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

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Etude du rôle de HIF-1 dans la modulation de l'apoptose

Lecocq, Christophe

Award date:
2002

Link to publication

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

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

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

Download date: 02. May. 2026

FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR

Faculté des Sciences

Etude du rôle de HIF-1 dans la modulation de l'apoptose

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de

licencié en Sciences biologiques

Christophe LECOCQ

Juin 2002

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: joelle. jonet@fundp.ac.be - http://www.fundp.ac.be/fundp.html

Etude du rôle de HIF-1 dans la modulation de l'apoptose

LECOCQ Christpohe

Résumé

Toute diminution de l'apport en oxygène est perçue par la cellule. Celle-ci réagit alors par une série de mécanismes visant à maintenir son homéostasie. L'activation du facteur de transcription HIF-1 joue un rôle essentiel dans cette adaptation des cellules à l'hypoxie. HIF-1 est un dimère constitué des sous-unité HIF-1α et ARNT.

De plus, certaines données de la littérature suggèrent que HIF-1 joue également un rôle dans la modulation de l'apoptose : selon les conditions, il induirait (hypoxie sévère ou prolongée) ou inhiberait (hypoxie légère) l'apoptose.

Dans ce mémoire, nous avons voulu mettre en évidence et caractériser le rôle anti-apoptotique de HIF-1. A cette fin, nous avons étudié la protection contre l'apoptose induite par la déprivation de sérum et/ou l'incubation en présence de ter-butyl hydroperoxyde suite à la mise sous hypoxie ou l'ajout de chlorure de cobalt, deux activateurs de HIF-1. Ces études ont été réalisées sur des cellules HepG2 et sur des cellules Hepa sauvages ou déficientes pour la sous-unité ARNT de HIF-1. Dans un deuxième temps, nous avons étudié si HIF-1 intervenait dans la régulation de deux gènes anti-apoptotiques : Mcl-1 et Bcl-2. A cette fin, nous avons étudié l'expression de ces deux gènes par Western blot et immunofluorescence sur les deux types cellulaires utilisés précédemment.

L'ensemble des résultats obtenus montre que l'hypoxie et le cobalt peuvent protéger les cellules de l'apoptose induite par le ter-butyl hydroperoxyde et/ou la déprivation de sérum. Ces deux conditions augmentent aussi l'expression de Mcl-1. Par contre, ni la protection, ni la surexpression de Mcl-1 ne sont observées dans les cellules déficientes pour ARNT. Ils suggèrent donc que HIF-1 peut moduler l'apoptose et avoir un rôle anti-apoptotique.

Mémoire de licence en Sciences biologiques
Juin 2002
Promoteur: C. Michiels

Quatre années déjà se sont écoulées depuis mon arrivée à Namur... c'est la fin d'une belle aventure. L'heure est venue pour moi d'adresser ces chaleureux remerciements.

Avant tout, je tiens à remercier Madame Carine Michiels pour sa patience et sa disponibilité de tous les instants. Ses corrections, son suivi constant et surtout ses précieux conseils ont été pour moi une grande source de motivation pour le bon déroulement de ce mémoire.

J'aimerais aussi remercier Jean-Pascal (alias JPP) pour m'avoir enseigné notamment tous les secrets de la culture cellulaire. Merci à toi pour ton soutien journalier, ton humour mais aussi pour avoir plus d'une fois pousser la chansonnette sous la hotte... ça détend!!

Merci au reste de l'équipe HIF et plus particulièrement à Denis pour sa bonne humeur, son aide lors de mes quelques Bradford mais surtout pour m'avoir remonté le moral durant les longues soirées de rédaction au laboratoire.

Merci également à Noëlle à qui j'ai donné beaucoup de travail en microscopie confocale, à Edouard pour ses conseils avisés ainsi qu'à tous les autres membres de l'URBC que j'ai côtoyé de près ou de loin ces quelques mois.

Merci à tous les mémorants avec qui j'ai passé des moments inoubliables. Merci à Marina et Valery pour tous les moments agréables que j'ai passé en leur compagnie au sein de l'équipe HIF (à quand la prochaine réunion pour une tournée de pralines??). Merci à Ludo et Christelle, plus connue sous le nom de "Bouboule", pour toutes les parties de franches rigolades qu'ils nous ont tous les deux fait partager dans "la cage" ou ailleurs...

Merci enfin à Madame Raes pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire.

Mes derniers remerciements iront aux personnes qui sont à mes yeux les plus chères. Merci à mes parents qui m'ont accordé leur confiance au cours de toutes ces années et qui n'ont pas hésité à faire beaucoup de sacrifices pour me permettre de réaliser mon rêve. Merci à Christelle et Fred pour leurs vifs encouragements et tous les moments de détente passés ensemble. Merci à toute ma famille qui, bien que distante de plus de 800 km, m'a toujours soutenu comme elle pouvait.

Christophe, Papy pour les intimes.

Listes des abréviations

Ac	Anticorps
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
Ahr	Aryl hydrocarbon receptor
AP-1	Activator Protein-1
Apaf-1	Apoptotic protease activating factor-1
APS	Ammonium persulfate
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messager
ARNT	Aryl Receptor Nuclear Translocator
ATF	Activated Transcription Factor
ATP	Adénosine triphosphate
BH	Bcl-2 Homology
bHLH	basic Helix Loop Helix
BSA	Bovine Serum Albumin
CAD	Caspase Activated DNAse
CARD	Caspase Recruitment Domain
CBP	CREB Binding Protein
CED	Cell Death
CTL	Contrôle
DED	Death Effector Domain
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Diméthyl Sulfoxyde
DPI	Diphénylène Ionodium
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Acide éthylènediaminetétraacétique
ELISA	Enzyme Linked Immuno Assay
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
EPO	Erythropoïétine
ERK	Extracellular Regulated protein Kinase
ES cells	Embryonic Stem cells
FADD	Fas Associated Death Domain

GLUT-1	Glucose transporter-1
HIF-1	Hypoxia Inducible Factor-1
HIF-1α	Hypoxia Inducible Factor-1α
HMEC-1	Human microvascular endothelial cells-1
HRE	Hypoxia Responsive Element
Hsp90	Heat shock protein 90
IAP's	Inhibitor of Apoptosis Protein
ICAD	Inhibitor Caspase Acivated DNAse
ICE	Interleukin-1 converting enzyme
ID	Inhibitory Domain
IgG	Immunoglobuline G
Inr	Initiator
kb	Kilobases
kDa	KiloDalton
MAP	Mitogen Activated Protein
MEK	MAP/ERK Kinase
MPT	Mitochondrial Permeability Transition
NADPH oxydase	Nicotinamide Adénosine Diphosphate oxydase
NF-1	Nuclear Factor-1
NLS	Site de localisation nucléaire
ODD	Oxygen-dependent Degradation
PARP	Poly-ADP ribose Polymerase
PAS	Per Ahr/ARNT Sim
pb	paire de bases
PBS	Phosphate Buffer Saline
PEST	Proline-Glutamate-Sérine-Thréonine
PFA	Paraformaldéhyde
PTP	Permeability-transition pore
PVDF	Polyvylidine Diofluorure
pVHL	von Hippel Lindau protein
ROS	Reactive Oxygen Species
rpm	rotation par minute
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-PAGE electrophresis	Sodium dodecylsulfate/polyacrylamide gel

SIM	Simple Minded
SOD	Superoxyde Dismutase
Sp-1	Specific protein-1
TA	Domaine de transactivation
TAD-C	Domaine de transactivation C-terminal
TAD-N	Domaine de transactivation N-terminal
TBS	Tris Buffer Saline
TEMED	N,N,N'-Tetra-méthyl-éthylènediamine
TNFR	Tumor Necrosis Factor Receptor
TNF-α	Tumor Necrosis Factor-α
TRADD	TNFR Associated Death Domain
UTR	Untranslated Region
VDAC	Voltage dependent anion channel
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

Tables des matières

I. INTRODUCTION 1

I.1 Hypoxie et réponses cellulaires 1

I.1.1 Effets à court terme 2

I.1.2 Effets à long terme 3

I.2 Hypoxia Inducible Factor-1 (HIF-1) 3

I.2.1 Etude de l'expression du gène de l'EPO et découverte de HIF-1 4

I.2.2 Structure de HIF-1 4

I.2.3 Gènes cibles régulés par HIF-1 5

I.2.3.1 VEGF 6

I.2.3.2 Les enzymes impliqués dans le métabolisme du glucose 6

I.2.4 Modèles de la transduction du signal de la réponse hypoxique 7

I.2.5 Régulation de l'activité de HIF-1 9

I.2.5.1 Régulation transcriptionnelle dans certains types cellulaires. 9

I.2.5.2 Régulation post-traductionnelle 11

I.3 HIF-1 et l'apoptose 15

I.3.1 L'apoptose ou mort cellulaire programmée 15

I.3.2 Découverte et mécanismes de l'apoptose 16

I.3.2.1 Découverte de l'apoptose : Caenorabditis elegans 16

I.3.2.2 Signaux pro-apoptotiques. 18

I.3.2.3 Les caspases 18

I.3.2.4 Les différents substrats des caspases 20

I.3.2.5 Les protéines adaptatrices 20

I.3.2.6 La famille Bcl-2 21

I.3.2.7 L'apoptose et ses implications pathologiques 23

I.3.3 Rôle de HIF-1 dans l'apoptose 24

I.4 But du mémoire 27

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES 29

II.1 Culture cellulaire 29

II.1.1 Caractéristiques des types cellulaires étudiés 29

II.1.2 Milieux de culture et solutions 29
II.1.3 Repiquage des cellules 29
II.2 Incubations **30**
II.3 Mesure de la fragmentation de l'ADN **31**
II.3.1 Préparation des extraits cellulaires 32
II.3.2 Test ELISA 32
II.4 Mesure de l'activité des caspases **34**
II.5 Western blot **35**
II.5.1 Préparation des extraits cellulaires totaux 35
II.5.2 Electrophorèse 36
II.5.3 Transfert 39
II.5.4 Traitement et révélation 40
II.5.5 Révélation du film 43
II.6 Dosage protéique par la méthode de Bradford **43**
II.7 Immunofluorescence **44**
III. RÉSULTATS ET DISCUSSION **47**
III.1 Modèle expérimental d'induction l'apoptose **47**
III. 2 Mise en évidence du rôle anti-apoptotique de HIF-1 ..... **49**
III.2.1 Activation de HIF-1 49
III.2.1.1 Etude de la stabilisation de HIF-1α par Western blot 49
III.2.1.2 Marquage de HIF-1α 49
III.2.2 Etude morphologique 51
III.2.3 Mesure de la fragmentation de l'ADN 52
III.2.4 Mesure de l'activité des caspases 54
III.2.5 Mise en évidence de l'activité des caspases par immunofluorescence 55
III.2.6 Mesure de la fragmentation de l'ADN sur les cellules Hepa C1 et C4 56
III.2.6.1 Adaptation du modèle expérimentale sur les cellules Hepa 57
III.2.6.2 Mesure de la fragmentation de l'ADN 57
III.2.7 Etude de l'activité des caspases sur les cellules Hepa 59

III.3 Mise en évidence d'une régulation de protéines anti-apoptotiques par HIF-1 ..... *61*

III.3.1 Etude par Western blot *61*

III.3.1.1 Expression de Mcl-1 61

III.3.1.2 Expression de Bcl-2 63

III.3.2 Etude par immunofluorescence *63*

III.3.2.1 Marquage de Mcl-1 dans les HepG2 63

III.3.2.2 Expression de Mcl-1 chez les cellules Hepa 65

IV. CONCLUSION ET PERSPECTIVES 67

Introduction

I. INTRODUCTION

L'homme, comme la plupart des espèces animales, présente une dépendance totale vis-à-vis de l'oxygène pour sa survie. Durant l'embryogenèse, les organismes supérieurs développent des systèmes cardiovasculaire et respiratoire complexes ayant pour rôle de prélever l'O_2 de l'environnement et de le distribuer à toutes les cellules de l'organisme. En tant qu'accepteur final d'électrons dans la respiration mitochondriale, l'O_2 permet aux cellules de synthétiser, via la phosphorylation oxydative, de l'ATP, source d'énergie essentielle au bon fonctionnement des cellules. Ceci explique que tous les organismes, des bactéries aérobies jusqu'aux eucaryotes supérieurs possèdent divers mécanismes visant à maintenir l'homéostasie en O_2.

I.1 Hypoxie et réponses cellulaires

Des problèmes vasculaires, comme le thrombus par exemple, peuvent entraîner une situation d'ischémie c'est-à-dire une situation où un tissu subit à la fois une diminution des apports nutritionnels et de l'approvisionnement en O_2. Lorsque seul l'apport en O_2 diminue, on parle d'hypoxie.

En réponse à cette hypoxie, les cellules eucaryotes ont développé plusieurs systèmes qui leur permettent de survivre. D'une manière générale, ces adaptations entraînent tout d'abord une réorganisation du métabolisme énergétique se traduisant par la production d'ATP indépendante de l'oxygène suite à une activation de la glycolyse ainsi que par l'augmentation du transport de glucose vers l'intérieur de la cellule. Une autre adaptation consiste en l'activation de la néoangiogenèse, c'est-à-dire la formation de nouveaux capillaires ayant pour but d'améliorer, à plus long terme, l'apport en O_2 dans le tissu concerné.

Dans ce chapitre, nous aborderons plus en détails ces différents mécanismes biochimiques développés par les cellules confrontées à un stress hypoxique.

I.1.1 Effets à court terme

Durant une hypoxie, les cellules subissent une chute rapide du taux d'ATP intracellulaire suite à une diminution des phosphorylations oxydatives au niveau de la respiration mitochondriale, elle-même due au manque d'O_2.

Pour remédier à ce problème, les cellules ont développé plusieurs mécanismes adaptatifs leurs permettant de survivre à ce stress.
Tout d'abord, il y a une augmentation de l'activité glycolytique intracellulaire

- via l'augmentation de l'activité des enzymes impliquées dans les différentes réactions de la glycolyse. Cette augmentation se fait grâce à une régulation allostérique, surtout au niveau de la phosphofructokinase, mais également par une augmentation de leur expression suite à une activation de la transcription des gènes codant pour ces mêmes protéines. C'est notamment le cas de l'aldolase A, de l'énolase-α, de la lactate deshydrogénase et de la pyruvate kinase.
- via l'augmentation du nombre de transporteurs de glucose de type GLUT-1 par augmentation de leur expression. Ces derniers permettant le transport du glucose vers le cytoplasme, ils contribuent à combler le manque d'énergie dû à l'hypoxie.

De plus, il y a au niveau des cellules hypoxiques une inhibition de plusieurs réactions métaboliques ainsi que de certaines enzymes grandes consommatrices d'ATP. Parmi celles-ci, on retrouve entre autres la voie de synthèse des protéines et des acides nucléiques.

A côté de ces réponses à l'hypoxie, communes à tous les types cellulaires, il y en a quelques-unes qui sont spécifiques du tissu concerné. En effet, les cellules du rein mais aussi d'autres types cellulaires synthétisent, suite à l'hypoxie, des facteurs de croissance tels que l'EPO (érythropoïétine) et le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) responsables respectivement de l'érythropoïèse et de la néoangiogenèse. Néanmoins, ce genre de réponses engendre plutôt des effets à plus long terme et fera l'objet d'une brève description ci-dessous.

I.1.2 Effets à long terme

La libération, par certaines cellules, d'érythropoïétine a pour effet de stimuler la production de nouveaux globules rouges. Ceci permet un transport plus efficace de l'oxygène dans le sang et donc d'apporter plus d'oxygène à toutes les cellules de l'organisme.
Pour sa part, le VEGF va entraîner une meilleure irrigation des tissus hypoxiques grâce à la genèse de nouveaux capillaires contribuant ainsi à diminuer l'ischémie locale.

Il est important de souligner que tous ces mécanismes adaptatifs, mis en place par les cellules soumises à un stress hypoxique, sont régulés par un facteur de transcription spécifique, le facteur HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor-1).

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

En condition d'hypoxie, le facteur de transcription HIF-1 induit l'expression de gènes impliqués dans la glycolyse ainsi que d'autres gènes dont les protéines augmentent l'apport d'O_2 ou facilitent l'adaptation métabolique à l'hypoxie.
Il stimule également la néoangiogenèse et l'érythropoïèse via la production respectivement du VEGF et de l'EPO.
A côté de cela, HIF-1 joue également un rôle important dans le développement embryonnaire via la régulation de la vascularisation mais aussi dans la progression de tumeurs ainsi que dans l'apoptose (voir chapitre I.3).

Ce chapitre donne une description détaillée de ce facteur de transcription. Nous aborderons successivement l'historique de sa découverte, sa structure, ses gènes cibles et les acquis concernant la régulation de son activité.

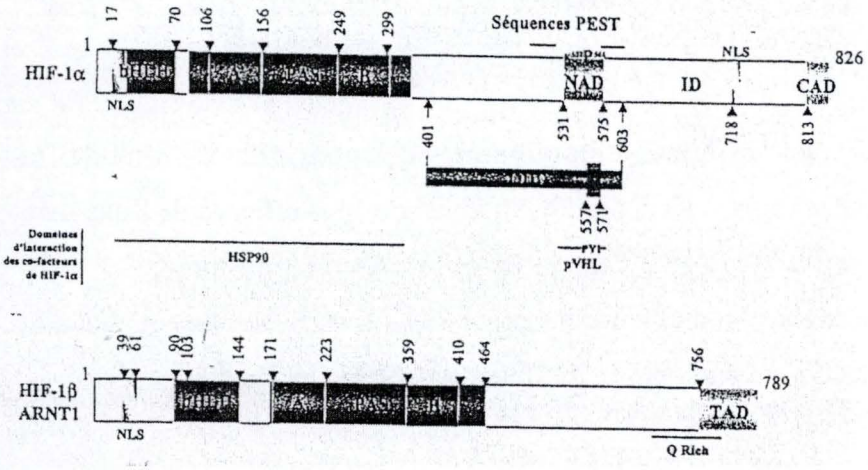


Figure I.1: Structure des sous-unités de HIF-1

Schéma représentant les domaines fonctionnels des deux sous-unités de HIF-1 et des domaines d'interaction des co-facteurs de HIF-1α (ODD : oxygen dependent degradation motif ; LXXLAP : motif conservé de *C. elegans* à l'homme, et reconnu par la HIF-proline hydroxylase ; pVHL : von Hippel Lindau protein ; PAS : Per, Arnt, Sim motif ; NAD et CAD : domaines de transactivation N- et C-terminal ; NLS : séquence de localisation nucléaire ; ID : Inhibitory Domain) (d'après E. Gothié et J. Pouysségur 2002).

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

Il a été montré que l'hypoxie était capable de stimuler l'expression de l'érythropoïétine, une hormone glycoprotéique d'environ 30 kDa synthétisée principalement dans les reins. Cette hormone est acheminée par voie sanguine jusqu'à la moelle osseuse pour y stimuler les précurseurs des globules rouges qui vont se différencier en érythrocytes, augmentant le nombre de globules rouges et donc la capacité de transport du sang en O_2.

La découverte de HIF-1 en tant que régulateur central de l'homéostasie en O_2 s'est faite tout d'abord grâce à l'analyse des mécanismes moléculaires responsables de l'activation de la transcription du gène de l'érythropoïétine (EPO) en réponse à l'hypoxie. Cette étude a permis de mettre en évidence une séquence *enhancer* en position 3' non codante du gène (5'-TACGTGCT-3') qui est sensible à l'hypoxie et qui a été nommée HRE (hypoxia responsive element). Cette séquence fixe en condition d'hypoxie un complexe protéique nommé HIF-1 (hypoxia inducible factor-1) (Wang *et al.*, 1993a).

