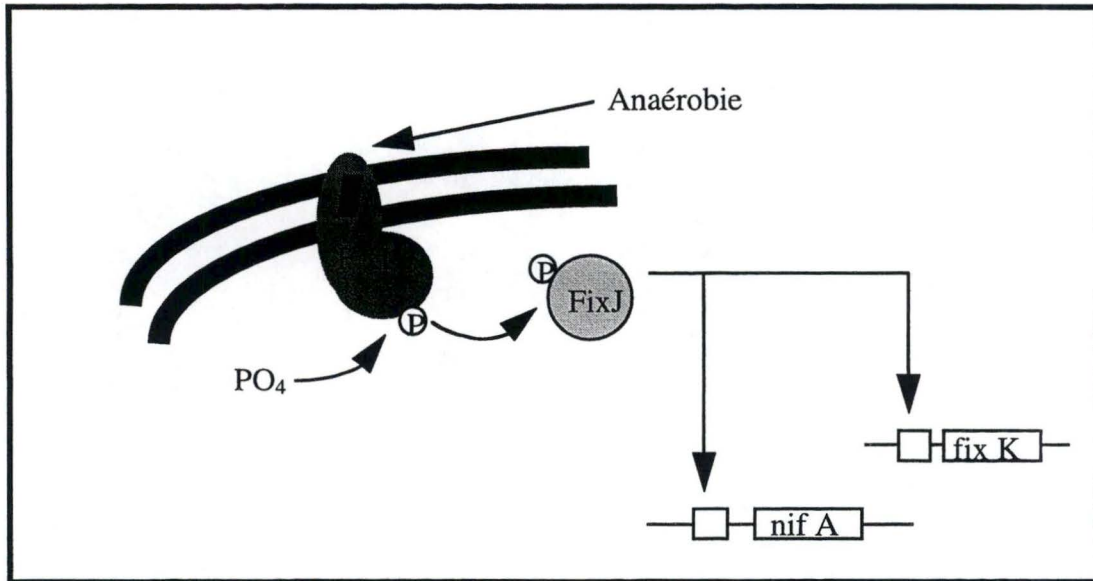


**Figure I.8 :** Représentation schématique du système AhR/ARNT (Whitlock *et al.*, 1996)

1 : Le facteur trans AhR est associé sous forme cytosolique inactive à la chaperonne Hsp90. La fixation d'une dioxine sur AhR entraîne sa dissociation de Hsp90.

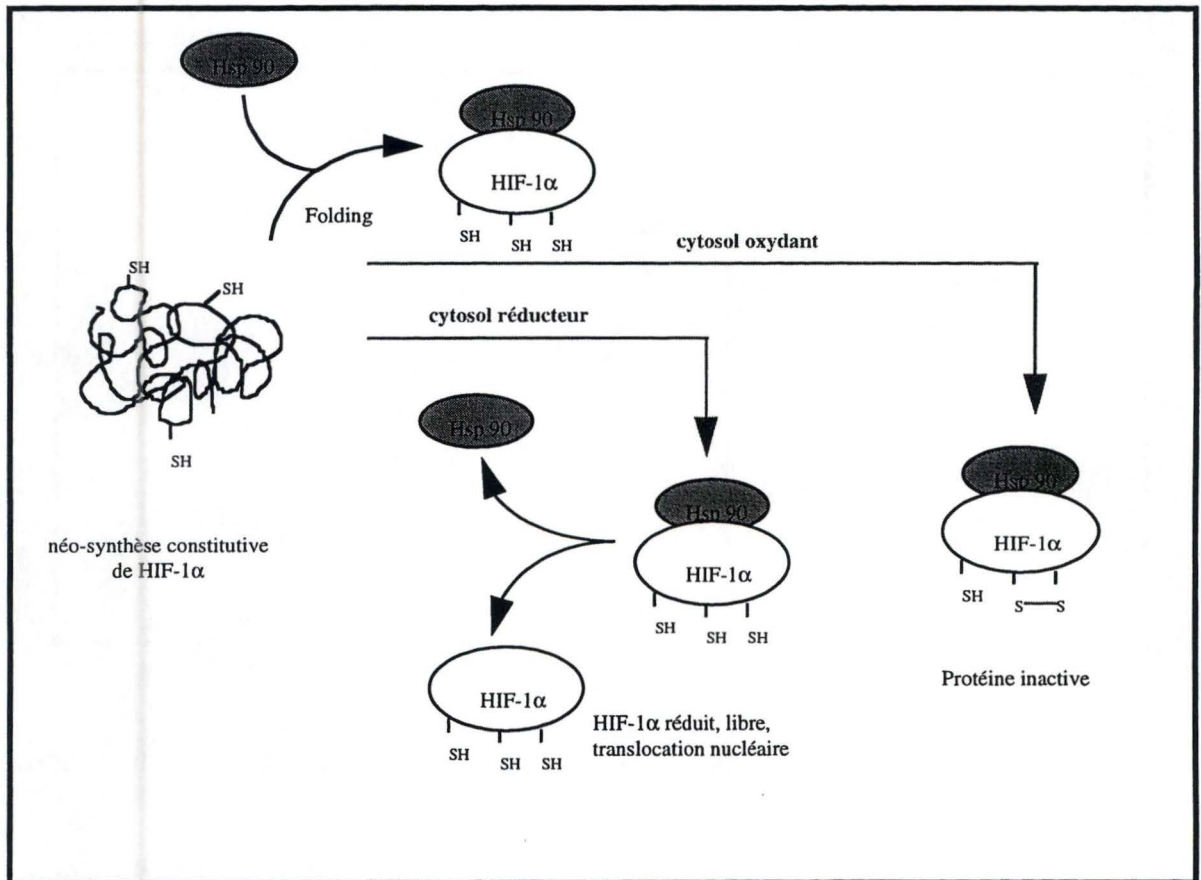
2 : AhR est alors transloquée dans le noyau où elle s'associe à ARNT pour former un hétérodimère actif.

3 : Le complexe transactivateur se fixe alors sur les éléments cis de type XRE (Xenobiotic Response Element).



**Figure I.9 :** Représentation schématique du système bactérien à deux composantes (Semenza & Wang, 1992).

En conditions anaérobies, le groupement hémique du senseur membranaire FixL se trouve sous forme déoxy. Le domaine intracellulaire de FixL s'autophosphoryle alors sur une histidine; ce phosphate est ensuite transféré sur l'opérateur transcriptionnel FixJ. FixJ phosphorylé est actif et induit l'expression des gènes impliqués dans la fixation de l'azote.



**Figure I.10** : Hypothèse de la régulation redox de HIF-1 (Huang *et al.*, 1996).

En conditions de normoxie, le cytosol est oxydant. Au cours, ou suite au folding de HIF-1 $\alpha$ , les cystéines de la protéine sont oxydées et la formation de ponts disulfures inactiverait HIF-1 $\alpha$ . En condition d'hypoxie, le maintien des groupements sulfhydryls sous forme réduite permettrait l'activation de HIF-1 $\alpha$  et sa translocation nucléaire (Wang *et al.*, 1995; Huang *et al.*, 1996).

En l'absence de toxine, le monomère AhR est associé dans le cytosol à une chaperonne : HSP 90 (Heat Shock Protein 90). C'est la fixation du xénobiotique sur AhR qui permet sa dissociation de HSP 90 et sa translocation nucléaire (figure I.8) (Whitlock *et al.*, 1996). Dès lors, il est probable que les mécanismes d'activation de HIF-1 $\alpha$  impliquent sa dissociation d'une chaperonne. Si c'est le cas, plusieurs hypothèses compatibles entre elles sont possibles :

- La phosphorylation de HIF-1 $\alpha$  par une kinase dépendante d'une voie qui n'est pas encore identifiée permettrait sa translocation nucléaire en séparant HIF-1 $\alpha$  de HSP 90. Semenza et son équipe ont d'ailleurs montré que HIF-1 devait être phosphorylé pour être actif (Wang & Semenza, 1993a). Parmi les modèles de transduction du signal induit par l'hypoxie, on ne connaît actuellement que le mécanisme bactérien de *Rhizobium meliloti* (Guillemin & Krasnow, 1997), utilisant une histidine kinase à groupement hémique activé si l'hème se présente sous forme déoxy (figure I.9). Aucune donnée de ce genre n'est reportée chez les eucaryotes.
- En condition de normoxie, le cytosol étant oxydant, les cystéines de HIF-1 $\alpha$  sont sous forme oxydée (Huangs *et al.*, 1996), ce qui déstabiliserait la protéine ou le complexe HIF-1 $\alpha$  / HSP 90 qui serait alors dégradée par un système de type protéasome. En hypoxie, le cytosol devient réducteur, ce qui pourrait stabiliser HIF-1 $\alpha$ , permettant sa translocation nucléaire (figure I.10).

Ces deux hypothèses supposent une expression constitutive de HIF-1 $\alpha$ . Les expériences de Semenza et Wang (Wang *et al.*, 1995) sur diverses lignées hépatocytaires montrent une expression constitutive faible de l'ARNm codant pour HIF-1 $\alpha$  avec une forte induction sous hypoxie, n'excluant pas la possibilité d'une boucle de rétroaction positive de HIF-1 sur sa propre transcription.

Au contraire, les résultats exposés par Huang et Bunn montrent une expression constitutive élevée de l'ARNm codant pour HIF-1 $\alpha$  en normoxie

Hypoxia-inducible gene	Species	Location	HIF-1 binding site	Function	Reference
erythropoietin	human	3'FS +3065/+3082	gccc TACGTGCTGT ctca	+	Wang <i>et al.</i> , 1993b
erythropoietin	mouse	3'FS +359/+376	gccc TACGTGCTGC ctcg	+	Firth <i>et al.</i> , 1994
erythropoietin	human	5'FS -163/-180	tgca GACGTGCGTG tggg	+	Semenza <i>et al.</i> , 1994
phosphofructokinase L	mouse	IVS1 +346/+361	ggcg TACGTGCTGC ag	+	Semenza <i>et al.</i> , 1994
aldolase A	human	5'FS -184/-201	ctcg GACGTGACTC ggac	+	Semenza <i>et al.</i> , 1996
aldolase A	human	IVS4 +124/+141	tctt CACGTGCGGG gacc	-	Semenza <i>et al.</i> , 1994
phosphoglycerate kinase I	human	5'FS -173/-190	gtga GACGTGCGGG ttcc	+	Semenza <i>et al.</i> , 1994
phosphoglycerate kinase I	human	5'FS -206/-189	gccg GACGTGACaa acgg	N.D.	Semenza <i>et al.</i> , 1996
phosphoglycerate kinase I	mouse	5'FS -290/-307	ttgt CACGTcCTGC acga	+	Firth <i>et al.</i> , 1994
phosphoglycerate kinase I	human	5'UT +30/+13	tgcc GACGTGCGCT ccgg	N.D.	Semenza <i>et al.</i> , 1994
enolase I	human	5'FS -590/-607	ggcg CACGTGCGCC gcct	-	Semenza <i>et al.</i> , 1994
enolase I	human	5'FS -413/-396	gccg GACGTGCGCC ccca	-	Semenza <i>et al.</i> , 1996
enolase I	human	5'FS -386/-369	tgag TCGTGCGGG actc	+	Semenza <i>et al.</i> , 1996
enolase I	human	5'FS -368/-351	ggag TACGTGACGG agcc	+	Semenza <i>et al.</i> , 1996
lactate dehydrogenase A	mouse	5'FS -89/-72	ccta CACGTGGGTT cccg	+	Firth <i>et al.</i> , 1995
lactate dehydrogenase A	mouse	5'FS -62/-79	agcg GACGTGCGGG aacc	+	Firth <i>et al.</i> , 1995
glucose transporter I	mouse	5'FS +273/+290	caca GCGTGCCGT ctga	+	Ebert <i>et al.</i> , 1995
vascular endothelial growth factor	human	5'FS -978/+961	tgca TACGTGGGCT ccaa	+	Liu <i>et al.</i> , 1995
vascular endothelial growth factor	rat	5'FS +61/+78	tgca TACGTGGGCT tcca	+	Levy <i>et al.</i> , 1995
inducible nitric oxide synthase	human	5'FS -229/-212	tgac TACGTGCTGC ctga	+	Melillo <i>et al.</i> , 1995
retrotransposon VL30	rat	5'FS -101/-113	agag TACGTGCTa	+	Estes <i>et al.</i> , 1995
heme oxygenase I	mouse	5'FS +322/+339	agcg GACGTGCTGG cgtg	+	Lee <i>et al.</i> , 1997
heme oxygenase I	mouse	5'FS +350/+333	agag GACGTGCCaC gccA	+	Lee <i>et al.</i> , 1997
transferrin	human	5'FS -201/-184	gaaa TACGTGCCCT tLgt	+	Rolfs <i>et al.</i> , 1997
transferrin	human	5'FS -185/-168	tggtg TACGTGCaGG aaag	+	Rolfs <i>et al.</i> , 1997

Tentative HIF-1 consensus DNA recognition site:

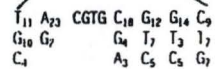


Fig. 2 Compilation of HIF-1 DNA Binding Sites. Nucleotides that match the tentative HIF-1 consensus DNA binding sequence are in capitals. The core motif is in bold face. Note that the mouse phosphoglycerate kinase I HIF-1 site corresponds to the complementary human site shown above it; mismatches to the tentative consensus site were found in both cases. Cases where binding of HIF-1 to the corresponding sites leads to functional upregulation of a reporter gene are marked by a (+) sign. HIF-1 binding sites that are, despite proven HIF-1 binding, transactivation-inactive are marked by a (-) sign. FS, flanking sequence; IVS, intervening sequence; UT, untranslated; N.D., not determined.

Figure I.11 : Gènes induits et activés par HIF-1 (D'après Wenger & Gassman, 1997).



comme en hypoxie dans d'autres types cellulaires, comme par exemple les cellules HeLa (Huang *et al.*, 1996).

Ces premiers résultats sur HIF-1 montrent qu'il existe un mécanisme d'adaptation moléculaire agissant sur la régulation de l'expression des gènes qui est déclenché dans des conditions d'hypoxie, même si la régulation fine de ce mécanisme reste jusqu'à présent toujours obscure.

Après cette description des caractéristiques structurales et fonctionnelles du facteur de transcription HIF-1, nous allons nous intéresser à quelques gènes régulés par l'oxygène.

### **I.3.3. Gènes régulés par l'oxygène (Bunn & Poyton, 1996)**

Comme énoncé précédemment, HIF-1 est un facteur de transcription ubiquiste. Il est en effet exprimé dans de nombreux types cellulaires et module l'expression de toute une série de gènes dont l'Epo, le VEGF, ainsi que plusieurs gènes responsables du métabolisme du glucose via la glycolyse (figure I.11).

#### ◆ *Vascular endothelial growth factor (VEGF)*

Le VEGF est un facteur de croissance spécifique, ayant pour cible les cellules endothéliales et pouvant être produit par de nombreux types cellulaires y compris les cellules endothéliales. Le VEGF intervient dans l'angiogénèse et est responsable de la néovascularisation de tissus hypoxiques, dont notamment la vascularisation des nodules tumoraux impliqués directement dans les phénomènes de métastases.

Liu et ses collaborateurs ont identifié, en amont de ce gène, une séquence activatrice homologue à l'élément cis cible de HIF-1 (Liu *et al.*, 1995).

Cependant, il apparaît que la réponse hypoxique de VEGF nécessite non seulement cette séquence conservée de HIF-1 mais aussi les régions flanquantes; ces dernières pouvant être la cible d'autres facteurs. Par ailleurs, une augmentation de la stabilité de l'ARNm codant pour VEGF a été observée en conditions hypoxiques. Il est donc probable que plusieurs éléments contribuent à la régulation hypoxique du VEGF humain.

◆ *Gènes responsables du métabolisme du glucose*

La production d'énergie dans une cellule dépend de l'utilisation ordonnée d'une part des nutriments (glucose et acides gras) et d'autre part de l'oxygène. Lorsque la disponibilité du glucose et de l'oxygène est adéquate, la glycolyse fournit le pyruvate qui est ensuite métabolisé par le cycle des acides tricarboxyliques (cycle de Krebs) pour fournir des molécules énergétiques telles que l'adénosine triphosphate (ATP). Or, le métabolisme du glucose dépend essentiellement de son transport à travers la cellule et de l'activité de trois enzymes : l'hexokinase, la phosphofructokinase et la pyruvate kinase.

Lorsque la quantité de glucose est limitante, la gluconéogénèse prend le relais principalement par l'activation de trois autres enzymes : la glucose-6-phosphatase, la fructose-1-6-biphosphatase et la phosphoénol pyruvate carboxylase.

Il est donc intéressant de comprendre la manière donc l'hypoxie régule les gènes responsables de l'entrée du glucose dans la cellule ainsi que ceux influençant la balance glycolyse-gluconéogénèse.

a) Glucose transporter-1

Comme vu précédemment, l'hypoxie entraîne un déséquilibre de la balance énergétique. Cela provoque une diminution dramatique de la concentration en ATP. Les cellules tentent alors de compenser le manque

d'énergie en stimulant la glycolyse. Cependant, celle-ci ne peut fournir que deux molécules d'ATP par molécule de glucose, soit dix-huit fois moins que pour les chaînes de phosphorylations oxydatives. La survie cellulaire en hypoxie va donc dépendre de la capacité de la cellule à métaboliser le glucose uniquement via la glycolyse.

L'importation de glucose dans les cellules intestinales et rénales est couplée à la rentrée d'ions  $\text{Na}^+$  dans la cellule. Les ions  $\text{Na}^+$  qui atteignent le cytoplasme par ce système de symport sont réexportés par la  $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ . Le transport du glucose chez les autres types cellulaires se fait via des canaux par simple diffusion.

Parmi les différentes isoformes de transporteurs existant, GLUT-1 semble être responsable de l'importation basale et constitutive du glucose dans toute une série de types cellulaires dont les cellules endothéliales. L'induction de GLUT-1 lors d'une hypoxie permet aux cellules de maintenir leur production énergétique via une importation massive du glucose. La transcription du gène GLUT-1 répond non seulement à l'hypoxie via l'activation de HIF-1 (Behrooz & Beigi, 1996) mais également à toute une série de stimuli (cytokines, mitogènes, esters de phorbol, ...). La régulation de ce transporteur est complexe et dépend certainement d'un ensemble d'interactions entre éléments cis et facteurs trans dont fait partie GLUT-1.

## b) Enzymes de la glycolyse

La régulation des gènes encodant les enzymes glycolytiques est complexe et pas encore entièrement comprise. L'effet de l'hypoxie sur l'expression de ces gènes varie d'après le type cellulaire et peut contribuer à une adaptation de la cellule face à un stress. Les cellules endothéliales microvasculaires de l'aorte ou des artères pulmonaires tolèrent mieux l'hypoxie que les autres types cellulaires (fibroblastes, cellules musculaires lisses) et ceci en maintenant un taux élevé de molécules énergétiques (ATP, GTP) (Tetryakov & Farber, 1995).

L'analyse des éléments-cis des gènes de la glycolyse conforte l'idée d'une régulation par l'hypoxie. La séquence consensus de HIF-1 est présente à l'extrémité 5' des gènes de la phosphoglycérate kinase 1, de l'énolase 1 et de l'aldolase A chez l'homme ainsi que la lactate déhydrogénase A et la phosphofructokinase L chez la souris (Semenza *et al.*, 1996).

### c) Enzymes de la gluconéogénèse

Il est probable que la balance énergétique entre glycolyse et gluconéogénèse soit déterminée par de subtiles perturbations métaboliques. Le modèle de la "zonation métabolique" propose un gradient anatomique au niveau des lobules hépatiques basé sur la teneur en oxygène. Dans la zone oxygénée (zone périportale), l'expression de phosphoénolpyruvate carboxylase est préférentiellement stimulée favorisant la gluconéogénèse. Par contre, dans la zone hypoxique (zone périveineuse), ce sont les gènes responsables de la glycolyse qui sont activés, soit l'hexokinase et la pyruvate kinase.

L'ensemble de ces mécanismes joue donc un rôle adaptateur pour la cellule et le tissu soumis à l'hypoxie, orientant son métabolisme énergétique vers la voie de la glycolyse et favorisant l'oxygénation du tissu par néovascularisation.

Une meilleure compréhension des mécanismes par lesquels l'hypoxie active HIF-1 va dépendre non seulement de l'identification des kinases responsables de sa phosphorylation mais aussi du rôle que l'état rédox de la cellule joue dans l'activation de HIF-1. D'autres facteurs tels que la régulation de la séquestration de la sous-unité HIF-1 $\alpha$  dans le cytoplasme ou de sa dégradation par un système de type protéasome ne sont pas à exclure et doivent être étudiés de manière approfondie.

## I.4. BUT DU MEMOIRE

Comme nous venons de le décrire, il existe un mécanisme d'adaptation moléculaire agissant sur la régulation de l'expression des gènes suite à des conditions d'hypoxie. Cette expression différentielle de certains gènes lors d'une exposition à une hypoxie est médiée par l'activation de facteurs de transcription spécifiques, le plus typique étant HIF-1. Si HIF-1 commence à bien être décrit, la régulation de son expression et de son activité reste par contre assez floue.

Le but de ce mémoire était de mieux comprendre le rôle du facteur de transcription HIF-1 dans l'adaptation métabolique des cellules endothéliales à l'hypoxie. La plupart des travaux étudiant l'activation du facteur de transcription HIF-1 ont été réalisés à partir de lignées cellulaires dérivées du foie. L'originalité de ce travail réside dans le fait que ce travail a été réalisé sur des cellules endothéliales. Les cellules endothéliales sont en effet les premières à souffrir d'une déficience de l'apport en oxygène aux tissus. Elles sont donc un modèle de choix pour toute une série de travaux effectués au laboratoire concernant les phénomènes hypoxiques tels que ceux impliqués dans le développement des veines variqueuses et dans l'athérosclérose.

Pratiquement, nous avons suivi l'activité de HIF-1 par la technique de retard sur gel ou EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay). La mise au point de cette technique fait l'objet de la première partie du travail. Ensuite, l'expression de la sous-unité sensible à l'hypoxie de HIF-1, HIF-1 $\alpha$  et celle d'un gène, dont la transcription est régulée par HIF-1, le VEGF ont été suivies par RT-PCR. Nous avons ainsi pu mettre en parallèle l'induction dans le temps de l'activation de HIF-1, de l'induction du gène VEGF et de l'activité métabolique globale reflétée par le contenu en ATP des cellules.

L'ensemble des résultats obtenus nous permet de proposer un mécanisme d'adaptation moléculaire des cellules HMEC-1 à l'hypoxie.

# **Matériel et méthodes**

## II. MATERIEL ET METHODES

### II.1. ASPECT CELLULAIRE

#### II.1.1. Culture cellulaire

##### *A. Matériel*

- Les cellules :

Les cellules HMEC-1 (Human Microvascular Endothelial Cells) sont des cellules endothéliales microvasculaires humaines transformées par l'antigène grand T du virus SV40. Cette lignée a été mise au point par le professeur Thomas Lawley, directeur du Département de Dermatologie à l'Université d'Emory (Atlanta, USA). Les cellules HMEC-1 gardent les propriétés morphologiques, phénotypiques et fonctionnelles des cellules endothéliales microvasculaires (Ades *et al*, 1992).

- Les solutions :

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

. MCDB-131 + sérum : milieu MCDB-131 enrichi par 15 % de sérum de veau fœtal (Gibco, Paisley, Grande-Bretagne). On ajoute à ce milieu de l'EGF (10 ng/ml), de l'hydrocortisone (1 µg/ml) ainsi que de la glutamine 10 mM (36,5 mg / 500 ml).

##### *B. Méthode*

Les cellules sont cultivées dans des boîtes de culture de 75 cm<sup>2</sup> (T75, Nunc Intermed, Roskilde, Danemark). Lorsqu'elles arrivent à confluence, c'est-à-dire quand leur densité moyenne est de 120000 cellules/cm<sup>2</sup>, on les repique dans deux ou quatre boîtes T75.

Les milieux utilisés sont préchauffés à 37°C. L'ancien milieu est décanté et les cellules sont rincées avec 10 ml d'un milieu sans sérum. Après deux minutes, ce milieu est retiré de la boîte de culture et 2 ml de trypsine-EDTA sont ajoutés. Lorsque les cellules se sont arrondies, la trypsine est décantée et l'on remet 2 ml de trypsine durant une à deux minutes à température ambiante, ce qui va permettre d'accélérer leur détachement de la paroi. L'évolution du détachement cellulaire est suivie en microscopie optique (Zeiss, Allemagne).

Lorsque la majorité des cellules se sont détachées, 6 ml de MCDB 131 contenant 15 % de sérum sont ajoutés : le sérum contient des inhibiteurs de protéases, la trypsine est inactivée et l'on peut récupérer les cellules dans un tube à centrifuger (Stérilin, Festham, Grande-Bretagne).

Les cellules sont alors centrifugées pendant 10 minutes à 1000 rpm, resuspendues dans un volume de milieu adéquat et transférées dans des boîtes de culture T75. Le volume de milieu est porté à 15 ml par T75. Les boîtes de culture sont finalement incubées dans une étuve à 37°C (95 % d'air humide et 5 % de CO<sub>2</sub>). Les cellules sont repiquées lorsqu'elles sont arrivées à confluence et forment une monocouche cellulaire.

### **II.1.2. Incubation sous hypoxie et extraction des protéines nucléaires**

Une fois à confluence, les cellules repiquées selon la méthode décrite au point précédent, sont prêtes pour l'incubation sous hypoxie ou en normoxie.

#### *A. Matériel*

##### - Milieu modifié :

Le milieu employé lors des incubations sous hypoxie est du milieu CO<sub>2</sub> indépendant (Gibco, Paisley, Grande-Bretagne) auquel on ajoute 2 % de sérum et 7,3 mg de glutamine pour 100 ml.

- HBSS (Hank's Balanced Salt Solution): (Merck, Darmstadt, Allemagne)
  - . NaCl 140 mM



- . glucose 5,5 mM
- . KCl 5 mM
- . MgSO<sub>4</sub> 0,8 mM
- . MgCl<sub>2</sub> 1 mM
- . Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3 mM
- . KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,4 mM

Juste avant l'emploi on ajoute du CaCl<sub>2</sub> à une concentration finale de 1 mM et la solution est ajustée à pH 7,35

- CoCl<sub>2</sub> 125 μM
- Tampons de lyse destinés à extraire les protéines nucléaires :

#### TAMPON A :

- . HEPES 10 mM (Janssen Chimica, Beerse, Belgique)
- . KCl 10 mM (Merck, Darmstadt, Allemagne)
- . EDTA 0,1 mM (Titriplex, Merck, Darmstadt, Allemagne)
- . EGTA 0,1 mM (E-4378, Sigma Chemical, Saint-Louis, USA)
- . DTT 1 mM (dithiothréitol, D-8024, Sigma Chemical, Saint-Louis, USA)
- . Péfablox 100 mM (Boehringer Mannheim, Mannheim, Allemagne)

#### TAMPON B :

- . HEPES 20 mM (Janssen Chimica, Beerse, Belgique)
- . NaCl 0,4 mM (Merck, Darmstadt, Allemagne)
- . EDTA 1 mM (Titriplex, Merck, Darmstadt, Allemagne)
- . EGTA 1 mM (E-4378, Sigma Chemical, Saint-Louis, USA)
- . DTT 1 mM (dithiothréitol, D-8024, Sigma Chemical, Saint-Louis, USA)
- . Péfablox 100 mM (Boehringer Mannheim, Mannheim, Allemagne)

N.B. : Le DTT et le péfablox sont ajoutés juste avant l'emploi.

#### *B. Méthode*

- Incubation sous hypoxie :

Pour les incubations sous hypoxie, le milieu des cellules à confluence dans des boîtes T75 est décanté et les cellules sont ensuite couvertes par 4 ml de milieu modifié. Les boîtes ouvertes, sont ensuite placées dans un incubateur où

règne une atmosphère composée à 100 % en azote (créée par un flux de 5 min) et incubées à 37 °C sur un agitateur mécanique. La hauteur de la solution physiologique au dessus des cellules est très importante. Elle doit être réduite à un fin film afin de faciliter la diffusion des gaz atmosphériques tout en empêchant la dessiccation des cellules. Des boîtes contrôles sont incubées dans les mêmes conditions mais dans une atmosphère normale ou normoxie.

N.B. : on peut réaliser une hypoxie chimique en ajoutant du  $\text{CoCl}_2$  dans le milieu de culture des cellules (125  $\mu\text{l}$  de  $\text{CoCl}_2$  15 mM pour 15 ml de milieu, soit 125  $\mu\text{M}$  final).