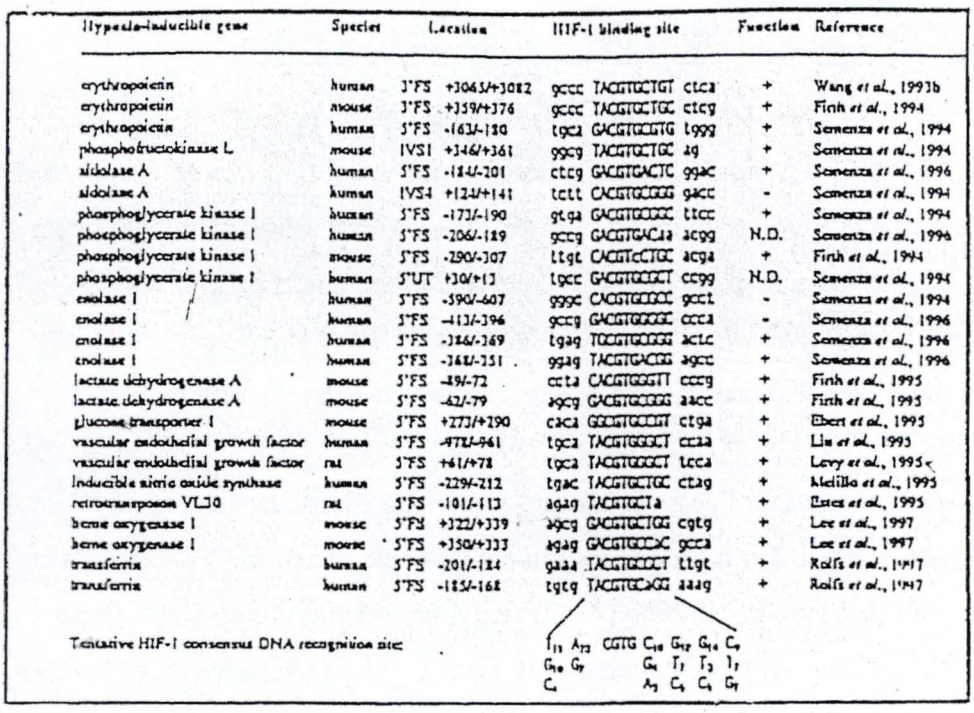
La liaison de HIF-1 à la séquence *enhancer* du gène de l'EPO est détectable après seulement 15 minutes d'hypoxie et atteint un maximum après 4 heures dans des cellules hépatocytaires. Lors du retour en normoxie, HIF-1 quitte très rapidement sa séquence cible.

Enfin, Wang et Semenza ont également démontré que HIF-1 était activé en situation hypoxique dans des cellules ne produisant pas d'EPO, suggérant l'implication de HIF-1 dans la transcription d'autres gènes en hypoxie (Wang *et al.*, 1995b).

I.2.2 Structure de HIF-1

Le facteur de transcription HIF-1 est un hétérodimère constitué de deux sous-unités :

- HIF-1α de 120 kDa
- HIF-1β / ARNT (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator) de 94 kDa



Hypoxia-inducible gene	Species	Location	HIF-1 binding site	Function	Reference
erythropoietin	human	3'FS	+3065/+3082	gccc TACGTGCTGT ctca	+	Wang *et al.*, 1993b
erythropoietin	mouse	3'FS	+359/+376	gccc TACGTGCTGC ctcg	+	Firth *et al.*, 1994
erythropoietin	human	5'FS	-163/-130	tgca GACGTGCGTG tggg	+	Semenza *et al.*, 1994
phosphofructokinase L	mouse	IVS1	+146/+361	ggcg TACGTGCTGC ag	+	Semenza *et al.*, 1994
aldolase A	human	5'FS	-184/-201	ctcg GACGTGACTC ggac	+	Semenza *et al.*, 1996
aldolase A	human	IVS4	+124/+141	tctt CACGTGCGGG gacc	-	Semenza *et al.*, 1994
phosphoglycerate kinase 1	human	5'FS	-173/-190	gtga GACGTGCGCC ttcc	+	Semenza *et al.*, 1994
phosphoglycerate kinase 1	human	5'FS	-206/-189	gccg GACGTGACaa acgg	N.D.	Semenza *et al.*, 1996
phosphoglycerate kinase 1	mouse	5'FS	-290/-307	ttgt CACGTcCTGC acga	+	Firth *et al.*, 1994
phosphoglycerate kinase 1	human	5'UT	+30/+13	tgcc GACGTGCGCT ccgg	N.D.	Semenza *et al.*, 1994
enolase 1	human	5'FS	-590/-607	gggc CACGTGCGCC gcct	-	Semenza *et al.*, 1994
enolase 1	human	5'FS	-413/-396	gccg GACGTGCGGC ccca	-	Semenza *et al.*, 1996
enolase 1	human	5'FS	-386/-369	tgag TCCGTGCGGG actc	+	Semenza *et al.*, 1996
enolase 1	human	5'FS	-361/-351	ggag TACGTGACGG agcc	+	Semenza *et al.*, 1996
lactate dehydrogenase A	mouse	5'FS	-89/-72	ccta CACGTGGGTT cccg	+	Firth *et al.*, 1995
lactate dehydrogenase A	mouse	5'FS	-62/-79	agcg GACGTGCGGG aacc	+	Firth *et al.*, 1995
glucose transporter 1	mouse	5'FS	+273/+290	caca GCCGTGCCGT ctga	+	Ebert *et al.*, 1995
vascular endothelial growth factor	human	5'FS	-975/-961	tgca TACGTGGGCT ccaa	+	Liu *et al.*, 1995
vascular endothelial growth factor	rat	5'FS	+61/+78	tgca TACGTGGGCT tcca	+	Levy *et al.*, 1995c
inducible nitric oxide synthase	human	5'FS	-229/-212	tgac TACGTGCTGC ctag	+	Melillo *et al.*, 1995
retrotransposon VL30	rat	5'FS	-101/-113	agag TACGTGCTa	+	Estes *et al.*, 1995
heme oxygenase 1	mouse	5'FS	+322/+339	agcg GACGTGCTGG cgtg	+	Lee *et al.*, 1997
heme oxygenase 1	mouse	5'FS	+350/+333	agag GACGTGCCaC gcca	+	Lee *et al.*, 1997
transferrin	human	5'FS	-201/-184	gaaa TACGTGCCCT ttgt	+	Rolfs *et al.*, 1997
transferrin	human	5'FS	-155/-168	tgtg TACGTGCaGG aaag	+	Rolfs *et al.*, 1997

Tentative HIF-1 consensus DNA recognition site: T_{11} A_{12} CGTG C_{16} G_{17} G_{18} C_{19} / G_{10} G_9 G_8 T_7 T_6 T_5 / C_4 A_3 C_2 C_1 G_1

Figure I.2 : Liste de gènes dont la transcription est activée par HIF-1

(d'après Wenger et Gassman, 1997).

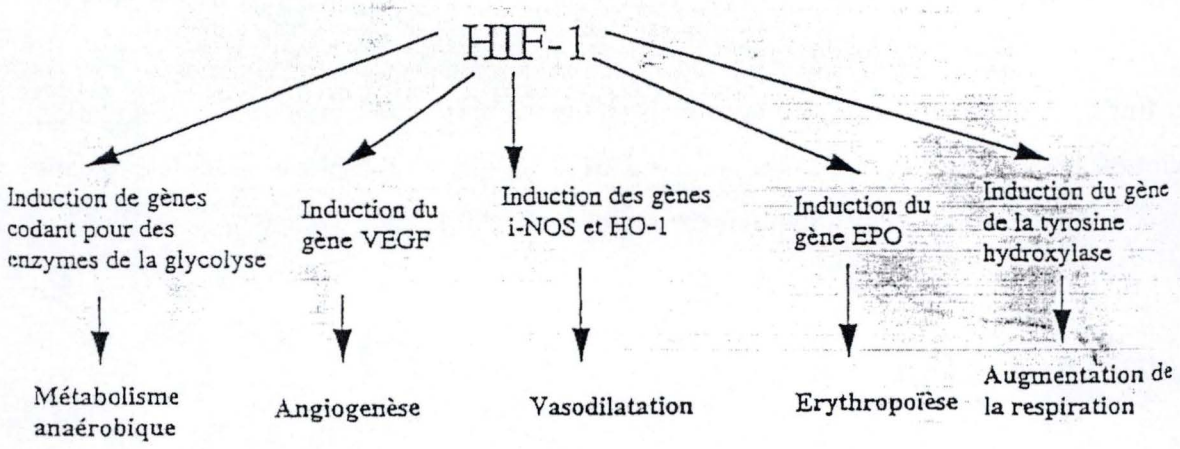


Figure I.3 : Principaux gènes induits et activés par HIF-1 et leur fonction

(VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor ; i-NOS : inducible Nitric Oxide Synthase ; HO-1 : Hème oxygénase-1 ; EPO : érythropoïétine) (d'après Guillemin et Krasnow, 1997).

Ces deux sous-unités contiennent un domaine en position amino-terminale de type basic-helix-loop-helix-PAS (bHLH-PAS) et font partie d'une superfamille de protéines contenant ces domaines.
Le motif HLH intervient dans la dimérisation des protéines tandis que la partie basique qui le précède intervient dans la fixation et la spécificité de la liaison de la protéine à l'ADN.
Le domaine PAS, quant à lui, est impliqué dans la dimérisation des deux sous-unités (voir figure I.1).

HIF-1α contient également, dans sa partie carboxy-terminale, deux domaines de transactivation.
Le premier domaine de transactivation (TAD-N ou NAD) correspond aux acides aminés 531-575. Le second TAD (TAD-C ou CAD), en position carboxy-terminale dans la protéine, correspond aux acides aminés 786-826. Ils sont séparés par un domaine inhibiteur de la transcription, à savoir le domaine ID (inhibitory domain), qui est impliqué dans l'inactivation des deux domaines de transactivation TAD-N/C en normoxie.
Il est intéressant de noter que la sous unité ARNT-1 contient également un domaine TAD dans sa partie carboxy-terminale, mais ce dernier n'est pas impliqué dans la réponse à l'hypoxie.
Huang et son équipe ont découvert un domaine de dégradation dépendant de l'oxygène (ODD domain), localisé entre les résidus 401 et 603 de la protéine HIF-1α qui interviendrait dans la dégradation de HIF-1α en normoxie (Huang *et al.*, 1996) (voir chapitre 1.2.4).

I.2.3 Gènes cibles régulés par HIF-1

En condition d'hypoxie, HIF-1 active l'expression de nombreux gènes, en plus de celui de l'EPO, dont notamment le gène encodant le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) et ceux encodant les protéines impliquées dans la glycolyse (voir figures I.2 et I.3).

I.2.3.1 VEGF

Le VEGF est un facteur de croissance (mitogène) qui est spécifique des cellules endothéliales et initie l'angiogenèse. Son expression est fortement augmentée au niveau des tissus subissant une diminution de la concentration en O_2.

Liu et son équipe ont identifié un élément activateur ou *enhancer* de 28 bp à l'extrémité 5' du promoteur du gène du VEGF. La présence d'une séquence cis HRE au sein de cet *enhancer* est nécessaire pour l'induction hypoxique de la transcription du VEGF (Liu *et al.*, 1995). De plus, l'ARNm codant pour le VEGF est stabilisé en condition d'hypoxie (Levy *et al.*, 1998).

I.2.3.2 Les enzymes impliqués dans le métabolisme du glucose

En normoxie, la cellule produit la majorité de son énergie par la respiration aérobie au cours de laquelle l'O_2 est réduit en H_2O. En hypoxie, la phosphorylation oxydative n'est plus possible par manque d'O_2, l'accepteur final d'électrons. La cellule subit alors une diminution importante de la production d'ATP.

Afin de compenser cette perte, la cellule réagit par différents mécanismes. D'une part, la cellule augmente son activité glycolytique. En effet, dans les cellules hypoxiques, HIF-1 active la transcription de gènes codant pour des protéines spécifiques de cette voie métabolique, comme les enzymes glycolytiques. HIF-1 induit également l'augmentation de l'expression de transporteurs membranaires de glucose. D'autre part, la cellule réduit les coûts énergétiques notamment en diminuant l'expression d'enzymes grandes consommatrices d'ATP telle que la phosphoénolpyruvate carboxykinase. Cette enzyme est impliquée dans la gluconéogenèse c'est-à-dire la synthèse de glucose à partir de précurseurs non carbohydratés. En condition hypoxique, la gluconéogenèse est donc inhibée.

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

- Glucose transporter-1 (Glut-1)

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

- Enzymes de la glycolyse

Quelques exemples : aldolase A, énolase 1 lactate deshydrogénase A, phosphofructokinase L, phosphoglycérate kinase 1.

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

Les produits de ces gènes cibles de HIF-1 participent donc à des mécanismes adaptateurs pour la cellule et le tissu soumis à l'hypoxie. Ces mécanismes orientent le métabolisme énergétique de la cellule vers la glycolyse et favorisent l'oxygénation du tissu via la néovascularisation et la production d'érythropoïétine.

I.2.4 Modèles de la transduction du signal de la réponse hypoxique

Les mécanismes par lesquels les cellules humaines perçoivent une diminution de la concentration en O_2 et conduisant à l'activation de HIF-1 ne sont pas encore bien connus. La plupart des recherches menées dans ce domaine consistent en l'identification d'un senseur cellulaire à oxygène et de la voie de transduction du signal en aval de ce senseur.

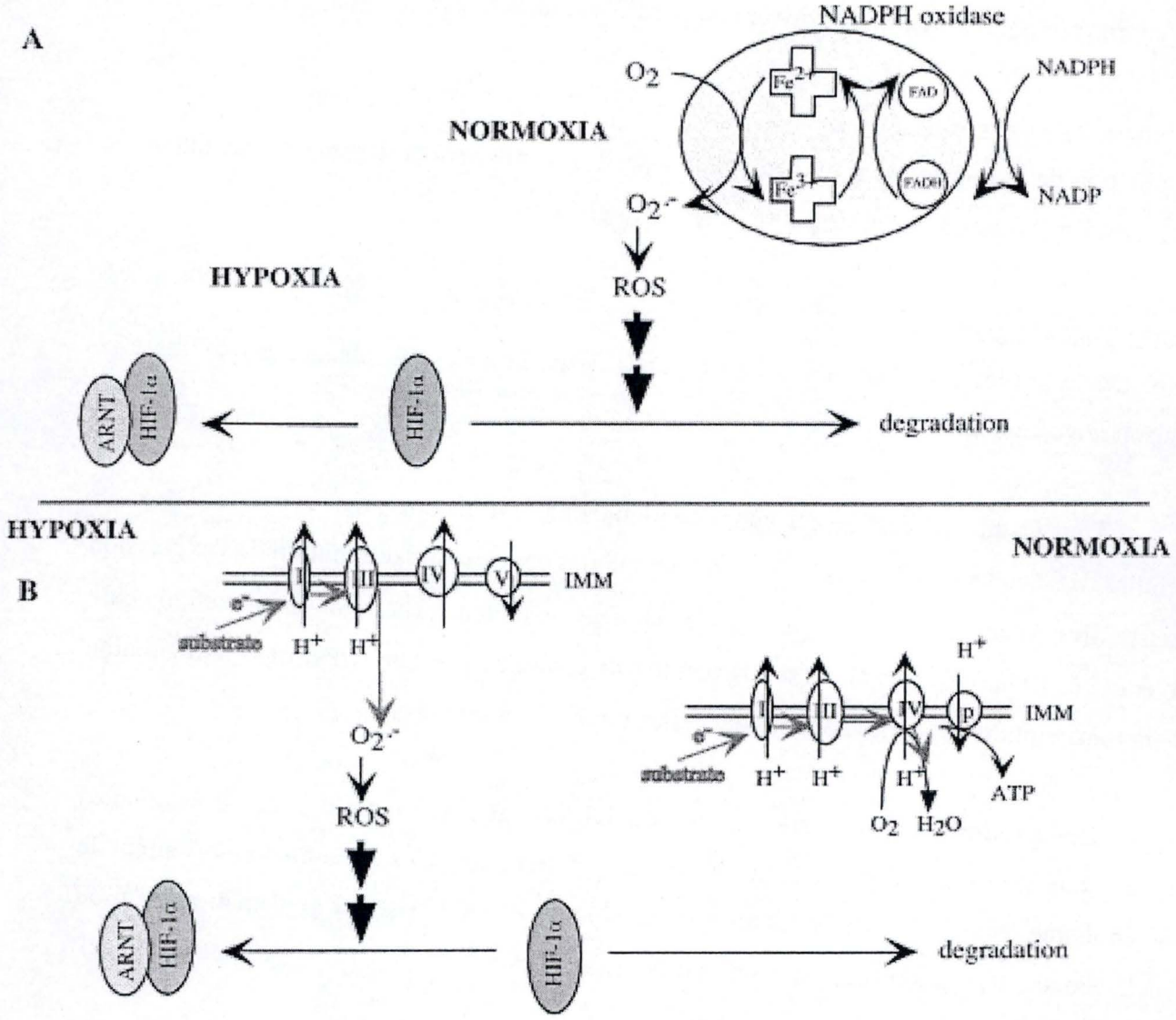


Figure I.4 : Schéma reprenant les deux premiers modèles de la perception de l'O_2 par la cellule

A Des radicaux libres dérivés de l'O_2 (ROS) seraient générés par une NAD(P)H oxydase en quantité directement proportionnelle à la concentration en O_2. La diminution de la synthèse de ROS cytosoliques activerait la voie de transduction du signal hypoxique.

B En inhibant l'activité de la cytochrome oxydase du complexe IV de la chaîne de transport d'électrons, l'hypoxie induirait une augmentation de la production mitochondriale de ROS au niveau du complexe III, augmentation qui activerait la voie de transduction du signal conduisant à l'activation de HIF-1.

Plusieurs modèles ont été proposés quant à l'identité de ce senseur. Trois d'entre eux ont reçu une attention toute particulière.

Le premier modèle se base sur la conversion de l'oxygène en espèces réactives dérivées de l'oxygène (reactive oxygen species : ROS) tels que H_2O_2 ou $OH^{\cdot}$. Une NADPH oxydase convertit O_2 en superoxyde, qui est réduit par la superoxyde dismutase (SOD) en peroxyde d'hydrogène (voir figure I.4.A).

Une réduction de la concentration en O_2 entraînerait une diminution de la production de radicaux libres, ce qui affecterait les voies de transduction du signal menant à l'induction de HIF-1. Cependant, le diphénylène ionodium (DPI), un inhibiteur de la NADPH oxydase, bloque l'induction de HIF-1 en réponse à l'hypoxie, soit un effet opposé à ce qui prédit par le premier modèle (Gleadle *et al.*, 1995).

Pour ce qui est du deuxième modèle, l'hypoxie entraîne la production croissante de ROS dans la mitochondrie et ce serait l'augmentation ces radicaux libres mitochondriaux qui activeraient la voie de transduction du signal (Chandel *et al.*, 2000) (voir figure I.4.B). Malheureusement, de nombreuses données existent déjà et tendent à démontrer qu'en hypoxie, la production radicalaire mitochondriale diminue. Cela serait dû à la diminution globale en O_2. Ces résultats sont donc en contradiction avec le deuxième modèle.