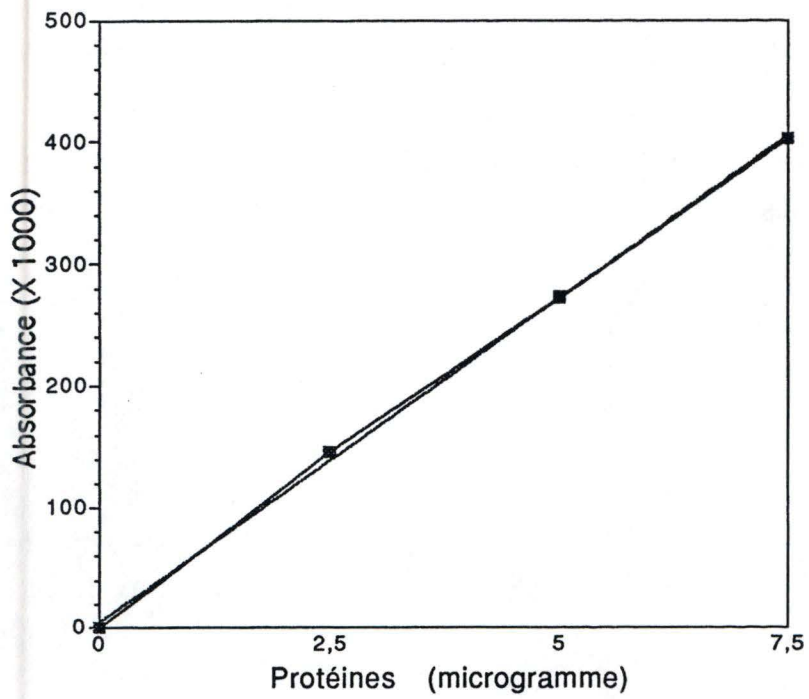
- Extraction de la fraction nucléaire :

Après l'incubation en normoxie sous hypoxie, les boîtes sont décantées et rincées deux fois avec 5 ml d'HBSS à température ambiante, puis à nouveau décantées. Les boîtes sont alors mises sur glace (4°C) et 2 ml de tampon A sont ajoutés. Après 5 minutes sur glace, 125  $\mu\text{l}$  de NP-40 10% sont rajoutés et les boîtes sont maintenues à 4°C pendant 10 min. Pour chaque boîte, les cellules sont raclées et récoltées dans un eppendorf. Lorsque tous les eppendorfs sont prêts, ils sont centrifugés 1 minute à 13000 rpm pour culotter les cellules. Le surnageant est alors éliminé et le culot resuspendu dans 50 $\mu\text{l}$  de tampon C. Après 15 secondes de sonication à 4°C et une centrifugation de 5 min à 13000 rpm, la fraction nucléaire (le surnageant) est récupérée. 10  $\mu\text{l}$  sont aliquotés séparément afin de réaliser un dosage de protéines selon la méthode de Bradford (Bradford, 1976). Le reste est congelé à -70°C.

### **II.I.3. Dosage des protéines selon la méthode de Bradford :**

#### *A. Matériel*

- Etalon SAB (1,45mg/ml) : Serum Albumin Bovine (Bio-Rad, Richmond, USA)
- Colorant : Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, Richmond, USA)
- Extraits cellulaires à doser



$$f(x) = 1,334000E+2 \cdot x + -1,282500E+2$$
$$R^2 = 9,989845E-1$$

**Figure II.1 :** Droite d'étalonnage de la concentration en protéines dosées par la méthode de Bradford.

## *B. Méthode*

On dilue l'étalon à trois concentrations différentes : 2,5 µg/ml, 5 µg/ml et 7,5 µg/ml. On prélève 10 µl de chaque échantillon dont on veut doser les protéines que l'on dilue dans 3,2 ml d'eau distillée.

Le spectrophotomètre est réglé comme suit : la longueur d'onde est fixée à 595 nm et l'absorbance est réglée sur 0 en mettant de l'eau distillée dans la cuvette de lecture.

On prélève 3 fois 800 µl de chaque échantillon (blanc, étalons, échantillons à doser) auxquels on ajoute de minute en minute 200 µl de colorant en commençant par les blancs (eau distillée) et on laisse incubé pendant 5 minutes à température ambiante. Après cette incubation, on lit l'absorbance à une longueur d'onde de 595 nm.

Les moyennes des absorbances des 3 concentrations de l'étalon servent à tracer une droite d'étalonnage dont l'équation va permettre de déterminer la concentration en protéines des échantillons que l'on a dosé (figure II.1).

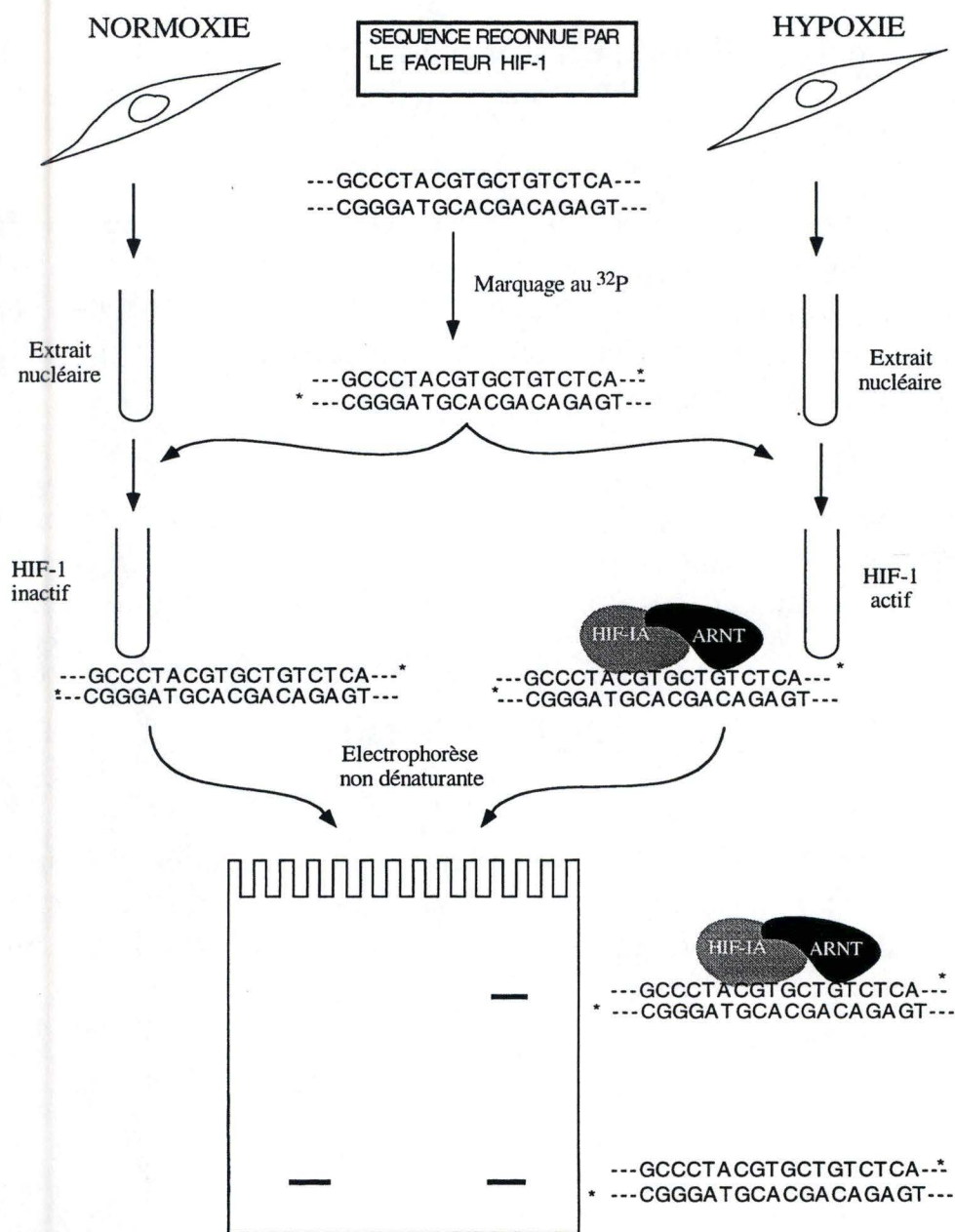
### **II.1.4. Mesure de la viabilité cellulaire**

La mesure de la viabilité cellulaire après une incubation sous hypoxie ou en normoxie, est réalisée par un test d'exclusion de colorant vital, le bleu Trypan, sur des cellules repiquées à faible densité (Sigma Chemical, Saint-Louis, USA).

#### *A. Matériel*

- Solution de Bleu Trypan (Sigma Chemical, Saint-Louis, USA) diluée 2X
- Boîte de pétri de 60 mm de diamètre (Falcon, Oxford, Grande-Bretagne)

TECHNIQUE DE RETARD SUR GEL.



**Figure II. 2.:** Principe du retard sur gel (ou Electrophoretic Mobility Shift Assay) illustré ici pour le facteur de transcription HIF-1.

## B. Méthode

Les cellules sont repiquées à faible densité (100 000 cellules/boîte). Après une incubation sous hypoxie ou en normoxie, les boîtes sont décantées et les cellules sont couvertes pendant 3 minutes avec 1 ml de bleu Trypan dilué 2X. Les cellules incapables d'exclure ce colorant vital (bleu) sont considérées comme mortes.

Les cellules sont alors comptées et le pourcentage de viabilité est déterminé par la formule suivante :

$$\% \text{ de cellules vivantes} = \frac{\text{Nombre de cellules non colorées}}{\text{Nombre de cellules (non colorées + colorées)}} \times 100$$

### **II.1.5. Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)**

La technique de retard sur gel ou EMSA permet de mettre en évidence la (non) liaison d'une protéine avec une séquence d'ADN déterminée. Un oligonucléotide contenant la séquence cible d'un facteur de transcription est incubé en présence d'un extrait cellulaire ou nucléaire avant d'être déposé sur un gel d'électrophorèse en conditions non dénaturantes permettant de séparer les molécules. Si la protéine active est présente dans l'extrait cellulaire, elle se lie à la séquence marquée, et la migration du complexe ADN-protéine sera retardée par rapport à la migration de la sonde seule (figure II.2). Un retard plus important peut également être mis en évidence sur le gel par l'utilisation d'un anticorps dirigé contre le facteur de transcription étudié (supershift).

Les principales étapes de cette technique sont les suivantes : la culture des cellules et l'incubation sous hypoxie (vu précédemment), le marquage de la sonde, la liaison entre les protéines et la sonde marquée, l'électrophorèse, la quantification et la révélation du gel.

### II.1.5.1. Marquage et purification des sondes

Les sondes utilisées pour les EMSA sont préalablement marquées en radioactivité. Ce marquage s'effectue à l'aide d'ATP radioactif  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$  ATP. Le phosphore du groupement phosphate à l'extrémité 5' de la sonde est substitué par le phosphore du  $[\gamma$ - $^{32}\text{P}]$  ATP et ceci grâce à une enzyme polynucléotide kinase et à son tampon d'activation.

#### A. Matériel

- Mixture réactionnelle :
  - . 1  $\mu\text{l}$  de la sonde à marquer (Eurogentec, Seraing, Belgique)
  - . 1  $\mu\text{l}$  de tampon de réaction 10 fois concentré (Boehringer Mannheim, Mannheim, Allemagne)
  - . 6,5  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O distillée
  - . 1  $\mu\text{l}$  de T4 polynucléotide kinase (10 U/ $\mu\text{l}$ ) (Boehringer Mannheim, Mannheim, Allemagne)
  - . 1  $\mu\text{l}$  de  $[\gamma$ - $^{32}\text{P}]$ -ATP (10  $\mu\text{Ci/ml}$ ) (NEN Dupont, Vilvoorde, Belgique)
- La sonde oligonucléotidique consensus de HIF-1 fournie par Eurogentec est constituée de 18 paires de bases. Elle reproduit la séquence enhancer du gène de l'érythropoïétine :  
  
5'- gatcGCCCTACGTGCTGTCTCA-3'  
3'-CGGGATGCACGACAGAGTctag-5'
- Une autre sonde a aussi été utilisée. Il s'agit d'une sonde mutée dont la séquence est la suivante (la mutation est en gras) :  
  
5'- gatcGCCCTAAAAGCTGTCTCA-3'  
3'-CGGGATTTTCGACAGAGTctag-5'
- EDTA : 0,25 M à pH 8,0; autoclavé
- Tampon TE : (Tris-HCl 10 mM ; pH 8,0; EDTA 1 mM, autoclavé)
- Quick spin colonne : séphadex G-25 (Boehringer Mannheim, Mannheim, Allemagne)
- Aqualuma (Lumac, Landgraaf, Pays-Bas)

- Compteur à scintillation  $\beta$  (Beckman LS1801, U.S.A.)
- Instant Imager (Packard, Downers Grove, USA)
- Gel de polyacrylamide 20 % :
  - . 35 ml d'acrylamide/bisacrylamide (la solution stock se compose de 30 % d'acrylamide pour 1 % de N,N'-méthylène bisacrylamide).
  - . 2,5 ml de TBE 10 X :
    - TRIS 0,9 M (Janssen Chimica, Beerse Belgique)
    - Acide borique 0,9 M (Merck, Darmstadt, Allemagne)
    - EDTA 0,02 M (Merck, Darmstadt, Allemagne)
  - . H<sub>2</sub>O distillée : 12,2 ml
  - . 25  $\mu$ l de TEMED (Bio-Rad, Richmond, USA)
  - . 300  $\mu$ l de persulfate d'ammonium (0,1g/1 ml) (Serva, Verviers, Belgique)

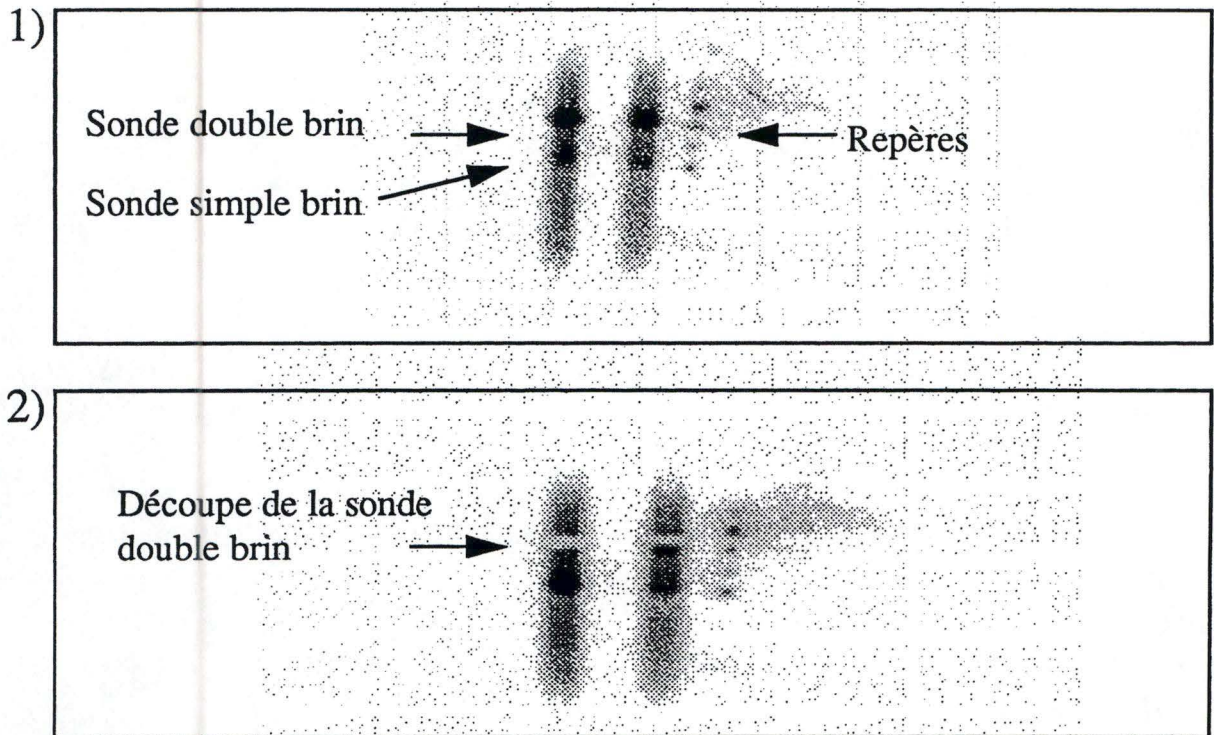
N.B. : Le TEMED et le persulfate d'ammonium sont ajoutés en dernier lieu puisque ce sont les agents polymérisateurs.

### *B. Méthode*

Après avoir chauffé un bain à 37°C et décongelé le [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP, la mixture réactionnelle est préparée dans un microtube et incubée durant 15 minutes à 37°C. A la fin de l'incubation, la réaction est stoppée en ajoutant 2  $\mu$ l d'EDTA. Ensuite, les oligonucléotides sont séparés des nucléotides radioactifs grâce à une purification sur spin colonne.

La colonne est placée dans un tube de 10 ml, puis tassée par une centrifugation de deux minutes à 2400 rpm. A ce moment, l'échantillon est déposé au centre de la colonne et on procède à une nouvelle centrifugation de 2 minutes à 2400 rpm avant de récupérer l'éluat. La dernière opération va être répétée 4 fois. Il s'agit de déposer 50  $\mu$ l d'eau au centre de la colonne et de centrifuger pendant 2 minutes à 2400 rpm en récoltant l'éluat à chaque fois dans un microtube différent. Le compteur Geiger permet d'évaluer dans quel microtube on a recueilli la sonde. On évalue la radioactivité contenue dans 1  $\mu$ l (en triplicat) au compteur à scintillation.





**Figure II.3 : Isolation de la sonde double brin.**

- 1) La sonde double brin est visualisée par rapport aux repères radioactifs.
- 2) La sonde double brin est ensuite découpée du gel.

Afin de séparer la sonde double brin de la sonde simple brin, et pour éviter au maximum les liaisons non spécifiques des protéines nucléaires à l'ADN simple brin, la totalité du volume de sonde marquée est déposée sur un gel de polyacrylamide 20 %. Lorsque la migration est terminée, on réalise des repères sur le gel à l'aide d'un cure-dent trempé dans une solution d'ATP radioactif et de bleu de bromophénol. Le gel est ensuite passé à l'Instant Imager où la sonde double brin est localisées par rapport aux repères d'ATP radioactif. On découpe ensuite un morceau du gel, là où se trouve la sonde double brin (figure II.3). Le morceau du gel est alors découpé en petits cubes et placé dans 50 µl de TE pendant une nuit afin que la sonde diffuse dans le tampon. La phase liquide est récupérée et un comptage est de nouveau réalisé.

### II.1.5.2. Liaison sonde - protéine

#### A. Matériel

- Tampon de liaison :
  - . HEPES 10 mM pH 7.9 (Janssen Chimica, Beerse, Belgique)
  - . MgCl<sub>2</sub> 0,5 mM (Merck, Darmstadt, Allemagne )
  - . EDTA 0,1 mM (Merck, Darmstadt, Allemagne)
  - . Glycérol 5 % (Janssen Chimica, Beerse, Belgique)
  - . DTT 500 mM (dithiothréitol, D-8024, Sigma Chemical, Saint-Louis, USA)

N.B. : le DTT est ajouté juste avant la manipulation

- Sonde marquée
- Extraits nucléaires
- ADN de sperme de saumon : 0,1 µg/20 µl de volume final de solution.  
(Sigma Chemical, Saint-Louis, USA)

## *B. Méthode*

Pour chaque échantillon, un volume d'extrait nucléaire correspondant à la quantité de protéines désirée (en général 25 µg) est prélevé; nous ajustons ensuite les volumes avec le tampon B (décrit au point II.1.2) afin d'ajouter un même volume de solution de liaison pour chaque échantillon (40 µl en final). On ajoute ensuite 0,1 µg d'ADN de sperme de saumon / 20 µl de volume final de solution. Ces premières étapes se réalisent sur glace. Le tout est alors incubé 10 minutes à température ambiante avant d'ajouter la sonde oligonucléotidique marquée (un volume équivalent à 10 000 cpm). Après une incubation de 15 minutes à température ambiante, 4 µl de bleu de bromophénol sont ajoutés.

### **II.1.5.3. Supershift**

#### *A. Matériel*

- Voir point II.1.5.2
- Anticorps anti-ARNT (Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator) : anticorps polyclonal obtenu à partir de lapin immunisé avec un peptide synthétique dont la séquence dérive du ARNT humain (Affinity BioReagent, Golden, CO, USA) à une concentration stock de 1 mg/ml.

#### *B. Méthode*

La préparation des échantillons jusqu'à l'ajout de la sonde marquée est identique à ce qui est décrit au point II.1.5.2. Après l'incubation de 15 minutes à température ambiante, 1 µl d'anticorps anti-ARNT est ajouté. Les échantillons sont alors incubés 30 minutes sur glace (4°C) avant d'ajouter le bleu de bromophénol.

- . TRIS 0,9 M (Janssen Chimica, Beerse, Belgique)
  - . Acide borique 0,9 M (Merck, Darmstadt, Allemagne)
  - . EDTA 0,02 M (Merck, Darmstadt, Allemagne)
- Gel d'électrophorèse (4 %) :
- . 7 ml d'acrylamide / bisacrylamide (la solution stock se compose de 30 % d'acrylamide pour 1 % de N,N'-méthylène bisacrylamide).
  - . 2,5 ml de TBE 10 X
  - . H<sub>2</sub>O distillée : 41,1ml
  - . 25 µl de TEMED (Bio-Rad, Richmond, USA)
  - . 300 µl de persulfate d'ammonium (0,1g/1 ml) (Serva, Vervier, Belgique)
- Solution de bleu, composée de : glycérol 50 % (Merck, Darmstadt, Allemagne), Na<sub>2</sub> EDTA 100 mM (Merck, Darmstadt, Allemagne) et de bleu de bromophénol 0,1% (Janssen Chimica, Beerse, Belgique).

### *B. Méthode*

Le gel est coulé et laissé polymérisé pendant environ une heure. Il s'agit d'un gel natif, sans SDS afin de ne pas séparer le facteur de transcription de la sonde ni de dénaturer la protéine (en l'occurrence le facteur de transcription HIF-1) éventuellement présente dans les extraits protéiques.

Lorsque le gel est polymérisé, il est placé dans la cuve d'électrophorèse (V15-17, Life Technologies, Paisley, Angleterre). Du tampon TBE 1X est ajouté afin que le gel subisse un pré-run durant 1h30 à 100 V. Ensuite, les échantillons sont déposés dans les puits. La migration qui suit se déroule à 100 V et dure environ 2h30, jusqu'à ce que le bleu de bromophénol atteigne les 2/3 de la hauteur du gel.

Le gel est alors démoulé et placé entre un papier Whatman d'un côté et un papier cellophane de l'autre. A ce moment, le gel est prêt pour la quantification.

Lorsque le gel est polymérisé, il est placé dans la cuve d'électrophorèse (V15-17, Life Technologies, Paisley, Angleterre). Du tampon TBE 1X est ajouté afin que le gel subisse un pré-run durant 1h30 à 100 V. Ensuite, les échantillons sont déposés dans les puits. La migration qui suit se déroule à 100 V et dure environ 2h30, jusqu'à ce que le bleu de bromophénol atteigne les 2/3 de la hauteur du gel.

Le gel est alors démoulé et placé entre un papier Whatman d'un côté et un papier cellophane de l'autre. A ce moment, le gel est prêt pour la quantification.

### **II.1.5.5. Quantification et révélation**

#### *A. Matériel*

- Instant Imager (Packard, Downers Grove, USA)
- Film MP pour isotopes émettant des radiations  $\beta$  et  $\gamma$  (Amersham, Gand, Belgique)
- Pour révéler les films, nous utilisons un révélateur dilué 5X (PQ Universal, Ilford, Grande-Bretagne), et un fixateur dilué 5X (Hypam, Ilford, Grande-Bretagne).
- Sécheur de gel (modèle 583, Bio-Rad, Richmond, USA)

#### *B. Méthode*

La quantification de la radioactivité associée aux différentes bandes est réalisée grâce à un Instant Imager. Cet appareil détermine la radioactivité contenue en chaque point du gel. Le résultat de ce comptage est visualisé sur écran, par l'impression de points noirs. La démarche suivie est la suivante : le gel est emballé dans un sachet plastique (afin d'éviter toute contamination radioactive), puis déposé dans le compteur de l'Instant Imager. La durée de comptage du gel est arbitraire, celle-ci est fonction de l'intensité des spots obtenus qui est proportionnelle au nombre de cpm contenus dans l'échantillon.

Une fois la lecture du gel terminée, nous utilisons le logiciel Imager pour traiter les données obtenues. Pour ce faire, nous appliquons sur l'image une matrice contenant autant de lignes qu'il y a de pistes chargées sur le gel. L'ordinateur définit alors un profil de radioactivité pour chacune des lignes définies. A l'aide de ceux-ci, nous délimitons chaque pic de radioactivité (un pic du profil correspondant à un spot de l'image). Le logiciel nous donne alors la valeur de l'intégration de chaque pic ainsi délimité.

Le gel est ensuite séché pendant 1h30 à 80°C et placé dans une cassette d'autoradiographie (Kodak, KP63375), en présence d'un film pré-flashé.

Après trois jours d'exposition, nous révélons le film en le plaçant 5 minutes dans le révélateur, 30 secondes dans de l'eau distillée, et enfin 3 minutes dans le fixateur. Le film est rincé à l'eau courante avant d'être séché à l'air libre.

### **II.1.6. Western - Blot**

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

- Séparation des protéines de l'extrait cellulaire par électrophorèse.
- Transfert des protéines sur un support solide, en l'occurrence une membrane de nitrocellulose.
- Traitement de la membrane de nitrocellulose afin de limiter la fixation non-spécifique.
- Détection de la protéine recherchée par un anticorps spécifique.
- Révélation par chémioluminescence, par le système ECL (Enhanced Chemiluminescence).

La méthode de préparation des fractions nucléaires est la même que celle décrite pour les EMSA (voir point II.1.2).

### II.1.6.1. Electrophorèse

#### A. Matériel

- Gel séparateur acrylamide 10 % (ce pourcentage est à ajuster en fonction du PM des protéines que l'on veut mettre en évidence) composé de :
  - . 14 ml de tampon Tris 2 M, pH 8,8 (Merck, Darmstadt, Allemagne). La solution stock est à conserver maximum 3 mois à 4°C.
  - . 12,5 ml d'acrylamide 30%/N,N'-méthylène bisacrylamide 0,15 %. Cette solution se conserve maximum 6 semaines à 4°C, à l'abri de la lumière.
  - . 0,187 ml de SDS 20 % : dodécylsulfate de sodium (Merck, Darmstadt, Allemagne). La solution stock de 20 % se conserve à température ambiante car il précipite à 4°C.
  - . 10,8 ml d'eau distillée.
  - . 20 µl de TEMED (Bio-Rad, Richmond, USA).
  - . 75 µl d'ammonium persulfate 10% (0,1g/1ml d'H<sub>2</sub>O) fraîchement préparé (Serva, Verviers, Belgique).
  
- Le gel concentrateur est composé de :
  - . 2,5 ml de tampon Tris 2 M, pH 8,8 (8382, Merck, Darmstadt, Allemagne). La solution stock est à conserver maximum 3 mois à 4°C.
  - . 1,5 ml d'acrylamide 30%/N,N'-méthylène bisacrylamide 0,8 %. Cette solution se conserve maximum 1,5 mois à 4°C, à l'abri de la lumière.

- . 0,50  $\mu$ l de SDS 20 % : dodécylsulfate de sodium (13760, Merck, Darmstadt, Allemagne). La solution stock de 20 % se conserve à température ambiante car il précipite à 4°C.
  - . 6 ml d'eau distillée.
  - . 15  $\mu$ l de TEMED (Bio-Rad, Richmond, USA)
  - . 50  $\mu$ l d'ammonium persulfate 10% (0,1g/1ml d'H<sub>2</sub>O) fraîchement préparé (Serva, Verviers, Belgique).
- Le tampon d'électrophorèse est dilué 4X avant usage à partir d'une solution stock composée de :
- . Tris 0,05 M (Merck, Darmstadt, Allemagne)/Glycine 0,38 M (Merck, Darmstadt, Allemagne)
  - . SDS 0,1 % (Merck, Darmstadt, Allemagne)

Cette solution se conserve à température ambiante pendant un mois maximum.

- Le tampon d'échantillon est composé de :
- . Tris-HCl 125 mM, pH 6,8 (Merck, Darmstadt, Allemagne)
  - . SDS 4,6 % (Merck, Darmstadt, Allemagne)
  - . Glycérol 20 % (Merck, Darmstadt, Allemagne)
  - . Bleu de bromophénol 0,006 % (Janssen Chimica, Beerse, Belgique). On réalise une solution stock de 1 % que l'on conserve à 4°C
  - .  $\beta$ -mercaptoéthanol 10 % (Sigma Chemical, Saint-Louis, USA). Cette solution est aliquotée en fractions de 1,5 ml qui sont congelées à -20°C



Composition of SDS-PAGE, Silver Stain, and Biotinylated Standards

Protein	Source	MW (Daltons)	Reference	Polypeptide	Low	High	Broad
Myosin	Rabbit skeletal muscle	200,000	1			X	X
$\beta$ -galactosidase	<i>E. coli</i>	116,250	2			X	X
Phosphorylase B	Rabbit muscle	97,400	3		X	X	X
Serum albumin	Bovine	66,200	4		X	X	X
Ovalbumin	Hen egg white	45,000	5		X	X	X
Carbonic anhydrase	Bovine	31,000	6		X		X
Triosephosphate isomerase	Rabbit	26,625	7	X			
Trypsin inhibitor	Soybean	21,500	8		X		X
Myoglobin	Equine	16,950	9	X			
$\alpha$ -Lactalbumin	Bovine	14,437	10	X			
Lysozyme	Hen egg white	14,400	11		X		X
Aprotinin	Bovine pancreas	6,500	12	X			X
Insulin, b chain, oxidized	Bovine	3,496	13	X			
Bacitracin	—	1,423	14	X			

**Tableau II.1** : Caractéristiques des étalons de poids moléculaire utilisés pour le western Blot (d'après Bio-Rad, USA).

- L'étalon est composé de :

- . 5  $\mu$ l d'étalon high range (Bio-Rad, Richmond, USA) (tableau II.1)
- . 45  $\mu$ l de tampon Tris 0,5 M, pH 6,8 (Merck, Darmstadt, Allemagne)
- . 50  $\mu$ l de tampon d'échantillon

### *B. Méthode*

Une fois réalisé le montage des plaques, on coule le gel séparateur (dans notre cas, un gel à 7 % en acrylamide) entre les plaques de verre (gardées à la verticale de façon à vérifier l'étanchéité du système) et ce, jusqu'à environ 1,5 cm en dessous du peigne. On ajoute alors à la surface du gel ainsi coulé de l'isobutanol saturé en eau pour éviter que le gel ne se craque en surface et pour favoriser la polymérisation en le préservant de l'oxygène.

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

Pendant ce temps, les différents échantillons sont préparés : on dépose une quantité de 25  $\mu$ g de protéines par puits. On prélève dans chaque fraction le volume adéquat (c'est-à-dire le volume contenant ces 25  $\mu$ g de protéines) et on le dilue 2X dans le tampon d'échantillon (volume 1 : 1). Ensuite, les protéines sont dénaturées à 100°C pendant 5 minutes.

Une fois le gel concentrateur polymérisé et les échantillons et l'étalon préparés, on enlève délicatement le peigne ainsi que les pinces puis on place le gel dans la cuve à électrophorèse avec du tampon d'électrophorèse dilué 4X. Ensuite, on dépose les échantillons dans le fond des puits (on veille à déposer un

minimum de 20  $\mu$ l par puits, le maximum conseillé étant de 65  $\mu$ l) et on les fait migrer pendant 1h30 à 30 mA (à travers le gel concentrateur) puis entre 3 et 4 heures à 45 mA (à travers le gel séparateur).

## II.1.6.2. Transfert

### A. Matériel

- Tampon de transfert : tampon Tris 0,5 M (Merck, Darmstadt, Allemagne), glycine 0,76 M (Merck, Darmstadt, Allemagne) pH 8,3 auquel on ajoute du méthanol 20 % final (Janssen Chimica, Beerse, Belgique)
- Solution de bleu de Coomassie brillant R (Janssen Chimica, Beerse, Belgique)
- 100 ml d'acide acétique (Janssen Chimica, Beerse, Belgique)
- 500 ml d'eau distillée
- Solution de décoloration du bleu de Coomassie, constitué de :
  - . 30 % d'éthanol (Merck, Darmstadt, Allemagne)
  - . 10 % d'acide acétique (Acros, Verviers, Belgique)
  - . 60 % d'eau

### B. Méthode

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

On utilise pour le transfert une membrane immobilone (Bio-Rad, Richmond, U.S.A.), membrane en difluorure de polyvylidène (PVDF, 0,45  $\mu$ m d'épaisseur) de la grandeur du gel séparateur, que l'on immerge pendant 1 minute dans du méthanol 100 % puis que l'on équilibre avec du tampon de transfert pendant 15 minutes.

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

N.B. : A ce moment une coloration au bleu de Coomassie peut éventuellement être réalisée si on ne désire pas transférer les protéines. On place le gel dans une solution d'acide trichloroacétique 12 % afin de fixer les protéines, puis dans la solution de coloration décrite ci-dessus.

Ensuite, dans un bac en plastique contenant du tampon de transfert, on immerge par ordre et en évitant les bulles d'air :

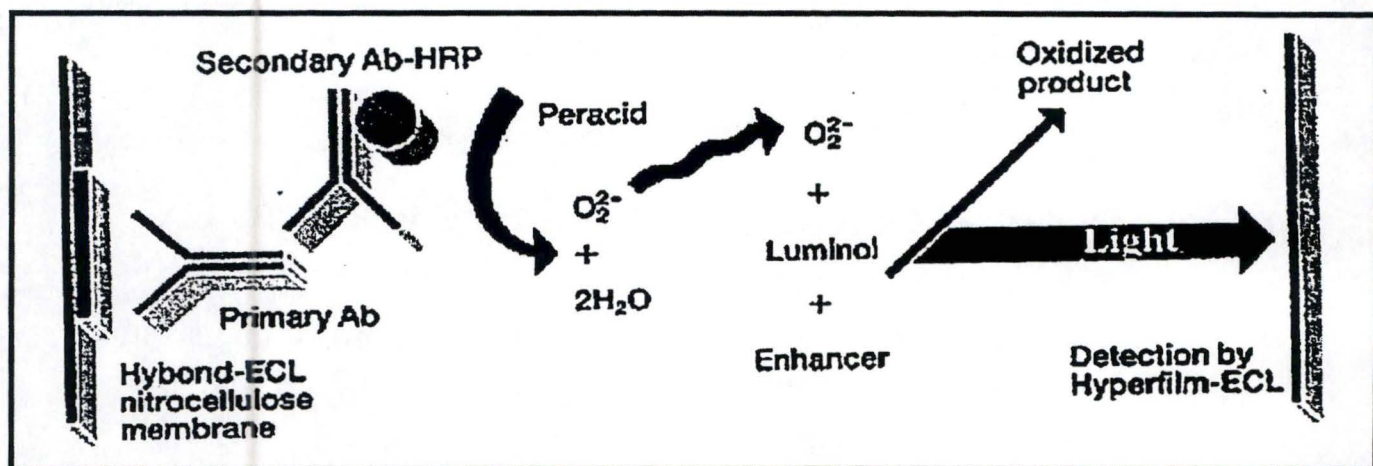
- . Le support plastique
- . Le tampon "scotch brite"
- . 2 feuilles de papier Whatman (3 mm) de la grandeur du gel
- . Le gel séparateur
- . 2 feuilles de papier Whatman
- . Le tampon "scotch brite"
- . Le support plastique

Après avoir fortement resserré le "système sandwich", on le dépose dans l'appareil de Hoeffler (LKB 2005 Transfert Electroblothing, Pharmacia, Uppsala, Suède) de sorte que le gel soit du côté du pôle négatif et donc la membrane du côté du pôle positif. Les protéines, chargées négativement (électrophorèse au SDS), vont en effet migrer du gel vers la membrane. Pour terminer, on rajoute dans la cuve le tampon de transfert (le même qui a servi à la préparation du "système sandwich"). On réalise le transfert en plaçant le système en chambre froide à 4°C toute la nuit, à 30 Volts.

### II.1.6.3. Traitement et révélation

#### A. Matériel

- Solution de coloration au rouge Ponceau (0,2 % final) (Merck, Darmstadt, Allemagne) dissout dans 75 ml d'acide trichloroacétique 20 %. La solution est portée à un volume de 500 ml avec de l'eau distillée.
- Blotto 5 % à préparer le jour même :
  - . PBS 1X final, pH 7,4 dilué à partir d'une solution stock de PBS 10X
  - . Lait en poudre 5 % (Gloria)
  - . Merthiolate 0,001 % (Fluka, Milan, Italie) dilué à partir d'une solution stock de 1 % (conservée à température ambiante)
  - . 0,1 % de Tween 20 (Sigma Chemical, Saint-Louis, USA)
- Solution TBS + Tween 20 0,1 %, pH 7,4 :
  - . On prépare une solution stock constituée de Tris 0,2 M (8382, Merck, Darmstadt, Allemagne), NaCl 1,37 M (Merck, Darmstadt, Allemagne), pH 7,6. Cette solution se conserve à température ambiante et le jour de l'expérience, elle est diluée 10X de la manière suivante :
    - 300 ml de la solution stock
    - 2700 ml d'eau distillée
    - 3 ml de Tween 20
  - . De cette solution, on retire 100 ml qui serviront à diluer l'anticorps, avant d'ajouter 0,1% de lait en poudre(Gloria) aux 2900 ml restant.
- Anticorps anti-ARNT (Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator) : anticorps polyclonal obtenu à partir de lapin immunisé avec un peptide synthétique dont la séquence dérive du ARNT humain (Affinity BioReagent, Golden Co, USA).
- Anticorps secondaire anti-lapin lié à la peroxydase (Amersham, Gand, Belgique) conservé à 4°C. La dilution utilisée est de 1 : 50 000
- Révélateur E.C.L. : Enhanced ChemoLuminescence (Amersham, Gand, Belgique)



**Figure II.4 :** Principe de révélation par le système ECL (Enhanced ChemiLuminescence) aboutissant finalement à la production de lumière après oxydation du luminol par des anions superoxydes. Cette lumière sera alors détectée par un hyperfilm (d'après Amersham, Belgique).

## B. Méthode

Le lendemain matin, on termine le transfert en augmentant le voltage à 50 Volts pendant 30 minutes, puis on colore la membrane au rouge Ponceau, 5 minutes sous agitation. On la rince ensuite 2 à 3 fois à l'eau distillée. On marque au crayon les protéines de l'étalon. Cette coloration aspécifique est une méthode simple pour visualiser toutes les protéines qui étaient présentes dans le gel et qui ont été transférées sur la membrane. Elle permet donc d'apprécier directement l'efficacité du transfert et de connaître la position des marqueurs de poids moléculaire qui permettront de calculer le poids moléculaire des protéines mises en évidence par l'anticorps.

On décolore ensuite la membrane dans du PBS 1X puis on la place dans un sac plastique en présence de 30 ml de Blotto 5 % pendant une heure à température ambiante, sous agitation. Le Blotto 5 % va saturer la membrane et donc limiter les liaisons non spécifiques.

La membrane est alors rincée 3 fois (1 x 15 minutes et 2 x 5 minutes) avec la solution de TBS-T 1X à laquelle on a ajouté 0,1 % de lait en poudre.

Pour localiser sur le support la protéine d'intérêt, nous utilisons un anticorps primaire qui reconnaît spécifiquement cette protéine. Il s'agit en l'occurrence d'un anticorps spécifique obtenu à partir de lapin immunisé avec un peptide synthétique dont la séquence dérive du ARNT humain. La détection se fait de manière indirecte puisque l'on ajoute un second anticorps anti-lapin qui reconnaît le premier. Cet anticorps secondaire est couplé à la peroxydase qui va catalyser la réaction de décomposition de l' $H_2O_2$  en  $H_2O$  et en  $O_2^-$ .  $O_2^-$  est alors révélé par chémoluminescence en présence de luminol. Celui-ci est oxydé et va monter dans un état excité. Il ne peut retourner à son état fondamental qu'en émettant de la lumière qui sera détectée par un film (figure II.4). On voit donc apparaître une bande sur le film à l'endroit où se trouve la protéine d'intérêt.

En pratique, la membrane est remise dans un sac plastique et incubée 2 h 30 en présence de l'anticorps primaire (anti-ARNT) dilué 1000X dans le TBS-T sans lait. Les anticorps non fixés aux protéines sont éliminés par 3 rinçages de 15 minutes avec du TBS-T + 0,1 % de lait. La membrane est ensuite incubée durant 1h00 à température ambiante en présence de 10 ml d'anticorps secondaire anti-IgG de lapin liés à la peroxydase, dilués 5 000X dans du TBS-T. Rincée 1 x 15 minutes puis 4 x 5 minutes avec du TBS-T + 0,1 % de lait, la membrane est alors mise en présence de liquide de révélation à raison de 0,125 ml/cm<sup>2</sup> (soit environ 10 ml pour une membrane de 14,5 x 12.5 cm) pendant une minute.

#### **II.1.6.4. Révélation du film**

##### *A. Matériel*

- Film d'exposition : hyperfilm MP pour isotopes émettant des radiations  $\beta$  et  $\gamma$  (Amersham, Gand, Belgique).
- Pour révéler les films, on utilise le révélateur PQ Universal dilué 5X et le fixateur Hypam lui aussi dilué 5X.
- La solution d'Amidoschwartz qui contient :
  - . 250 mg d'Amidoschwartz (Janssen Chimica, Beerse, Belgique)
  - . 200 ml d'éthanol (Merck, Darmstadt, Allemagne)
  - . 50 ml d'acide acétique (Janssen Chemica, Beerse, Belgique)
  - . 50 ml d'eau distillée

##### *B. Méthode*

Après avoir précautionneusement enlevé un maximum de liquide révélateur en l'absorbant sur un papier Whatman, on place la membrane dans une cassette d'autoradiographie et, en chambre noire, on dépose un film sur celle-ci. On expose le film 1 minute. Si, après développement, le signal est trop



fort, il convient de diminuer le temps d'exposition et, dans le cas contraire, de l'augmenter.

Pour développer le film, on le place dans le révélateur jusqu'à ce qu'apparaissent les bandes, puis dans de l'eau distillée (30 secondes) et enfin dans un bain contenant le fixateur pendant 4 minutes. Pour terminer, le film est rincé à l'eau courante avant d'être séché à l'air libre.

Une coloration des différentes bandes de protéines peut être réalisée en plongeant la membrane dans une solution d'Amidoschwartz 5 minutes. Après l'avoir rincée à l'eau, on peut la conserver dans un sac plastique.

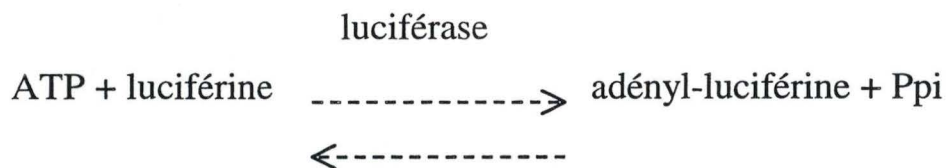
## **II.1.7. Dosage de l'adénosine triphosphate (ATP)**

### **II.1.7.1. Principe**

Le dosage de l'ATP est réalisé en utilisant un kit de dosage basé sur la bioluminescence émise par le système luciférine-luciférase (Sigma Chemical , Saint Louis, USA). Ce système permet en effet de doser l'ATP intracellulaire.

Après perméabilisation des membranes, l'ATP intracellulaire est libéré dans le milieu. En présence de luciférase, la luciférine et l'ATP réagissent pour donner naissance à une molécule de luciféryl-adénylate qui demeure fortement lié au site catalytique de la luciférase. Lorsque cette forme de l'enzyme est exposée à l'oxygène moléculaire, la luciféryl-adénylate est oxydée en oxyluciférine. C'est le passage de cet état excité à un état basal plus stable qui libère de l'énergie sous forme de photons.

ATP intracellulaire -----> ATP libre



Adényl -luciférine + O<sub>2</sub> -----> oxyluciférine + AMP + CO<sub>2</sub> + photons

La quantité de lumière émise est directement proportionnelle à la concentration en ATP. Cette méthode, spécifique de l'ATP permet de mesurer des quantités d'ATP de l'ordre de la picomole.

#### *A. Matériel*

- Tampon de lyse : ATP releasing reagent (Sigma Chemical, Saint-Louis, USA)
- Mixture réactionnelle : préparée au laboratoire, contient la luciférine et la luciférase.
- Lumac Biocounter M2010 (Lumac, Landgraaf, Hollande)
- Eau distillée filtrée sur filtre Sartorius Minisart 0,20 µM (Sartorius AG, Göttingen, Allemagne) dans une bouteille stérile
- Cuvettes pour le Lumac (Lumac, Landgraaf, Hollande)

#### *B. Méthode*

Pour réaliser le dosage de l'ATP, les cellules sont repiquées la veille dans des boîtes de pétri de 35 mm de diamètre à raison de 500 000 cellules par boîte dans du MCDB 131 + 2 % de sérum.

Après l'incubation sous hypoxie ou en normoxie en présence de 0,7 ml de milieu CO<sub>2</sub> indépendant, le milieu des boîtes de pétri est décanté et on ajoute 0,5 ml de tampon de lyse. Le tout est maintenu à 4°C. Après 20 secondes, on récupère le tampon de lyse qui contient l'ATP et on le stocke à -70°C.

Lors du dosage, on place dans la cuvette Lumac 100 µl de mixture réactionnelle. Celle-ci a été dégelée à température ambiante et à l'abri de la lumière, au moins une heure avant le dosage.

Ensuite, on ajoute 10 µl d'échantillon dilué 10X dans de l'eau stérile que l'on resuspend dans les 100 µl de mixture. La cuvette est alors placée dans le luminomètre. La valeur maximale du pic d'émission de la lumière est alors enregistrée. Cette valeur est exprimée en RLU (Relative Light Unit).

On dose également les protéines afin de corriger les valeurs de RLU par rapport au nombre de cellules dans la boîte. Les résultats finaux sont exprimés en RLU/µg de protéines. Pour ce faire, on utilise la technique de Lowry (Lowry *et al.*, 1951).

### III.7.2 Dosage des protéines selon Lowry

#### A. Matériel

- Solution d'étalon protéine (albumine de sérum bovin) à 200 µg/ml (Sigma Chemical, Saint-Louis, USA)
- NaOH 0,5 N et 1 N (Merck, Darmstadt, Allemagne)
- Mixture alcaline à préparer juste avant l'emploi :
  - 100 ml Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2% (Merck, Darmstadt, Allemagne)
  - 1 ml CuSO<sub>4</sub> . H<sub>2</sub>O 1% (Merck, Darmstadt, Allemagne)

. 1 ml  $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$  2% (Merck, Darmstadt, Allemagne)

- Réactif phénol de Folin-Ciocalteu à diluer 2X avant utilisation (Sigma Chemical, Saint-Louis, USA)

### *B. Méthode*

La méthode de Lowry se base sur le principe qu'une fois dénaturées au NaOH, les protéines exposent leurs groupements aux réactifs. Les ions cuivriques de la solution alcaline utilisée pour le dosage forment un complexe bleu avec les liaisons peptidiques, tandis que le complexe phosphomolybdique-phosphotungstique du réactif de Folin est réduit par les résidus tyrosine et tryptophane des protéines. L'intensité de la coloration bleue est lue à 660 nm au spectrophotomètre (Uvikon 940, Kontron Instruments, Italie) et est proportionnelle à la quantité de protéines présentes.

Après avoir récupéré le tampon de lyse contenant l'ATP, les cellules toujours attachées dans le fond des boîtes sont lysées 30 minutes en présence de 0,5 ml de NaOH 0,5 N. Parallèlement, on prépare le blanc et les étalons :

- blanc : 0,2 ml d'eau + 0,2 ml de NaOH 1N

- étalon : 0,2 ml BSA + 0,2 ml de NaOH 1N pendant 30 minutes minimum

Les protéines cellulaires sont resuspendues et les fractions de 0,4 ml sont récoltées. Le blanc et l'étalon sont gardés tels quels. Ces fractions peuvent être dosées directement ou conservées. A chaque tube, on ajoute 2 ml de mixture alcaline de 30 secondes en 30 secondes. Celle-ci doit agir seule pendant 5 à 15 minutes. Ensuite, 0,2 ml de réactif de Folin sont ajoutés en respectant le temps et l'ordre des tubes, qui sont immédiatement et vigoureusement agités. La densité optique (DO) à 660 nm est lue au spectrophotomètre après 30 minutes.

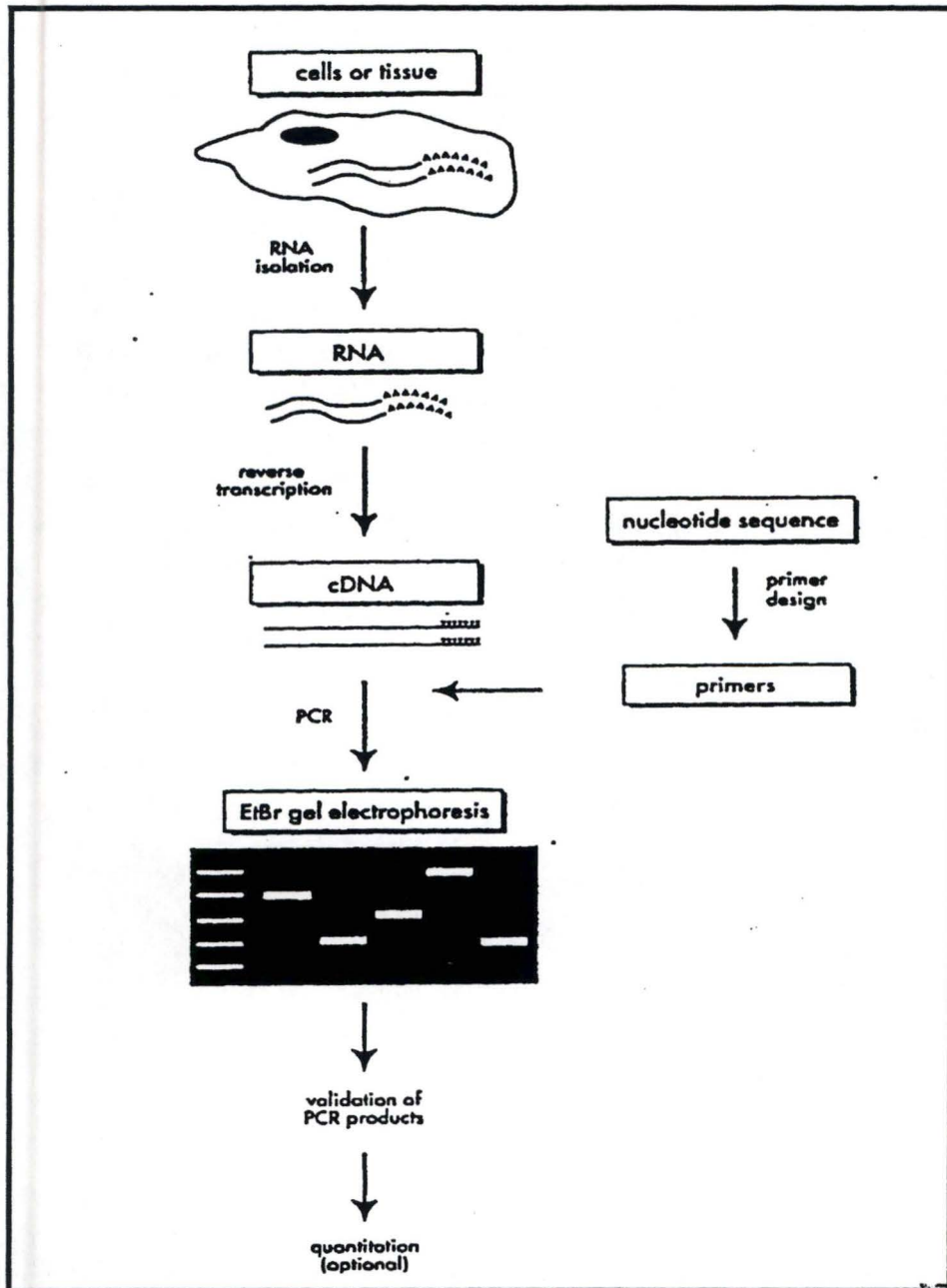


Figure II.5 : Principe de la RT-PCR (d'après Clontech Laboratories, USA).

La concentration en protéines se calcule comme suit :

$$\text{Concentration en } \mu\text{g/ml} = 200 * \frac{(\text{DO échantillon} - \text{DO blanc})}{(\text{DO étalon} - \text{DO blanc})}$$

## II.2 ASPECT MOLECULAIRE

### II.2.1. Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

La technique de RT-PCR est une technique très sensible permettant de mettre en évidence de très petites quantités d'un ARNm particulier. Elle consiste en la synthèse d'un brin d'ADN complémentaire (ADNc) du brin d'ARNm à détecter (transcription inverse ou reverse transcription (RT)). Ensuite ce brin d'ADNc servira de matrice pour la synthèse du deuxième brin et ces deux brins seront amplifiés par réaction de polymérisation en chaîne de l'ADN (PCR ou Polymerase Chain Reaction) (figure II.5).

La technique de RT-PCR telle que nous l'avons utilisée comporte plusieurs étapes :

- La culture et l'incubation des cellules sous hypoxie
- L'extraction de l'ARN
- La vérification de la qualité de l'ARN sur gel d'agarose
- La RT-PCR proprement dite

- L'analyse des produits de PCR sur gel d'agarose ou de polyacrylamide
- La révélation et la quantification des bandes du gel

### **II.2.1.1. Culture et incubation des cellules sous hypoxie**

La culture des cellules et l'incubation en normoxie ou sous hypoxie sont effectuées de la même manière que décrite au point II.1.2.

### **II.2.1.2. Extraction de l'ARN total**

#### *A. Matériel*

- PBS stérile : tampon phosphate 10 mM additionné de NaCl 0,9 % pH 7,4.
- H<sub>2</sub>O-DEPC stérile : l'eau distillée est traitée au diéthyl pyrocarbonate (0,5 %) (Acros, Courtrai, Belgique) et, après une nuit à température ambiante, le tout est autoclavé.
- Tampon de lyse :
  - . 250 ml de thiocyanate de guanidine (Sigma Chemical, Saint-Louis, USA)
  - . 17,5 ml de citrate de sodium 0,75 M, pH 7,0 (Merck, Darmstadt, Allemagne)
  - . 26,5 ml de N-Lauroylsarcosine 10 % (Sigma Chemical, Saint-Louis, USA)
  - . Compléter avec de l'H<sub>2</sub>O-DEPC pour atteindre un volume de 500 ml.
  - . Aliquoter le tampon de lyse dans les tubes falcon de 50 ml et conserver à 4°C (Falcon, USA)
- β-mercaptoéthanol (Sigma Chemical, Saint-Louis, USA)
- Tubes corex de 30 ml (Corex, U.S.A.)
- Acétate de sodium 2 M, pH 7.0

- Phénol saturé en citrate de sodium 0,1M (conservé à 4 °C) (Sigma Chemical, Saint-Louis, USA)
- Chloroforme (Sigma Chemical, Saint-Louis, USA)
- Isopropanol (Sigma Chemical, Saint-Louis, USA)
- Acétate d'ammonium, pH 7,5 (Sigma Chemical, Saint-Louis, USA)
- Ethanol 100 % (Merck, Darmstadt, Allemagne)

### *B. Méthode*

L'extrême sensibilité des ARN vis-à-vis des RNases, enzymes très répandues et très stables, implique la nécessité de travailler avec un très grand soin (porter des gants) et dans des conditions les plus stériles possibles (conditions dites RNases-free) à toutes les étapes de l'extraction.

Après l'incubation en hypoxie ou en normoxie, le milieu des boîtes de culture est rapidement décanté et les cellules sont lavées 2X au moyen de 10 ml de PBS stérile puis mises sur glace (4°C). On ajoute ensuite 4 ml de tampon de lyse (additionné de  $\beta$ -mercaptoéthanol à raison de 0,35 ml par 50 ml de tampon de lyse) par boîte de culture T75. Après avoir laissé agir 2 à 5 minutes, les cellules sont raclées et la solution est transférée dans un tube corex stérile de 30 ml.

Pour un volume de tampon de lyse on ajoute :

- . 0,1 volume d'une solution d'acétate de sodium 2 M, pH 7,0
- . 1 volume de phénol saturé en citrate de sodium 0,1M
- . 0,2 volume de chloroforme

(mélanger vigoureusement après l'addition de chaque réactif)

La solution finale est vortexée et refroidie sur glace pendant 20 minutes. Ensuite, on centrifuge à 8 000 rpm pendant 20 minutes à 4°C. La solution est



séparée en une phase organique phénol-chloroforme, dans le fond du tube, en une interphase (ces deux phases contenant les protéines et l'ADN) et enfin en une phase aqueuse supérieure incolore qui contient les ARN. La phase aqueuse est alors récupérée et transférée dans un nouveau tube corex stérile.