En conclusion, aucun de ces deux modèles n'est pour l'instant accepté parce qu'aucun des deux ne permet d'expliquer l'ensemble des observations expérimentales.

Enfin, les équipes de Ratcliffe et de Kaelin Jr. viennent de publier des résultats sur le mécanisme d'activation de HIF-1 impliquant une activité hydroxylase dépendante du fer et de l'oxygène. L'enzyme correspondante, dénommée HIF PH pour HIF-1α prolyl-hydroxylase, serait le senseur de l'oxygène cellulaire (voir figure I.5). En fait, cette enzyme catalyse, en présence d'O_2 et de fer, une réaction d'hydroxylation sur un résidu proline de la sous-unité HIF-1α (Pro^{564}). La protéine von Hippel Lindau (pVHL), un suppresseur de tumeurs, reconnaît le domaine de dégradation de HIF-1α dépendant de l'oxygène (ODD domain) via ce résidu proline qui est exclusivement hydroxylé en normoxie (Ivan *et al.*, 2001; Jaakkola *et al.*, 2001). pVHL est, en réalité, une protéine appartenant à un complexe contenant une poly-ubiquitine ligase qui entraîne la dégradation de HIF-1 par le protéasome 26s en normoxie.

En hypoxie, la prolyl-hydroxylase est inhibée par le manque d'O_2 et ne peut donc plus hydroxyler son substrat, Pro^{564}. Cette dernière n'étant plus hydroxylée, pVHL ne la reconnaît plus. Cela provoque l'inhibition de la dégradation de HIF-1α par le protéasome et donc son accumulation.

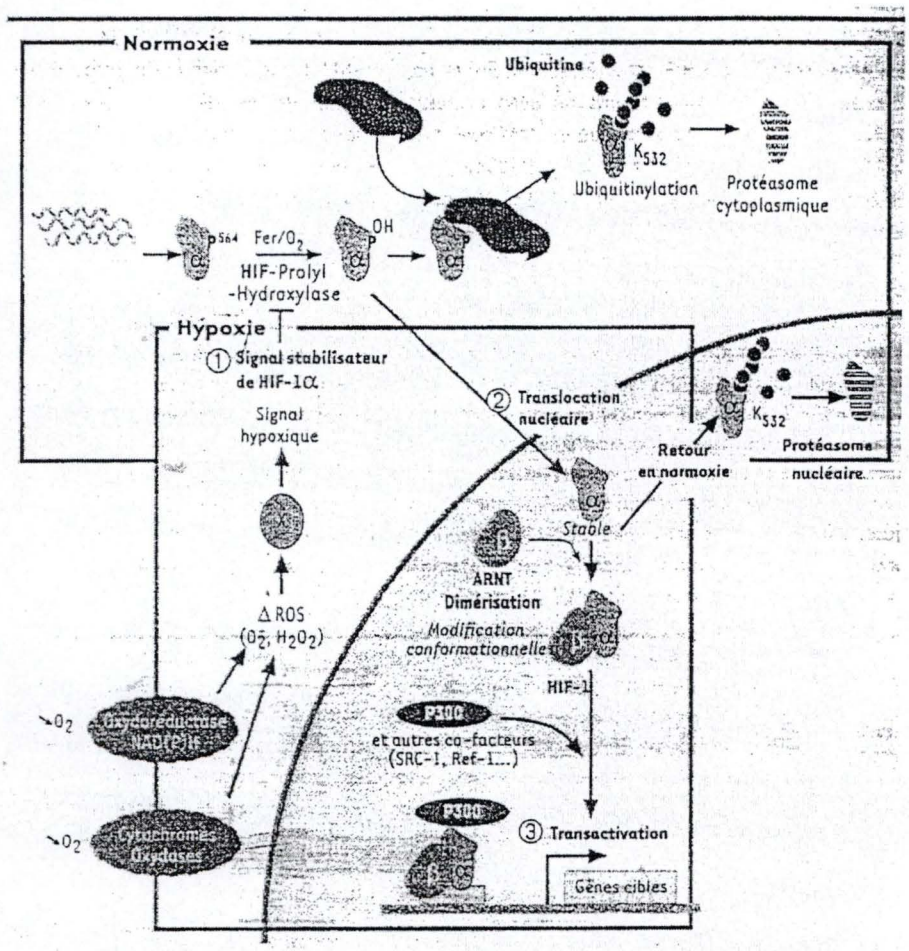


Figure I.5 : Troisième modèle du senseur à oxygène

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

Le senseur à O_2 pourrait donc être cette prolyl-hydroxylase qui serait à la base de la stabilisation de HIF-1α en normoxie.

Quelles que soient les étapes se déroulant en aval du senseur à oxygène, un point important dans la voie de transduction du signal en réponse à l'hypoxie est l'activation du facteur de transcription HIF-1. A ce jour, plusieurs mécanismes impliquant essentiellement la sous-unité HIF-1α ont été découverts.

I.2.5 Régulation de l'activité de HIF-1

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

I.2.5.1 Régulation transcriptionnelle dans certains types cellulaires.

La présence ou l'absence de cette régulation transcriptionnelle semble être très variable d'un type cellulaire à l'autre.

D'une part, l'hypoxie engendre une augmentation de la transcription du gène HIF-1A dans des lignées cellulaires hépatocytaires telles que Hep3B et HepG2 (Wang *et al.*, 1995a), mais aussi dans les cardiomyocytes de rats, dans des cellules de cerveau et de rein (Ladoux *et al.*, 1997; Palmer *et al.*, 1998; Wiener *et al.*, 1996). Dans ces cellules, on observe une augmentation de la quantité d'ARNm de HIF-1α en hypoxie.
D'autre part, dans les cellules HeLa, L929, LN229 (Wenger *et al.*, 1997b), dans les HMEC-1 (Minet *et al.*, 1999) et dans de nombreuses autres lignées cellulaires, l'hypoxie n'induit pas d'augmentation de la transcription du gène HIF1A et on n'observe pas de variation dans la quantité d'ARNm de HIF-1α en hypoxie par rapport à la normoxie. Dans ce cas, le taux de transcription serait identique en normoxie et en hypoxie et donc, seule la régulation post-traductionnelle interviendrait en réponse à l'hypoxie (Huang *et al.*, 1996).

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

Le promoteur du gène HIF1A comprend notamment une séquence riche en GC qui contient plusieurs sites de liaison potentiels de Sp1. Certains de ceux-ci sont localisés en aval du site +1, dans la région appelée 5' UTR (Untranslated Region). Ce promoteur contient également plusieurs sites potentiels HRE (Hypoxia Responsive Element), séquence *cis* du facteur de transcription HIF-1 (Iyer *et al.*, 1998b).
Minet et al. (Minet *et al.*, 1999) ont démontré que la transcription constitutive de HIF1A est en partie médiée par des sites de liaison Sp1 au sein du promoteur et par des séquences *cis* dans la 5' UTR.

En ce qui concerne les différences observées entre les types cellulaires quant à la régulation transcriptionnelle du gène HIF1A en réponse à l'hypoxie, l'hypothèse suivante peut être émise. L'activation transcriptionnelle de HIF1A en réponse à l'hypoxie observée dans certains types cellulaires (HepG2) serait due à l'absence d'un facteur *trans* inhibiteur dans ces cellules. En effet, Minet et son équipe ont découvert dans la partie centrale du promoteur HIF1A (nucléotides +1 à -200), un fragment (nt +1 à -105) contenant des éléments *cis* importants, impliqués dans la régulation positive de la transcription de HIF1A en réponse à l'hypoxie chimique (traitement au $CoCl_2$), ceci aussi bien dans les cellules HMEC-1 que dans les cellules HepG2 (Minet *et al.*, 1999). En plus de cette séquence impliquée dans la régulation positive, les mêmes auteurs ont mis en évidence, et ce uniquement dans les cellules HMEC-1, un régulateur négatif de la transcription dans la séquence nucléotidique allant de -105 à -201. C'est l'activité de ce dernier qui éteint l'activité de l'élément de régulation positif mentionné ci-dessus et qui expliquerait ainsi l'absence d'augmentation du taux de transcription de HIF1A en réponse à l'hypoxie dans les cellules HMEC-1 et donc l'absence d'augmentation du taux d'ARNm de HIF-1α en conditions d'hypoxie.

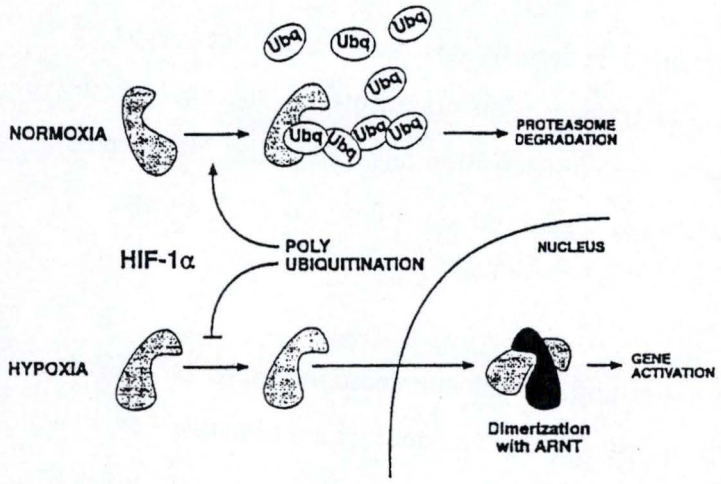


Figure I.6 : Rôle joué par le système ubiquitine-protéasome dans la voie d'activation de HIF-1α

En normoxie, HIF-1α est polyubiquitinylé et rapidement dégradé par le protéasome 26S. Un stress hypoxique engendrerait une inhibition du processus d'ubiquitination permettant une stabilisation de HIF-1α, sa translocation nucléaire et sa dimérisation avec la sous-unité ARNT. HIF-1 ainsi formé peut alors reconnaître la séquence HRE (Hypoxia Responsive Element) présente au niveau des éléments régulateurs des gènes dont il active la transcription (d'après Kallio *et al.*, 1999).

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

I.2.5.2 Régulation post-traductionnelle

La régulation post-traductionnelle de HIF-1 se fait à plusieurs niveaux :

- stabilité de la protéine HIF-1α

En normoxie (20% O_2), on ne détecte pas de HIF-1α dans les cellules. En revanche, l'expression de cette protéine augmente en condition d'hypoxie et peut être détectée déjà après 30 minutes et atteint un maximum après 4 heures dans les cellules Hep3B. La sous-unité ARNT est quant à elle constitutivement exprimée et est présente en grande quantité, dans le noyau, à la fois en normoxie et en hypoxie. En fait, la sous-unité HIF-1α est exprimée en normoxie mais est continuellement dégradée par le système ubiquitine-protéasome via l'activité de la prolyl hydroxylase mentionnée ci-dessus (voir chapitre I.2.4). En effet, Huang et son équipe ont montré que la quantité de la protéine HIF-1α augmentait en normoxie dans des cellules présentant un dysfonctionnement de l'activité du protéasome, suggérant que l'hypoxie peut mener à une diminution de la dégradation de HIF-1α, qui est la seule sous-unité régulée par l'hypoxie (Huang *et al.*, 1996) (voir figure I.6).

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

- phosphorylation de HIF-1α

En plus de l'inhibition de sa dégradation, HIF-1α subit également des phosphorylations (voir figure I.7). La première indication suggérant que HIF-1 est une protéine phosphorylée fut fournie par Wang et Semenza en 1993 (Wang *et al.*, 1993a; Wang *et al.*, 1993b). Grâce à la méthode de l'EMSA (electrophoretic mobility shift assay), ils ont montré que quand des extraits nucléaires provenant de cellules Hep3B ayant subi un stress hypoxique étaient traitées avec une phosphatase, le complexe HIF-1/ADN était disrupté.
Plus tard, Wang et Semenza ont également montré que des inhibiteurs de kinases (2-aminopurine, génistéine) étaient capables d'inhiber la liaison de HIF-1 à l'ADN de même que la stabilisation de la sous-unité HIF-1α (Wang *et al.*, 1995b).

Plusieurs kinases sont connues pour être activées en hypoxie et sont dès lors des candidats potentiels pour l'activation de HIF-1. C'est le cas pour certains membres de la famille des MAP kinases.

C'est dans cette optique que Minet et son équipe ont étudié le rôle respectif de ces kinases dans l'activation de HIF-1 par l'hypoxie dans les cellules endothéliales HMEC-1 (Human Microvascular Endothelial Cell-1) (Minet *et al.*, 2001). Minet et son équipe ont démontré que la voie des ERK (MAP kinases) est impliquée dans l'induction de l'activité transcriptionnelle de HIF-1 (Minet *et al.*, 2000a). En effet, ils ont d'abord montré que ERK1 et ERK2 sont activées durant l'hypoxie. Minet et son équipe ont observé que, dans des cellules traitées avec PD98059, il y avait inhibition de l'activité transcriptionnelle de HIF-1 induite par l'hypoxie (Minet *et al.*, 2000a). De plus, cette activité était inhibée dans des cellules HMEC-1 exprimant le mutant dominant négatif de ERK1. En revanche, cela n'était pas observé dans des cellules HMEC-1 exprimant le dominant négatif de ERK2. L'inhibition de ces kinases en hypoxie avec PD98059 n'empêche pas la stabilisation de la sous-unité HIF-1α ni l'activité de liaison à l'ADN de HIF-1 (Dudley *et al.*, 1995).

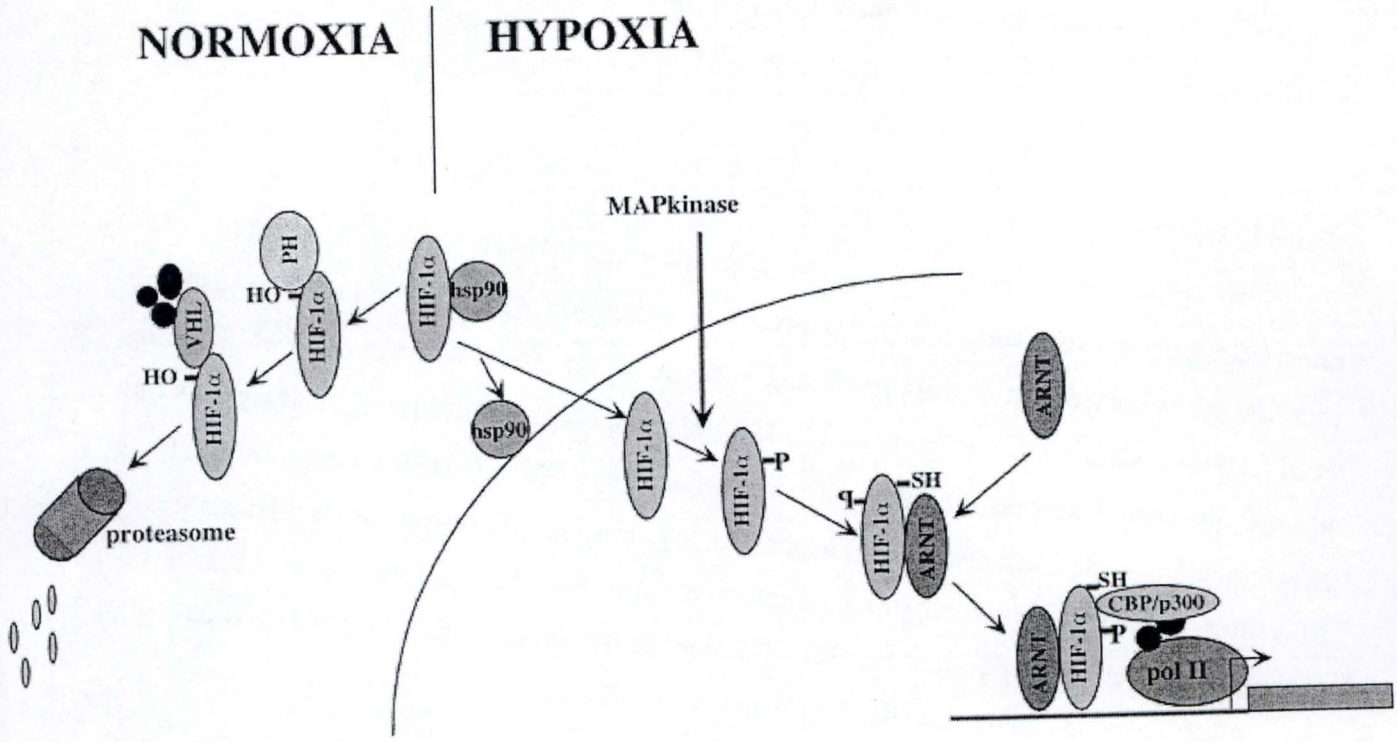


Figure I.7 : Représentation schématique de la régulation de HIF-1

(ARNT : Aryl Receptor Nuclear Translocator ; HIF-1α : Hypoxia Inducible Factor-1α ; hsp 90 : heat shock protein 90 ; pol II : polymerase II ; VHL : von Hippel Lindau protein) (d'après Michiels *et al.*, 2001).

Ces résultats montrent que ERK1 est impliquée dans l'activation transcriptionnelle de HIF-1 induite par l'hypoxie sans que cette kinase ne participe pas à la stabilisation de la protéine HIF-1α. La phosphorylation de HIF-1α par ERK1 pourrait par exemple moduler l'interaction de HIF-1 avec des coactivateurs transcriptionnels.

- translocation nucléaire et activation du domaine carboxy-terminal de HIF-1α

En réponse à l'hypoxie, HIF-1α est transloqué du cytoplasme vers le noyau et s'associe avec ARNT qui a une localisation exclusivement nucléaire. Cette translocation, essentielle à l'activation de HIF-1, est régulée.

Tout d'abord, il a été montré que HIF-1α est associé, en normoxie, à la protéine chaperonne Hsp90 (Gradin *et al.*, 1996; Minet *et al.*, 2000b). Hsp90 masquerait le site NLS en position carboxy-terminale de HIF-1α empêchant ainsi sa translocation en normoxie (voir figure I.7).
HIF-1α possède en réalité deux séquences de localisation nucléaire (NLS ; voir figure I.1) :

- Le premier motif NLS possède une structure bipartite et est localisé dans le domaine bHLH. Il est réprimé par le domaine PAS-b, ce qui entraîne une rétention cytoplasmique de la protéine.
- Le second motif, de type RKRK et localisé en position carboxy-terminale de HIF-1α, est apparenté au NLS retrouvé dans l'antigène grand-T de SV40. Cette séquence jouerait un rôle clé dans l'import nucléaire de HIF-1α dépendant de l'hypoxie.

De plus, Hsp90 permet également à HIF-1α d'adopter, en normoxie, une conformation spécifique le rendant activable par l'hypoxie.

En hypoxie, Hsp90 se dissocie de HIF-1α conduisant au démasquage du motif NLS carboxy-terminal de HIF-1α et à la translocation de HIF-1α dans le noyau.

En fait, la translocation nucléaire n'est pas suffisante en elle-même pour activer HIF-1. Une étape de transactivation du domaine carboxy-terminal de HIF-1α est également nécessaire pour l'activation de HIF-1. Elle serait réalisée par la phosphorylation via ERK1 (voir ci-dessus).