A la phase aqueuse, on ajoute un volume d'isopropanol pour un volume de tampon de lyse (soit 4 ml pour une T75). La solution, bien mélangée est placée pendant une heure à  $-20^{\circ}\text{C}$  afin que l'ARN précipite.

Après une centrifugation à 12 000 rpm pendant 20 minutes à  $4^{\circ}\text{C}$ , le culot est dissout dans 2 ml de tampon de lyse. On ajoute ensuite 0,5 ml d'acétate d'ammonium à pH 7,5 ainsi que 7,5 ml d'éthanol 100 % et on précipite toute la nuit à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Le lendemain, on centrifuge à 12 000 rpm pendant 20 minutes à  $4^{\circ}\text{C}$  et on lave le culot d'ARN au moyen de 5 ml d'éthanol refroidi à  $4^{\circ}\text{C}$ . On centrifuge de nouveau à 12 000 rpm pendant 20 minutes à  $4^{\circ}\text{C}$  et on décante le surnageant au maximum. Le tube ouvert est ensuite retourné pendant quelques minutes pour laisser s'évaporer l'éthanol tout en évitant que le culot ne sèche complètement, ce qui rendrait difficile la dissolution de l'ARN. On dépose tout de suite le tube corex sur glace et on resuspend le culot dans 100  $\mu\text{l}$  d' $\text{H}_2\text{O}$ -DEPC. On transfère ensuite l'ARN dans un microtube stérile que l'on congèle à  $-70^{\circ}\text{C}$  après avoir estimé la quantité d'ARN.

L'estimation de la quantité d'ARN se fait par lecture de l'absorbance des acides nucléiques à 260 nm au spectrophotomètre. Pour évaluer le degré de pureté de la préparation, on réalise également une lecture à 280 nm. Des préparations en ARN ont un rapport  $\text{DO}_{260}/\text{DO}_{280}$  compris entre 1,7 et 1,9. Des valeurs inférieures peuvent refléter une contamination de la préparation par du phénol ou des protéines, une mauvaise dissolution de l'ARN ou encore une trop grande concentration d'ARN. La concentration en ARN est calculée en sachant qu'une solution d'ARN d'une densité optique égale à 1 à 260 nm contient environ 40  $\mu\text{g}$  d'ARN/ml.

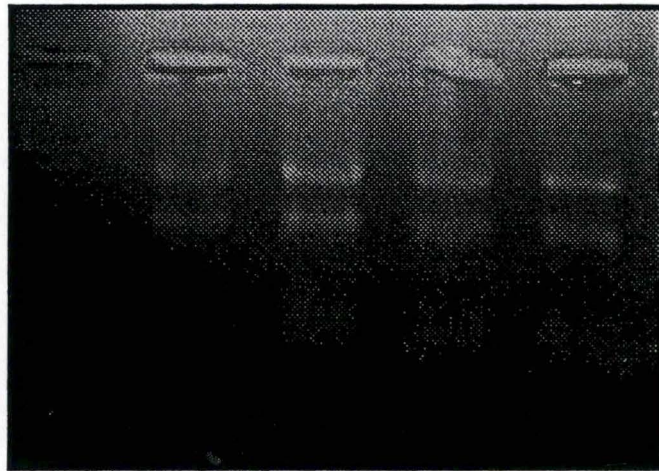
## II.2.1.3 Vérification de la qualité de l'ARN sur gel d'agarose

### A: Matériel

- Cuve d'électrophorèse traitée au SDS (Horizon 11-14, Gibco BRL Life Technologies, Grande-Bretagne)
- Transilluminateur, longueur d'onde : 392 nm (Analis, Namur, Belgique)
- Appareil polaroid (modèle 44-16 MP4 Instant Camera System, USA)
- Film polaroid (Duofilm, 667 Iso 3000/36°C, Janssen Chimica, Beerse, Belgique)
- Gel d'agarose :
  - . 115,4 ml H<sub>2</sub>O-DEPC (Across, Courtrai, Belgique)
  - . 1,5 g d'agarose (Ultra Pure Grade Agarose, Bio-Rad, Vilvoorde, Belgique)
  - . 7,5 ml de MOPS 20X (acide 3-(morpholino)-propanesulfonique (Sigma Chemical, Saint-Louis, U.S.A.)
  - . 27 ml de formaldéhyde 37 % (Fluka, Milan, Italie).
- Le MOPS 20X est composé de :
  - . 41,86 g MOPS 0,4 M (Sigma Chemical, Saint-Louis, U.S.A.)
  - . 16,67g d'acétate de sodium (Merck, Darmstadt, Allemagne)
  - . 20 ml d'EDTA 20 mM (Merck, Darmstadt, Allemagne)

On ajoute 370 ml d'H<sub>2</sub>O-DEPC et, après avoir mis à pH 7,0 on porte à 500 ml

- Formaldéhyde (Fluka, Milan, Italie)
- Bromure d'éthidium, solution stock de 500 µg/ml, (Sigma Chemical, Saint-Louis, USA)
- DYE for RNA :
  - . 0,25 % de bleu de bromophénol
  - . 50 % de glycérol (Merck, Darmstadt, Allemagne)
  - . 1 mM d'EDTA (Merck, Darmstadt, Allemagne)



← ARN 28S  
← ARN 18S  
← ARN t

**Figure II.6 :** Vérification de la qualité des ARN totaux extraits des cellules après migration sur gel d'agarose dénaturant. Deux bandes principales correspondant aux ARN ribosomiaux 28S et 18S sont visibles ainsi que dans une moindre mesure les ARN de transfert.

## B. Méthode

L'électrophorèse en gel d'agarose permet de séparer les fragments d'ARN en fonction de leur taille au sein du gel. Elle est pratiquée en présence d'un agent dénaturant, le formaldéhyde. Cet agent détruit la structure secondaire complexe des ARN qui interférerait avec la mobilité des ARN.

On coule le gel dans la cuve à électrophorèse munie d'un peigne et on le laisse polymériser pendant une heure. Pendant ce temps, les échantillons sont préparés : 3  $\mu\text{g}$  d'ARN dilués dans un volume total de 4  $\mu\text{l}$  d' $\text{H}_2\text{O}$ -DEPC

7,5  $\mu\text{l}$  de formamide

0,75  $\mu\text{l}$  de MOPS

2,7  $\mu\text{l}$  de formaldéhyde

On ajoute 2  $\mu\text{l}$  de bromure d'éthidium ainsi que 0,5  $\mu\text{l}$  de DYE for RNA préparé avec de l' $\text{H}_2\text{O}$ -DEPC. Le bromure d'éthidium est nécessaire pour la visualisation ultérieure des bandes d'ARN par illumination sous U.V.

Après polymérisation du gel, on enlève délicatement le peigne et on recouvre le gel avec 900 ml du tampon d'électrophorèse (MOPS 1X). Ensuite, on dépose les échantillons au fond des puits et on les fait migrer à 80 Volts pendant 1 heure environ.

On observe ensuite le gel sous une lampe U.V. Si l'ARN n'est pas dégradé, on observe 2 bandes principales d'ARN ribosomal d'environ 5 kilobases (kb) (ARN 28 S) et d'environ 2 kb (ARN 18 S), et une bande d'ARN de transfert comprise entre 0,1 et 0,3 kb. Si l'ARN est dégradé, une traînée est observée sur le gel d'agarose (figure II. 6).

Gène	Paire d'amorces nucléotidiques	Taille des amplicons
VEGF (Lyzuka <i>et al.</i> , 1994)	<i>amorces</i> - 5' : 5'-CTGCTGTCTTGGGTGCATTG-3'  <i>amorces</i> -3' : 5'-TTCACAATTTGTTGTGCTGTAG-3'	377 bp
HIF-1 $\alpha$ (Wenger <i>et al.</i> , 1996)	<i>amorces</i> - 5' : 5'-TGAGGCTTACCATCAGCTAT- 3'  <i>amorces</i> -3' : 5'-AGCACCAAGCAGGTCATAGG-3'	487 bp
TUBULINE ( Schmedtje, 1997)	<i>amorces</i> -5' 5'-GGAAGATGCTGCCAATAACT-3'  <i>amorces</i> -3' 5'-TGCCATAATCAACTGACAGG-3'	200 bp

**Tableau II.3 :** Description des amorces utilisées lors des RT-PCR pour mettre en évidence l'expression des gènes codant pour les protéines VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), HIF-1 $\alpha$  (Hypoxia-Inducible Factor 1- $\alpha$ ) et tubuline.

## II.2.1.4. RT-PCR

### A. Matériel

- Amorces : les amorces utilisées sont reprises dans tableau II.3  
(dissoutes à raison de 100 picomoles/ml d'eau RNase-free, Eurogentec, Seraing, Belgique)
- Kit de RT-PCR (Access RT-PCR system, Promega, Madison, USA) :
  - . 500 unités d'AMV *reverse transcriptase* (Avian Myeloblastosis virus), 5 unités/ $\mu$ l.
  - . 500 unités de *Tfl* ADN polymérase (de *Thermus flavus*), 5 unités/ $\mu$ l.
  - . 1 ml de tampon de réaction 5X.
  - . 1,2 ml de  $MgSO_4$  25 mM
  - . 100  $\mu$ l d'un mélange de dATP, dCTP, dGTP, dTTP à une concentration de 10 mM.
  - . 13 ml d'eau RNase-free.
- [ $\alpha$ - $^{32}P$ ] dCTP : (Cytosine 5'-triphosphate) ; 100  $\mu$ Ci/10 $\mu$ l activité spécifique : 3.000 Ci/mmol (NEN Dupont, Vilvoorde, Belgique)
- Thermo-cycleur (GENE AMP 2400, Perkin Elmer (Roche), Branchburg, USA).

### B. Méthode

Le système RT-PCR de Promega permet de réaliser la transcription inverse et l'amplification par PCR d'un ARN spécifique à partir d'ARN totaux dans un seul tube. Ceci est réalisable grâce à un tampon de réaction qui permet une activité maximale pour les deux enzymes : la transcriptase inverse d'AMV (Avian Myeloblastosis Virus) et l'ADN polymérase d'une archéobactérie marine hyperthermophile : *Thermus flavus*. Il n'y a donc pas lieu de changer le tampon

ni d'ajouter l'ADN polymérase entre l'étape de transcription inverse et l'étape de PCR. Ceci simplifie la procédure et réduit les risques de contamination éventuelle avec des brins d'ADN exogène.

La transcriptase inverse d'AMV peut travailler à des températures élevées (48°C, dans le tampon de réaction), ce qui minimise les problèmes potentiels liés aux structures secondaires dans l'ARN et facilite donc la synthèse de longs brins d'ADNc. L'ADN de *Thermus flavus* n'a ni activité exonucléase 5'-3' ni activité exonucléase 3'-5'; elle réalise donc l'élongation de manière rapide.

On prépare le mélange réactionnel suivant :

Mélange de réaction	Volume	Concentration finale
Tampon de réaction 5X	10,0 µl	1X
Mélange de dNTP (10 mM chacun)	1,0 µl	0,2 mM
Primer 5'	0,2 µl	20 pmoles/50 µl
Primer 3'	0,2 µl	20 pmoles/50 µl
MgSO <sub>4</sub> 25 mM	2,0 µl	1 mM
AMV transcriptase inverse (5 U/µl)	1,0 µl	0,1 U/µl
<i>Tfl</i> ADN polymérase	1,0 µl	0,1 U/µl
[α- <sup>32</sup> P] dCTP dilués dans l'eau RNase-free	30,6 µl	0,25 µCi/50 µl
Echantillon d'ARN total	4,0 µl	1µg d'ARN total
Volume final	50 µl	

On prépare ce mélange dans l'ordre indiqué dans le tableau ci-dessus et, en dernier lieu, on ajoute les 2 enzymes. Si on a plusieurs échantillons, on mélange chacun de ces composants en multipliant les volumes additionnés par le nombre d'échantillons (réalisé dans une pièce spéciale appelée pièce PCR 1). Puis, on transfère 46 µl de ce mélange dans chaque microtube de réaction auquel on ajoute 4 µl d'ARN (réalisé dans une autre pièce spéciale appelée pièce PCR 2).

Les échantillons sont ensuite mis dans le thermo-cycleur qui réalise les cycles de température décrits dans le tableau ci-dessous :

<b><i>Activation de la transcriptase inverse d'AMV et synthèse du brin d'ADNc</i></b>		
48°C / 60 minutes		
<b><i>Inactivation de la transcriptase inverse d'AMV et dénaturation des brins ARN/ADNc :</i></b>		
94°C / 2 minutes		
<b><i>Synthèse du brin complémentaire de l'ADN puis amplification par PCR :</i></b>		
1) x cycles	94°C / 30 sec	Dénaturation des doubles brins
	60°C / 30 sec	Hybridation dont les conditions sont définies en fonction de la séquence des amorces
	72°C / 45 sec	Extension d'amorce, donc polymérisation
2) 1 cycle	72°C / 10 min	Extension finale
3) 1 cycle	4°C	Stockage

On stocke ensuite les produits de ces réactions à -20°C ou bien on les analyse directement soit sur gel d'agarose (pour une RT-PCR non radioactive) soit sur gel de polyacrylamide (pour une RT-PCR radioactive).

## **II.2.1.5. Analyse des produits de PCR**

### **II.2.1.5.1 Electrophorèse en gel d'agarose**

Pour mettre au point les conditions de PCR (nombre de cycles, température d'hybridation, etc.), nous avons choisi d'analyser, dans un premier temps, les produits provenant de RT-PCR non radioactives sur gel d'agarose.



Concentration en agarose (%)	Séparation efficace de molécules d'ADN (kB)
0,3	5-60
0,6	1-20
0,7	0,8-10
0,9	0,5-7,0
1,2	0,4-6,0
1,5	0,2-3,0
2,0	0,1-2,0

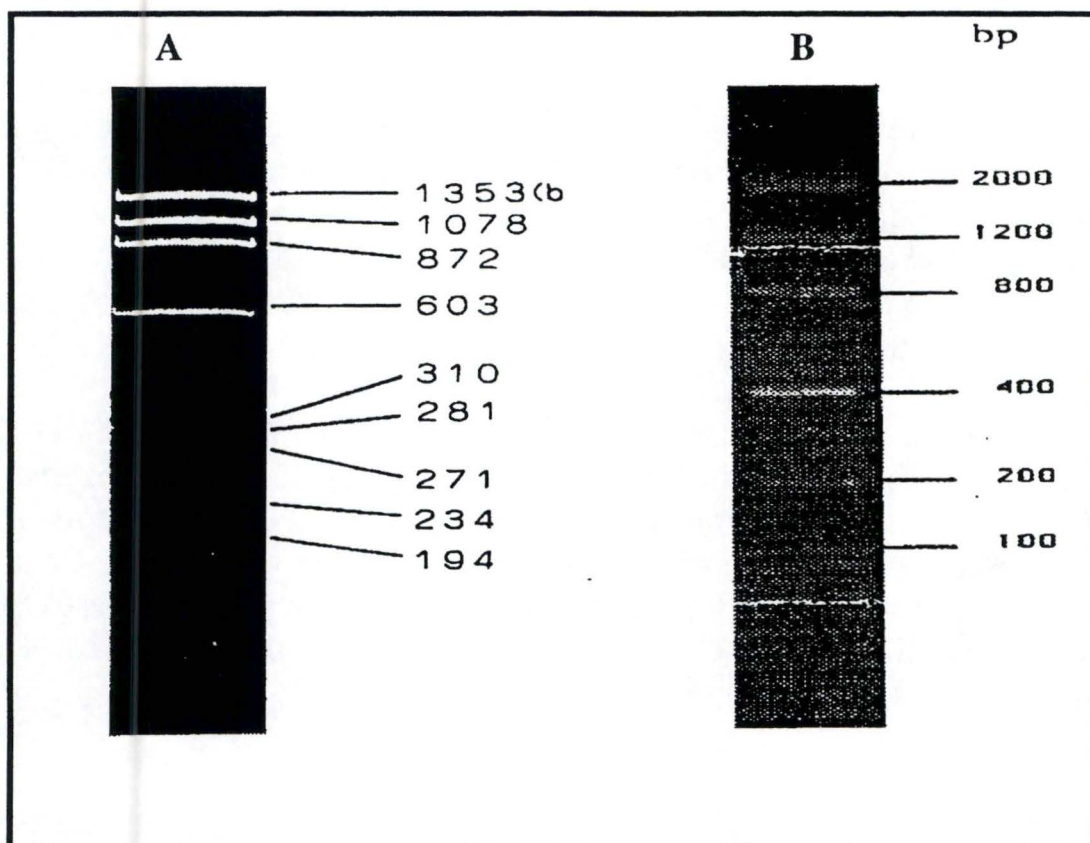
**Tableau II.2 :** Concentration optimale en agarose à utiliser selon la taille des molécules d'ADN à séparer.

L'électrophorèse en gel d'agarose permet de séparer les fragments d'ADN en fonction de leur taille. Le pourcentage en agarose peut être modifié en fonction des tailles respectives des fragments à séparer, un plus faible pourcentage permettant la migration de plus longs fragments d'ADN et inversement. Les molécules d'ADN double brin linéaire migrent à une vitesse inversement proportionnelle à leur poids moléculaire.

La taille des différents fragments est estimée en faisant co-migrer des marqueurs de poids moléculaire. Il s'agit d'ADN restreint par une enzyme de restriction générant des fragments de tailles connues. Les fragments sont visualisés grâce au bromure d'éthidium que l'on ajoutera dans le gel. Celui-ci s'intercale entre les bases de la double hélice. L'ADN ainsi marqué est rendu fluorescent sous illumination U.V. La fluorescence d'un fragment d'ADN est proportionnelle à sa taille ainsi qu'à sa quantité.

#### *A. Matériel*

- Cuve d'électrophorèse (Horizon 11-14, Gibco BRL Life Technologies, Paisley, Grande-Bretagne)
- Transilluminateur, longueur d'onde : 392 nm (Analis, Namur, Belgique)
- Appareil polaroïd (modèle 44-16 MP4 Instant camera System, USA)
- Film polaroïd (Duofilm, 667 Iso 3000 / 36°C, Janssen Chimica, Beerse, Belgique)
- TBE 1X (Tris-borate 0,9 M ; EDTA 0,002 M), pour un litre :
  - . 54 g de Tris (Merck, Darmstadt, Allemagne)
  - . 27,5 g d'acide borique (Merck, Darmstadt, Allemagne)
  - . 20 ml d'EDTA 0,5 M (pH 8,0) (Merck, Darmstadt, Allemagne)
- Bromure d'éthidium, solution stock de 500 µg/ml, (Sigma Chemical, Saint-Louis, USA)
- Agarose (Ultra Pure Grade Agarose, Bio-Rad, Richmond, USA). La concentration en agarose à utiliser va dépendre de la taille des molécules d'ADN à séparer (tableau II.2)



**Figure II.7 :** Marqueurs de poids moléculaire après migration sur gel d'agarose (Low DNA Mass Ladder) ou gel de polyacrylamide (marqueur IV).

A) Marqueur IV (d'après Gibco, Grande Bretagne)

B) Low DNA Mass Ladder (d'après Eurogentec, Belgique)

- Tampon d'échantillon :
  - . Glycérol 50 % (Merck, Darmstadt, Allemagne)
  - . EDTA 100 mM (Merck, Darmstadt, Allemagne)
  - . SDS 1 % (Merck, Darmstadt, Allemagne)
  - . Bleu de bromophénol 0,1 % (Janssen Chimica, Gand, Belgique)
- Marqueur ADN de poids moléculaire (figure II.7a)
  - . Marqueur IV (Eurogentec, Seraing, Belgique)

### *B. Méthode*

Pour préparer le gel, on porte à ébullition un volume approprié de tampon TBE 1X, additionné d'agarose jusqu'à obtenir une solution limpide. Cette solution est alors coulée sur le support de gel muni d'un peigne. Quand le gel est polymérisé, il est immergé dans le tampon TBE 1X. On dépose ensuite dans les puits du gel les échantillons auxquels on a ajouté une solution d'alourdissement (tampon d'échantillon 10 % final) et on règle le voltage à 80 Volts pour permettre la migration. L'ADN, chargé négativement migre vers le pôle positif, tandis que le bromure d'éthidium non lié, chargé positivement migre vers le pôle négatif. En fin d'électrophorèse, les fragments d'ADN sont visualisés dans le gel au moyen d'une illumination sous U.V. et photographiés.

#### II.2.1.5.2. Gel de polyacrylamide

Après les mises au point des conditions PCR, nous avons réalisé les expériences de RT-PCR en présence de nucléotides radioactifs; ce qui nous a permis de diminuer le nombre de cycles d'amplification lors de la PCR et de voir apparaître plus facilement les éventuelles bandes contaminantes puisque la sensibilité est augmentée grâce à la radioactivité. Nous avons analysé ces produits de manière semi-quantitative sur gel de polyacrylamide.

% en acrylamide	Taille des fragments d' ADN (bp)	Migration du bleu de bromophénol (bp)
3,5	100 à 1000	100
5,0	100 à 500	65
8,0	60 à 400	45
12,0	50 à 200	20
20,0	5 à 100	12

**Tableau II.4 :** Concentration en acrylamide donnant la résolution maximale des fragments d'ADN.

## A. Matériel

- Tampon d'électrophorèse (TBE 1X) fait à partir de la solution stock de TBE (10 X) :
  - . TRIS 0,9 M (Janssen Chimica, Beerse, Belgique)
  - . Acide borique 0,9 M (Merck, Darmstadt, Allemagne)
  - . EDTA 0,02 M (Merck, Darmstadt, Allemagne)
  
- Gel d'électrophorèse (5 %) :
  - . 8,75 ml d'acrylamide / bisacrylamide (la solution stock se compose de 30 % d'acrylamide pour 1 % de N,N'-méthylène bisacrylamide).
  - . 2,5 ml de TBE 10 X :
    - TRIS 0,9 M (Janssen Chimica, Beerse, Belgique)
    - Acide borique 0,9 M (Merck, Darmstadt, Allemagne)
    - EDTA 0.02 M (Merck, Darmstadt, Allemagne)
  - . H<sub>2</sub>O distillée : 35,45ml
  - . 25 µl de TEMED (Bio-Rad, Richmond, U.S.A.)
  - . 300 µl de persulfate d'ammonium (0,1g/1 ml) (Serva, Vervier, Belgique)
  
- Bleu de bromophénol (Janssen Chimica, Beerse, Belgique)
- Marqueur de poids moléculaire : Low DNA Mass Ladder (Gibco, Paisley Grande-Bretagne) (voir figure II.7b)

## B. Méthode

On coule le gel d'électrophorèse (5%) (décrit au point II.1.4.3) et on le laisse polymériser environ 1 heure. Nous avons réalisé des gels dont la concentration en acrylamide est de 5 % car cette concentration permet une résolution maximale de fragments d'ADN allant de 100 à 500 bp (tableau II.4). La taille des produits PCR que nous avons analysés ont une taille attendue de 200 à 487 bp.

La taille des différents fragments d'ADN est estimée en faisant co-migrer des marqueurs de poids moléculaire qui ont été préalablement marqués au  $^{32}\text{P}$  grâce à la T4 kinase, afin de permettre leur visualisation lors de l'autoradiographie du gel (voir la méthode de marquage au point II.1.5.5).

Lorsque le gel est polymérisé, on le place dans la cuve d'électrophorèse avec le tampon d'électrophorèse (TBE 1X) et on lui fait subir un pré-run d'une heure à 100 Volts. Pendant ce temps, 20  $\mu\text{l}$  des produits de la RT-PCR (sur les 50  $\mu\text{l}$  au total) sont ajoutés à 2  $\mu\text{l}$  de tampon d'échantillon puis déposés au fond des puits, pour ensuite migrer pendant 2 h à 100 Volts. Le gel est alors démoulé, placé sur un papier Whatman et recouvert par un papier cellophane. A ce moment, le gel est prêt pour la quantification.

## II.2.1.6. Révélation et quantification

### A. Matériel

- Instant Imager (Packard, Downers Grove, USA)
- Film MP pour isotopes émettant des radiations  $\beta$  et  $\gamma$  (Amersham, Gand, Belgique)
- Pour révéler les films, nous utilisons le révélateur Ilford PQ Universal dilué 5X (Universal, Ilford, Grande-Bretagne), et le fixateur Ilford Hypam dilué 5X (Hypam, Ilford, Grande-Bretagne).

### B. Méthode

Le gel est directement lu à l'Instant Imager pendant 10 minutes (voir le point II.1.4.4., page 9) puis séché sous vide à 80°C pendant 1 heure. Le gel est alors autoradiographié en présence d'un film MP pré-flashé. Après 24 à 48 h, le film est révélé en le plaçant 4 minutes dans le fixateur, puis 30 secondes dans de

l'eau distillée, et enfin 4 minutes dans le fixateur. Le film est rincé à l'eau courante avant d'être séché à l'air libre.

## II.2.2 Le séquençage

La technique de séquençage utilisée est un séquençage à fluorescence par OCR avec le système ABI.PRISM Dye terminator cycle sequencing reaction kit (Perkin-Elmer (Roche), Branchburg, USA).

Principe :

Un fragment à séquencer est incubé dans des conditions PCR en présence d'une seule amorce. Le mix PCR contient un ratio adéquat de nucléotides marqués par un agent fluorescent (rhodamine, fluorescéine,...) inhibant l'élongation et de nucléotides non marqués permettant l'élongation.

La réaction PCR produit une population d'amplicons de taille variable et terminée par un nucléotide marqué. Cette population d'amplicons est déposée sur un gel de polyacrylamide résolutif à la base près. Les fragments migrent suivant leur taille. Sur le profil de migration, passe un laser qui excite les marqueurs fluorescents réémettant sous une autre longueur d'onde qui leur est spécifique. La succession des rayonnements émis est analysé et donne la séquence du fragment.

La séquence du brin sens s'obtiendra si on met l'amorce antisens dans le mix PCR et inversement pour le brin antisens.



## II.2.2.1 Préparation de la PCR

### *A. Matériel*

- L'appareil PCR utilisé est le Gene Amp PCR System 2400
- Tubes PCR (Biozym, Landgraaf, Hollande)
- Amorces (voir tableau II.3)
- Terminator Ready Reaction mix (Perkin-Elmer (Roche), Branchburg, USA) contenant la polymérase, les dNTPs, les dNTP terminateurs fluorescents et le tampon PCR.

### *B. Méthode*

1,5 à 2,5  $\mu\text{l}$  de matrice (0,2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) sont déposés dans un tube PCR auquel on ajoute soit l'amorce sens soit l'amorce antisens (3,2 pmoles). De l'eau est ensuite ajoutée pour que le volume final soit de 20  $\mu\text{l}$ . On ajoute ensuite 8  $\mu\text{l}$  de Terminator Ready Reaction mix.

Les conditions PCR sont les suivantes :

- . Dénaturation à 96°C pendant 10 secondes
- . Hybridation à 50°C pendant 5 secondes
- . Elongation à 60°C pendant 4 minutes

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

## II.2.2.2 Préparation des échantillons pour l'analyse sur gel

### A. Matériel

- Ethanol 95% (Merck, Darmstadt, Allemagne)
- Ethanol 75% (Merck, Darmstadt, Allemagne)
- NaAc 3M pH 4,6 ou 5,2 (Merck, Darmstadt, Allemagne)
- Appareil ABI.PRISM (Perkin-Elmer (Roche), Branchburg, USA)

### B. Méthode

Pour chaque échantillon de séquençage, on prépare un microtube de 1,5 ml dans lequel on place 50 µl d'éthanol 95 %, 2 µl de NaAc 3M et les 20 µl de la réaction PCR de séquençage. Le tout est alors vortexé et placé 10 minutes sur glace.

On centrifuge 30 minutes à 15 000 rpm (4°C) et on lave le culot avec 250 µl d'éthanol 70 %. On centrifuge de nouveau à 15000 rpm (4°C) et le culot est séché sous vide.

Les échantillons sont ensuite déposés sur un gel de polyacrylamide 4%, la lecture de la séquence étant effectuée de manière automatique par l'appareil ABI.PRISM.

# **Résultats et discussion**

# III. RESULTATS ET DISCUSSION

La partie expérimentale de ce mémoire se compose de deux volets. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la mise en évidence de l'activation de HIF-1 par la technique de retard sur gel. En second lieu, nous nous sommes focalisés sur la régulation transcriptionnelle de HIF-1 $\alpha$  en estimant la quantité d'ARNm de cette protéine par des expériences de RT-PCR.

## III.1. ETUDE DE L'ACTIVATION DE HIF-1

### III.1.1. Mise au point de l'EMSA

La majeure partie de notre travail se base sur les expériences de retard sur gel. Il a donc été nécessaire de mettre au point cette technique.

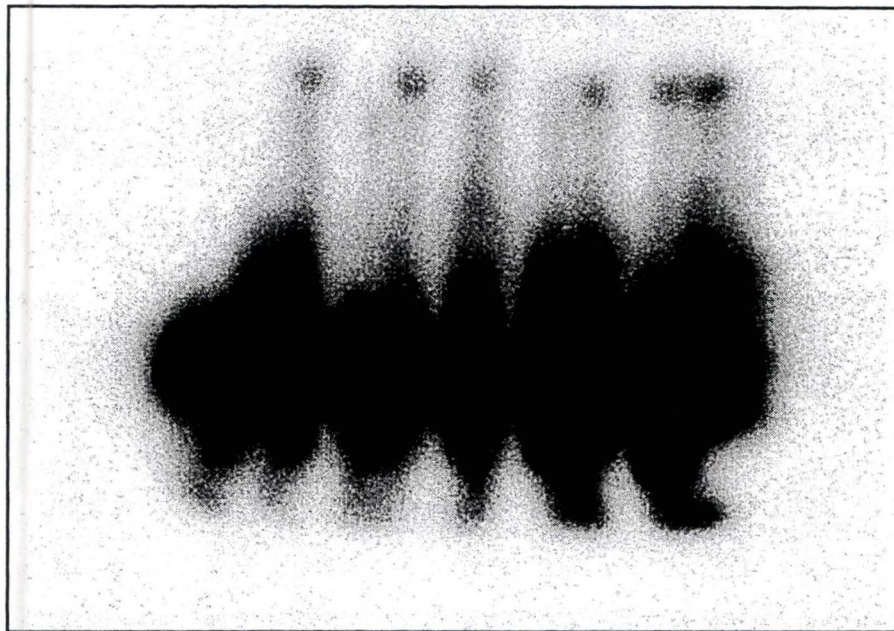
Dans nos expériences de retard sur gel, nous nous attendons à observer une première bande correspondant à la liaison constitutive de protéines à la sonde spécifique de HIF-1 et une seconde bande, migrant moins loin, qui correspond à la liaison de HIF-1 à sa séquence consensus. Cette bande spécifique ne devrait être observée que pour des extraits provenant des cellules incubées sous hypoxie ou en présence de CoCl<sub>2</sub> (Schemdtje *et al.*, 1996).

#### III.1.1.1. Utilisation de la sonde W18

##### ◆ *Description de l'expérience réalisée*

Lors des premières expériences, l'incubation sous hypoxie des cellules HMEC-1 a été réalisée dans une solution saline HBSS. Cette solution saline est couramment utilisée au laboratoire pour incuber les HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) sous hypoxie. L'extraction de la fraction nucléaire et le marquage de la sonde W18 ont été effectués tels que décrit au point II.1.4. du chapitre "matériel et méthodes".

1 2 3 4 5 6 7 8 9



**Figure III.1 :** Analyse de la liaison du facteur HIF-1 à la sonde W18 par la technique de retard sur gel.

Les pistes 2 à 5 contiennent des extraits nucléaires de cellules cultivées dans des boîtes de pétri; les pistes 6 à 9 contiennent des extraits nucléaires de cellules cultivées dans des boîtes de culture.

Les échantillons déposés sur gel sont :

1 : sonde seule (contrôle négatif)

2 et 6 : extraits nucléaires de cellules maintenues en normoxie (2h30) + sonde W18

3 et 7 : extraits nucléaires de cellules incubées sous hypoxie (2h30) + sonde W18

4 et 8 : extraits nucléaires de cellules contrôle (16 h) + sonde W18

5 et 9 : extraits nucléaires de cellules incubées en présence de 125 μM CoCl<sub>2</sub> (16h) + sonde W18

marquage de la sonde W18 ont été effectués tels que décrit au point II.1.4. du chapitre “ matériel et méthodes”.

Deux types de boîte de culture ont été envisagés : des boîtes de Pétri ou des boîtes de cultures T75. Pour chacune de ces conditions, les cellules ont été incubées soit 2h30 en normoxie ou sous hypoxie soit 16 h en présence ou en absence de  $\text{CoCl}_2$  125  $\mu\text{M}$ . Le  $\text{CoCl}_2$  est utilisé afin de mimer l’hypoxie (voir point I.3.1 de l’introduction). Après les incubations, les fractions nucléaires ont été préparées et un EMSA a été réalisé en présence de la sonde W18.

Chaque échantillon déposé sur gel contient 20  $\mu\text{g}$  de protéines, 10 000 cpm de sonde et une solution de liaison réalisée selon la méthode de Liu (Liu *et al.*, 1995). Cette solution contient : HEPES 10 mM ;  $\text{MgCl}_2$  0,5 mM; EDTA 0,1 mM; glycérol 5% et KCl 100 mM ainsi que 0,1  $\mu\text{g}$  d’ADN de sperme de saumon/20  $\mu\text{l}$  de volume final de solution.

#### ◆ *Résultats*

La figure III.1 est une autoradiographie électronique de l’EMSA réalisé. La piste 1 correspond à un contrôle négatif : on n’observe aucune bande retardée sur le gel par rapport à la sonde libre (visible à la base du gel). Nous observons par contre un retard plus ou moins marqué pour les pistes 2, 4, 5, 7, 8 et 9.

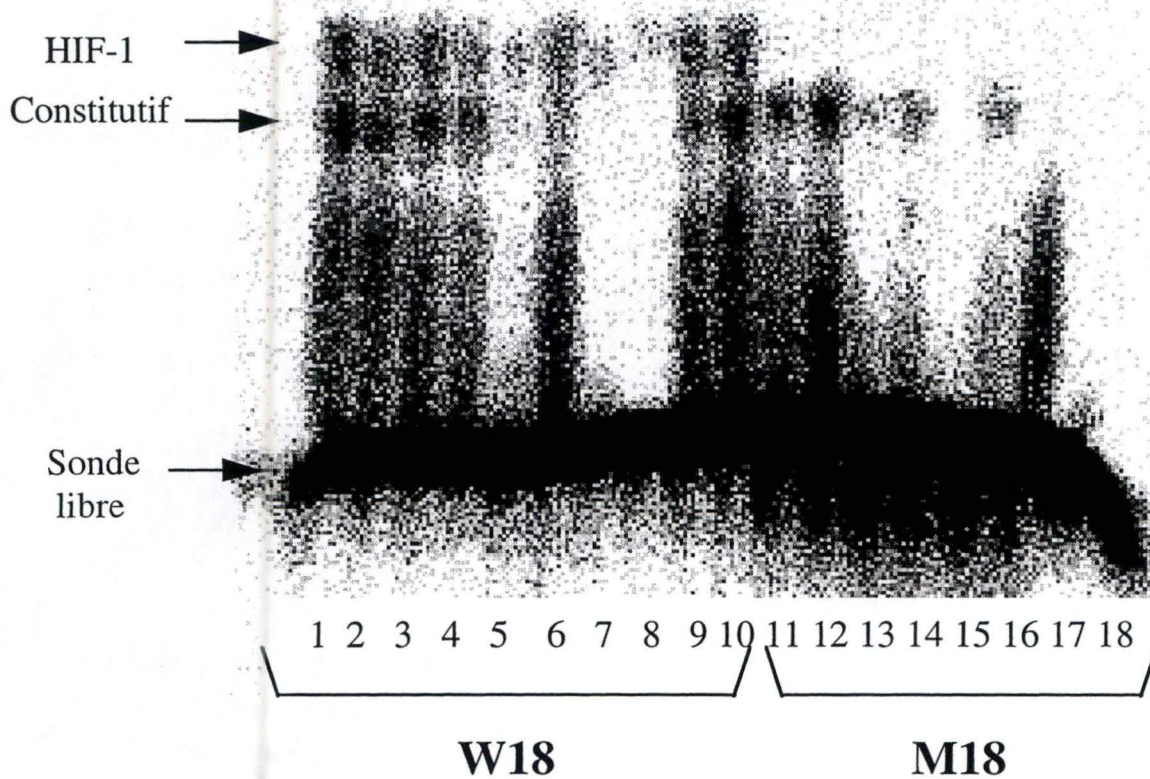
D’un point vue pratique, il est plus facile de récupérer des cellules cultivées dans les boîtes T75 pour préparer les extraits nucléaires. Ces conditions seront donc gardées par la suite.

#### ◆ *Discussion*

Les retards observés ne permettent pas de mettre en évidence une liaison spécifique de HIF-1 à la sonde W18. En effet, deux bandes auraient dû être observées : une bande constitutive et une bande spécifique.

Les conditions expérimentales de l’EMSA telles qu’utilisées dans cette première expérience n’étaient donc pas adéquates. Dans l’espoir d’améliorer ces conditions, nous avons utilisé la solution de liaison décrite par Semenza

Temps (min)	60	90	120	150	90	60	90	120	150
Traitement	N H	N H	N H	N H	N H	N H	N H	N H	N H



**Figure III.2:** Analyse de la liaison du facteur HIF-1 à la sonde sauvage W18 et à la sonde mutée M18 par la technique de retard sur gel. Les extraits ont été préparés à partir de cellules ayant subi différents temps d'incubation en normoxie (N) ou sous hypoxie (H).

(Semenza & Wang, 1992). De plus, afin d'identifier avec plus de certitude la bande correspondant à la liaison spécifique de HIF-1, la sonde mutée M18 (décrite au point II.1.5.1. du chapitre "matériel et méthodes") a également été utilisée.

### III.1.1.2. Utilisation de la sonde mutée M18

#### ◆ *Description de l'expérience réalisée*

Les cellules ont été incubées pendant des temps croissants en normoxie ou en hypoxie avant d'en préparer les fractions nucléaires. Les cellules ont été cultivées dans des boîtes de culture T75 et les incubations sous hypoxie ont été réalisées dans la solution saline HBSS. Pour le retard sur gel, les extraits nucléaires ont été incubés soit en présence de la sonde sauvage W18 soit en présence de la sonde mutée M18.

Chaque échantillon déposé sur le gel contient 40 µg de protéines, 10 000 cpm de sonde, une solution de liaison réalisée selon la méthode de Semenza (pour avoir 60 µl final) ainsi que 0,1 µg d'ADN de sperme de saumon/20 µl de volume final de solution (point II.1.4.2. du chapitre "matériel et méthodes").

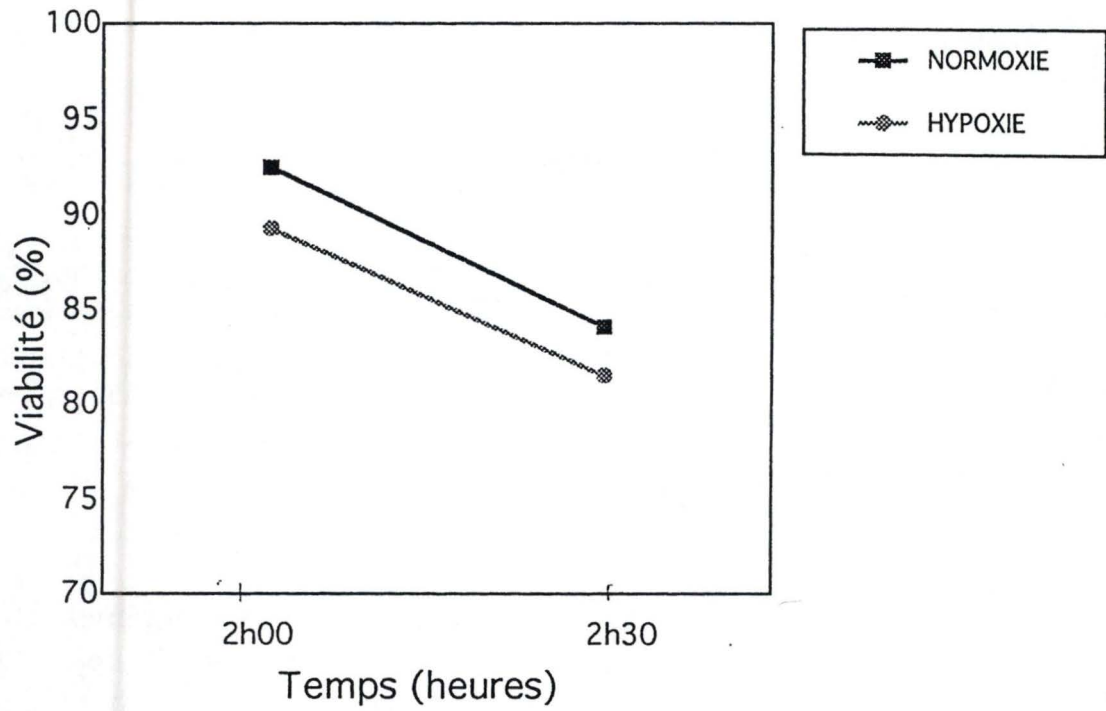
#### ◆ *Résultats*

La figure III.2 est une autoradiographie électronique de l'EMSA réalisé. Nous observons une nette différence entre les pistes de 1 à 10 (sonde W18) et les pistes de 11 à 18 (sonde M18).

Les deux bandes auxquelles nous nous attendions sont présentes. La bande constitutive est présente dans les extraits contenant la sonde W18 et la sonde M18. Par contre, la bande spécifique correspondant à HIF-1 n'est visible que pour les extraits incubés en présence de la sonde W18. L'excès de sonde libre est visible à la base du gel.

Nous n'observons, cependant, aucune différence significative entre les pistes contenant les extraits des cellules hypoxiques par rapport aux extraits de cellules normoxiques (piste 2 par rapport à la piste 1 ou piste 4 par rapport à la





**Figure III.3 :** Evolution de la viabilité des cellules HMEC-1 lors des incubations dans l'HBSS.

piste 3). Les pistes 5, 6, 7 et 8 ne montrent presque pas de retard. Les pistes 3, 4 ainsi que 9 et 10 contiennent les mêmes extraits nucléaires et permettent de vérifier la reproductibilité de l'expérience

#### ◆ *Discussion*

La différence observée entre les extraits nucléaires incubés avec la sonde sauvage W18 et ceux incubés avec la sonde mutée M18 indique qu'il y a effectivement une reconnaissance spécifique de la sonde W18, ce qui indique que nous mettons bien en évidence la liaison du facteur HIF-1. Nous ne pouvons cependant pas mettre en évidence l'activation de HIF-1 par l'hypoxie.

De plus, on ne remarque plus de retard sur les pistes 5, 6, 7 et 8 qui correspondent à des temps plus longs (90 et 120 minutes) d'incubation. Nous avons alors pensé que les cellules HMEC-1 supportaient mal l'incubation dans l'HBSS et nous avons vérifié la viabilité des cellules lors de l'incubation sous hypoxie.

### **III.1.1.3. Viabilité des cellules HMEC-1 dans l'HBSS**

Le critère choisi afin d'estimer la mortalité cellulaire se base sur le test d'exclusion d'un colorant vital : le bleu de Trypan.

#### ◆ Description de l'expérience réalisée

Les cellules sont soit incubées sous hypoxie pendant 2h ou 2h30, soit laissées un laps de temps identique en normoxie, et ce dans du HBSS. Après l'incubation, la mortalité des cellules est estimée à l'aide du bleu de Trypan (voir point II.1.4 du chapitre "matériel et méthodes").

#### ◆ *Résultats*

La figure III.3 représente l'évolution de la viabilité des cellules HMEC-1 incubées 2h ou 2h30 sous hypoxie ou en normoxie. On observe que la mortalité

des cellules augmente au cours du temps et ce, non seulement pour les cellules incubées sous hypoxie mais également pour celles maintenues en normoxie. La mortalité est toujours légèrement supérieure pour les cellules incubées sous hypoxie par rapport aux cellules normoxiques.

#### ◆ *Discussion*

Si la viabilité des cellules contrôles maintenues en normoxie est relativement bonne pour une durée de 2h, on observe que la mortalité augmente au cours du temps. Ces résultats laissent penser que ce type cellulaire supporte mal les incubations dans l'HBSS.

Nous avons donc décidé de ne plus utiliser l'HBSS pour les incubations sous hypoxie mais un milieu indépendant du CO<sub>2</sub> auquel on ajoute 2 % de sérum et de la glutamine (voir le point II.1.2. du chapitre "matériel et méthodes"). Ces conditions correspondent à celles utilisées par Schmedtje pour les HMEC-1 (Schmedtje *et al.*, 1996).

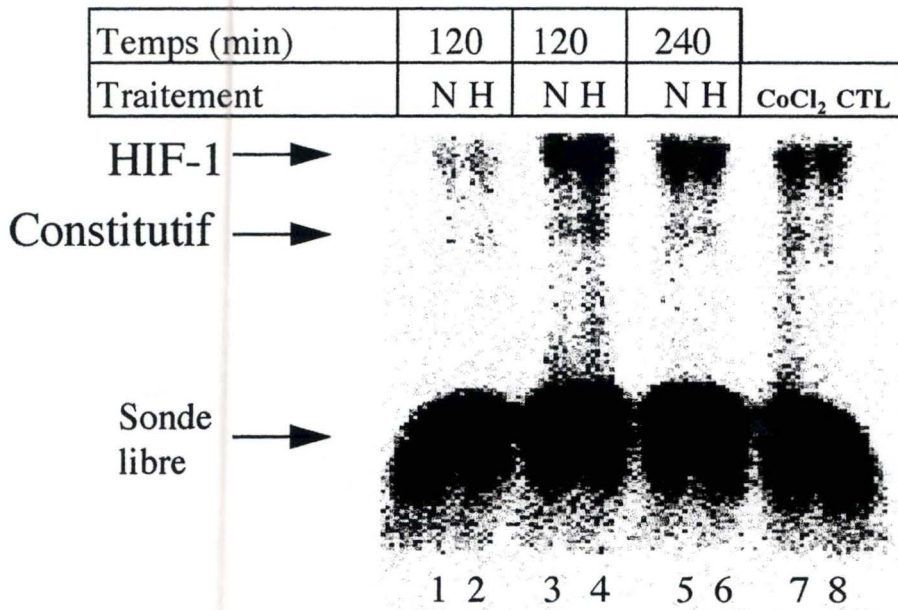
#### **III.1.1.4. Comparaison HBSS-milieu modifié**

Au vu des résultats du test de viabilité, nous nous sommes aperçu qu'il était indispensable de réaliser les incubations sous hypoxie-normoxie, non plus dans l'HBSS mais dans le milieu modifié. Nous avons donc comparé ces deux types d'incubation dans une expérience de retard sur gel.

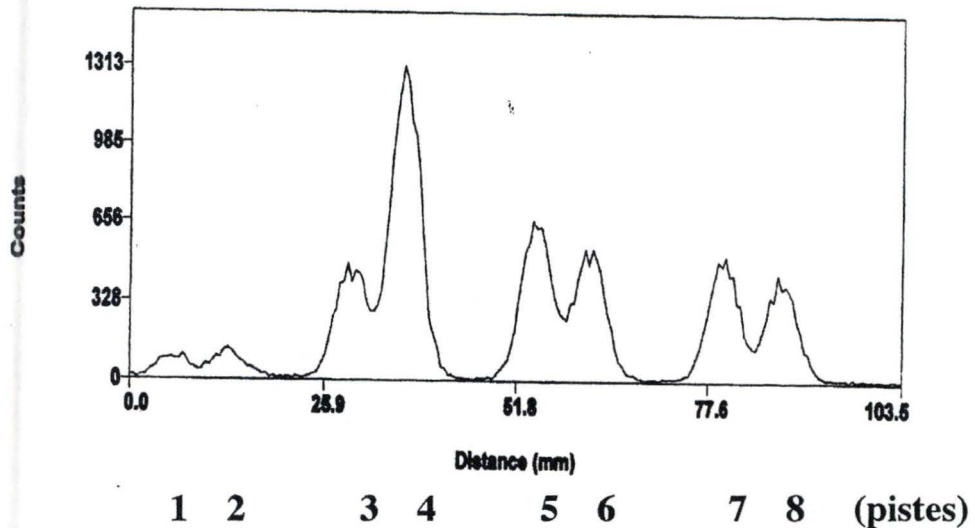
#### ◆ *Description de l'expérience réalisée*

Les cellules ont été incubées en normoxie ou en hypoxie soit dans le milieu modifié (2h ou 2h30) soit dans l'HBSS (2h). Des cellules ont également été incubées 16h en présence ou en absence de CoCl<sub>2</sub> 125 µM. Après les incubations, nous avons préparé les extraits nucléaires et réalisé une expérience de retard sur gel en présence de la sonde sauvage W18.

Chaque échantillon déposé sur le gel contient 25 µg de protéines, 10 000 cpm de sonde W18, la solution de liaison selon Semenza (pour un volume final



**Figure III.4 :** Comparaison des différents milieux d'incubation (HBSS et milieu modifié) pour l'activation de HIF-1 mise en évidence par la technique de retard sur gel. Pistes 1 et 2 : extraits nucléaires obtenus à partir de cellules incubées dans l'HBSS. Pistes 3 à 6 : extraits nucléaires obtenus à partir de cellules incubées dans le milieu modifié. N : Normoxie. H : Hypoxie.



**Figure III.4 (bis) :** Profil quantitatif de la radioactivité correspondant à la bande HIF-1 pour les différentes pistes de la figure III.4.

de 40 µl) ainsi que 0,1 µg d'ADN de sperme de saumon/20 µl de volume final de solution.

#### ◆ *Résultats*

La figure III.4 est une autoradiographie électronique de l'EMSA réalisé. Nous observons distinctement la bande correspondant à HIF-1. La bande constitutive, quant à elle, est de faible intensité mais est présente. L'excès de sonde libre est visible à la base du gel. Les deux premières pistes correspondant aux cellules incubées dans l'HBSS montrent des bandes d'intensité très faible par rapport à celles observées pour les pistes 3 à 8 où les cellules ont été incubées dans le milieu modifié.

La figure III.4 (bis) représente le profil de la radioactivité correspondant à bande de HIF-1 pour les différentes pistes de la figure III.4

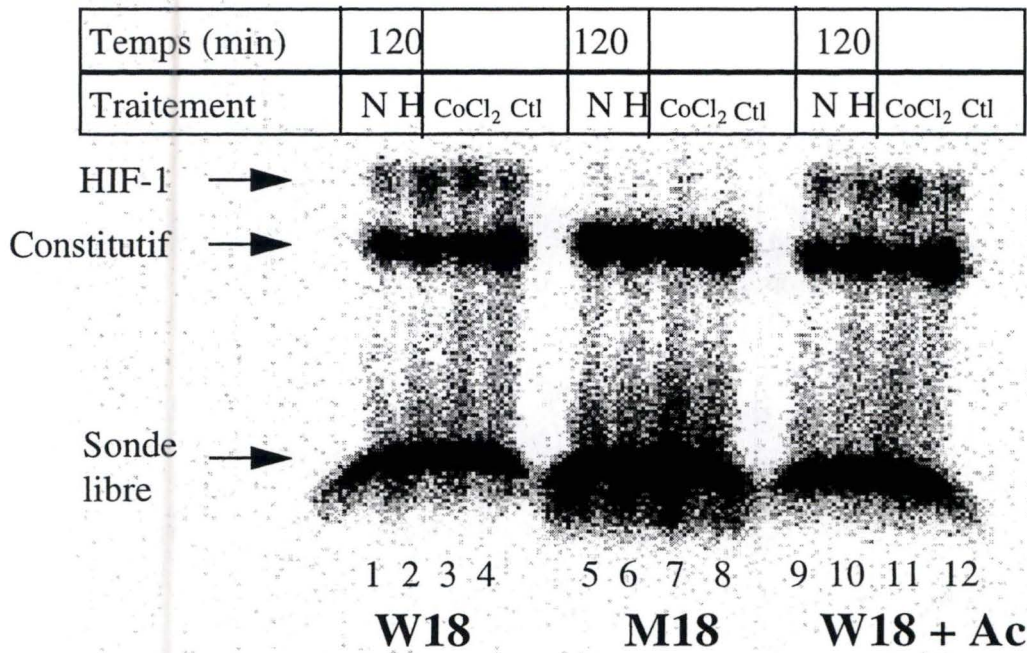
L'intensité de la bande spécifique de HIF-1 de la piste 4 (hypoxie 2h) est plus intense que celle de la piste 3 (normoxie 2h). Cette différence n'est cependant pas observée pour 4h d'hypoxie ou pour les cellules incubées en présence de  $\text{CoCl}_2$ .

#### ◆ *Discussion*

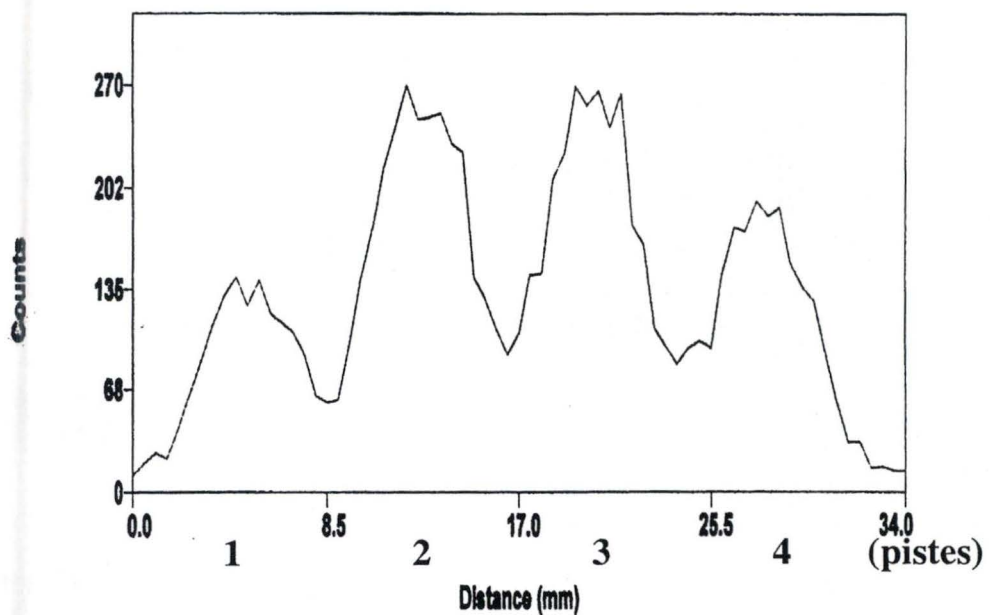
Cette expérience nous a permis de mettre en évidence l'importance du milieu d'incubation lors des incubations sous hypoxie : le milieu modifié contenant 2% de sérum et de la glutamine semble plus adéquat que l'HBSS. Par ailleurs, une durée d'hypoxie de deux heures pourrait être plus favorable pour observer une activation de HIF-1 que ne l'est 4h. Ce résultat reste à confirmer.

### **III.1.2. Etude de l'activation de HIF-1**

L'expérience précédente indique que les conditions expérimentales de la mise en évidence de l'activation du facteur HIF-1 par retard sur gel semblent être au point. Nous avons voulu ensuite vérifier si le complexe qui lie la sonde sauvage est bien le facteur HIF-1. A cette fin, un "supershift" à l'aide d'un



**Figure III.5 :** Analyse de la liaison du facteur HIF-1 à la sonde sauvage W18 en l'absence ou en présence d'Ac anti-ARNT par la technique de retard sur gel. Les extraits nucléaires ont été préparés à partir de cellules ayant subi 120 minutes d'incubation en normoxie (N) ou sous hypoxie (H) ou à partir de cellules incubées 16 h en présence ou en l'absence de 125  $\mu$ M de COCl<sub>2</sub>.



**Figure III.5 (bis) :** Profil quantitatif de la radioactivité correspondant à la bande HIF-1 pour les pistes 1, 2, 3 et 4 de la figure III.5.

anticorps dirigé contre ARNT, l'une des deux sous-unités de l'hétérodimère HIF-1, a été réalisée.

◆ *Description de l'expérience réalisée*

Les cellules ont été incubées soit 2h en normoxie ou sous hypoxie soit 16h en absence ou en présence de  $\text{CoCl}_2$  125  $\mu\text{M}$  avant d'en préparer les extraits nucléaires. Pour chacun de ces extraits, une expérience de retard sur gel a été réalisée en présence de la sonde sauvage W18 ; en présence de la sonde mutée M18 ou en présence de la sonde sauvage et de l'anticorps dirigé contre ARNT (supershift).

Chaque échantillon déposé sur le gel contient 25  $\mu\text{g}$  de protéines, 10 000 cpm de sonde W18, la solution de liaison selon Semenza (pour un volume final de 40  $\mu\text{l}$ ) ainsi que 0,1  $\mu\text{g}$  d'ADN de sperme de saumon/20  $\mu\text{l}$  de volume final de solution. La concentration finale en anticorps anti-ARNT était de 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

◆ *Résultats*

La figure III.5 est une autoradiographie électronique de l'EMSA réalisé. La bande correspondant à HIF-1 est nettement visible lorsque le retard sur gel est réalisé en présence de la sonde sauvage. Par contre, aucune bande correspondant à HIF-1 n'est visible pour les extraits nucléaires incubés en présence de la sonde mutée M18. La bande constitutive est visible et d'intensité relativement constante dans toutes les pistes. La liaison de ce facteur constitutif se fait de manière similaire à la sonde sauvage et à la sonde mutée.