Pour être complètement actif, HIF-1 interagit physiquement, via sa partie carboxy-terminale, avec les coactivateurs CPB/p300 (Arany *et al.*, 1996; Ebert *et al.*, 1998; Kallio *et al.*, 1998). Ces coactivateurs servent en fait à recruter la machinerie basale de transcription qui va à son tour permettre à l'ADN polymérase de transcrire le gène situé en aval de ce complexe. Ces coactivateurs ont également une activité histone acétyltransférase qui permet le remodelage de la chromatine, nécessaire à la transcription.

Pour clore cette partie, il faut préciser que, même si beaucoup d'éléments semblent être bien compris dans la régulation de HIF-1, il subsiste, à l'heure actuelle, encore certaines inconnues au niveau de la régulation de HIF-1 notamment en ce qui concerne le rôle des kinases et l'identification formelle du senseur à oxygène.

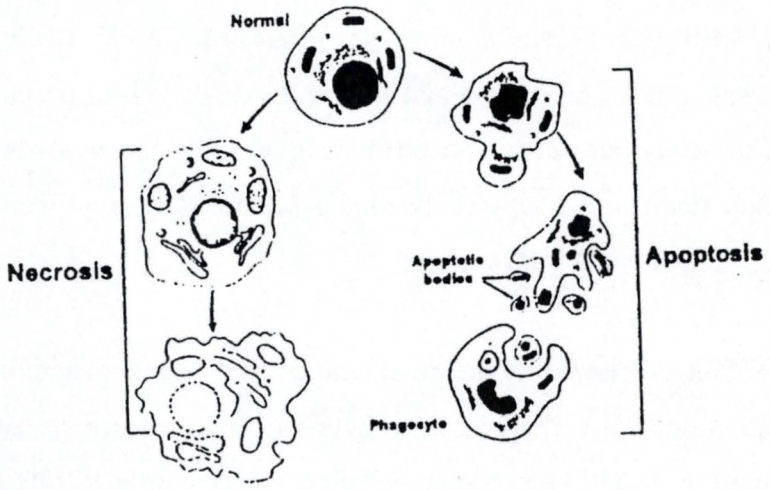


Figure I.8 : Morphologie d'une cellule en nécrose et d'une cellule en apoptose (d'après Saikumar *et al.*, 1999).

I.3 HIF-1 et l'apoptose

I.3.1 L'apoptose ou mort cellulaire programmée

L'apoptose est un processus physiologique essentiel par lequel les organismes pluricellulaires maintiennent l'homéostasie de leurs tissus. Durant le développement, l'apoptose aide à sculpter certaines parties du corps comme lors de la formation de cavités, de la séparation des doigts et participe également au développement du système nerveux. L'apoptose sert également à éliminer des structures embryonnaires devenues inutiles au stade adulte.
Au stade adulte, l'apoptose intervient pour maintenir l'homéostasie du corps. La division cellulaire permet le renouvellement cellulaire alors que l'apoptose est nécessaire pour l'élimination des cellules vieillissantes, la régulation du système immunitaire ainsi qu'à l'élimination des intrus.

La morphologie cellulaire propre à l'apoptose est caractérisée par un rétrécissement des cellules, une condensation du cytoplasme, la formation de protubérances au niveau de la membrane plasmique, une condensation de la chromatine nucléaire en périphérie du noyau et une fragmentation internucléosomique de l'ADN (voir figure I.8).
L'apoptose doit être différenciée d'un autre type de mortalité cellulaire, appelé la nécrose. La nécrose peut être provoquée par des toxines, des stimuli physiques tels que la lyse virale, l'attaque du complément ou encore l'hypothermie. Contrairement aux cellules apoptotiques, les cellules nécrotiques sont incapables de maintenir leur homéostasie et subissent une entrée massive d'eau et d'ions extracellulaires. Ceci conduit au gonflement de la cellule et finalement à l'éclatement de la membrane plasmique (voir figure I.8).

La perte de l'intégrité membranaire lors de la nécrose conduit au relarguage du contenu cytoplasmique dans le milieu extracellulaire, ce qui induit le déclenchement d'une réaction inflammatoire locale. Contrairement aux cellules nécrotiques, les cellules apoptotiques subissent un fractionnement de leur cytoplasme en vésicules conduisant à la formation de corps apoptotiques. Ces petites vésicules englobant des parties de cytoplasme, sont ensuite phagocytées par les cellules environnantes ou par les macrophages évitant ainsi le déclenchement d'une réaction inflammatoire. In vitro, le dernier stade du processus

Necrosis	Apoptosis
Morphological features	
● Loss of membrane integrity	● Membrane blebbing, but no loss of integrity ● Aggregation of chromatin at the nuclear membrane
● Begins with swelling of cytoplasm and mitochondria	● Begins with shrinking of cytoplasm and condensation of nucleus
● Ends with total cell lysis	● Ends with fragmentation of cell into smaller bodies
● No vesicle formation, complete lysis	● Formation of membrane bound vesicles (apoptotic bodies)
● Disintegration (swelling) of organelles	● Mitochondria become leaky due to pore formation involving proteins of the bcl-2 family.
Biochemical features	
● Loss of regulation of ion homeostasis	● Tightly regulated process involving activation and enzymatic steps
● No energy requirement (passive process, also occurs at 4°C)	● Energy (ATP)-dependent (active process, does not occur at 4°C)
● Random digestion of DNA (smear of DNA after agarose gel electrophoresis)	● Non-random mono- and oligonucleosomal length fragmentation of DNA (Ladder pattern after agarose gel electrophoresis)
● Postlytic DNA fragmentation (= late event of death)	● Prelytic DNA fragmentation ● Release of various factors (cytochrome C, AIF) into cytoplasm by mitochondria ● Activation of caspase cascade ● Alterations in membrane asymmetry (i.e., translocation of phosphatidyl-serine from the cytoplasmic to the extracellular side of the membrane)
Physiological significance	
● Affects groups of contiguous cells	● Affects individual cells
● Evoked by non-physiological disturbances (complement attack, lytic viruses, hypothermia, hypoxia, ischemica, metabolic poisons)	● Induced by physiological stimuli (lack of growth factors, changes in hormonal environment)
● Phagocytosis by macrophages	● Phagocytosis by adjacent cells or macrophages
● Significant inflammatory response	● No inflammatory response

Figure I.9 : Tableau récapitulatif reprenant les différentes caractéristiques de la nécrose et de l'apoptose.

apoptotique est appelé aussi nécrose secondaire durant lequel les cellules apoptotiques finissent par perdre leur intégrité membranaire, conduisant à un phénotype proche de celui de la nécrose.

Un tableau comparatif reprenant les principales caractéristiques morphologiques et biochimiques des deux types de mort cellulaire est présenté à la figure I.9.

Suite à certains stress tels que des toxines, des agents physiques, les cellules peuvent mourir par apoptose ou par nécrose. En fait, le type de mort observé, apoptose ou nécrose, dépend souvent de l'intensité et la durée de l'application du stress. De plus, contrairement à l'apoptose, la nécrose ne nécessite pas d'énergie pour son déroulement et les stimuli qui induisent l'apoptose en présence d'énergie mènent à la nécrose en absence d'énergie due à une forte diminution en ATP (Saikumar *et al.*, 1998).

L'apoptose est également appelée mort cellulaire programmée. En effet, par rapport à la nécrose qui est un phénotype passif, l'apoptose est un processus actif dans lequel la cellule joue le rôle principal. En effet, toute cellule possède dans son patrimoine génétique et exprime constitutivement la "mécanique" nécessaire pour entrer en apoptose si le stimulus adéquat est perçu. C'est pourquoi l'apoptose est aussi communément appelée "suicide cellulaire" car elle affecte les cellules individuellement contrairement à la nécrose qui touche un groupe de cellules contiguës. Ainsi, un dérèglement du processus apoptotique peut avoir des conséquences dramatiques et conduire à l'apparition de certaines maladies. Un taux d'apoptose excessif peut entraîner des maladies auto-immunes et neurodégénératives (maladie d'Alzheimer) tandis qu'un taux d'apoptose insuffisant peut être à la base de certains cancers.

I.3.2 Découverte et mécanismes de l'apoptose

I.3.2.1 Découverte de l'apoptose : Caenorabditis elegans

L'apoptose fut d'abord caractérisée suite à des études génétiques chez le nématode *Caenorabditis elegans*. Lors du développement de *C. elegans,* l'activation sélective de gènes entraîne précisément la mort de 131 cellules, laissant intactes les 959 autres cellules qui constituent le nématode à l'âge adulte (Ellis *et al.*, 1986).

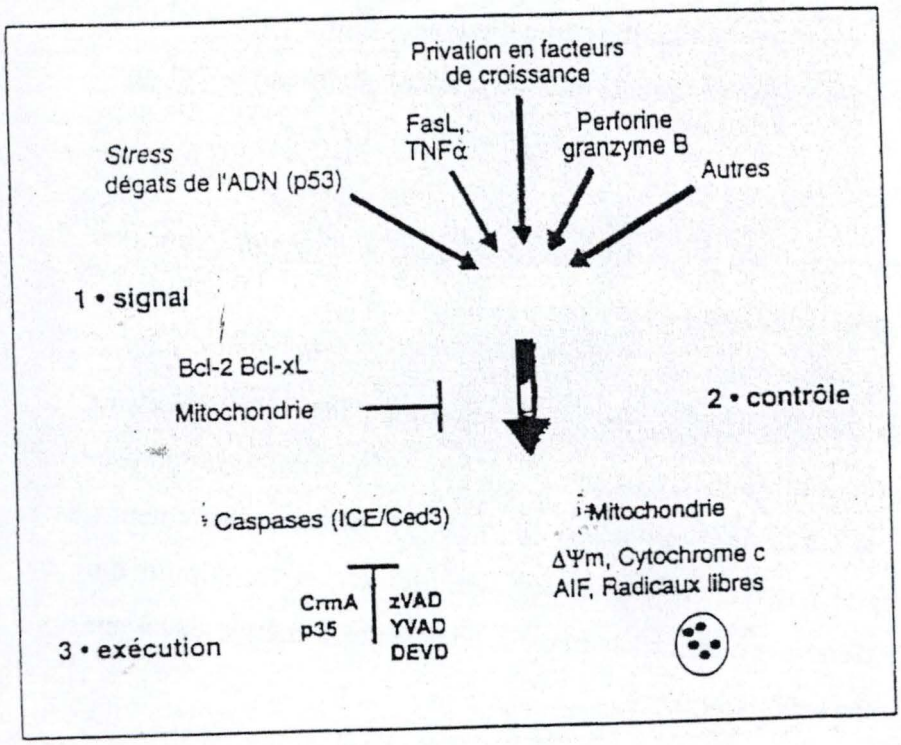


Figure I.10 : Schéma récapitulant les trois phases du processus apoptotique : déclenchement du signal apoptotique, contrôle et exécution

(d'après Mignon *et al.*, 1998).

D'autres études ont révélé que l'apoptose consiste en trois étapes successives (voir figure I.10).

- L'engagement dans la voie apoptotique suite à des signaux extra- ou intracellulaires.
- Le contrôle du processus apoptotique par la mitochondrie.
- L'exécution de l'apoptose par activation de caspases, qui sont des protéases intracellulaires.

Ces étapes et les gènes qui les contrôlent (gènes ced chez *C. elegans*), sont bien conservés au cours de l'évolution (Yuan, 1996).

Chez *C. elegans,* les produits protéiques des gènes ced-3 et ced-4 (CED-3 et CED-4) sont nécessaires pour le déclenchement de l'apoptose (Horvitz *et al.*, 1994). Après avoir reçu un signal pro-apoptotique, CED-4 se lie à la forme inactive de CED-3 et entraîne son activation (Spector *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 1997). CED-3, sous sa forme active, peut alors cliver différents substrats conduisant à la mort cellulaire. CED-9, une protéine membranaire, peut se lier à CED-4 et empêche ainsi l'activation de CED-3 et donc de l'apoptose (Chaudhary *et al.*, 1998; Seshagiri *et al.*, 1997).

Dans les cellules de mammifères, de nombreux régulateurs de l'apoptose ayant un rôle similaire à CED-3, CED-4 et CED-9 ont été découverts.

Néanmoins, la mort cellulaire observée chez les mammifères est de loin plus complexe que chez *C. elegans*. En effet, suite à la réception de signaux extra- ou intracellulaires pro-apoptotiques, il y a transduction de ces signaux par des protéines adaptatrices jusqu'à des protéases à cystéines spécifiques appelées "caspases initiatrices". A ce stade, les cellules sont engagées dans l'apoptose. Il s'ensuit l'activation de "caspases exécutrices" en cascade qui finalement débouche sur le clivage de différents substrats conduisant à la mort cellulaire par apoptose.

Les protéines adaptatrices sont en fait des homologues de CED-4 tandis que les caspases initiatrices et exécutrices sont homologues de CED-3. De plus, il y a, dans les cellules de mammifères, des protéines homologues de CED-9 qui inhibent l'apoptose telles que Bcl-2, Bcl-x_L.

I.3.2.2 Signaux pro-apoptotiques.

A la phase descriptive de la fin des années 1970, établissant les caractéristiques morphologiques de l'apoptose, a fait suite la phase moléculaire au début des années 1990 avec la caractérisation rapide des gènes et des protéines impliqués dans cette mort cellulaire très conservée à travers les espèces (Steller, 1995). De nombreux signaux très différents, physiologiques comme pathologiques, extra- comme intracellulaires ont été identifiés comme pouvant déclencher des processus apoptotiques. Ainsi, la privation en facteurs de croissance, les dommages à l'ADN, le traitement par substances cytotoxiques ou des glucocorticoïdes, la protéine p53, le TNF-α (tumor necrosis factor-α) ou encore des agents de la voie Fas peuvent induire l'apoptose dans de très nombreux types cellulaires (White, 1996).

En dépit de la diversité de ces multiples signaux inducteurs, toutes les cellules engagées dans le processus apoptotique montrent, de façon spectaculaire, des modifications morphologiques et biochimiques similaires, suggérant l'existence d'une phase effectrice commune à tous les types cellulaires : tous ces signaux aboutissent à l'activation irréversible d'un tronc commun constitué par des protéases à cystéines appelées caspases, et orchestré par la mitochondrie. En plus des caspases, les protéines de la famille Bcl-2 interviennent également dans la régulation de l'apoptose. Certains membres de cette famille ont un rôle anti-apoptotique (Bcl-2, Mcl-1, Bcl-x_L) tandis que d'autres ont une activité pro-apoptotique (Bax, Bid). Une étude plus détaillée de la famille Bcl-2 sera présentée ultérieurement.

I.3.2.3 Les caspases

Induits par de nombreux signaux différents, les processus apoptotiques aboutissent, comme mentionné ci-dessus, à l'activation d'un effecteur commun, les caspases. Il s'agit de protéases à cystéine de la famille de *l'interleukin-1 converting enzyme* (ICE) possédant une cystéine dans le site actif.

Les caspases clivent leurs substrats protéiques à des sites contenant un résidu aspartate, engageant ainsi la phase terminale et irréversible de l'apoptose. La découverte de l'homologie entre CED-3 de *C. elegans* et ICE chez les mammifères a fourni l'évidence que des mécanismes de mort cellulaire pouvaient être similaires chez divers organismes (Miura *et*

Table 1.

Name of Caspase	Other Names	Size of Prodomain	Function	Molecular Weight (kD)
Caspase-1	ICE	Long	Inflammation, cytokine maturation	45
Caspase-2	ICH-1, Nedd-2	Long	Effector (initiator?)	51
Caspase-3	Cpp-32, Yama, apopain	Short	Effector	32
Caspase-4	TX, ICH-2, ICErel-II	Long	Effector, cytokine maturation	43
Caspase-5	TY, ICErel-III	Long	Effector	48
Caspase-6	Mch2	Short	Effector	34
Caspase-7	Mch3, ICE-LAP3, CMH-1	Short	Effector	35
Caspase-8	FLICE, Mach, Mch5	Long	Initiator	55
Caspase-9	ICE-LAP6, Mch6	Long	Initiator	46
Caspase-10	Mch4	Long	Initiator	55
Caspase-11	mICH-3, mCASP-11	Long	Inflammation, effector	43
Caspase-12	mICH-4, mCASP-12	Long	Effector	50
Caspase-13	ERICE	Long	Effector	43
Caspase-14	MICE	Short	Effector	30

Figure I.11 : Tableau reprenant les différentes caspases présentes chez les mammifères ainsi que leur rôle respectif dans le processus apoptotique

(d'après Saikumar *et al.*, 1999).

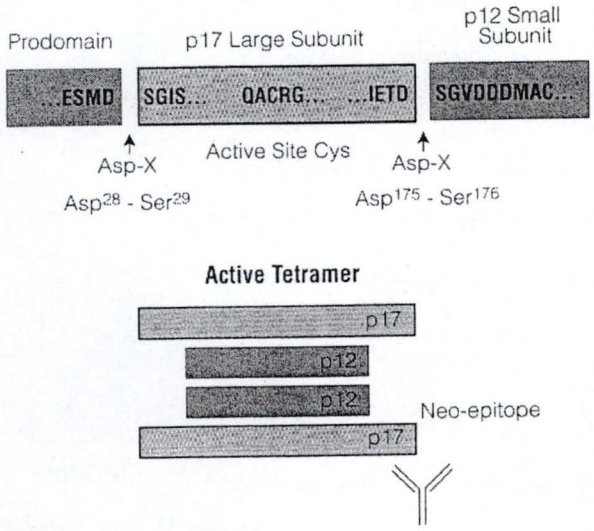


Figure I.12 : Représentation schématique de la procaspase 3 ainsi que sa forme active tétramérique, la caspase 3.

al., 1993). Depuis lors, plus de 13 protéases à cystéine homologues à CED-3 ont été découvertes (voir figure I.11).
Les caspases présentent toutes une certaine homologie et sont généralement synthétisées comme précurseurs inactifs possédant 4 domaines distincts. L'activation des caspases implique le clivage protéolytique entre les domaines, ce qui entraîne le rejet d'un prodomaine et de la région intermédiaire entre les deux domaines. Les domaines protéiques restant se réorganisent et s'assemblent pour former un complexe tétramérique actif composé de deux grandes et de deux petites sous-unités (voir figure I.12).

Basées sur la spécificité de substrat, les caspases ont été classées en trois catégories (Thornberry *et al.*, 1997). Les membres du groupe I ont une préférence pour un substrat présentant une séquence d'acides aminés de type WEDH (caspase-1, -4, -5). Les membres du groupe II préfèrent, quant à eux, la séquence DEXD, avec une absolue nécessité du résidu aspartate (D) en position 4 (caspase-2, -3, -7) tandis que les membres du groupe III reconnaissent les séquences (I/L/V)EXD (caspase-6, -8, -9). Plusieurs études ont suggéré que les caspases du groupe I sont impliquées dans l'inflammation tandis que les caspases des groupes II et III auraient un rôle dans l'exécution et la transduction du signal lors de l'apoptose.