D'autre part, nous n'avons pas pu mettre en évidence de supershift pour les extraits incubés en présence de la sonde W18 et de l'anticorps anti-ARNT : aucune bande retardée et migrant moins loin que celle correspondant à HIF-1 n'apparaît dans les pistes 9 à 12.

La figure III.5 (bis) représente une analyse quantitative de la radioactivité associée à la bande correspondant à HIF-1 pour les pistes de 1 à 4 de la figure III.5. L'intensité de la sonde spécifique de HIF-1 est 2X plus grande pour les cellules incubées en hypoxie par rapport aux cellules normoxiques. De même,

l'incubation en présence de  $\text{CoCl}_2$  semble également augmenter l'activité de la liaison à l'ADN du facteur HIF-1 d'environ 50%.

#### ◆ *Discussion*

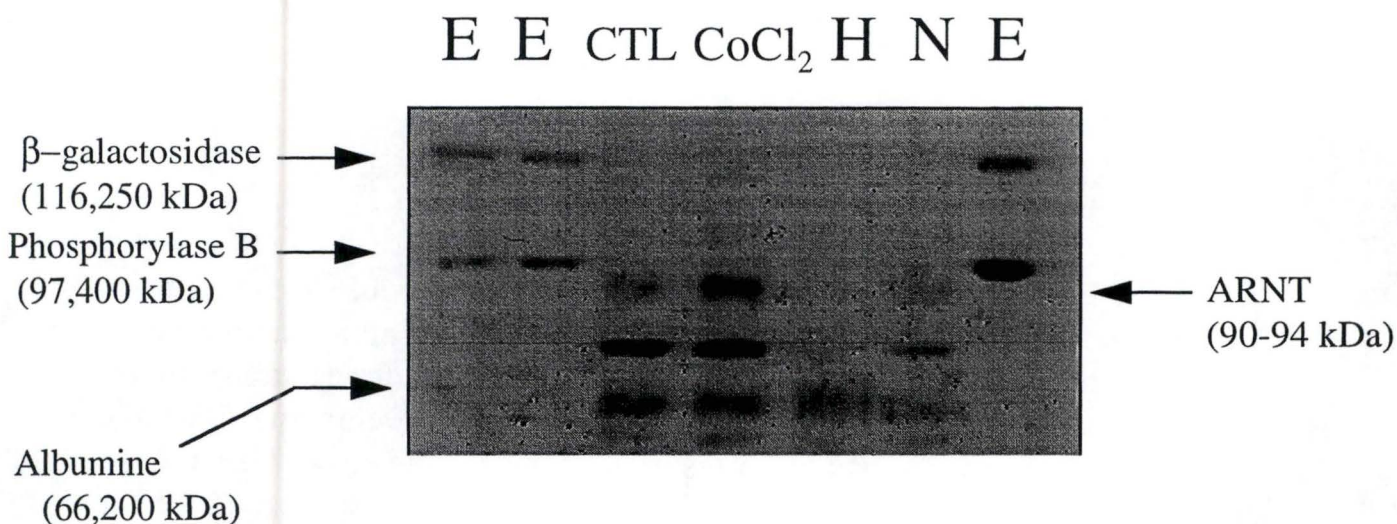
Les résultats présentés à la figure III.5 indiquent que les conditions expérimentales du retard sur gel permettent une estimation semi-quantitative de l'activation de HIF-1. Ils montrent une activation du facteur de transcription HIF-1 en réponse à l'hypoxie traditionnelle ou à l'hypoxie chimique ( $\text{CoCl}_2$ ). Par ailleurs, le fait que la bande correspondant à la liaison de HIF-1 à sa séquence consensus disparaisse si une sonde mutée est utilisée suggère que c'est bien le facteur HIF-1 qui est responsable de ce complexe.

Afin d'identifier plus sûrement la nature protéique du facteur impliqué dans ce complexe, une expérience de supershift a été réalisée. Cependant, nous n'avons pas réussi à montrer un retard plus important sur le gel pour les extraits incubés en présence de la sonde sauvage et l'anticorps anti-ARNT. Nous avons également réalisé une expérience similaire en utilisant des quantités plus importantes d'anticorps mais sans obtenir de bande plus retardée.

Il faut cependant remarquer que ce type d'expériences est très délicat à réaliser dans la mesure où la liaison du facteur à la sonde doit laisser accessible les épitopes reconnus par l'anticorps et où le complexe ARNT-facteur de transcription-Ac doit rester lié pendant la migration sur le gel.

L'anticorps anti-ARNT utilisé dans les expériences précédentes reconnaît une séquence spécifique de l'extrémité carboxyterminale de la protéine ARNT, une des deux sous-unités de HIF-1. Cet épitope devrait se trouver dans le domaine de transactivation. Cependant, il n'existe pas encore de modèle en trois dimensions de ce complexe. Il n'est donc pas impossible d'exclure que la reconnaissance d'ARNT par l'anticorps n'empêche son interaction avec HIF-1 $\alpha$  ou avec l'ADN. Nous avons vérifié par un western blot que l'anticorps dont nous disposons était bien capable de reconnaître ARNT dans les fractions nucléaires.

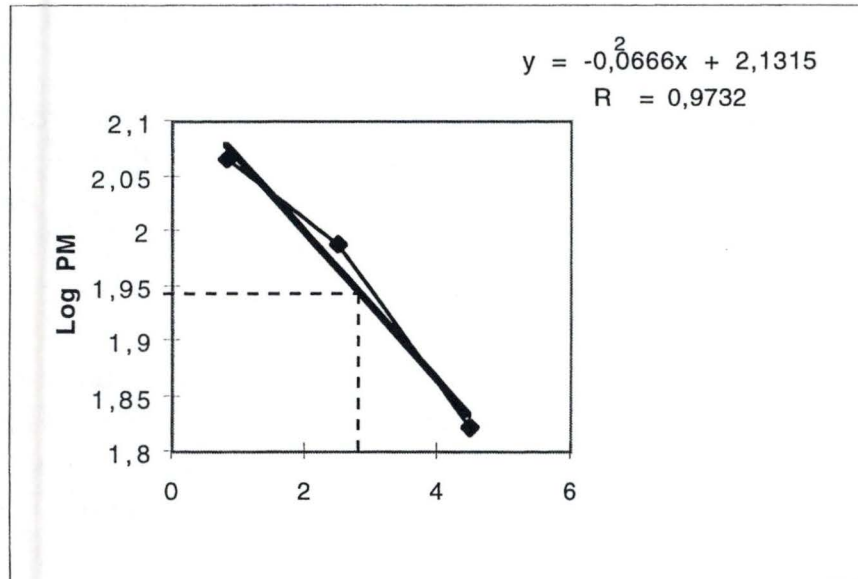




**Figure III.6 :** Mise en évidence de la protéine ARNT par western blot dans des extraits nucléaires de cellules HMEC-1.

Les cellules ont été incubées soit 2h en normoxie (N) ou en hypoxie (H) soit 16h en présence ou en absence de CoCl<sub>2</sub> 125 μM.

E : Etalon



**Figure III.6 (bis) :** Estimation du poids moléculaire de ARNT après migration sur un gel de polyacrylamide dénaturant.

### III.1.3 Reconnaissance de l'anticorps

#### ◆ *Description de l'expérience réalisée*

Les protéines des extraits nucléaires de cellules incubées soit en 2h normoxie ou sous hypoxie, soit en présence ou en absence de  $\text{CoCl}_2$  ont été séparées sur un gel de polyacrylamide dénaturant. Elles ont été ensuite transférées sur une membrane et la protéine ARNT a été révélée à l'aide d'un anticorps spécifique. Le protocole de ce western blot est décrit au point II.1.6 du chapitre "matériel et méthodes"

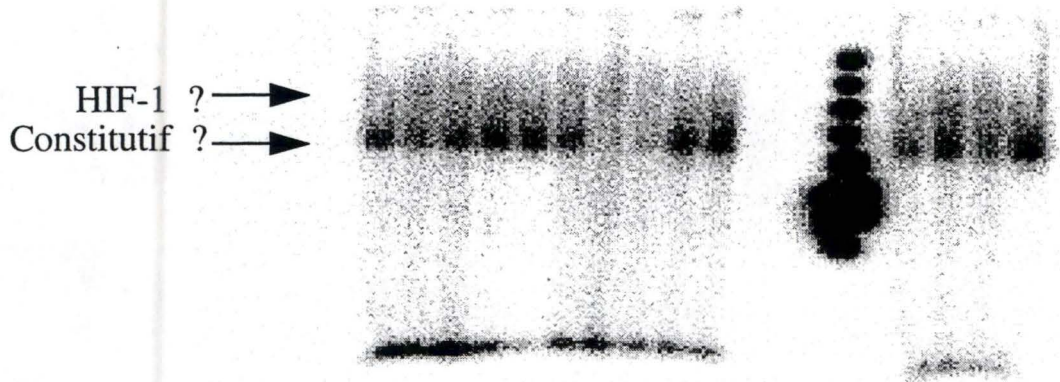
#### ◆ *Résultats*

La figure III.6 représente le film de révélation du western blot réalisé. Plusieurs bandes sont allumées par l'anticorps ARNT. Une de ces bandes correspondant à une protéine d'environ 88 kDa est notamment mise en évidence dans les extraits nucléaires des cellules HMEC-1 (figure III.6 (bis)).

#### ◆ *Discussion*

ARNT a un poids moléculaire calculé de 85 kDa et observé en SDS-PAGE d'environ 90-94 kDa (Semenza *et al.*, 1995). Parmi les quelques bandes allumées par ARNT sur le western blot de la figure III.6, on retrouve une bande d'un poids moléculaire estimé à 88 kDa. Dans la mesure où cette bande correspondrait bien à ARNT, ces résultats nous apportent deux renseignements importants. Premièrement, ARNT est bien présent dans les extraits nucléaires des cellules HMEC-1 même si il existe des variations au niveau quantitatif. Deuxièmement, l'anticorps dont nous disposons reconnaît bien ARNT, ce qui voudrait dire que le fait que nous n'ayons pas observé de supershift lors des expériences précédentes n'est pas dû à une mauvaise reconnaissance de l'anticorps à ARNT mais à d'autres facteurs qui restent non éclaircis à ce jour.

CoCl <sub>2</sub> (h)	24 24 16 12					*		
	- + + +							
Temps (min)		240	180	150	120	R	120	90
Traitement		H N	H N	H N	H N		H N	H N



**Figure III.7 :** Etude de la cinétique d'activation de HIF-1 par la technique de retard sur gel.

Les extraits nucléaires ont été préparés à partir de cellules HMEC-1 incubées pendant différents temps soit en normoxie (N) ou sous hypoxie (H) soit en présence ou en absence de CoCl<sub>2</sub> 125 µM.

R : repères radioactifs de position.

\* : partie non radioactive

expérience permettra notamment de vérifier les résultats obtenus à la figure III.4. De plus, puisque le supershift n'a pas pu être réalisé, nous voulions identifier le facteur HIF-1 du complexe de liaison à l'ADN par western blot après avoir prélevé sur le gel d'EMSA la bande correspondant à cette liaison spécifique. Ce fragment de gel aurait été broyé dans le tampon d'échantillon servant à l'électrophorèse SDS-PAGE et placé ensuite dans un puits du gel avant d'être finalement révélé après électrophorèse et transfert sur membrane à l'aide de l'anticorps anti-ARNT.

#### ◆ *Description de l'expérience réalisée*

Les cellules ont été incubées soit pendant des temps croissants en normoxie ou sous hypoxie allant de 90 à 240 minutes, soit pendant 12, 16 ou 24 en présence de  $\text{CoCl}_2$  125  $\mu\text{M}$ .

Une expérience de retard sur gel a été réalisée en incubant les extraits nucléaires en présence de la sonde W18 marquée radioactivement (visualisation sur l'EMSA) ou non (pour subir ensuite le western blot).

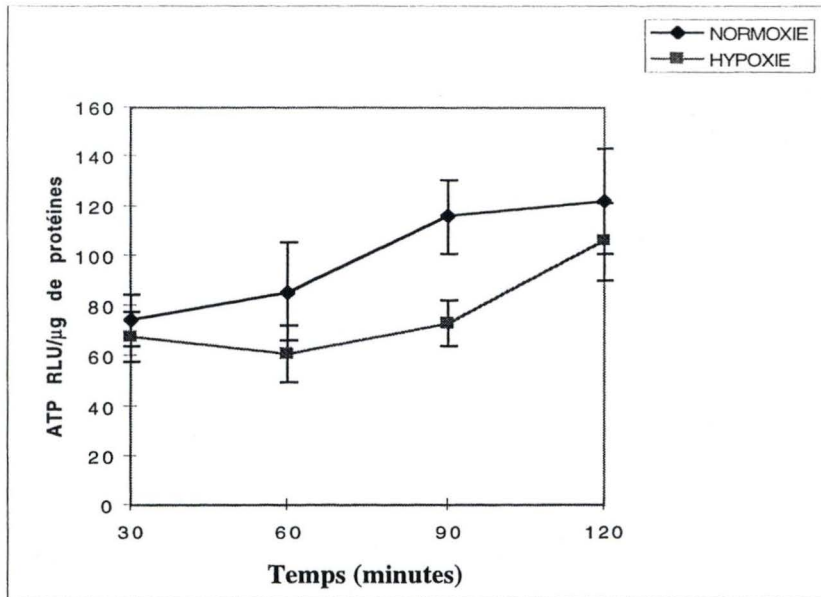
Chaque échantillon déposé sur le gel contient 25  $\mu\text{g}$  de protéines, 10 000 cpm de sonde W18, la solution de liaison selon Semenza (pour un volume final de 40  $\mu\text{l}$ ) ainsi que 0,1  $\mu\text{g}$  d'ADN de sperme de saumon/20  $\mu\text{l}$  de volume final de solution.

#### ◆ *Résultats/Discussion*

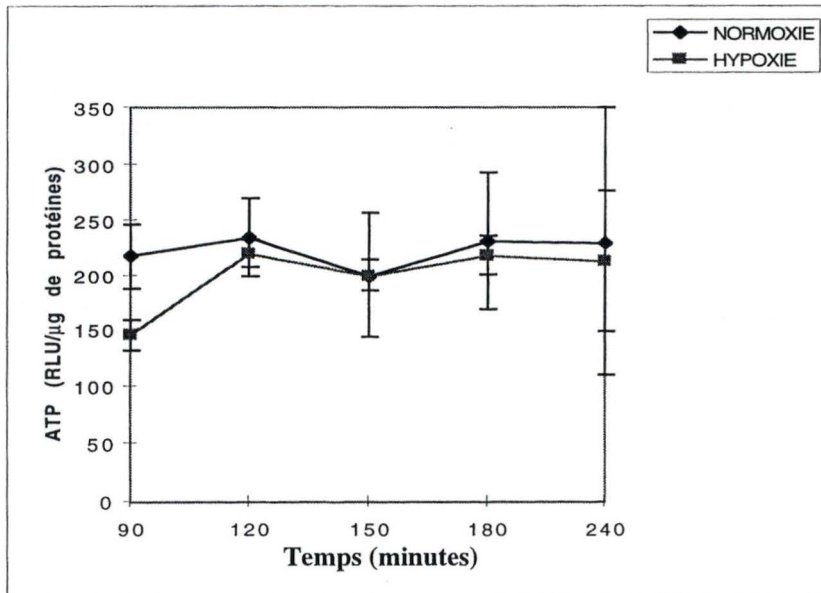
La figure III.7 présente l'autoradiographie de l'EMSA réalisé. On observe bien la bande constitutive, cependant, son intensité varie de piste à piste. De plus, si une bande correspondant à la liaison de HIF-1 apparaît dans les pistes 2, 6, 7 et 15, cette bande est d'intensité très faible et n'apparaît que sporadiquement, c'est-à-dire, pas de manière plus intense dans les extraits de cellules hypoxiques par rapport aux cellules normoxiques. Nous n'avons donc pas pu réaliser de western blot sur la bande correspondant à la liaison de HIF-1.

Cette expérience a été réalisée une nouvelle fois avec une sonde nouvellement marquée et purifiée, sans plus de succès. Nous pensons que les extraits nucléaires étaient partiellement dégradés notamment parce que

A)



B)



**Figure III.8 :** Effet de l'hypoxie sur le contenu en ATP des cellules HMEC-1.

Les cellules ont été incubées en normoxie ou sous hypoxie pendant des durées croissantes avant d'être lysées. Le contenu en ATP du lysat a ensuite été dosé. Les résultats sont exprimés en RLU/μg de protéines en tant que moyenne  $\pm$  1 écart-type pour  $n = 3$ .

A) Durée d'incubation de 30 à 120 minutes

B) Durée d'incubation de 90 à 240 minutes

l'intensité de la bande constitutive n'était pas constante de piste à piste. Cette expérience doit donc être refaite.

### **III.1.5. Dosage de l'adénosine triphosphate (ATP)**

Après avoir étudié les effets de l'hypoxie sur l'activation de HIF-1, nous avons examiné l'influence de l'hypoxie sur le contenu en ATP des cellules HMEC-1. Ces expériences avaient pour but d'utiliser un autre critère que l'activation du facteur de transcription HIF-1 pour suivre l'effet de l'hypoxie sur les cellules HMEC-1. Il était également intéressant de mettre en parallèle la cinétique d'évolution des deux paramètres.

#### *◆ Description de l'expérience réalisée*

L'évolution du contenu en ATP a été suivie pour différentes durées d'incubation allant, d'une part, de 30 minutes à 2h00 et, d'autre part, de 1h30 à 4h00 en normoxie et sous hypoxie. Le protocole suivi pour la réalisation de cette expérience est décrit au point II.1.7 du chapitre "matériel et méthodes".

#### *◆ Résultats*

La figure III.8A montre que l'hypoxie induit une diminution importante du contenu en ATP après 60 minutes et 90 minutes par rapport aux cellules maintenues dans des conditions normoxiques. On observe respectivement une diminution de 28% et 36% à 60 et 90 minutes d'hypoxie. Après 2 heures d'hypoxie, cette différence tend à s'amenuiser. Les résultats de la deuxième expérience réalisée avec des temps plus longs d'incubation confirment ces observations (figure III.8B). On observe de nouveau une différence d'environ 33% à 90 minutes. Aux temps plus long (de 2 et 4h), le contenu en ATP des cellules incubées sous hypoxie est revenu aux valeurs de celui des cellules contrôles normoxiques.

◆ *Discussion*

Ces résultats montrent un net effet de l'hypoxie sur le contenu en ATP des cellules. Cet effet est visible pendant une période relativement courte d'hypoxie (entre 30 et 120 minutes). Les résultats confirment ce que nous observons pour les EMSA décrits précédemment : nous observons une activation plus importante de HIF-1 pour les extraits de cellules incubées 2h sous hypoxie par rapport aux cellules normoxiques alors que nous ne voyons plus de différence pour les extraits de cellules incubées sous hypoxie pendant 4h par rapport aux cellules contrôles.

### III.2 ETUDE DE L'EXPRESSION DES GENES HIF-1 $\alpha$ ET VEGF

Les résultats présentés dans la première partie de ce travail indiquent que HIF-1 serait activé sous hypoxie après 2 heures dans les cellules HMEC-1.

Comme nous l'avons signalé dans l'introduction (voir le point I.3.2), une controverse existe quant aux mécanismes d'activation de HIF-1 : soit elle serait la conséquence d'une augmentation de la transcription du gène HIF-1 $\alpha$  avec modifications subséquentes éventuelles de la protéine nouvellement traduite (Wang *et al.*, 1995), soit la protéine HIF-1 $\alpha$  serait stabilisée sous hypoxie et dans ce cas, aucune augmentation de sa transcription ne serait observée (Huang *et al.*, 1996). Jusqu'à présent une augmentation de la transcription de HIF-1 $\alpha$  sous hypoxie n'a été observée que dans les cellules d'hépatomes HepG2 et Hep3B. Nous avons donc voulu vérifier si, pour les cellules HMEC-1, il y avait ou non augmentation de la transcription de HIF-1 $\alpha$  sous hypoxie.

Dans la seconde partie de ce travail nous avons étudié l'expression de HIF-1 $\alpha$  au niveau de l'ARNm de manière semi-quantitative. Nous avons également suivi l'expression du VEGF, comme contrôle positif de l'effet de l'hypoxie car il est bien connu que son expression augmente sous hypoxie dans toute une série de types cellulaires dont les cellules endothéliales (Liu *et al.*, 1995). Nous avons comparé les produits de l'amplification par RT-PCR des ARNm de HIF-1 $\alpha$  et de VEGF, aux produits de la RT-PCR réalisée avec des amorces s'hybridant spécifiquement à l'ARNm d'un gène constitutif, en l'occurrence le gène codant pour l' $\alpha$ -tubuline.

Nous avons choisi l'  $\alpha$ -tubuline comme gène exprimé constitutivement car la GAPDH généralement choisie voit son expression augmentée sous hypoxie (Graven *et al.*, 1998).



### **III.2.1 Mise au point des conditions de RT-PCR**

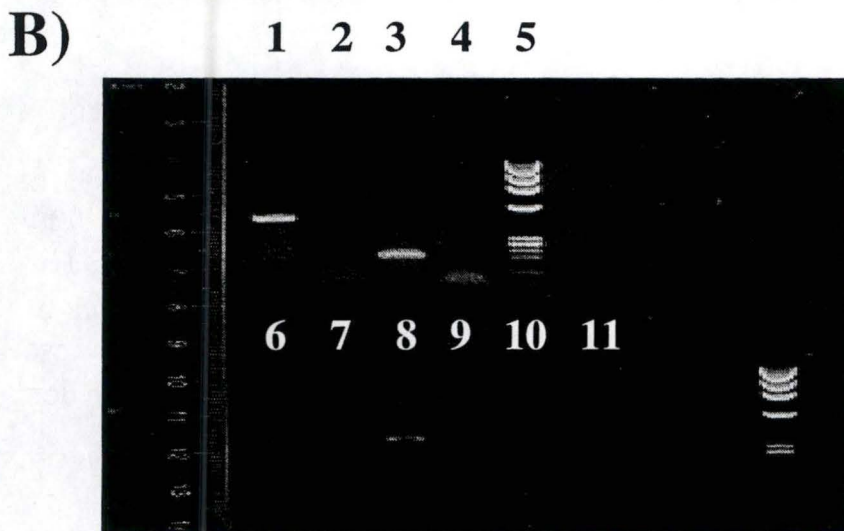
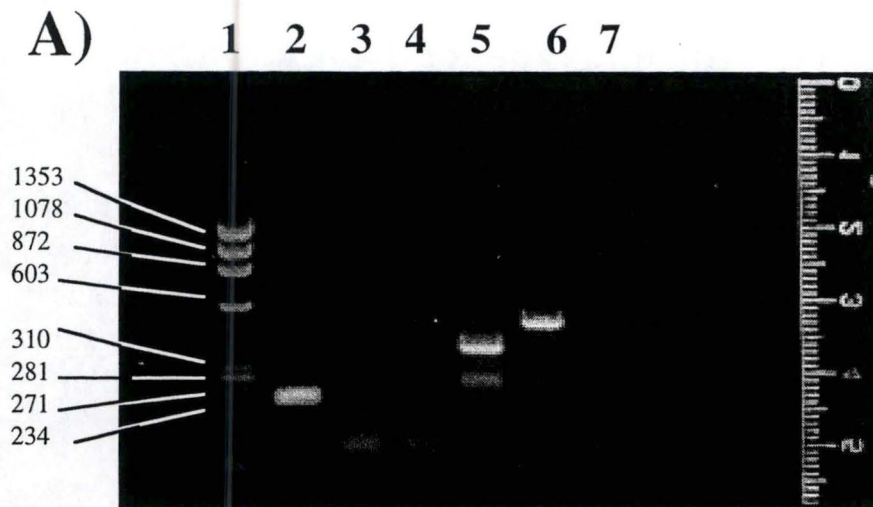
Les conditions de RT-PCR seront mises au point pour HIF-1 $\alpha$ , VEGF et  $\alpha$ -tubuline. Nous devons en effet déterminer un nombre de cycles d'amplification afin de se trouver dans la phase exponentielle de la PCR. Dans ces conditions seulement, la RT-PCR peut nous donner des renseignements sur les variations relatives dues aux changements des concentrations en ARNm d'un échantillon à l'autre.

#### **III.2.1.1 RT-PCR non radioactive**

Nous avons d'abord réalisé la RT-PCR en présence de nucléotides non radioactifs et d'amorces s'hybridant spécifiquement aux ARNm de HIF-1 $\alpha$ , VEGF et de la  $\alpha$ -tubuline afin de vérifier la nature des produits obtenus après la RT-PCR (amplicons). Les tailles attendues pour ces amplicons est respectivement de 487, 377 et 200 paires de bases (pb). Il faut noter que les amorces ont été choisies de manière à se trouver sur des exons différents.

##### *◆ Description de l'expérience réalisée*

Nous avons utilisé 1  $\mu$ g d'ARN total extrait de cellules incubées sous hypoxie pendant 2h30. Le nombre de cycles fixés pour l'étape PCR est de 40 afin d'être à saturation, l'objectif étant de mettre en évidence les différents amplicons correspondant aux gènes HIF-1 $\alpha$ , VEGF et  $\alpha$ -tubuline. Les produits de la RT-PCR sont ensuite mis sur un gel d'agarose (1,5%) afin d'en estimer la taille. Le protocole suivi pour cette expérience est décrit au point II.2.1 du chapitre "matériel et méthodes".



**Figure III.9 :** Gel d'électrophorèse des produits de RT-PCR non radioactive obtenus avec les amorces correspondant aux gènes HIF-1 $\alpha$ , VEGF ou tubuline. La RT-PCR a été réalisée avec 40 cycles à partir de 1  $\mu$ g d'ARN total extrait de cellules incubées 2h30 sous hypoxie.

**A)** 1 : Marqueur IV  
2 : Tubuline  
3 : Blanc  
4 : Blanc  
5 : VEGF  
6 : HIF-1 $\alpha$   
7 : Blanc

**B)** 1 : HIF-1 $\alpha$   
2 : Blanc  
3 : Tubuline  
4 : Blanc  
5 : Marqueur  
6 : VEGF + DMSO 1%  
7 : Blanc

8 : VEGF + DMSO 5%  
9 : Blanc  
10 : VEGF (65°C)  
11 : VEGF + DMSO 5% (65°C)

## ◆ *Résultats*

Nous observons, sur la photo du gel présentée à la figure III.9A, une seule bande correspondant aux amplicons du gène HIF-1 $\alpha$  d'une taille d'environ 500 bp et aux amplicons du gène  $\alpha$ -tubuline d'une taille légèrement supérieur à 200 bp. Ces fragments ont bien la taille attendue. En ce qui concerne VEGF, nous observons deux bandes dont la plus intense à une taille d'environ 370 bp, ce qui correspond à la taille attendue qui est de 377 bp.

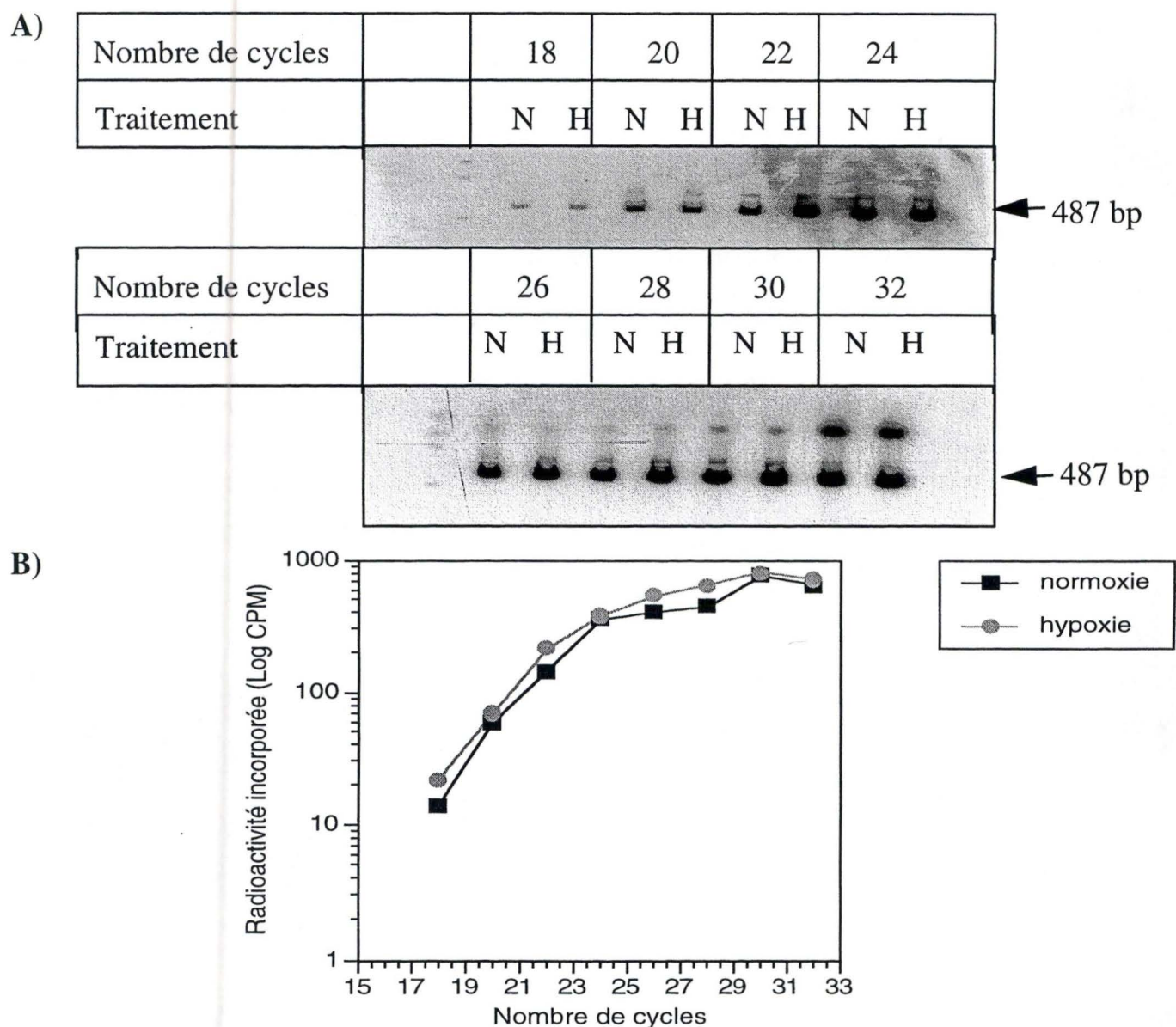
Une deuxième expérience d'amplification a été réalisée afin de reproduire ces résultats mais également afin d'essayer d'améliorer la spécificité de l'amplification PCR pour VEGF. Pour ce faire, plusieurs concentration en DMSO et une température d'hybridation plus élevée (65 °C à la place de 60 °C) ont été testées (figure III.9B).

Aux pistes 1 et 3, on remarque que l'amplification de l'ADNc de HIF-1 $\alpha$  et de l'  $\alpha$ -tubuline donnent toujours bien une seule population d'amplicons de la taille attendue. Pour VEGF, la RT-PCR réalisée à une température d'hybridation de 65°C ne permet pas d'amplifier l'ADNc engendré par l'étape de transcription inverse. Par ailleurs, du DMSO 1% et 5% permettent d'observer une seule bande d'environ 400 bp correspondant aux amplicons du gène VEGF.

Afin d'identifier de manière non équivoque les amplicons VEGF obtenus par RT-PCR, une expérience de séquençage a été réalisée directement sur les produits PCR. La séquence obtenue a été alignée sur l'ADNc de VEGF (via le serveur BCM). Nous avons obtenu un pourcentage d'identité d'environ 90% indiquant qu'il s'agit bien des amplicons VEGF.

## ◆ *Discussion*

Ces résultats nous ont permis de mettre en évidence les bandes correspondant aux amplicons attendus pour les trois gènes d'intérêt.



**Figure III.10** : Analyse par RT-PCR radioactive de l'expression de HIF-1 $\alpha$  en fonction du nombre de cycles de l'amplification PCR.

A) Autographie du gel de polyacrylamide permettant de localiser la bande de 487 bp correspondant aux amplicons HIF-1 $\alpha$ .

B) Quantification de l'intensité des bandes correspondant aux amplicons HIF-1 $\alpha$  à l'aide de l'Instant Imager pour les différents nombres de cycles réalisés.

L'expérience de séquençage a confirmé que la bande de 377 bp obtenue pour VEGF correspond effectivement à l'ADNc de ce gène.

### III.2.1.2 Détermination du nombre de cycles : RT-PCR radioactives

Après avoir mis au point les conditions PCR et identifié les bandes correspondant aux amplicons HIF-1 $\alpha$ , VEGF et  $\alpha$ -tubuline, nous avons fait varier le nombre de cycles d'amplification afin de déterminer les limites de la phase exponentielle de l'étape PCR.

#### ◆ *Description des expériences réalisées*

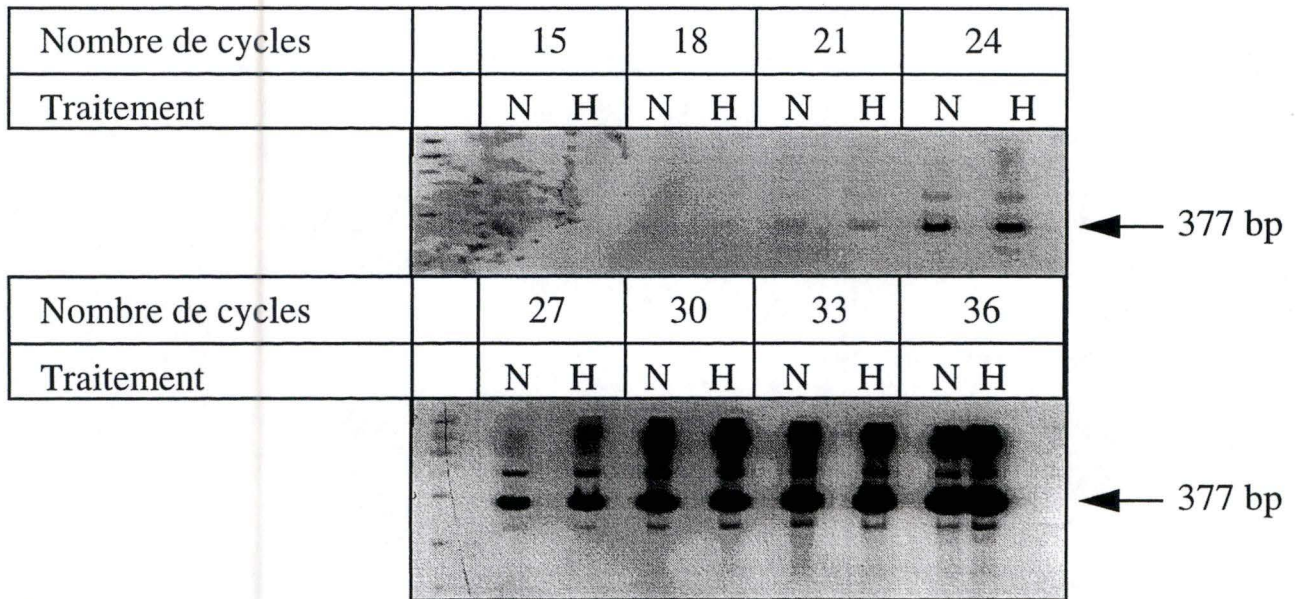
Nous avons réalisé des expériences de RT-PCR en faisant varier le nombre de cycles d'amplification en présence de nucléotides radioactifs et d'amorces s'hybridant spécifiquement à l'ADNc des gènes HIF-1 $\alpha$ , VEGF ou  $\alpha$ -tubuline à partir de 1  $\mu$ g d'ARN total extraits de cellules incubées ou non sous hypoxie pendant 2h30. Nous avons ensuite analysé ces produits sur un gel de polyacrylamide (5%) comme décrit au point II.2.2 du chapitre "matériel et méthodes".

#### ◆ *Résultats*

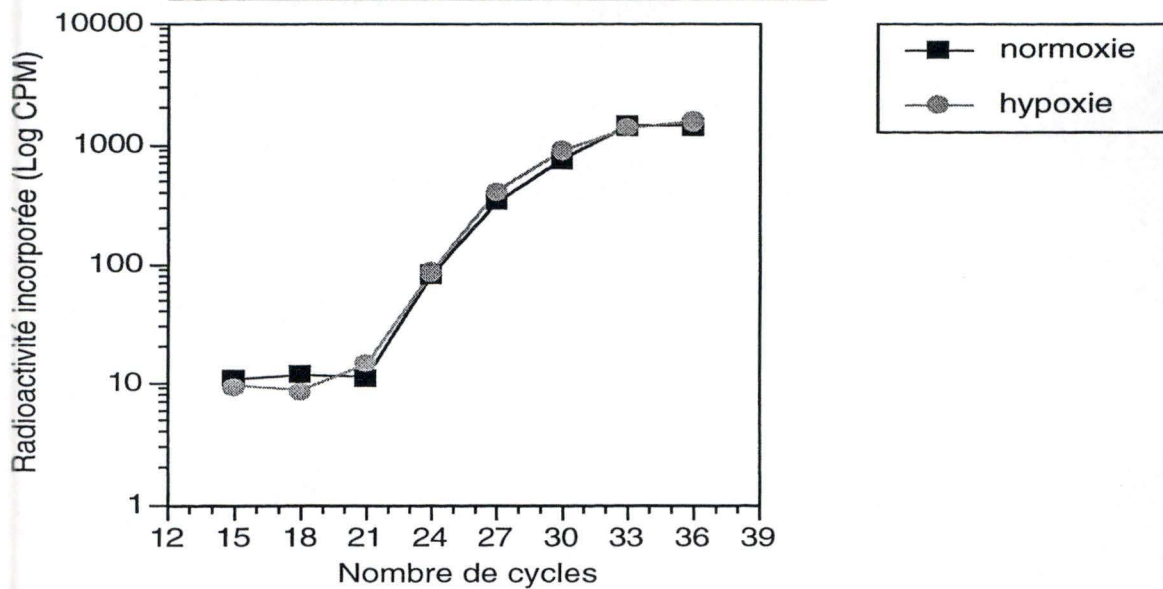
##### 1) HIF-1 $\alpha$

Les produits d'amplification obtenus à partir des ARN de cellules incubées sous hypoxie ou maintenues en normoxie ont été déposés sur un gel de polyacrylamide. L'autoradiographie du gel après migration est présentée à la figure III.10A. Nous observons une bande principale de 487 pb qui correspond à l'amplicon de HIF-1 $\alpha$  et dont l'intensité augmente avec le nombre de cycles d'amplification.

A)



B)



**Figure III.11 :** Analyse par RT-PCR radioactive de l'expression de VEGF en fonction du nombre de cycles de l'amplification PCR.

A) Autographie du gel de polyacrylamide permettant de localiser la bande de 377 bp correspondant aux amplicons VEGF.

B) Quantification de l'intensité des bandes correspondant aux amplicons de VEGF à l'aide de l'Instant Imager pour les différents nombres de cycles réalisés.

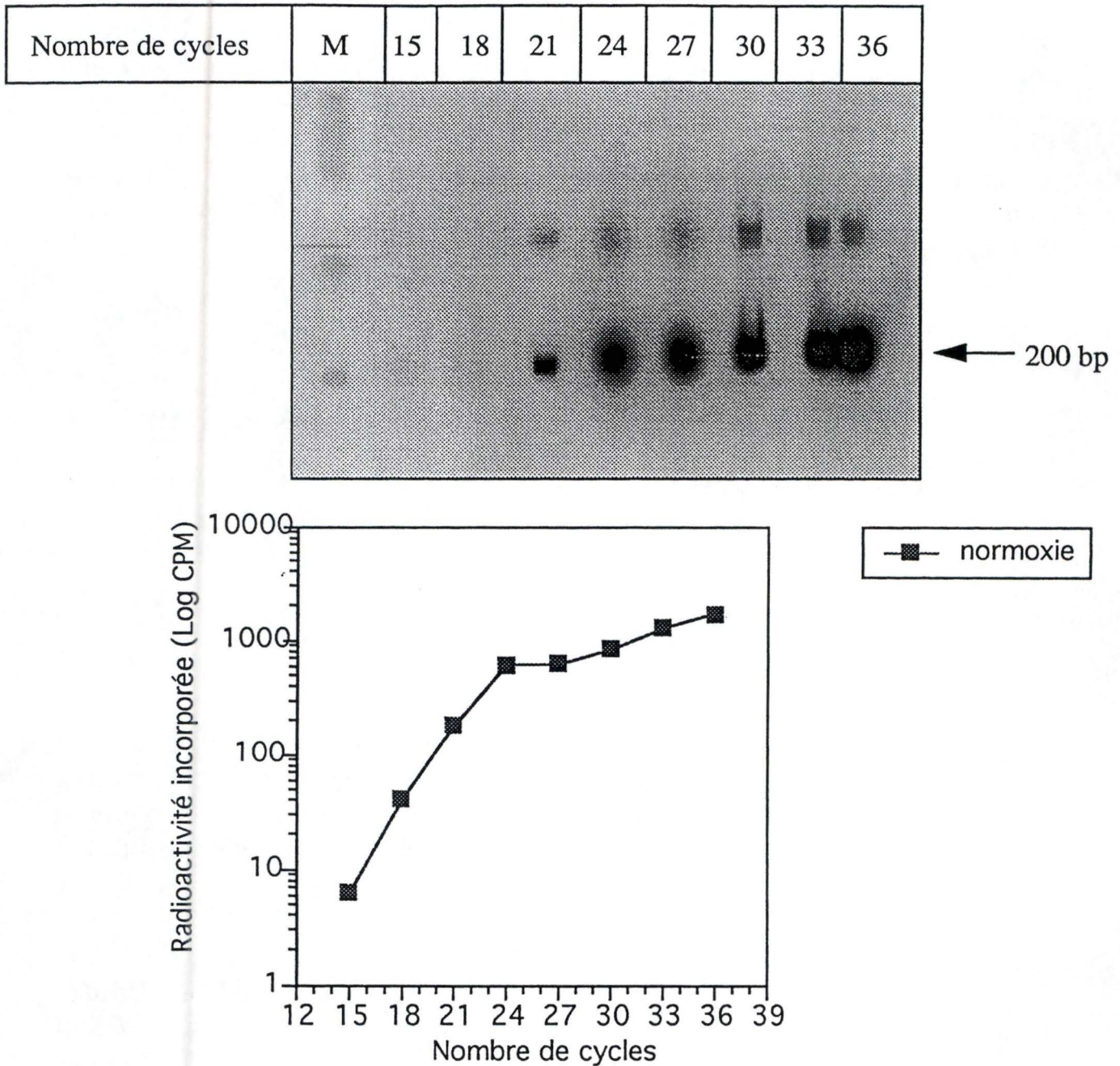
Lorsque nous quantifions, à l'aide de l'Instant Imager (décrit au point II.1.5.5 du chapitre "matériel et méthodes"), l'intensité des bandes de 487 pb ainsi obtenues (figure III.10B), nous observons une relation linéaire entre le nombre de cycles PCR et la quantité d'amplicons HIF-1 $\alpha$  obtenus pour une amplification PCR allant de 18 à 24 cycles. Au delà de 24 cycles, la droite s'infléchit, témoignant d'un début de saturation de la PCR. La pente de la phase exponentielle est la même pour les amplicons provenant des ARN de cellules incubées sous hypoxie ou non, ce qui semble indiquer que l'efficacité des RT-PCR est comparable d'un échantillon à l'autre.

Pour rester dans la phase exponentielle de la PCR, nous avons choisi 21 cycles d'amplifications pour les RT-PCR suivantes réalisées sur l'ARNm de HIF-1 $\alpha$ .

## 2) VEGF :

Tout comme pour HIF-1 $\alpha$ , nous avons effectué une RT-PCR à partir de cellules incubées ou non sous hypoxie pendant 2h30 avec les amorces correspondant à VEGF. Nous observons une bande principale à 377 pb dont l'intensité augmente avec le nombre de cycles d'amplification (figure III.11A).

Suite à la quantification de l'intensité de cette bande à l'aide de l'Instant Imager, nous remarquons une relation linéaire entre le nombre de cycles PCR et la quantité d'amplicons VEGF obtenus pour une PCR allant de 18 à 27 cycles (figure III.11B). Au delà de 27 cycles, la droite s'infléchit, témoignant d'un début de saturation au niveau de la PCR. La pente de la phase exponentielle est la même pour les amplicons provenant des ARN de cellules incubées sous hypoxie ou non, ce qui semble indiquer que l'efficacité des RT-PCR est comparable d'un échantillon à l'autre. Pour rester dans la phase exponentielle de la PCR, nous avons choisi 24 cycles d'amplifications dans les RT-PCR suivantes réalisées sur l'ARNm du VEGF.



**Figure III.12** : Analyse par RT-PCR radioactive de l'expression de tubuline en fonction du nombre de cycles d'amplification PCR.

A) Autographie du gel de polyacrylamide permettant de localiser la bande de 200 bp correspondant aux amplicons tubuline.

B) Quantification de l'intensité des bandes correspondant aux amplicons tubuline à l'aide de l'Instant Imager pour les différents nombres de cycles réalisés.



### 3) $\alpha$ -Tubuline

En ce qui concerne le gène constitutif de l'  $\alpha$ -tubuline, nous avons réalisé une RT-PCR à partir de cellules restées en normoxie pendant 2h30. Nous observons l'apparition d'une bande principale à 200 pb dont l'intensité augmente avec le nombre de cycles d'amplification (figure III.12A).

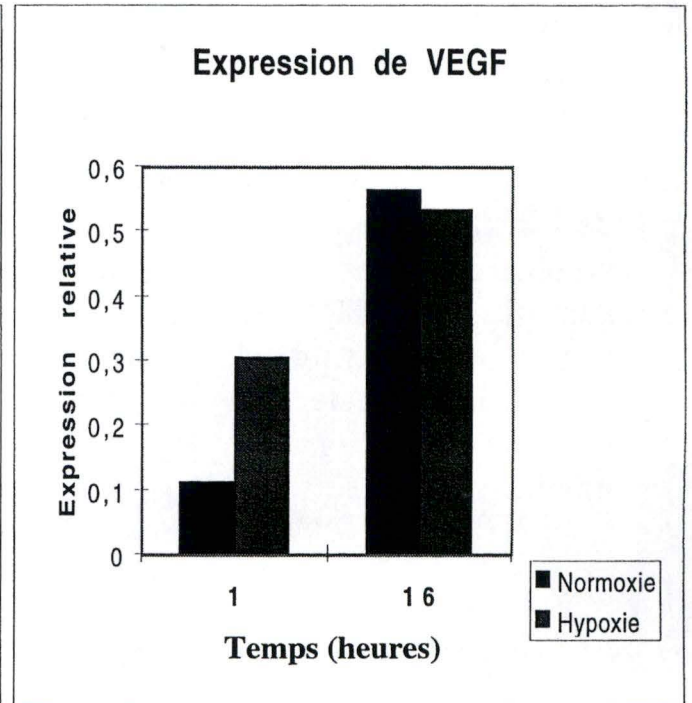
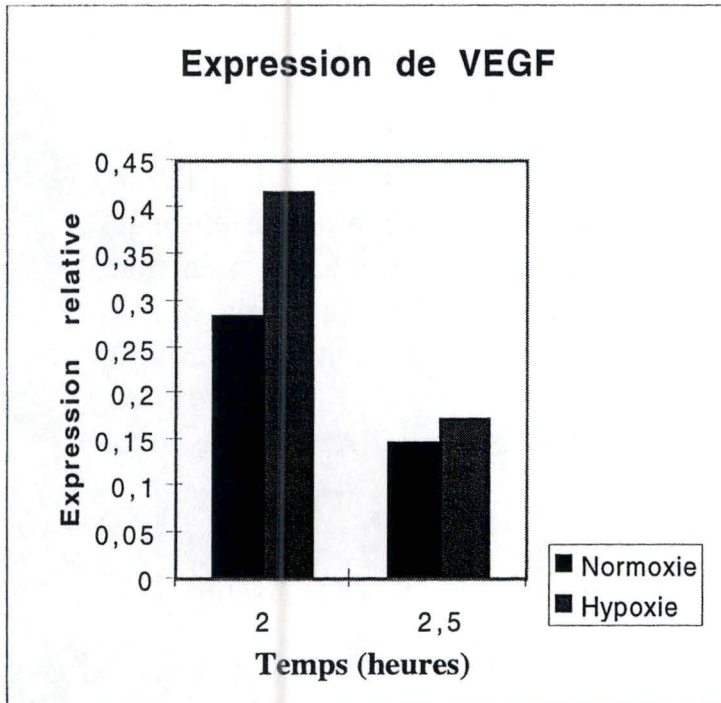
Suite à la quantification de l'intensité de cette bande principale à l'aide de l'Instant Imager, nous remarquons également une relation linéaire entre le nombre de cycles PCR et la quantité d'amplicons  $\alpha$ -tubuline obtenus pour une amplification PCR allant de 18 à 24 cycles (figure III.12B). Au delà de 24 cycles, la droite s'infléchit, témoignant d'un début de saturation au niveau de la PCR. Afin de rester dans la phase exponentielle, nous avons choisi 21 cycles d'amplification dans les RT-PCR suivantes réalisées sur l'ARNm de l' $\alpha$ -tubuline.

### **III.2.2 Expression des gènes HIF-1 $\alpha$ et VEGF**

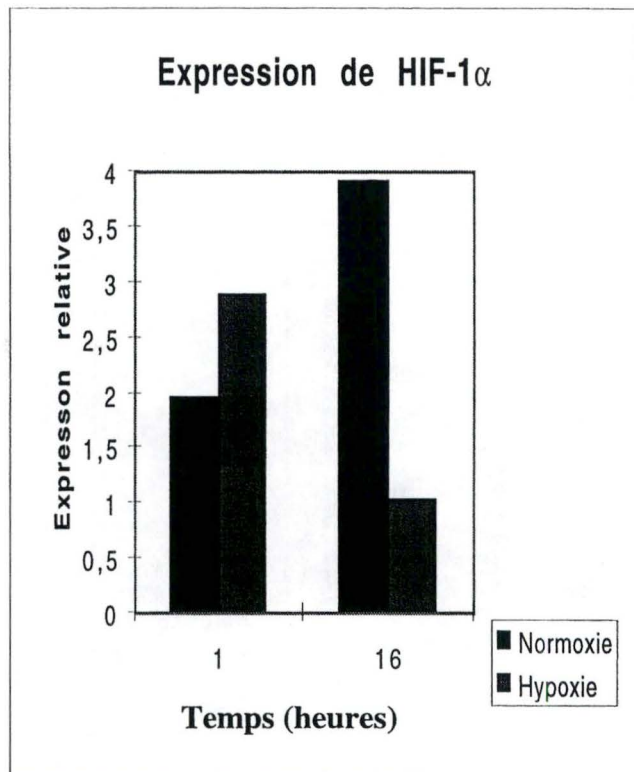
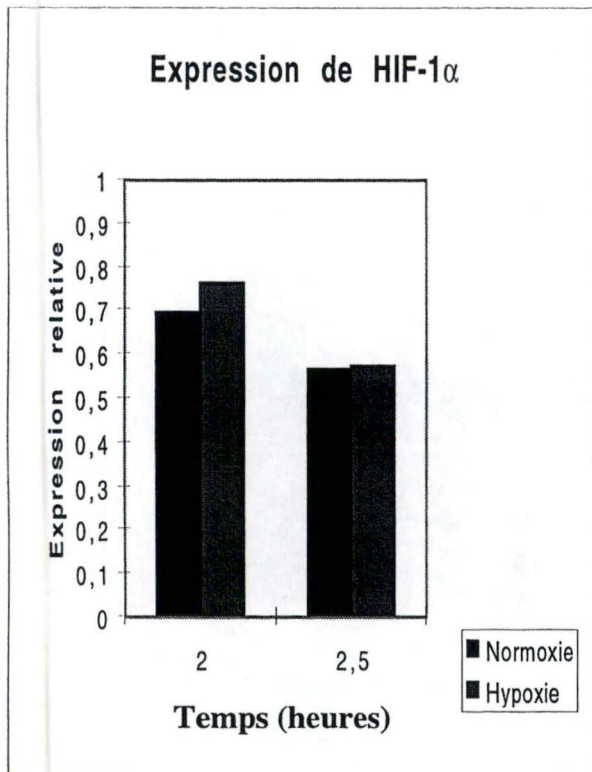
Les conditions de la RT-PCR étant maintenant définies, nous avons étudié l'effet de l'hypoxie sur l'expression des gènes HIF-1 $\alpha$  et VEGF pour des temps d'incubation différents en normoxie ou sous hypoxie. L'expression de l' $\alpha$ -tubuline a été quantifiée en parallèle afin de normaliser les valeurs obtenues pour VEGF et HIF-1 $\alpha$  en fonction de la quantité d'ARN engagée dans les RT-PCR.

#### *◆ Description de l'expérience réalisée*

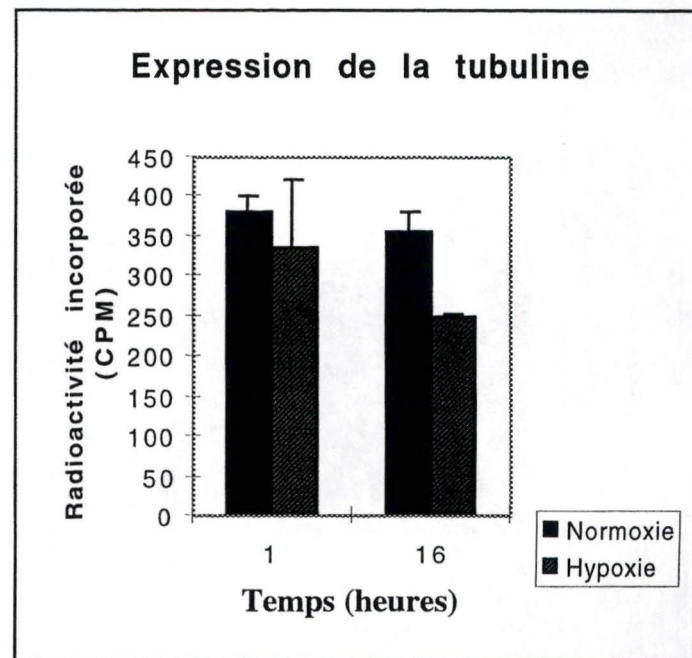
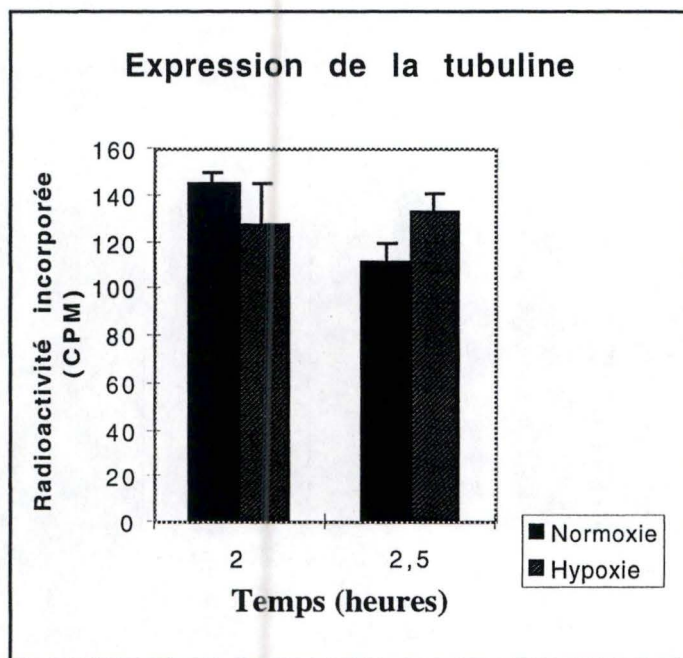
Les cellules ont été incubées en normoxie ou sous hypoxie dans une première expérience pendant 2h et 2h30 et, dans une deuxième expérience, pendant des durées de 1h et de 16h. La quantité d'amplicons HIF-1 $\alpha$  et VEGF dans chaque échantillon a été estimée par RT-PCR radioactive et cette quantité a été rapportée à la quantité d'amplicons  $\alpha$ -tubuline amplifiés dans ces mêmes



**Figure III.13** : Analyse par RT-PCR semi-quantitative de l'effet de l'hypoxie sur l'expression de VEGF pour différents temps d'incubation. La RT-PCR a été réalisée en présence des amorces 5' et 3' s'hybridant à l'ARNm de VEGF ou de la tubuline à partir de 1 µg d'ARN total extrait de cellules incubées en normoxie ou sous hypoxie. Les amplicons ont été analysés sur gel de polyacrylamide et l'intensité des bandes correspondant à ces amplicons a été quantifiée à l'aide de l'Instant Imager. La quantité d'amplicons VEGF dans chaque échantillon est rapportée à la quantité d'amplicons tubuline mesurée dans ces échantillons.