Les caspases ont été aussi classées comme initiatrices ou effectrices. Les caspases initiatrices sont à la base de la cascade, s'auto-activent et ont comme substrat les caspases effectrices. Les caspases initiatrices, de même que certaines caspases effectrices, possèdent de longs prodomaines contenant des motifs (death effector domain, DED ou caspase recruitment domain, CARD) qui associent ces enzymes à leurs adaptateurs-activateurs spécifiques (Hofmann *et al.*, 1997; Hofmann *et al.*, 1995). Chez les mammifères, les caspases 1, 2, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 13 ont des prodomaines DED ou CARD, contrairement aux caspases 3, 6, 7 et 14 qui ont de courts prodomaines et sont les caspases effectrices.
Le rôle important des caspases initiatrices dans la cascade protéolytique est soutenu par le fait qu'elles peuvent s'autoactiver ainsi qu'activer les caspases effectrices.
En d'autres mots, les sites de clivage reconnus par les caspases initiatrices sont présents à la fois dans leurs propres séquences et dans celles des caspases effectrices.

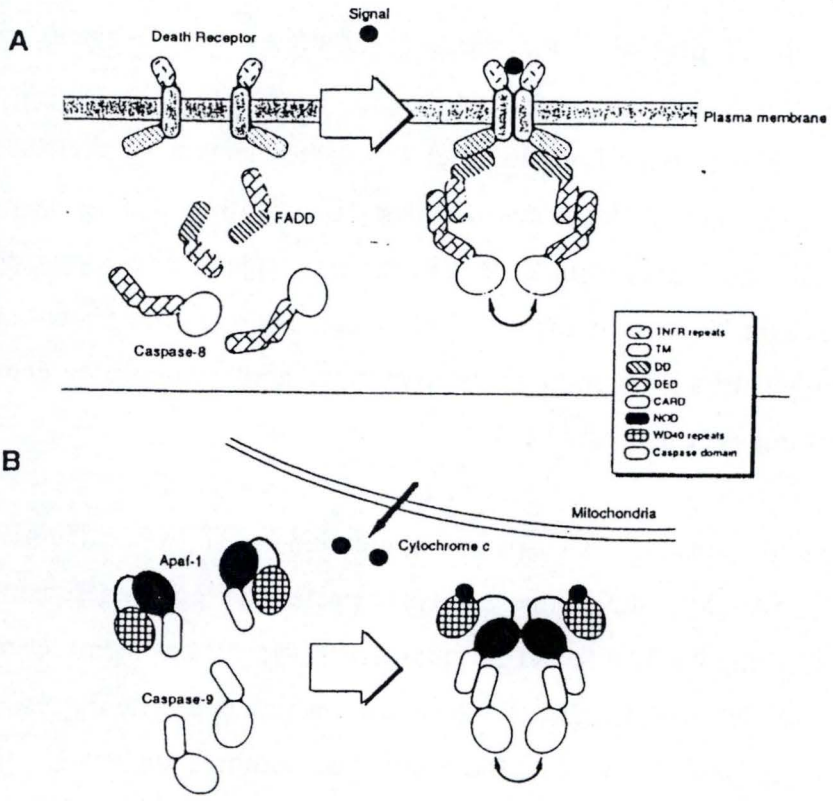


Figure I.13 : Modèle pour l'activation des caspases initiatrices

(A) La liaison de signaux entraînant la mort, tels que Fas ligand ou TNF-α, à leur récepteur respectif induit le recrutement d'adaptateurs tels que FADD et de la procaspase-8 pour former un complexe (DISC) qui mène à l'auto-activation de la caspase 8 par auto clivage.

(B) Suite à la réception de signaux extra- ou intracellulaires, il y a libération de cytochrome c de la mitochondrie vers le cytosol. Le cytochrome c s'y lie à Apaf-1 en présence d'ATP. L'ensemble se lie alors à la procaspase-9 et forme un complexe (apoptosome) entraînant l'activation de la caspase-9 par auto-clivage.

(d'après Nuñez, 1998).

A ce stade, il est important de noter qu'une fois la cascade initiée, le processus de mort cellulaire devient irréversible. La cascade de caspases joue un rôle important en clivant plusieurs substrats comprenant des protéines cytosoliques et nucléaires qui ont un rôle dans la réplication et la réparation de l'ADN, la division cellulaire et la structure du cytosquelette.

I.3.2.4 Les différents substrats des caspases

Dans les cellules subissant l'apoptose, les caspases ciblent deux groupes importants de substrats : *Les protéines de régulation

*Les protéines de structures

Le clivage des protéines de régulation renforce l'activation de l'apoptose tandis que celui des protéines de structure entraîne la désintégration cellulaire.

Le premier groupe comprend plusieurs kinases, telles que la MEK kinase 1. Le clivage réalisé par les caspases activent ces kinases qui contrôlent positivement la voie apototique. L'hydrolyse protéique médiée par les caspases peut également entraîner l'inactivation de régulateurs négatifs de l'apoptose, tels que des inhibiteurs de caspases (IAPs), des membres de la famille Bcl-2 ainsi que l'inhibiteur de la DNAse activée par les caspases (ICAD : inhibitor caspase activated DNAse).

Le deuxième groupe de substrats, impliqué dans le maintien de la structure cellulaire, comprend des lamines nucléaires, l'actine mais également des facteurs de transcription et des protéines impliquées dans la synthèse et la réparation de l'ADN telles que la poly-ADP ribose polymerase (PARP) (Sanghavi *et al.*, 1998).

I.3.2.5 Les protéines adaptatrices

1) Les protéines qui affectent l'activation de la caspase 8

Les récepteurs membranaires TNFR/Fas recrutent, après fixation de leur propre ligand, des protéines adaptatrices, respectivement FADD et TRADD qui s'associent avec la procaspase 8. L'ensemble forme un complexe appelé "DISC" au sein duquel il y a transactivation des procaspases (Muzio *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1998a). Ces caspases, une fois actives, peuvent cliver et ainsi activer d'autres caspases, telles que la caspase 3 (voir figures I.13.A). La caspase 8 active est à la base de l'activation de la cascade de caspases. De plus, la caspase 8

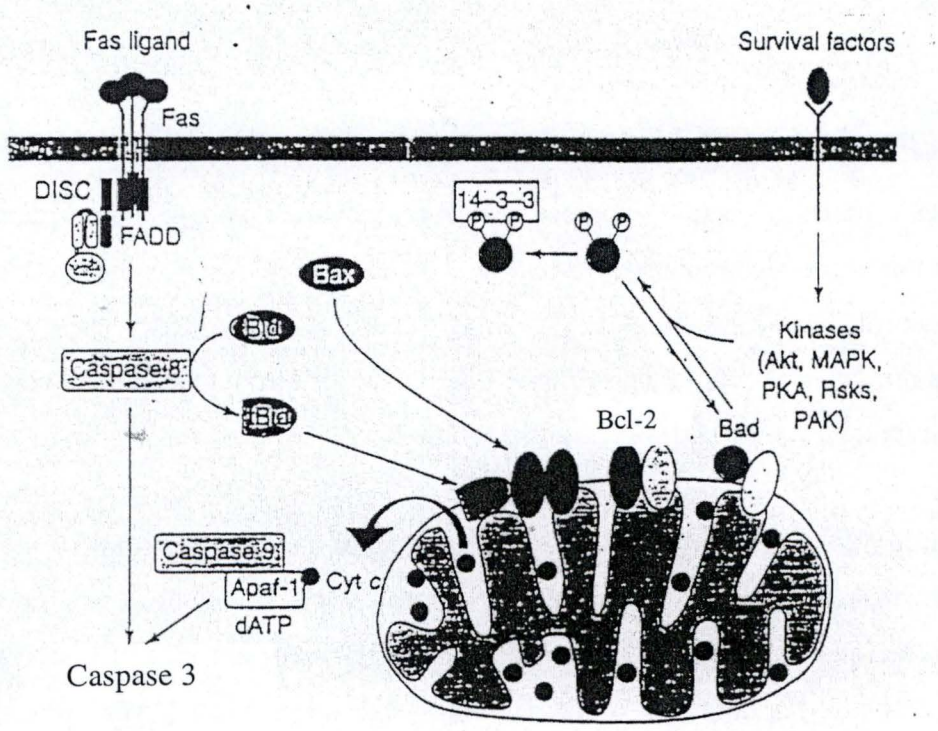


Figure I.14 : Schéma reprenant les deux voies principales d'activation des caspases (d'après Desagher, 2000).

permet à Bid, membre pro-apoptotique de la famille Bcl-2, de migrer, suite à son clivage, vers la membrane mitochondriale externe et de s'associer avec Bcl-2. Cela entraîne d'une part la libération du complexe Apaf-1/procaspase 9 et d'autre part la libération dans le cytoplasme du cytochrome c, ces deux évènements provoquant l'activation de la caspase 9 (voir figure I.14).

2) Les protéines qui affectent l'activation de la caspase 9

En condition de vie normale, le cytochrome c est séquestré dans l'espace intermembranaire mitochondriale. Différents stress apoptotiques (toxines, drogues, dégâts à l'ADN) peuvent entraîner la libération mitochondriale de cytochrome c dans le cytoplasme. Une fois libéré dans le cytosol, le cytochrome c s'associe à Apaf-1 et à la procaspase 9 formant ainsi un complexe appelé "apoptosome". Apaf-1 et la procaspase 9 sont séquestrés par Bcl-x_L ou Bcl-2 à la surface de la mitochondrie en condition de survie et sont libérés en conditions pro-apoptotiques. Cette caspase est une caspase initiatrice de l'apoptose : à son tour la caspase 9 peut activer la caspase 3. Cette dernière, une fois activée, clive une série de substrats conduisant finalement à la mort cellulaire par apoptose (voir figure I.13.B).

Apaf-1 contient dans sa séquence, un motif WD répété (WD-40) dans sa partie carboxy-terminale. Des études récentes suggèrent un rôle inhibiteur de ces répétitions puisque le retrait de WD-40 de Apaf-1 active la caspase 9, même en absence de cytochrome c (Srinivasula *et al.*, 1998).

I.3.2.6 La famille Bcl-2

Dans le nématode *C. elegans*, CED-9 régule la mort cellulaire par liaison et inactivation de CED-4 (Yang *et al.*, 1998b). Les homologues de CED-9 chez les mammifères sont les protéines de la famille Bcl-2. Chez *C. elegans*, CED-9 est exclusivement anti-apoptotique, tandis que chez les mammifères, les membres de la famille Bcl-2 peuvent être soit anti-, soit pro-apoptotiques (Reed, 1998).

Les gènes de la famille Bcl-2 comprennent donc à la fois des gènes anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-x_L, Mcl-1) et des gènes pro-apoptotiques (Bax, Bad, Bid). Comme les caspases, les membres de la famille Bcl-2 montrent une certaine homologie entre eux. La comparaison

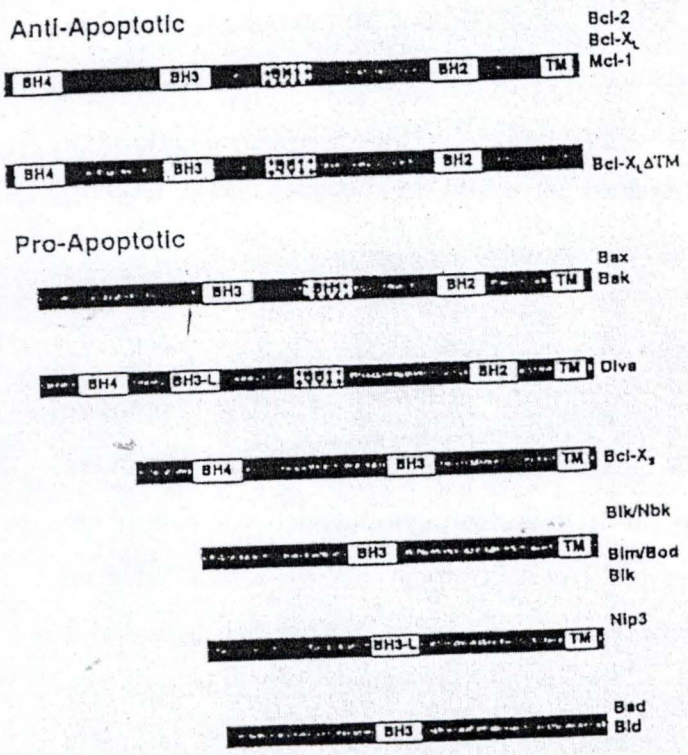


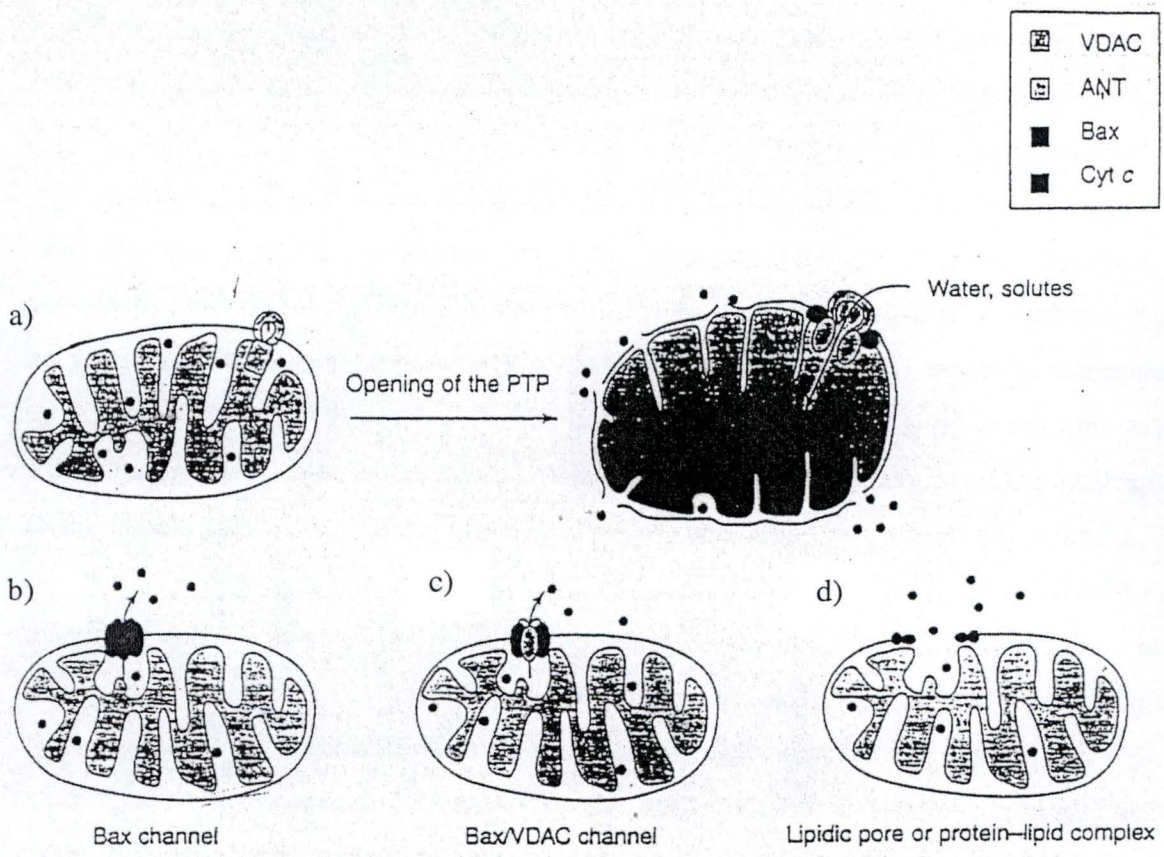
Figure I.15 : Schéma représentant les différents membres anti- et pro-apoptotiques de la famille Bcl-2

(d'après Reed, 1998).

de séquences peptidiques a révélé 4 régions conservées dans les molécules et appelées les domaines BH (Bcl-2 homology) : BH1, BH2, BH3 et BH4 (voir figure I.15).

Parmi les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, on retrouve notamment la protéine Bcl-2, localisée dans la membrane mitochondriale externe et dont le rôle est d'y retenir des protéines "pro-apoptotiques".

En ce qui concerne les membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2, le domaine BH3 semble être critique à la fois pour la dimérisation avec d'autres protéines ainsi que pour l'induction de l'apoptose (Kelekar *et al.*, 1998). Ainsi, ils peuvent agir en dimérisant avec les membres anti-apoptotiques, ce qui a pour effet de rendre ces derniers inactifs. Un deuxième mode d'action des membres pro-apoptotiques consiste à migrer du cytosol vers la membrane mitochondriale externe, comme le fait Bax, suite à la réception de signaux apoptotiques. Là, Il pourrait former un pore permettant la libération du cytochrome c dans le cytosol.
Il existe en réalité plusieurs hypothèses qui tentent d'expliquer le rôle joué par Bax au niveau de la mitochondrie dans la libération de cytochrome c.
La première hypothèse propose que Bax pourrait s'associer au Permeability Transition Pore (PTP) qui régule le potentiel de membrane mitochondriale et induire son ouverture permettant l'entrée massive d'eau dans la mitochondrie conduisant finalement à son éclatement et au relarguage du cytochrome c dans le cytoplasme (voir figure I.16.a). Le PTP serait constitué de l'apposition de VDAC situé dans la membrane mitochondriale externe et de l'adénine nucléotide translocase (ANT) présente dans la membrane mitochondriale interne.
Une deuxième hypothèse prévoit que Bax peut s'oligomériser sous certaines conditions et former ainsi des canaux permettant la libération du cytochrome c. L'oligomérisation, un processus uniquement décrit pour Bax, peut représenter le mécanisme par lequel les protéines pro-apoptotiques forment des mégapores (voir figure I.16.b).
Une autre hypothèse proposée est que Bax puisse coopérer avec VDAC pour former un large pore transportant le cytochrome c (voir figure I.16.c). Quand VDAC est reconstitué dans les liposomes, Bax déclenche l'ouverture de ce pore.
Enfin, une quatrième et dernière hypothèse a été émise. Celle-ci suggère que Bax peut diminuer la stabilité de la double couche phospholipidique et promouvoir ainsi la formation d'un pore lipidique ou d'un complexe protéine-lipide suffisamment grand pour permettre aux protéines intermembranaires de diffuser dans le cytosol (voir figure I.16.d).



<u>Figure I.16</u> : Quatre modèles expliquant le rôle joué par Bax dans la libération du cytochrome c par la mitochondrie durant l'apoptose

(a) Ouverture du PTP (Permeability Transition Pore) entraînant l'augmentation de la perméabilité membranaire et la désintégration membranaire.

(b) Formation d'un canal dans la membrane mitochondriale externe par Bax sans endommager la mitochondrie.

(c) Formation d'un canal via une association Bax/VDAC.

(d) Formation d'un pore lipidique.

(d'après Desagher, 2000).

Des recherches supplémentaires restent donc nécessaires afin d'identifier de manière plus précise le mécanisme par lequel le cytochrome c est libéré en conditions pro-apoptotiques.
Il est important de noter que ni la translocation de ces protéines du cytosol vers la mitochondrie ni la formation de pores et la libération du cytochrome c ne nécessitent l'activité des caspases (Finucane *et al.*, 1999; Saikumar *et al.*, 1998).

I.3.2.7 L'apoptose et ses implications pathologiques

Dans un état normal, la prolifération et la mort cellulaire sont en équilibre. Des altérations au niveau de la régulation de l'apoptose peuvent être à l'origine de l'apparition de certaines pathologies (voir figure I.17).

Des déficiences dans l'apoptose peuvent jouer un rôle important dans l'apparition de maladies auto-immunes puisque l'élimination de lymphocytes auto-réactifs dépend de l'apoptose. Les tumeurs malignes sont des accumulations aberrantes de cellules, causées soit par une prolifération excessive des cellules soit par une inhibition du processus apoptotique, ou les deux.

En outre, de nombreuses pathologies liées à l'âge sont caractérisées par une perte par apoptose de cellules post-mitotiques (cardiomyocytes, neurones). Des maladies neurodégénératives telles que les maladies d'Alzheimer, d'Huntington et de Parkinson sont causées par une augmentation importante du taux d'apoptose au niveau des cellules neuronales (Warner, 1997).

La compréhension de la régulation de l'apoptose est un des objectifs majeurs de ces dernières années et qui permettrait à moyen terme de développer une série de thérapies adaptées aux maladies précitées en permettant une régulation correcte de l'apoptose chez ces patients.

Ces dernières années, l'étude des origines du cancer a beaucoup progressé. En effet, les tumeurs malignes sont des accumulations aberrantes de cellules, causées soit par une prolifération excessive des cellules soit par une inhibition du processus apoptotique, ou les deux. Depuis peu, plusieurs recherches ont permis de montrer que le facteur de transcription HIF-1 pourrait favoriser la croissance tumorale par le fait qu'il induit la néoangiogenèse

Tableau I

MALADIES ASSOCIÉES À UN DÉRÈGLEMENT DE PROCESSUS APOPTOTIQUES

Systèmes	Exemples	Apoptose	
		Suractivée	Inhibée
Maladies neuro-dégénératives	Alzheimer	+	
	SLA	+	
	Parkinson	+	
Désordres immunitaires	Maladies auto-immunes		+
	SIDA	+	
	Diabète	+	
	Thyroïdite	+	
Ischémie Reperfusion	Infarctus du myocarde	+	
	AVC	+	
Néoplasies	Lymphomes		+
	Astrocytomes		+
	Hépatomes		+
	Mélanomes		+
	autres		+
Divers	Vieillissement	+	
	Alopécie	+	

SLA : sclérose latérale amyotrophique.
AVC : accident vasculaire cérébral.

Figure I.17 : Tableau représentant les différentes pathologies liées à un dérèglement du processus apoptotique

(d'après Mignon, 1998).

tumorale en augmentant la sécrétion du VEGF mais aussi par son action au niveau de la régulation du processus apoptotique.

I.3.3 Rôle de HIF-1 dans l'apoptose

Lorsqu'une tumeur se développe, certaines régions tumorales (celles du centre par exemple) subissent une diminution de l'apport en O_2, en glucose et autres nutriments suite à la faible vascularisation dans ces régions. L'apoptose induite suite à cette déficience nutritionnelle contre-balance la prolifération cellulaire et limite la progression des tumeurs (Holmgren *et al.*, 1995; O'Reilly *et al.*, 1996; Parangi *et al.*, 1996). L'évolution des cellules tumorales dans cet environnement hypoxique résulte de la sélection de populations qui non seulement résistent à l'apoptose (Graeber *et al.*, 1996) mais aussi qui entraînent la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (Hanahan *et al.*, 1996; Jiang *et al.*, 1997; Zhong *et al.*, 1998).

Dans ces zones hypoxiques, HIF-1 est activé et augmente l'expression du VEGF qui va agir sur les capillaires adjacents pour initier la néovascularisation de ces zones hypoxiques. Ce processus est appelé néoangiogenèse. Il va soutenir la croissance de la tumeur et l'essaimage des cellules tumorales pour former les métastases.

Une des altérations les plus communes dans les cancers humains est la mutation somatique du gène p53, un suppresseur de tumeurs. L'apparition de tels défauts est fortement associée à la progression de tumeurs et de métastases car elle permet à la cellule tumorale d'éviter l'apoptose (Levine, 1997). Le suppresseur de tumeurs humain p53 encode un facteur de transcription multifonctionnel qui permet une réponse cellulaire adaptée suite à divers stimuli, comprenant entre autres les dommages à l'ADN. Au repos, p53 est dégradé par le protéasome via son association avec MDM2. Une phosphorylation dans le domaine de transactivation de p53, par exemple suite à l'activation de kinases sensibles aux dommages à l'ADN, empêche cette dégradation et augmente aussi l'activité transcriptionnelle de p53 (Woods *et al.*, 2001). p53 induit un arrêt de la progression du cycle cellulaire permettant à la cellule de réparer son ADN. Cependant, si tel n'est pas le cas, p53 induira alors la mort de la cellule par apoptose en augmentant l'expression de gènes proapoptotiques tels que Bax.

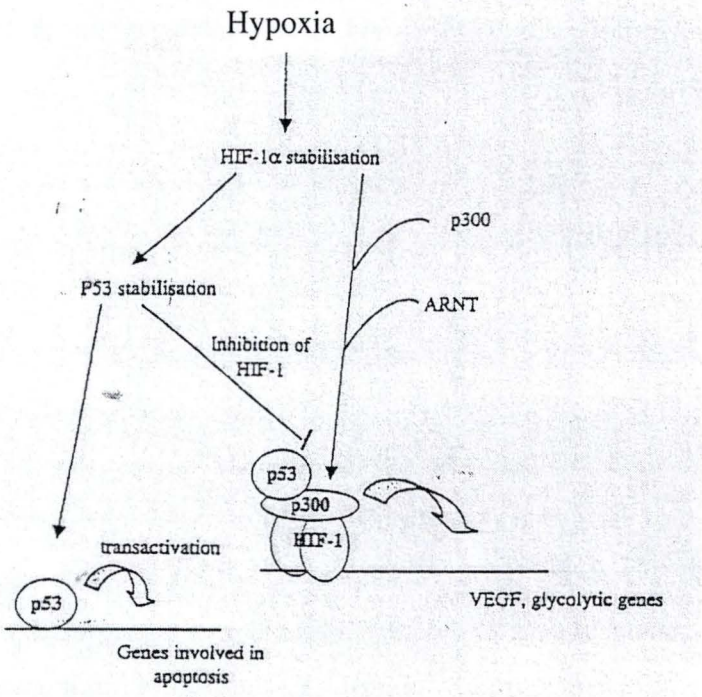


Figure I.18 : Schéma représentant l'effet de l'hypoxie sur la stabilisation et l'activité de p53

(d'après Minet, 2000).

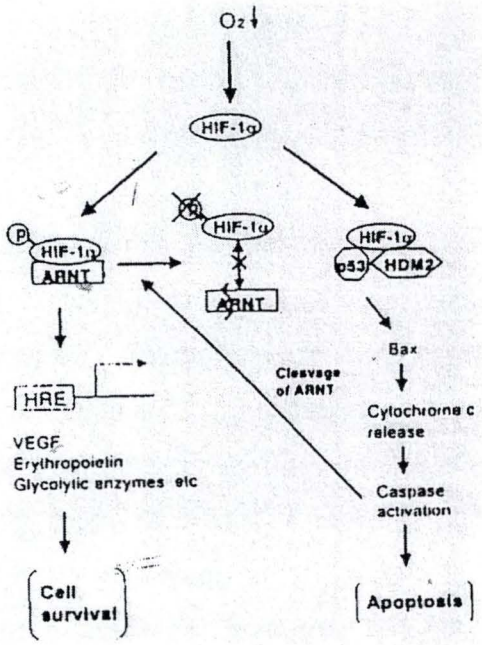


Figure I.19 : Modèle expliquant le rôle pro- ou anti-apoptotique de HIF-1α en fonction de son état de phosphorylation

(d'après Suzuki, 2001).

En 1998, An a décrit que p53 s'accumulait en hypoxie parce qu'il était stabilisé par HIF-1α(An *et al.*, 1998). Ce dernier est en effet retrouvé avec p53 dans des coimmunoprécipités obtenus à partir de cellules MCF7 qui expriment la forme sauvage de p53 et qui ont subi un stress hypoxique. La stabilisation de p53 est liée à l'accumulation de HIF-1α et est dépendante de la présence de cette protéine puisqu'elle n'est pas observée dans des cellules déficientes pour HIF-1α mais elle n'est pas dépendante de l'activité transcriptionnelle de HIF-1 puisqu'elle est observée dans des cellules déficientes pour la sous-unité ARNT. An montre également que la forme transcriptionnellement active de p53 est obtenue après association de p53 avec HIF-1α. Une fois actif, p53 entraîne l'expression de Bax qui peut transloquer vers la mitochondrie où il exerce son activité pro-apoptotique.
Parallèlement à ces observations, Ravi et son équipe ont montré que p53 entraîne l'ubiquitinylation médiée par Mdm2 et la dégradation par le protéasome de la sous-unité HIF-1α du facteur de transcription HIF-1 et donc une inhibition de son activité (Ravi *et al.*, 2000) (voir figure I.18).
Carmeliet et son équipe ont, quant à eux, travaillé sur des cellules ES (Embryonic Stem Cells). Ils ont montré que l'hypoxie réduisait la prolifération cellulaire et augmentait le taux d'apoptose dans les cellules ES sauvages (HIF-1α +/+) mais pas dans les cellules ES mutées pour le gène HIF-1α (HIF-1α -/-) (Carmeliet *et al.*, 1998).
Toutes ces observations suggèrent donc que HIF-1 aurait un rôle pro-apoptotique qui passerait par l'association de HIF-1α avec le suppresseur de tumeurs p53.

Cependant, Akakura (Akakura *et al.*, 2001) a montré que les cellules cancéreuses pancréatiques surexprimant HIF-1α étaient résistantes à l'apoptose induite par l'hypoxie ou la privation de glucose. De plus, la transfection avec HIF-1α de cellules pancréatiques ne l'exprimant pas constitutivement rend ces cellules résistantes à l'apoptose et permet le développement de tumeurs. Ces résultats suggèrent que l'expression augmentée de HIF-1α contribue à la survie et à la prolifération des cellules cancéreuses pancréatiques en hypoxie et que HIF-1 pourrait avoir donc un rôle anti-apoptotique.
Ces différentes observations décrites dans la littérature quant au rôle joué par HIF-1 dans la régulation de l'apoptose sont donc contradictoires.

Récemment, des études menées par Suzuki et son équipe permettraient de proposer un modèle conciliant ces deux fonctions apparemment opposées (Suzuki *et al.*, 2001).

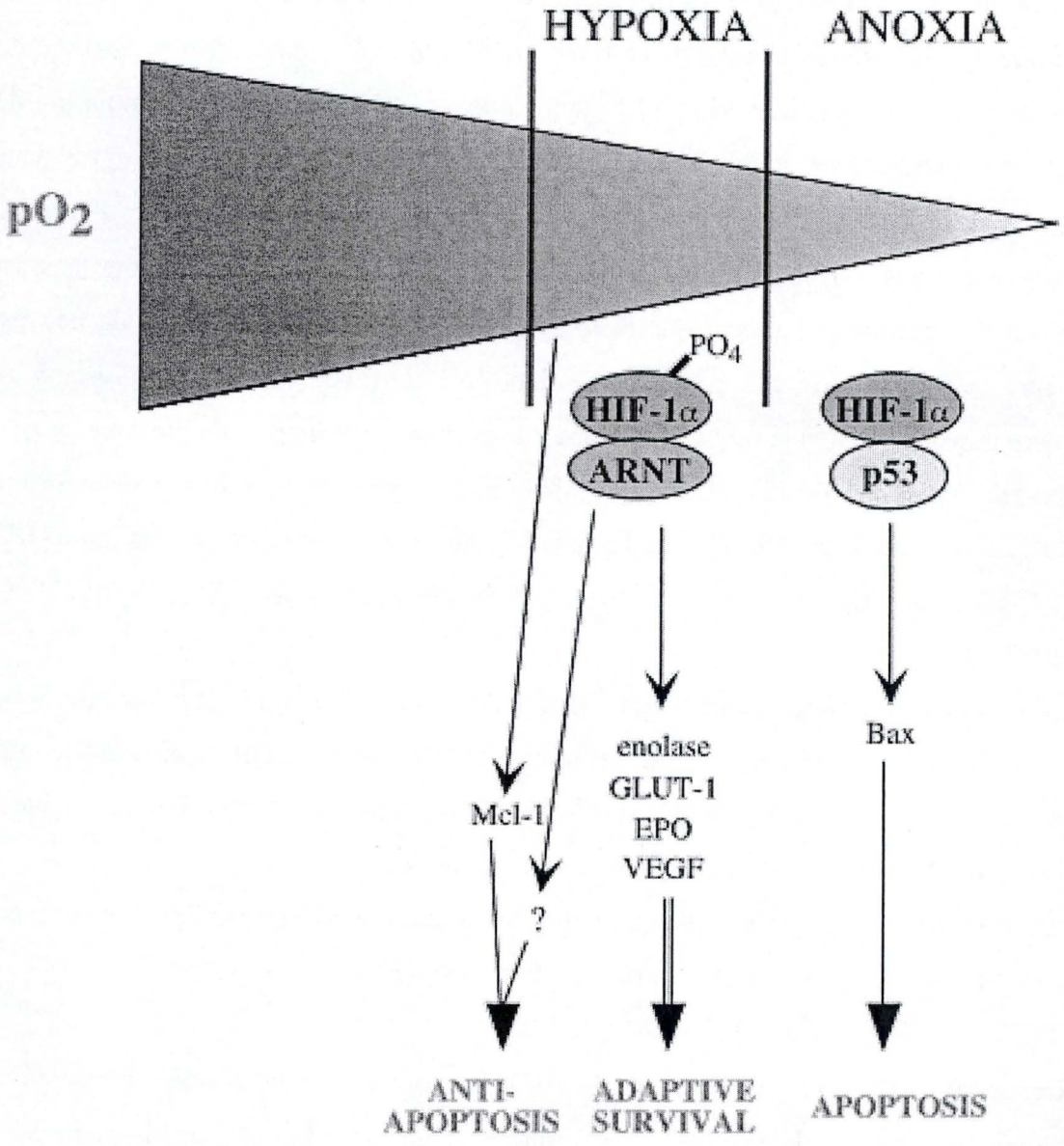


Figure I.20 : Schéma résumant les implications de HIF-1 dans l'apoptose en fonction de l'état de phosphorylation de HIF-1α et du degré de sévérité de l'hypoxie

(d'après Piret *et al.*, 2002).

En condition d'hypoxie légère (1-2% O_2), HIF-1 s'associe avec ARNT formant le facteur de transcription HIF-1 actif. HIF-1 induit la transcription de ces gènes cibles permettant à la cellule de s'adapter au stress hypoxique, mais également de survivre. Il protège également la cellule de l'apoptose mais le mécanisme exact responsable de cette protection reste à être élucidé.

Par contre, en condition d'hypoxie sévère ou prolongée, le mécanisme protecteur de HIF-1 n'est plus suffisant pour permettre à la cellule de s'adapter au manque d'oxygène et il y aurait induction de l'apoptose. Cette apoptose pourrait être induite par la stabilisation de la protéine p53 par HIF-1α (Graeber *et al.*, 1994).

Suzuki et son équipe expliquent ces effets opposés par le fait que la sous-unité HIF-1α existerait sous deux formes, une forme phosphorylée et une autre déphosphorylée (Suzuki *et al.*, 2001). Le rôle de HIF-1 dans l'apoptose dépendrait alors de l'état de phosphorylation de la sous-unité de HIF-1α (voir figure I.19).
En hypoxie "légère" (1% O_2), la sous-unité HIF-1α serait phosphorylée et s'associerait avec la sous-unité ARNT. L'hétérodimérisation stimule la phosphorylation de HIF-1α, conduisant à la forme active de HIF-1 qui va induire la transcription de ces gènes cibles (VEGF, enzymes de la glycolyse...). Cependant, dès que l'hypoxie devient sévère (0,1% O_2) ou prolongée, la forme déphosphorylée de HIF-1α deviendrait plus abondante et mènerait à la stabilisation de p53 qui induirait, via la libération de Bax, la libération de cytochrome c par la mitochondrie et l'activation des caspases. Une fois activées, celles-ci cliveraient la sous-unité ARNT ce qui inhiberait le facteur de transcription HIF-1. De plus, le clivage d'ARNT accélère l'apoptose via une augmentation de la forme déphosphorylée de HIF-1α. HIF-1α déphosphorylé entraîne donc un changement moléculaire activant la voie apoptotique dépendante de p53 en condition d'hypoxie sévère. Le rôle pro- ou anti-apoptotique de HIF-1α dépendrait donc du degré de sévérité de l'hypoxie (voir figure I.20).

I.4 But du mémoire

Comme nous venons de le voir, le facteur de transcription HIF-1 joue un rôle adaptatif dans la réponse des cellules à l'hypoxie. De plus, certaines données de la littérature suggèrent qu'il joue également un rôle dans la modulation de l'apoptose : selon les conditions, il induirait (hypoxie sévère ou prolongée) ou inhiberait (hypoxie légère) l'apoptose. Cependant, le ou les mécanisme(s) par le(s)quel(s) ce facteur de transcription inhibe l'apoptose en condition d'hypoxie légère n'est (sont) pas du tout connu(s).

Le but principal de ce mémoire est donc de mieux caractériser les "effets anti-apoptotiques" de HIF-1. Pour ce faire, nous avons utilisé deux modèles d'apoptose mis au point au laboratoire. Il s'agit de cellules d'hépatome humain de la lignée HepG2 incubées en présence d'un agent oxydant, le ter-butyl hydroperoxyde (t-BHP) et de cellules HepG2 privées de sérum pendant 24 heures.

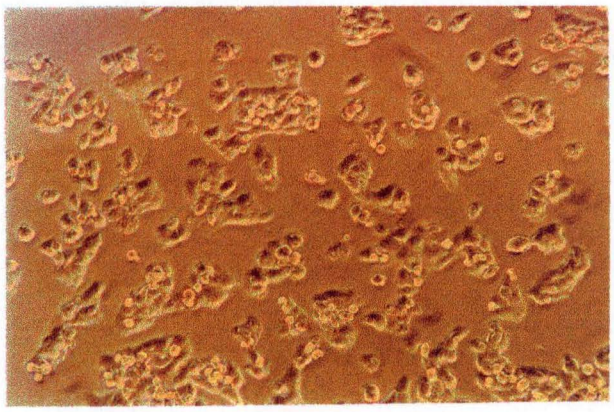
Afin d'étudier les effets de HIF-1 dans ces deux modèles, deux approches ont été envisagées. Premièrement, deux conditions connues pour activer HIF-1 ont été utilisées : l'incubation sous hypoxie et l'incubation en présence de $CoCl_2$ (hypoxie chimique). Nous avons donc étudié l'effet de ces incubations sur l'apoptose induite dans ces deux modèles en suivant différents paramètres caractéristiques de l'apoptose : la fragmentation de l'ADN et l'activation des caspases. Dans un second temps, des cellules d'hépatome de souris Hepa sauvage et mutée pour la sous-unité ARNT du facteur HIF-1 ont été utilisées. Un comportement différent de ces deux lignées vis-à-vis de la modulation de l'apoptose pour les conditions qui activent HIF-1 indiquera alors que HIF-1 est bien un acteur central dans cet effet.