**Figure III.14** : Analyse par RT-PCR semi-quantitative de l'effet de l'hypoxie sur l'expression de HIF-1 $\alpha$  pour différents temps d'incubation. La RT-PCR a été réalisée en présence des amorces 5' et 3' s'hybridant à l'ARNm de HIF-1 $\alpha$  ou de la tubuline à partir de 1  $\mu$ g d'ARN total extrait de cellules incubées en normoxie ou sous hypoxie. Les amplicons ont été analysés sur gel de polyacrylamide et l'intensité des bandes correspondant à ces amplicons a été quantifiée à l'aide de l'Instant Imager. La quantité d'amplicons HIF-1 $\alpha$  dans chaque échantillon est rapportée à la quantité d'amplicons tubuline mesurée dans ces échantillons.



**Fig III.15 :** Analyse par RT-PCR semi-quantitative de l'expression de la tubuline dans les cellules HMEC-1 suite à une incubation en normoxie ou sous hypoxie pendant différents temps. Les résultats des deux expériences réalisées sont présentés séparément. Ils sont exprimés en tant que moyennes  $\pm$  1 écart-type.

échantillons. Les amplicons ont été analysés sur gel de polyacrylamide (5%) et l'intensité des bandes obtenues a été quantifiée à l'aide de l'Instant Imager.

### ◆ *Résultats*

#### 1) VEGF

La figure III.13 présente l'analyse par RT-PCR semi-quantitative de l'effet de l'hypoxie sur l'expression de VEGF pour les temps de 1h, 2h00, 2h30 et 16h. Nous observons une augmentation de l'expression de VEGF pour les cellules incubées sous hypoxie après 1h et 2h respectivement de 167% et 46%. Nous observons curieusement une augmentation de l'expression de VEGF pour les cellules restés en conditions de normoxie pendant 16h. Ceci pourrait peut être s'expliquer par le fait que le milieu d'incubation utilisé lors de cette expérience (milieu indépendant du CO<sub>2</sub> contenant 2 % de sérum) contient nettement moins de sérum que le milieu que l'on utilise pour cultiver les cellules HMEC-1 (15% de sérum).

#### 2) HIF-1 $\alpha$

En ce qui concerne l'expression de HIF-1 $\alpha$ , nous observons sur la figure III.14 une légère augmentation de la quantité d'ARNm à 1h d'hypoxie. Cependant, après 2h et 2h30, plus aucune différence n'est observée. Enfin, il faut remarquer la très nette diminution (73%) de la quantité d'ARNm codant pour HIF-1 $\alpha$  après 16 h d'hypoxie par rapport au contrôle normoxique.

Afin de mieux interpréter ces résultats, il convient de noter que l'expression du gène "constitutif" de l' $\alpha$ -tubuline est bien constante dans les différentes conditions expérimentales sauf après 16h d'hypoxie où elle diminue d'environ 30% (figure III.15).

## ◆ Discussion

Les expériences de RT-PCR que nous avons réalisées nous permettent d'analyser de manière semi-quantitative l'expression de l'ARNm de HIF-1 $\alpha$  et du VEGF.

Avant de discuter les résultats concernant HIF-1 $\alpha$  et VEGF, il convient de commenter les résultats obtenus pour l' $\alpha$ -tubuline. On observe que l'expression de l'ARNm de l' $\alpha$ -tubuline est constante dans les différents échantillons sauf après 16 h d'hypoxie où une diminution d'environ 30% est mise en évidence. Deux hypothèses peuvent être proposées pour expliquer ce résultat : soit la quantité d'ARN total de cet échantillon engagé dans la RT-PCR est moindre que celle engagée pour les autres échantillons ce qui signifierait que la mesure de la densité optique faite précédemment n'était pas correcte, soit l'hypoxie diminue de manière non spécifique la transcription de tous les ARN. Un tel effet de l'hypoxie sur la synthèse d'ADN et sur la synthèse protéique a en effet été observé par Hayashi et al., 1997 sur des hépatocytes. De plus, Buttgerit et Brand (1995) ont montré que la synthèse protéique et la synthèse des ARN/ADN étaient les premiers processus inhibés lorsque on inhibe la respiration mitochondriale et donc la production d'ATP. Ceci reste bien entendu à confirmer dans le cadre du modèle expérimental utilisé dans ce travail.

En ce qui concerne HIF-1 $\alpha$ , on n'observe pas de différence significative de son expression dans les cellules hypoxiques par rapport aux cellules normoxiques sauf peut être à 1h mais ceci reste à confirmer. L'effet de 16h d'hypoxie se marque également comme pour l' $\alpha$ -tubuline mais de manière plus marquée, peut être parce que le temps de demi-vie de l'ARNm de HIF-1 $\alpha$  est plus court que celui de l' $\alpha$ -tubuline.

Enfin, les résultats montrent que l'ARNm du VEGF semble être exprimé en plus grande quantité dans les cellules HMEC-1 qui ont subi 1h ou 2h d'hypoxie par rapport aux cellules normoxiques. Cela semble reproductible dans la mesure où les temps 1h et 2h proviennent de deux expériences différentes. Il est bien connu que l'hypoxie induit l'expression de ce facteur de croissance dans une série de types cellulaires dont les cellules endothéliales (Liu *et al.*, 1995). Pour le temps de 16h, l'effet de l'hypoxie ne se marque plus. L'induction de

l'expression du VEGF pourrait être due à la fois à une augmentation de la transcription du gène dépendante de l'activation de HIF-1 mais également à une stabilisation spécifique de l'ARNm du VEGF comme le suggèrent les travaux de Levy *et al.* (1997). J

En conclusion, nous n'avons pas pu mettre en évidence d'effet marqué d'augmentation de l'expression de l'ARNm de HIF-1 $\alpha$  par l'hypoxie. Ceci n'est pas dû au fait que le degré ou la durée d'hypoxie ne sont pas suffisants, puisque nous avons mis en évidence une augmentation de l'expression de l'ARNm du VEGF.

# **Conclusion et perspectives**



## IV. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Situées à l'interface sang-tissu, les cellules endothéliales sont particulièrement exposées aux variations de la tension en oxygène. Un arrêt local ou un ralentissement de la circulation qui se produit en cas d'infarctus, d'insuffisance veineuse ou de thrombose place l'endothélium en conditions d'hypoxie.

Lors d'une telle situation, la cellule va modifier de façon drastique l'expression de certains gènes dont l'érythropoïétine et le VEGF mais va également synthétiser de manière accrue diverses enzymes glycolytiques (aldolase A, phosphoglycérate kinase 1, émolase, lactate déshydrogénase, phosphofructokinase L) (Semenza & Wang, 1994). L'ensemble de ces mécanismes joue un rôle adaptateur pour la cellule et le tissu soumis à l'hypoxie, orientant le métabolisme énergétique vers la voie glycolytique, et favorisant l'oxygénation du tissu par néovascularisation.

Cette expression différentielle de certains gènes lors de l'exposition des cellules à une carence en oxygène est entre autre médiée par l'activation d'un facteur transcriptionnel spécifique : HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor-1) identifié par Semenza et son équipe (Semenza & Wang, 1994). HIF-1 est un hétérodimère constitué de deux sous-unités : HIF-1 $\alpha$  et ARNT.

Le but de ce mémoire était de mieux comprendre le rôle du facteur de transcription HIF-1 dans l'adaptation métabolique des cellules endothéliales à l'hypoxie.

A cette fin, nous nous sommes principalement attachés à suivre l'activation de HIF-1 par l'hypoxie d'une part et l'évolution de la transcription de la sous-unité de HIF-1, HIF-1 $\alpha$  d'autre part. Ceci a été réalisé respectivement

par la technique de retard sur gel et par RT-PCR. Enfin, le métabolisme global de la cellule a été estimée par la mesure de son contenu en ATP.

Dans la première partie du travail, l'étude de l'activation de HIF-1 a été réalisée grâce à la technique de retard sur gel ou EMSA. Les différents résultats obtenus au cours de la mise au point de cette technique nous ont appris plusieurs choses. L'utilisation de la sonde mutée M18 indique qu'il y a effectivement une reconnaissance spécifique de la sonde sauvage puisqu'on n'observe plus de bandes correspondant à HIF-1 lorsque les extraits nucléaires sont incubés en présence de cette sonde mutée. Nous nous sommes également rendus compte de l'importance du milieu d'incubation lors de l'incubation sous hypoxie. Le milieu indépendant du CO<sub>2</sub> comprenant 2% de sérum et de la glutamine semble plus adéquat que l'HBSS. Enfin, une durée d'hypoxie de 2h pourrait être plus optimale pour l'activation de HIF-1 que des temps plus longs, même si ce résultat reste à confirmer.

La technique de retard sur gel a ainsi permis une estimation semi-quantitative de l'activation de HIF-1. Les résultats montrent en effet une activation du facteur de transcription HIF-1 en réponse à l'hypoxie traditionnelle ou à l'hypoxie chimique (CoCl<sub>2</sub>). L'expérience qui consistait à identifier plus sûrement la nature protéique du facteur HIF-1 par une expérience de supershift n'a pas montré de retard plus important malgré une bonne reconnaissance de l'anticorps anti-ARNT utilisé. Il faut cependant remarquer que ce type d'expérience est très délicat à réaliser dans la mesure où la liaison du facteur à la sonde doit laisser accessible les épitopes reconnus par l'anticorps et où le complexe Ac-ARNT/HIF-1 $\alpha$ -ADN doit rester lié pendant la migration sur le gel. L'étude cinétique d'activation de HIF-1 par l'hypoxie a malheureusement échoué et doit être refaite. Nous pensons en effet que les extraits nucléaires étaient partiellement dégradés. Cette expérience souligne néanmoins l'importance de la préparation de la fraction nucléaire.

Il serait intéressant, comme les conditions de mise en évidence de l'activité de HIF-1 sont maintenant au point, non seulement d'identifier la ou les voies de transduction du signal impliqués dans l'activation de HIF-1 (par l'emploi d'inhibiteurs de différentes kinases et de phosphatases) mais aussi de vérifier l'hypothèse de l'association de HIF-1 $\alpha$  avec Hsp90 ainsi que la dégradation possible de HIF-1 $\alpha$  sous sa forme oxydée par un système de type protéasome.

Dans la deuxième partie de ce travail, nous nous sommes intéressés à l'expression du gène codant pour HIF-1 $\alpha$  par des expériences de RT-PCR semi-quantitatives. Les résultats montrent que la transcription de HIF-1 $\alpha$  n'augmente pas de manière marquée dans les cellules endothéliales HMEC-1 soumises à une hypoxie. Par contre, une augmentation de la quantité d'ARNm codant pour le VEGF est observée après 1h et 2h d'hypoxie, ce qui indique que ces cellules sont bien capables de répondre à l'hypoxie dans nos conditions expérimentales.

Il est intéressant de noter que l'augmentation de la transcription du VEGF par l'hypoxie est dépendante de l'activation du facteur de transcription HIF-1 (Liu *et al.*, 1995). En effet, le promoteur de VEGF contient des séquences consensus de reconnaissance de HIF-1. Par conséquent, le fait qu'on observe effectivement une augmentation de la quantité d'ARNm codant pour le VEGF dans les cellules HMEC-1 soumises à une l'hypoxie de 1h ou 2h, suggère que HIF-1 a été activé. Ces résultats concordent avec ceux obtenus par la technique de retard sur gel où nous avons montré une activité plus importante de HIF-1 après 2h.

En ce qui concerne les résultats obtenus pour l'expression de HIF-1 $\alpha$ , nous n'avons pas observé d'augmentation marquée de sa transcription sous hypoxie. Comme nous l'avons décrit au point I.3.2 de l'introduction, des observations contradictoires ont été décrites dans la littérature concernant la régulation de la transcription de HIF-1 $\alpha$  sous hypoxie. Wang *et al.* (1995) rapportent que l'hypoxie augmente la transcription du gène HIF-1 $\alpha$  dans les lignées d'hépatomes HepG2 et Hep3B. Par contre, Huang *et al.* (1996) ne mettent pas en évidence d'augmentation de la quantité d'ARNm codant pour HIF-1 $\alpha$  dans différents types cellulaires dont les cellules HeLa. D'autres résultats de la littérature sont en accord avec ces différentes observations : jusqu'à présent, on n'a jamais observé d'augmentation de la transcription de HIF-1 $\alpha$  sous hypoxie que dans les hépatomes. Cela suggère que la régulation de l'activité de HIF-1 est post-traductionnelle. Les résultats décrits dans ce mémoire, obtenus sur une lignée de cellules endothéliales, concordent donc bien avec les observations reportées jusqu'à présent.

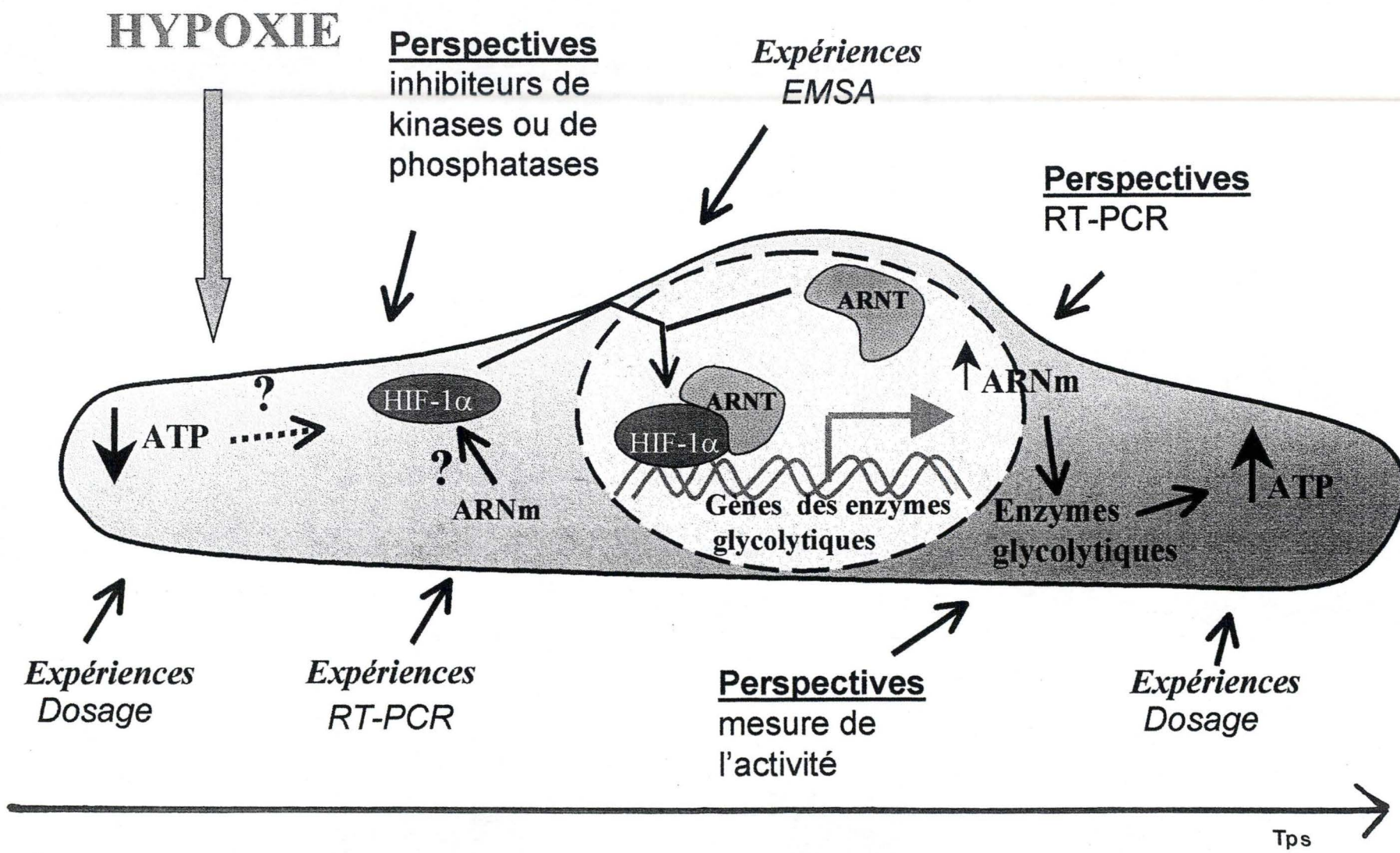


Figure IV.1 : Représentation schématique de l'activation du facteur de transcription HIF-1 par l'hypoxie et de son implication dans l'adaptation métabolique de la cellule à l'hypoxie.

Finalement, nous nous sommes également attachés à suivre dans les cellules HMEC-1, incubées sous hypoxie un paramètre caractéristique du métabolisme global : leur contenu en ATP.

De manière remarquable, on observe une diminution du contenu en ATP dans les cellules HMEC-1 incubées sous hypoxie, par rapport aux cellules maintenues en conditions normoxiques entre 60 et 90 minutes d'incubation. Au delà (de 2h à 4h d'hypoxie), le contenu en ATP remonte aux valeurs obtenues pour les cellules contrôles. Il est intéressant de noter que ces résultats sont différents de ceux obtenus pour les HUVEC, cellules endothéliales en culture primaire. On observe, en effet, pour ces cellules que l'hypoxie induit une diminution du contenu en ATP de plus en plus importante au cours du temps d'incubation sous hypoxie. Après plusieurs heures (2h et plus), le contenu en ATP des cellules diminue tellement que les cellules finissent par mourir (Arnould, 1994). Cette diminution en ATP est due à une diminution de l'activité respiratoire mitochondriale. Dans les HUVEC, la glycolyse est bien induite en tant que mécanisme de compensation, mais elle ne parvient pas à maintenir le contenu en ATP des cellules et est inhibée au bout de 2h (Janssens *et al.*, 1995). Les cellules HUVEC ne parviennent donc pas à s'adapter aux conditions d'hypoxie de manière à maintenir leur viabilité.

Au contraire, on observe pour les cellules HMEC-1 que le contenu en ATP des cellules incubées sous hypoxie revient aux valeurs contrôle au bout de 2h. Ceci suggère la présence d'un mécanisme de compensation efficace, médié via une augmentation de la glycolyse. Des résultats préliminaires obtenus au laboratoire montrent qu'effectivement la glycolyse est activée par l'hypoxie dans les cellules HMEC-1. L'augmentation de l'activité glycolytique peut être le résultat d'une activation proprement dite mais elle peut également être le résultat d'une augmentation de la transcription des gènes codant pour certaines enzymes glycolytiques via l'activation du facteur de transcription HIF-1 (voir point I.3.3 de l'introduction). Afin de confirmer cette hypothèse, il faudra maintenant estimer plus précisément l'activité glycolytique des cellules et suivre, par RT-PCR, l'expression de l'ARNm d'enzymes comme l'aldolase A par exemple.

La figure IV.1 montre une représentation schématique au cours du temps reprenant les différentes observations faites durant ce mémoire : l'hypoxie est capable d'activer le facteur de transcription HIF-1 sans qu'il n'y ait

d'augmentation de sa transcription. HIF-1 activé augmente alors la transcription de différents gènes qui vont permettre à la cellule de s'adapter aux conditions hypoxiques. C'est le cas pour VEGF mais on peut supposer, comme on observe un rétablissement de la concentration en ATP, que ce soit également le cas pour certains enzymes de la glycolyse.

La confirmation de ces résultats et l'identification d'autres gènes induits par HIF-1 permettra de mieux comprendre l'adaptation moléculaire et métabolique de la cellule endothéliale en condition d'hypoxie.

# **Bibliographie**

## V. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

**Ades W.E., Candal F.J., Swerlick R.A., George V.G., Summers S., Bosse D.C. and Lamley T.J.**

HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line  
*J. Invest. Dermatol.* 99 (1992) 683-690.

**Ager A.**

Isolation and culture of high endothelial venule endothelium from rat lymph nodes  
In *The endothelium : an introduction to current research*  
Waren J.B., Ed.; Wiley-Liss : London, 1990; pp 273-293.

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

An essential role for p300/CBP in the cellular response to hypoxia.  
*Cell* 93 (1996) 12969-12973.

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

Effect of hypoxia upon intracellular calcium concentration of human endothelial cells.  
*J. Cell. Physiol.* 152 (1992) 215-221.

**Arnould T., Michiels C. and Remacle J.**

Increased PMN adherence on endothelial cells after hypoxia, involvement of PAF, CD18/CD11b and ICAM-1.  
*J. Am. Physiol.* 264 (1993) C1102-C1110.

**Arnould T.**

Etude *in vitro* des effets de l'hypoxie-réoxygénation sur les cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine conduisant à moduler les interactions avec les polymorphonucléaires neutrophiles.

*Dissertation présentée pour l'obtention du grade de docteur en Sciences*  
Promoteur : Remacle J. (1994) FUNDP

**Behrooz A. and Ismail-Beigi F.**

Dual control of GLUT-1 glucose transporter gene expression by hypoxia and by inhibition of oxidative phosphorylation.  
*Biol. Chem.* 272 (1997) 5555-5562.

**Borsum T.**

Biochemical properties of vascular endothelial cells.  
*Cell Pathol.* 60 (1991) 279-286.

**Bunn H.F. and Poyton R.O.**

Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia.  
*Physiol. Rev.* 76 (1996) 839-885.

**Buttgereit F. and Brand M.D.**

A hierarchy of ATP-consuming processes in mammalian cells.  
*Biochem. J.* 312 (1995) 163-167.

**Corvol P., Alhenc-Gelas F. and Soubrier F.**

L'endothelium, site de production et de métabolisme des peptides vasoactifs.  
*Med./Sci.* 9 (1993) 1050-1060.



**Duance V.C. and Bailey A.J.**

The nature, structure and function of the vascular basement membrane.

In *Biochemical interactions at the endothelium*. Cryer A., Ed.; Elsevier Science Publisher : Amsterdam, 1983; pp 41-78.

**Fandrey J.**

Hypoxia-inducible gene expression.

*Res.Phys.* 101 (1995) 1-10.

**Gibbons G.H. and Dzau V.J.**

Endothelial function in vascular remodeling.

In *The endothelium : an introduction to current research*.

Warren J.B., Ed.; Wiley-Liss : London, 1990; pp 81-93.

**Gimbrone M.A.**

Vascular Endothelium in health and disease.

In *Molecular cardiovascular medicine*.

Haber E., Ed.; Scientific American : New York, 1995; pp 49-61.

**Graven K.K., Mc Donalds R.J. and Farber H.W.**

Hypoxia regulation of endothelial glyceraldehyde-3-phosphate deshydrogenase.

*Am. J. Physiol.* 274 (1998) : C347-C355.

**Guillemin K. and Krasnow M.A.**

The hypoxic response : huffing and hifing.

*Cell* 89 (1997) 9-12.

**Harker L.A.**

Endothelium and hemostasis.

In *endothelial cells*

Vol. 1. Ryan U.S., Ed.; CRC Press: Miami, 1988; pp 167-177.

**Hayashi K., Ochiai T., Ishinoda Y., Okamoto T., Maruyama T., Tsuda K. and Tsubouchi H.**

Relationship between cellular ATP content and cellular functions of primary cultured rat hepatocytes in hypoxia.

*J. Gatrol. Hepatol.* 12 (1997) 249-256.

**Herman I.M. and Castellot J.J.**

Regulation of vascular smooth muscle cells growth by endothelial-synthesized extracellular matrix.

*Arteriosclerosis* 7 (1987) 463-469.

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

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

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

**Inagami T., Mitsuhide N. and Hoover R.**

Endothelium as an endocrine organ.

*Annu. Rev. Physiol.* 57 (1995) 171-189.

**Jacobs R., Sage S.O. and Rink T.J.**

Aspect of calcium signaling in endothelium.

In *The endothelium: an introduction to current research*.

Warren J.B., Ed.; Wiley-Liss : London, 1990; pp 33-44.

**Jaffe E.A.**

Synthesis of Von Willebrand Factor by endothelial cells.

In *Endothelial cells*. Vol.1 Ryan, U.S., Ed.; CRC press: Miami, 1988; pp 119-126.

**Janssens D., Michiels C., Delaive E., Eliaers F., Drieu K. and Remacle J.**

Protection of hypoxia-inducible ATP decrease in endothelial cells by Ginkgo Biloba extract and Bilobalide.

*Biochem. Pharmacol.* 50 (1995) 991-999.

**Levy N.S., Goldberg M.A. and Levy A.P.**

Sequencing of the human vascular endothelial growth factor (VEGF) 3' untranslated region (UTR) : conservation of five hypoxia-inducible RNA-protein binding sites.

*Biochem. Biophys. Acta* 1352 (1997) 167-173.

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

Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells.

*Circ. Res.* 77 (1995) 638-643.

**Lizuka M., Yamauchi M., Ando K., Hori N., Furusawa Y., Chi I.H., Fukutsu K. and Morya H.**

Quantitative RT-PCR assay detecting the transcriptional induction of vascular endothelial growth factor under hypoxia.

*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 205 (1994) 1474-1480.

**Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J.**

Protein measurement with Folin phenol reagent.

*J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265-275.

**Michiels C., Arnould T. and Remacle J.**

Hypoxia-induced activation of endothelial cells as a possible cause of venous diseases: Hypothesis.

*Angiology* (1993a) 639-646.

**Michiels C., Arnould T., Knott I., Dieu M. and Remacle J.**

Stimulation of prostaglandin synthesis by human endothelial cells exposed to hypoxia.

*J. Am. Physiol.* 264 (1993b) C886-C874.

**Michiels C., Arnould T. and Remacle J.**

Rôle clé de l'hypoxie et des cellules endothéliales dans le développement des veines variqueuses.

*Med./Sci.* 10 (1994) 845-853.

**Schmedtje J.F., Liu W.-L., Ji Y., Thompson T.M. and Runge M.S.**

Evidence of hypoxia-inducible factor 1 in vascular endothelial and smooth muscle cells.

*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 220 (1996) 687-691.

**Schmedtje J.F., Ji Y.-S., Liu W.-L., Du Bois R.N. and Runge M.S.**

Hypoxia induces cyclooxygenase-2 via the NF- $\kappa$ B p65 transcription factor in human vascular endothelial cells

*J. Biol. Chem.* 272 (1997) 601-608.

**Semenza G.L. and Wang G.L.**

A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation.

*Mol. Cell. Biol.* 12 (1992) 5447-5454.

**Semenza G.L.**

Regulation of erythropoietin production.  
*Erythropoietin* 8 (1994) 863-884.

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

Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1.  
*J. Biol. Chem.* 269 (1994) 23757-23763.

**Semenza, G.L., Jiang, B.-H., S.W., Passantino, R., Concordet, J.P., Maire, P. and Giallongo, A.**

Hypoxia Response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate deshydrogenase A promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1.  
*J. Biol. Chem.* 271 (1996) : 32529-32537.

**Springer T.A.**

Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration.  
*Annu. Rev. Physiol.* 57 (1995) 827-872.

**Tetryakov A.V. and Farber H.W.**

Endothelial cell tolerance to hypoxia : potential role of purine nucleotide phosphatases  
*J. Clin. Invest.* 95 (1995) 738-744.

**Thorgeisson G.**

Structure and morphological features of vascular endothelium  
In *Biochemical interactions at the endothelium*. Cryer, A., Ed.; Elsevier Science Publisher : Amsterdam, 1983; pp 5-39.

**Wang G.L. and Semenza G.L.**

Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia.  
*J. Biol. Chem.* 268 (1993a) 21513-21518.

**Wang G.L. and Semenza G.L.**

General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90 (1993b) 4303-4308.

**Wang G.L., Jiang B., Rue E.A. and Semenza G.L.**

Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92 (1995) 5510-5514.

**Wang G.L. and Semenza G.L.**

Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1.  
*Biol. Chem.* 270 (1995) 1230-1237.

**Wenger R.H., Rolfs A., Marti H.H., Guénet J.L. and Gassman M.**

Nucleotide sequence, chromosomal assignment and mRNA expression of mouse hypoxia-inducible factor -1 $\alpha$ .  
*Biochem. Biophys. Res.* 223 (1996) 54-59.

**Whitlock J.P., Okino S.T., Dong L., Ko H.P., Clarke-Katzenberg R., Ma Q. and Li H.**

Induction of cytochrome P4501A1 : a model for analyzing mammalian gene transcription.  
*FASEB J.* 10 (1996) 809-818.

**Wusteman F.S.**

In *Biochemical interactions at the endothelium*.

Cryer A. , Ed.; Elsevier Science Publisher : Amsterdam, 1983; pp79-109.

**Zimmerman L.H., Levine R.A. and Farber H.W.**

Hypoxia induces a specific set of stress proteins in cultured endothelial cells.

*J. Clin. Invest.* 87 (1991) 908-914.