La dernière partie du travail a été consacrée à étudier deux gènes connus dans la littérature pour avoir un rôle anti-apoptotique (Mcl-1 et Bcl-2) dans le but de voir si leur expression pourrait être induite par les conditions qui activeraient HIF-1 (hypoxie et présence de $CoCl_2$). Ces études ont été réalisées dans les cellules HepG2 et dans les cellules Hepa

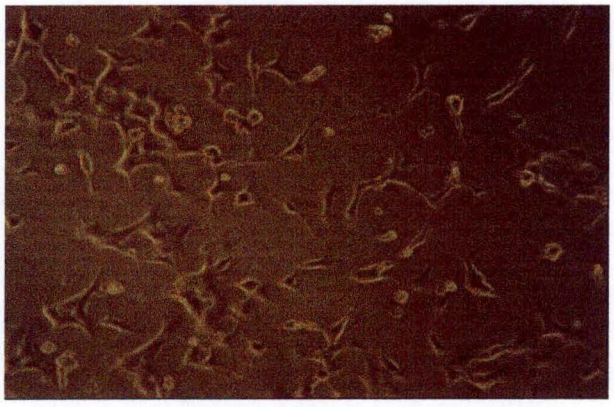
sauvages et déficientes pour ARNT. Si l'expression de ces gènes est sous la dépendance de HIF-1, ce pourrait être un des moyens par lequel HIF-1 exerce son effet anti-apoptotique. L'ensemble des résultats obtenus au cours de ce travail devrait nous permettre d'obtenir une vision plus détaillée du rôle du facteur de transcription HIF-1 dans la modulation de l'apoptose.

Matériel et Méthodes

HepG2



Hepa C1



Hepa C4 ARNT -/-

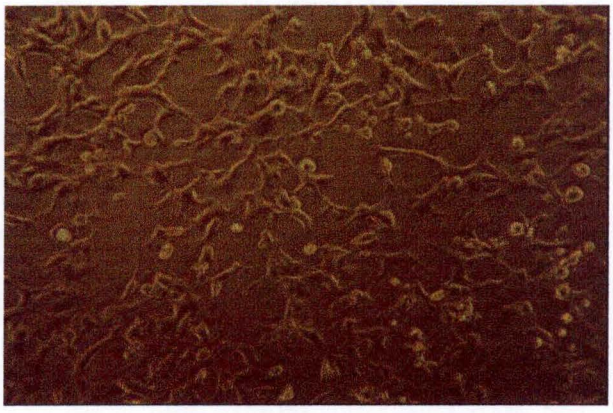


Figure II.1 : Morpholgie des différents types cellulaires utilisés au cours de ce mémoire.

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

II.1 Culture cellulaire

II.1.1 Caractéristiques des types cellulaires étudiés

- HepG2 : lignée cellulaire provenant d'un hépatome humain.
- Hepa : lignée cellulaire provenant d'un hépatome de souris.

Deux souches différentes sont utilisées :

*Hepa C1 : cette souche est dite sauvage ("wild type").

*Hepa C4 : cette souche est déficiente pour la sous-unité ARNT de HIF-1.

La morphologie de chacun des types cellulaires est représentée à la figure II.1.

II.1.2 Milieux de culture et solutions

- Milieu DMEM + sérum : milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) enrichi par 10% de sérum de veau fœtal (Gibco, Paisley, Grande-Bretagne).

Antibiotiques ajoutés au milieu DMEM

Pénicilline : 50 unités/ml (Bio whittaker Europe, Verviers, Belgique)

Streptomycine : 50 µg/ml (Bio whittaker Europe, Verviers, Belgique)

- Milieu de rinçage : PBS (Phosphate buffer saline).
- Trypsine-EDTA (Gibco, Paisley, Grande-Bretagne).

II.1.3 Repiquage des cellules

Les HepG2 et Hepa C1 et C4 ARNT -/- sont cultivées dans des boîtes de culture de 75 cm^2 (T75, Costar, Corning, New York, USA) et sont repiquées environ deux fois par semaine en deux ou trois, en fonction de leur état de confluence, selon le protocole suivant.

Le milieu de culture est décanté et les cellules sont rincées avec 10 ml de milieu de rinçage. Ce dernier est également décanté. Ensuite, les cellules sont détachées au moyen de 1,5 ml de trypsine-EDTA (chélateur de cations) que l'on laisse agir quelques minutes jusqu'au détachement des cellules.

Lorsque les cellules se détachent, la réaction est arrêtée au moyen de 4,5 ml de DMEM + 10% sérum. Ensuite, la suspension cellulaire est transvasée dans un tube de 10 ml (Sterilin, Festham, Grande-Bretagne) et centrifugée pendant 4 minutes à 1000 rpm (Centrifugeuse Universal Hettich, Allemagne).

Le surnageant est décanté et le culot de cellules est suspendu dans 2 ou 3 ml de DMEM + 10% sérum pour un repiquage respectivement en 2 ou 3. Les cellules sont ensuite réparties équitablement dans les boîtes de culture et du milieu complet est ajouté à raison de 15 ml final par boîte de 75 cm^2. Les boîtes sont alors placées dans une étuve à 37°C (95% d'air humide et 5% CO_2). Lorsque les cellules sont suffisamment confluentes, elles sont repiquées selon le même procédé.
Pour les expériences, les cellules sont ensemencées à raison de 50.000 cellules par puits de boîtes à 24 puits pour les HepG2 et 20.000 cellules par puits pour les cellules Hepa. Ces puits contiennent alors 1 ml de milieu DMEM + 10% sérum.

II.2 Incubations

a) Matériel

- Milieu CO_2 indépendant : le milieu employé lors des incubations est du milieu CO_2 indépendant (Gibco, Paisley, Grande-Bretagne). Ce milieu ne contient pas de carbonate et donc son pH ne dépend pas de la présence de CO_2 dans l'atmosphère.

  Antibiotiques et produits ajoutés au milieu CO_2 indépendant

  Pénicilline : 50 unités/ml

  Streptomycine : 50 µg/ml

  L-Glutamine (SIGMA, S^t Louis, USA) : 36,1 mg/500 ml
- Chlorure de cobalt ($CoCl_2$) (SIGMA, S^t Louis, USA).
- ter-butyl hydroperoxyde (t-BHP) (Merck, Darmstadt, Allemagne).

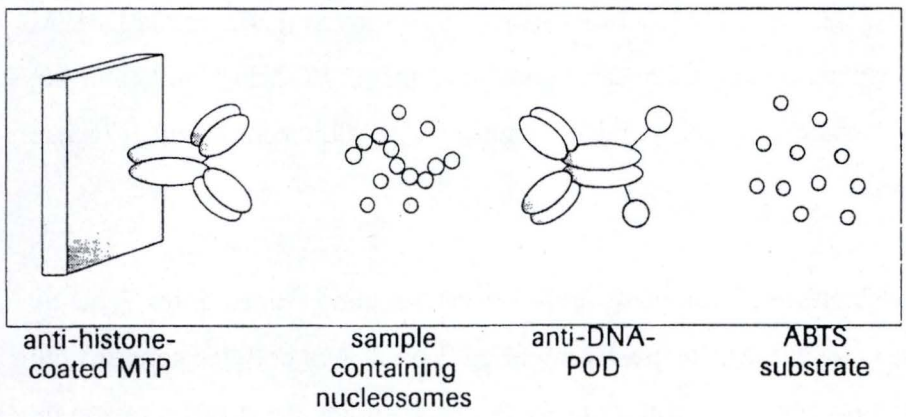


Figure II.2 : Principe du test ELISA pour mesurer de la fragmentation de l'ADN.

b) Méthode

Préalablement aux différentes incubations, les cellules sont incubées 24 heures dans du DMEM avec ou sans sérum selon les conditions testées. Ensuite, le milieu des cellules est décanté et les cellules sont recouvertes de milieu CO_2 indépendant avec ou sans sérum selon les conditions. La quantité de milieu CO_2 indépendant utilisée est de 2 ml/puits pour les plaques 24 puits et de 10 ml pour les boîtes de culture de 25 cm^2 (T25, Costar, Corning, New York, USA). Pour les incubations en conditions d'hypoxie, les boîtes sont ouvertes stérilement et placées dans un incubateur où règne une atmosphère composée de 99% en azote et 1% en O_2 et incubées à 37°C. Des boîtes contrôles sont incubées dans les mêmes conditions mais dans une atmosphère normale ou normoxie.

Le chlorure de cobalt est également connu pour induire l'activation de HIF-1α. L'ajout de $CoCl_2$ dans le milieu CO_2 indépendant correspond donc à une hypoxie "chimique". La concentration utilisée en $CoCl_2$ est de 150 µM.

L'apoptose des cellules est induite par le t-BHP, molécule induisant la production d'espèces réactives dérivées de l'oxygène. La concentration utilisée en t-BHP lors des incubations est de 5.10^{-5} M pour les HepG2 et de 5.10^{-4} M pour les Hepa C1 et C4 ARNT -/-.

II.3 Mesure de la fragmentation de l'ADN

La fragmentation de l'ADN entre les nucléosomes est une des dernières étapes du processus apoptotique. Elle génère des fragments de 180 pb ou multiples de 180 pb.

On peut détecter la présence de ces fragments soit directement par migration sur gel d'agarose soit à l'aide d'un ELISA qui mesure la quantité de nucléosomes solubles grâce à des anticorps anti-histones (voir figure II.2).

La culture de cellules ainsi que les incubations se réalisent dans des plaques 24 puits à raison de 50.000 cellules par puits pour les HepG2 et de 20.000 cellules par puits pour les Hepa C1 et C4.

II.3.1 Préparation des extraits cellulaires

a) Matériel

- Kit "Cell death detection" (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Allemagne).

b) Méthode

- Après les incubations, le milieu de chaque puits est récupéré et centrifugé à 1000 rpm (Heraus instruments Labofuge 400R) pendant 5 minutes.
- Mettre la plaque 24 puits contenant les cellules sur glace.
- Le surnageant est décanté et le culot est resuspendu avec 250 µl de "incubation buffer" (tampon de lyse) afin de récupérer les éventuels corps apoptotiques.
- Pipeter ces 250 µl et les réinjecter dans le puits correspondant de la plaque 24 puits afin détacher les cellules qui y sont attachées.
- Laisser incuber 30 minutes à température ambiante.
- Après 30 minutes d'incubation, décanter chacun des puits en veillant bien à récupérer les cellules, puis transférer l'échantillon dans un eppendorf.
- Centrifuger tous les eppendorfs à 13000 rpm (Heraus instruments Biofuge Pico) pendant 7 minutes.
- Récupérer 100 µl de surnageant de chaque eppendorf que l'on place dans une nouvelle série d'eppendorfs. Ces derniers peuvent être conservés à –20°C.

II.3.2 Test ELISA

a) Matériel

- Kit "Cell death detection" (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Allemagne).

b) Méthode

- Coater la plaque 96 puits avec l'anticorps primaire anti-histone :
    *Dilution 10 x du "coating buffer" et de l'anticorps primaire
    *Injecter 100 µl par puits d'anticorps primaire dilué 10 x.
    *Laisser incuber 16 heures (O/N) à 4°C ou 1 heure à température ambiante.
- Après incubation, vider la plaque 96 puits.

- Ajouter 200 µl/puits de "incubation buffer".
- Laisser incuber 30 minutes à température ambiante.
- Diluer 10 x les extraits cellulaires (voir ci-dessus) avec de l'incubation buffer.
- Après les 30 minutes d'incubation de la plaque 96 puits, vider la plaque et la rincer 3 x avec 250 µl/puits de la solution de rinçage ("washing buffer").
- Après le 3^{e} lavage, vider la plaque 96 puits et ajouter 100 µl/puits d'échantillons dilués 10 x.
- Laisser incuber 1h 30 à température ambiante.
- Préparation de l'anticorps secondaire anti-ADN couplé à la peroxydase :
  *Diluer 10 x l'anticorps secondaire avec de l'incubation buffer
- Après 1h 30 d'incubation, rincer 3 x la plaque 96 puits avec 250 µl/puits de la solution de rinçage (washing buffer).
- Après le 3^{e} lavage, vider la plaque 96 puits et ajouter 100 µl/puits d'anticorps secondaire dilué 10 x.
- Laisser incuber 1h 30 à température ambiante.
- Préparation du substrat de la peroxydase qui est couplé à l'anticorps secondaire :
  *Dissoudre une pastille dans 5 ml de "substrate buffer".
  *Conserver la préparation à l'abri de la lumière dans une fiole de verre brun.
- Après 1h 30 d'incubation, rincer 3 x la plaque 96 puits avec 250 µl/puits de la solution de rinçage (washing buffer).
- Après le 3^{e} lavage, vider la plaque 96 puits et ajouter 100 µl/puits du substrat de la peroxydase.
- Couvrir de papier aluminium la plaque 96 puits et l'agiter pendant 2, 5 et éventuellement 8 minutes.
- Après 2, 5 et 8 minutes, lire l'absorbance à 405 nm grâce à un spectrophotomètre (Ultramark, Bio-Rad).

II.4 Mesure de l'activité des caspases

Les caspases sont les protéases "exécutrices" de l'apoptose. Ainsi, on observe une augmentation de leur activité au début du processus, ce qui permet de détecter la phase d'initiation de la mort cellulaire.

La mesure de l'activité des caspases se réalise via un test fluorimétrique, grâce à un inhibiteur de caspases marqué avec un fluorochrome (FAM- VAD-FMK) qui vient se fixer dans le site actif des caspases. Ainsi, s'il y a beaucoup de caspases actives, une quantité importante d'inhibiteur pourra se fixer et la fluorescence sera élevée. Inversement, moins il y a de caspases actives, plus la fluorescence sera faible.

La culture de cellules ainsi que les incubations se réalisent dans des plaques 24 puits à raison de 200.000 cellules par puits.

a) Matériel et solutions

- Kit activité caspase (Immunosource, Halle Zoersel, Belgique).
- Diméthyl sulfoxyde (DMSO) (Merck, Darmstadt, Allemagne).
- Solution de rinçage : PBS (Phosphate Buffer Saline).

b) Méthode

- Après les incubations, remplacer stérilement le milieu de chacun des puits par 300 µl/puits de milieu CO_2 indépendant sans sérum frais.
- Resuspendre l'inhibiteur (FAM-VAD-FMK), qui est sous forme de poudre, dans 50 µl de DMSO et à l'abri de la lumière. Cela permet de réaliser une solution de l'inhibiteur concentré 150 x.
- Diluer 5 x l'inhibiteur avec du PBS. L'inhibiteur est ainsi concentré 30 x.
- Ajouter dans chacun des puits contenant déjà 300 µl de CO_2 indépendant sans sérum, 10 µl d'inhibiteur concentré 30 x.
- Couvrir les plaques 24 puits avec du papier aluminium.
- Mettre les plaques 24 puits en chambre chaude pendant 1 heure.
- Préparer le "washing buffer" :
    *Faire chauffer la solution stock concentrée 10 x à 37°C.
    *Diluer 10 x la solution stock dans de l'eau distillée.
- Après 1 heure, laver chacun des puits de la plaque 24 puits.

*Ajouter 2 ml/puits de washing buffer sans décanter préalablement.

*Décanter tous les puits.

*Laver chacun des puits avec deux fois 1 ml de washing buffer.

*Décanter.

- Ajouter 100 µl/puits de PBS.
- Couvrir la plaque 24 puits dans du papier aluminium.
- Placer la plaque 24 puits sur glace pour arrêter le métabolisme cellulaire.
- Lecture de la fluorescence au fluorimètre (BMG Lab Technologies GmbH, Offenburg, Allemagne). La longueur d'excitation est de 485 nm et la longueur d'émission est de 520 nm.

II.5 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 extraits cellulaires par électrophorèse.
- Transfert des protéines sur un support solide, en l'occurrence une membrane de polyvinylidine diofluorure (PVDF).
- Détection de la protéine recherchée par un anticorps spécifique.
- Révélation par chémoluminescence.

II.5.1 Préparation des extraits cellulaires totaux

Les extraits cellulaires totaux sont préparés à partir de cellules cultivées dans des boîtes de 25 cm^2 à raison de 665.000 cellules par T25 pour les HepG2 et de 266.000 cellules pour les Hepa C1 et C4.

a) Matériel et solutions

- PBS (Phosphate Buffer Saline)
- Tampon de lyse :
    - Tris 40 mM pH 7.5 (Merck, Darmstadt, Allemagne)
    - KCl 150 mM (Merck, Darmstadt, Allemagne)
    - EDTA 1 mM (Merck, Darmstadt, Allemagne)
    - Triton X-100 1% (Sigma, S^t Louis, USA)
    - Inhibiteurs de protéases 1x (Complete protease inhibitor cocktail tablets 25x, Roche, Allemagne)
    - Inhibiteurs de phosphatases 1x à partir d'un stock 25x :
        *$NaVO_3$ 25 mM (Sigma, S^t Louis, USA)
        *PNPP (phospho-nitophényl phosphate) 250mM
        *α-glycérophosphate 250mM (Sigma, S^t Louis, USA)
        *NaF 125 mM (Merck, Darmstadt, Allemagne)

b) Méthode

- Laver les cellules avec du PBS froid.
- Lyser les cellules avec 300 µl de tampon de lyse pour une boîte de culture T25.
- Collecter le lysat dans des eppendorfs et incuber à 4°C pendant 30 minutes.
- Centrifuger 15 minutes à 15000 rpm à 4°C (Heraus Sepatech, Biofuge 17RS).
- Récupérer le surnageant et le conserver à –20°C.
- Garder un aliquot pour réaliser un dosage de protéines par la technique de Bradford (voir point II.6).

II.5.2 Electrophorèse

a) Matériel et préparation des solutions

- Gel séparateur d'acrylamide ("running gel") composé de :
    - TRIS (ICN Biomedicals, Ohio, USA)
    - SDS (ICN Biomedicals, Ohio, USA)
    - Acryl/Bis 30/0.8 (Bio-Rad, Richmond, USA)
    - Ammonium persulfate (APS ; Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suède)
    - TEMED (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suède)

Le pourcentage d'acrylamide dépend du poids moléculaire des protéines que l'on veut mettre en évidence. Ainsi, un gel avec un pourcentage en acrylamide élevé sera utilisé pour séparer des protéines de faible poids moléculaire et inversément.

Le tableau ci-dessous indique les volumes à prélever des différents produits pour préparer les gels :

GEL MIX	**15%**	**10%**
Gel buffer	60 ml	60 ml
Acryl/Bis (30/0.8)	125 ml	83 ml
H_2O	65 ml	107 ml

Gel buffer (200 ml) : 36,3 g TRIS + 0,8 g SDS (pH 8,9)

Pour un gel épais : - 35 ml de gel mix

- 175 µl APS 25%
- 10,5 µl TEMED

- Gel concentrateur ("stacking gel") composé de :

- TRIS (ICN Biomedicals, Ohio, USA)
- SDS (ICN Biomedicals, Ohio, USA)
- Acryl/Bis 30/0,8 (Bio-Rad, Richmond, USA)
- Ammonium persulfate (APS ; Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suède)
- TEMED (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suède)

Le stock de gel concentrateur est réalisé en prélevant une quantité précise de chaque composant :

SPACER GEL MIX	
Spacer gel buffer	60 ml
Acryl/Bis (30/0,8)	40 ml
H_2O	140 ml

Spacer gel buffer (100 ml) : 5,1 g TRIS + 0,4 g SDS (pH 6,8)

Spacer gel : - 10 ml spacer gel mix
- 50 µl APS 25%
- 3 µl TEMED

- Tampon d'électrophorèse ("running buffer") :
  - TRIS (ICN Biomedicals, Ohio, USA)
  - SDS (ICN Biomedicals, Ohio, USA)
  - Glycine (Merck, Darmstadt, Allemagne)

Running buffer 10x (1l) : 63,2 g TRIS + 40 g glycine + 10 g SDS

- Tampon d'échantillon ("bleu de charge") :

Le stock de bleu de charge est réalisé selon le protocole suivant :

Bleu de charge 5x : - 10 ml spacer gel buffer
- 10 ml SDS 20%
- 5 ml β-mercaptoéthanol (Flukachemie AG, Buchs, Suisse)
- 10 ml glycérol (Merck, Darmstadt, Allemagne)
- 17,5 mg bleu de bomophénol (Janssen Chimica, Beerse, Belgique)

Une fois préparé, le stock est ensuite aliquoté (1 ml/eppendorf) et conservé au congélateur.

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

b) Méthode

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

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

Pendant ce temps, les différents échantillons sont préparés. On prélève de chaque fraction le volume adéquat, de manière à déposer une quantité équivalente de protéines par puits (20 µg), et on y ajoute un volume de tampon d'échantillon concentré 5x. Ensuite, les protéines sont dénaturées à 100°C pendant 3 minutes. Suite à cela, un "quick spin" est réalisé à la fois sur les échantillons et sur l'étalon de poids moléculaire.

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

II.5.3 Transfert

a) Matériel et solutions

- Membrane de PVDF (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Grande-Bretagne).
- Tampon de transfert ("Blotting buffer") :
  - TRIS (ICN Biomedicals, Ohio, USA)
  - Glycine (Merck, Darmstadt, Allemagne)
  - Méthanol (Acros Organics, New Jersey, USA)

Blotting buffer (5l) : 24 g TRIS + 115 g glycine + 1 l méthanol

b) Méthode

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

On découpe la membrane à la grandeur du gel séparateur, puis on l'immerge pendant 1 minute dans du méthanol et on l'équilibre enfin avec du tampon de transfert pendant au moins 5 minutes. Parallèlement, on immerge dans du tampon de transfert 2 éponges, 4 feuilles de papier Whatman.

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

Ensuite, sur le support inférieur de l'appareil de transfert (Pharmacia Biotech Inc., San Francisco, USA), on dépose par ordre et en évitant les bulles d'air :

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

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

II.5.4 Traitement et révélation

a) Matériel et solution

- Solution stock de TBS 10 x :

- TRIS (ICN Biomedicals, Ohio, USA)
- NaCl (Merck, Darmstadt, Allemagne)

TBS 10x (1l) : 24,22 g TRIS + 80,06 g NaCl (pH 7,6) à conserver à température ambiante.

- Solution TBS + 0,1% Tween à préparer le jour même :
  - TBS 10 x
  - Tween 20 (Sigma, S^t Louis, USA)
  - H_2O

TBS-Tween 0,1% (1l) : 100 ml TBS 10x + 1 ml Tween 20 + 900 ml H_2O

- Solution TBS-Tween 0,1% + 5% Gloria
  - TBS-Tween 0,1%
  - Gloria (Nestlé, Bruxelles, Belgique)

TBS-T 0,1% + 5% Gloria (200 ml) : 10 g Gloria et porter à volume avec du TBS-T 0,1%

- Solution TBS-Tween 0,1% + 0,1% Gloria
  - TBS-Tween 0,1%
  - Gloria (Nestlé, Bruxelles, Belgique)

TBS-T 0,1% + 0,1% Gloria (500 ml) : 500 mg Gloria et porter à volume avec du TBS-T 0,1%

- Anticorps primaires
  - Anticorps de lapin anti Mcl-1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) dilué 200x.
  - Anticorps de souris anti HIF-1α (BD Biosciences Transduction Laboratories, USA) dilué 1000 x.
  - Anticorps de souris anti Bcl-2 (Sigma, S^t Louis, USA) dilué 500 x.
  - Anticorps de souris anti α-tubuline (InnoGenex, San Ramon, USA) dilué 2500 x.

- Anticorps secondaires
  - Anticorps anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Grande-Bretagne) dilué 2000 x.
  - Anticorps anti- IgG de souris couplé à la peroxydase (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Grande-Bretagne) dilué 2000 x.

NB : Les anticorps primaires et secondaires sont dilués dans du TBS-T 0,1% + 0,1% Gloria.

- Liquide de révélation
  - Perkin Elmer Life Sciences, Boston, USA
  - Pierce, Rockford, USA

b) Méthode

Le lendemain matin, on arrête le transfert. La membrane est alors placée dans une bouteille en plastique en présence de TBS-T 0,1% + 5% Gloria pendant 1 heure à température ambiante, sous agitation. Cette solution permet le "blocking" de la membrane en saturant la membrane et donc empêcher les fixations non spécifiques des anticorps.

Pour localiser sur le support la protéine d'intérêt, nous utilisons un anticorps primaire qui reconnaît spécifiquement cette protéine. La détection se fait de manière indirecte puisque l'on ajoute un second anticorps qui reconnaît le premier. Cet anticorps secondaire est couplé à la peroxydase qui va catalyser la réaction de décomposition de l'H_2O_2 en H_2O et en $O_2^{\cdot-}$. $O_2^{\cdot-}$ est alors révélé par chémoluminescence en présence de luminol. Celui-ci est alors oxydé et peut donc retourner à son état fondamental en émettant de la lumière qui sera détectée sur un film. On voit donc apparaître une bande sur le film à l'endroit où se trouve la protéine d'intérêt.

En pratique, la réaction de blocking la membrane est incubée 2 heures en présence de l'anticorps primaire dilué dans du TBS- T + 0,1% Gloria. Les anticorps non fixés sont éliminés par 3 rinçages de 5 minutes chacun avec du TBS-T + 0,1% Gloria. La membrane est ensuite incubée durant 45 minutes en présence de l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase et dilué dans du TBS-T + 0,1% Gloria. Cette incubation se fait à température ambiante et sous agitation. Avant la révélation, la membrane est rincée 3 x 15 minutes avec du TBS-T sans Gloria. La membrane est alors mise en présence du liquide de révélation pendant 1 minute 30 secondes.

II.5.5 Révélation du film

a) Matériel et solutions

- Film d'exposition : film photos ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Buckingamshire, Grande-Bretagne)
- Pour révéler les films photos, on utilise un révélateur dilué 5 x (Ilford, Victoria, Grande-Bretagne) et un fixateur également dilué 5x (Ilford, Victoria, Grande-Bretagne).

b) Méthode

Après avoir été mise en présence du liquide de révélation pendant 1 minute 30 secondes, la membrane est soigneusement égouttée, insérée entre deux feuilles de plastique transparent et placée dans une cassette d'autoradiographie. En chambre noire, un film photo ECL est placé sur la feuille de plastique transparent se trouvant sur la membrane. On expose le film 1 minute. Le film est ensuite plongé dans un bain contenant le révélateur puis il est rincé dans un bain d'eau et enfin le film est plongé dans un bain contenant le fixateur. Si après le développement le signal est trop intense, il convient de diminuer le temps d'exposition et, dans le cas contraire, de l'augmenter.
La membrane peut être conservée, scellée entre 2 transparents à –20°C.

II.6 Dosage protéique par la méthode de Bradford

a) Matériel

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

b) Méthode

- Diluer le colorant 5 x dans de l'eau.
- Filtrer la solution.
- Pour chaque test, ajouter 1 ml de colorant.
- Ajouter de minute en minute une quantité donnée de protéines à doser (par exemple : 5 µl).
- Laisser agir 5 minutes.
- Lire l'absorbance au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 595 nm.

- Prévoir un tube avec l'étalon (3,7 µl), un tube avec le blanc étalon (3,7 µl d'eau) et un blanc avec le tampon de lyse dans lequel se trouvent les protéines les protéines (même quantité que pour les protéines).

Les dosages sont réalisés en duplicat.

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

$$\frac{((\text{Moyenne test} - \text{Moyenne blanc})/(\text{Moyenne étalon} - \text{Moyenne blanc étalon}))\times 5}{\text{Volume de l'échantillon}} = \mu g \text{ protéines}/\mu l$$

II.7 Immunofluorescence

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

a) Matériel et solutions

- Plaques 24 puits (Costar, Corning, New York, USA).
- Lamelles couvre-objet de 13 mm de diamètre (Vel, Knittel Glaser, Allemagne).
- Lames porte-objet de 2,6 x 7,6 cm (Vel, Knittel Glaser, Allemagne).
- PBS (Phosphate Buffer Saline).

  Pour 1l : - 20 ml tampon PO_4 0,5 M pH 7,4
  - 9 g NaCl (Merck, Darmstadt, Allemagne)
  Porter à volume avec de l'eau distillée.
- PBS/BSA : Dissoudre 2 g de BSA (Sigma, S^t Louis, USA) par 100 ml de PBS.
- PBS + Triton X-100 1% : Diluer 1 ml de Triton x-100 (Merck, Darmstadt, Allemagne) dans 100 ml de PBS et mélanger longuement sur agitateur magnétique car la solution de Triton est très visqueuse.
- PBS + 4% PFA (Paraformaldéhyde) (Merck, Darmstadt, Allemagne). Faire chauffer 4 g de paraformaldéhyde par 100 ml de PBS à une température de 80°C puis rectifier le volume.

- Anticorps primaire : *HIF-1α (BD Biosciences Transduction Laboratories, USA) dilué 100x
  *Mcl-1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) dilué 100 x
  *Caspase-3 active (Promega Corporation, Madison, USA) dilué 100 x

  L'anticorps primaire est en premier lieu centrifugé (quick spin), puis dilué dans du PBS/BSA.
- Anticorps secondaire : *Anticorps anti-IgG de souris ou de lapin marqué au fluorochrome Alexa 488, dilué 500 x (Molecular Probes, USA).

  L'anticorps secondaire est tout d'abord centrifugé via un quick spin puis, il est dilué 500 x dans du PBS/BSA.
- Mowiol (Sigma-Aldrich, Allemagne-Angleterre) : milieu de montage.

b) Méthode

Après avoir été repiquées dans des plaques 24 puits contenant une lamelle porte-objet par puits, les cellules (HepG2, Hepa C1 et Hepa C4 ARNT -/-) sont incubées 24 heures dans du milieu avec ou sans sérum et ensuite incubées 3, 6 ou 10 heures.

Suite à ces incubations, les cellules sont rincées avec du PBS préchauffé à 37°C en faisant attention de ne pas détacher les cellules. Ensuite, les cellules sont fixées sur les lamelles avec du PBS à 4% PFA pendant 10 minutes avant d'être à nouveau rincées 3 fois avec du PBS. Leurs membranes sont alors perméabilisées à l'aide de PBS + 1% Triton X-100 pendant 5 minutes.

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

Après avoir réalisé 3 rinçages de 10 minutes chacun avec du PBS/BSA, on ajoute l'anticorps secondaire. Celui-ci est incubé pendant 1 heure à température ambiante en chambre humide et à l'abri de la lumière pour conserver le fluorochrome.

Les lamelles sont à nouveau rincées 3 fois avec du PBS/BSA.

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

Si on ne réalise pas de marquage nucléaire, les couvre-objets sont directement déposés sur les lames porte-objet sur lesquelles du mowiol a été préalablement déposé. Le tout est également placé dans l'obscurité pendant 24 heures pour permettre la polymérisation du mowiol.

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

Résultats
et
Discussion

III. RÉSULTATS ET DISCUSSION

La première partie de ce mémoire vise à caractériser le rôle anti-apoptotique de HIF-1. Pour ce faire, deux approches ont été utilisées. D'une part, nous avons étudié l'effet de conditions connues pour activer HIF-1 sur l'apoptose induite par un stress oxydant et/ou par la déprivation de sérum. D'autre part, nous avons comparé cet effet dans des cellules sauvages et dans les cellules dépourvues de ARNT, une des deux sous-unités de HIF-1.

En pratique, les expériences réalisées au cours de ce mémoire ont été effectuées en hypoxie réelle (1% O_2) et en hypoxie chimique ($CoCl_2$). Cette dernière est réalisée en présence de chlorure de cobalt. Le cobalt remplacerait le fer au niveau du groupement hémique du senseur à oxygène, la prolyl hydroxylase, empêchant ainsi cette dernière de fixer l'O_2 et donc de diriger la sous-unité HIF-1α vers la dégradation par le protéasome. Les différentes lignées cellulaires utilisées dans le cadre de notre étude sont issues soit d'un hépatome humain (HepG2), soit d'un hépatome de souris (Hepa C1 sauvages et Hepa C4 déficientes pour la sous-unité ARNT).

III.1 Modèle expérimental d'induction l'apoptose

La mise au point d'un modèle induisant la mort cellulaire par apoptose sur les cellules HepG2 a été réalisée au laboratoire. Ce modèle consiste à repiquer les cellules (50.000 cellules/puits) au jour 0 dans du milieu DMEM + 10% sérum. Au jour 1, le milieu est renouvelé par du milieu DMEM frais avec ou sans sérum. Les cellules sont alors replacées dans l'incubateur pour une durée de 24 heures. Enfin, au jour 2, le milieu est remplacé par du milieu CO_2 indépendant et l'apoptose est induite par du t-BHP : les cellules sont incubées en présence ou en absence de t-BHP soit en normoxie, soit en présence de $CoCl_2$ (hypoxie chimique) ou soit en hypoxie réelle (1% O_2). Les deux conditions avec et sans sérum pendant les dernières 24 heures ont été envisagées pour deux raisons. D'une part, la présence de sérum est décrite comme pouvant protéger les cellules contre des stimuli pro-apoptotiques (Kelekar *et al.*, 1998). Nous avons donc privé les cellules de sérum 24 heures avant l'incubation en présence de t-BHP afin de pouvoir mettre en évidence un effet important de celui-ci par rapport à des cellules ayant été incubées au préalable avec du sérum. D'autre part, la privation

de sérum est connue pour induire l'apoptose par elle-même. Si tel est le cas dans notre modèle, alors on pourra aussi étudier l'effet de l'hypoxie et du $CoCl_2$ sur l'apoptose induite par la déprivation de sérum.

Pour faciliter l'analyse des résultats, une nomenclature précise a été établie pour chaque condition testée :

- La condition contrôle (CTL) représente les cellules qui ont été mises en présence de sérum tout au long de l'expérience, c'est-à-dire durant les 24 heures avec du DMEM et les 8 heures d'incubation avec du milieu CO_2 indépendant.
- La condition opposée (SS) représente quant à elle les cellules qui ont été privées de sérum tout au long de l'expérience, c'est-à-dire durant les 24 heures avec du DMEM et les 8 heures d'incubation avec du milieu CO_2 indépendant.
- La condition intermédiaire (AS) représente les cellules qui n'ont été privées de sérum que pendant l'incubation en milieu CO_2 indépendant.

Le ter-butyl hydroperoxyde (t-BHP) est un hydroperoxyde organique stable dans le temps et pénétrant facilement dans les membranes biologiques. Il est souvent utilisé pour engendrer un stress oxydant dans les cellules. Le t-BHP est capable de générer des espèces réactives dérivés de l'oxygène (ROS pour Reactive Oxygen Species) en interagissant avec des métaux de transition comme le fer (Halliwell *et al.*, 1984). Il induit ainsi de nombreux effets délétaires dans les cellules. Parmi ceux-ci, l'initiation de la peroxydation lipidique est la plus importante. Elle conduit à une perte de l'intégrité membranaire qui peut, si elle est trop importante, conduire à la mort des cellules (Rubin *et al.*, 1984). Le t-BHP peut aussi conduire à la mort des cellules en augmentant la perméabilité membranaire mitochondriale via l'ouverture des mégapores (Permeability Transition Pore). Cette augmentation de la perméabilité dépolarise la membrane mitochondriale, provoque le découplage de la respiration et la mort de la cellules par la chute de la production d'ATP (Nieminen *et al.*, 1997).

Le but des expériences que nous avons réalisées est de voir si les deux types d'hypoxie peuvent protéger les cellules de l'apoptose induite par le t-BHP et la déprivation de sérum et si oui, si cette protection est bien due à l'activation du facteur HIF-1.

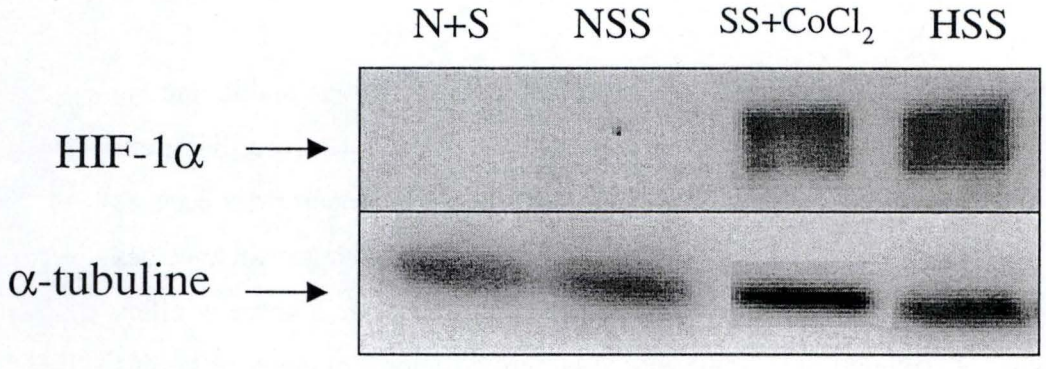


Figure III.1: Effet de l'hypoxie et du cobalt sur l'expression de HIF-1α. Les cellules HepG2 ont été incubées 24 heures dans du DMEM avec sérum (N+S) ou sans sérum (SS) puis 8 heures dans du milieu CO_2 indépendant avec (N+S) ou sans sérum (SS) en normoxie (N), en présence de $CoCl_2$ (150 µM) ou en hypoxie (H). Elles ont ensuite été lysées et l'abondance de la protéine HIF-1α a été détectée dans les extraits protéiques par Western blot.

Un contrôle de charge a été réalisé grâce à la révélation de l'α-tubuline.

III. 2 Mise en évidence du rôle anti-apoptotique de HIF-1

III.2.1 Activation de HIF-1

Deux conditions connues pour activer HIF-1 ont été utilisées tout au long de ce travail. Les premières expériences que nous avons réalisées avaient pour but de montrer que HIF-1 était bien activé dans nos conditions expérimentales. Comme décrit dans l'introduction, l'activation de HIF-1 en hypoxie ou en présence de cobalt dépend principalement de la stabilisation de la sous-unité HIF-1α (Semenza, 2000). Nous avons donc évalué la quantité de la protéine HIF-1α dans les cellules HepG2 incubées en normoxie et en hypoxie par deux techniques, l'immunofluorescence et le Western blot.

III.2.1.1 Etude de la stabilisation de HIF-1α par Western blot

Afin de mettre en évidence l'inhibition de la dégradation de HIF-1α dans nos conditions expérimentales, un Western blot a été réalisé sur des extraits de cellules HepG2 ayant été incubées 8 heures en normoxie, en hypoxie ou en présence de $CoCl_2$. Les résultats sont représentés à la figure III.1.

Discussion

Les résultats du Western blot révèlent que la sous-unité HIF-1α n'est pas présente en condition de normoxie. La présence ou l'absence de sérum n'influence pas cet effet. Par contre, celle-ci est détectée en hypoxie mais également suite à l'ajout de $CoCl_2$, ce qui montre que HIF-1α est bien stabilisé dans nos conditions expérimentales.

III.2.1.2 Marquage de HIF-1α

Les résultats de l'expérience décrite ci-dessus montrent que HIF-1α est bien stabilisé après 8 heures d'incubation en hypoxie ou en présence de $CoCl_2$. Nous avons ensuite voulu voir d'une part si l'accumulation de HIF-1α pouvait être plus précoce et d'autre part si le t-BHP n'interférait pas avec ce processus.

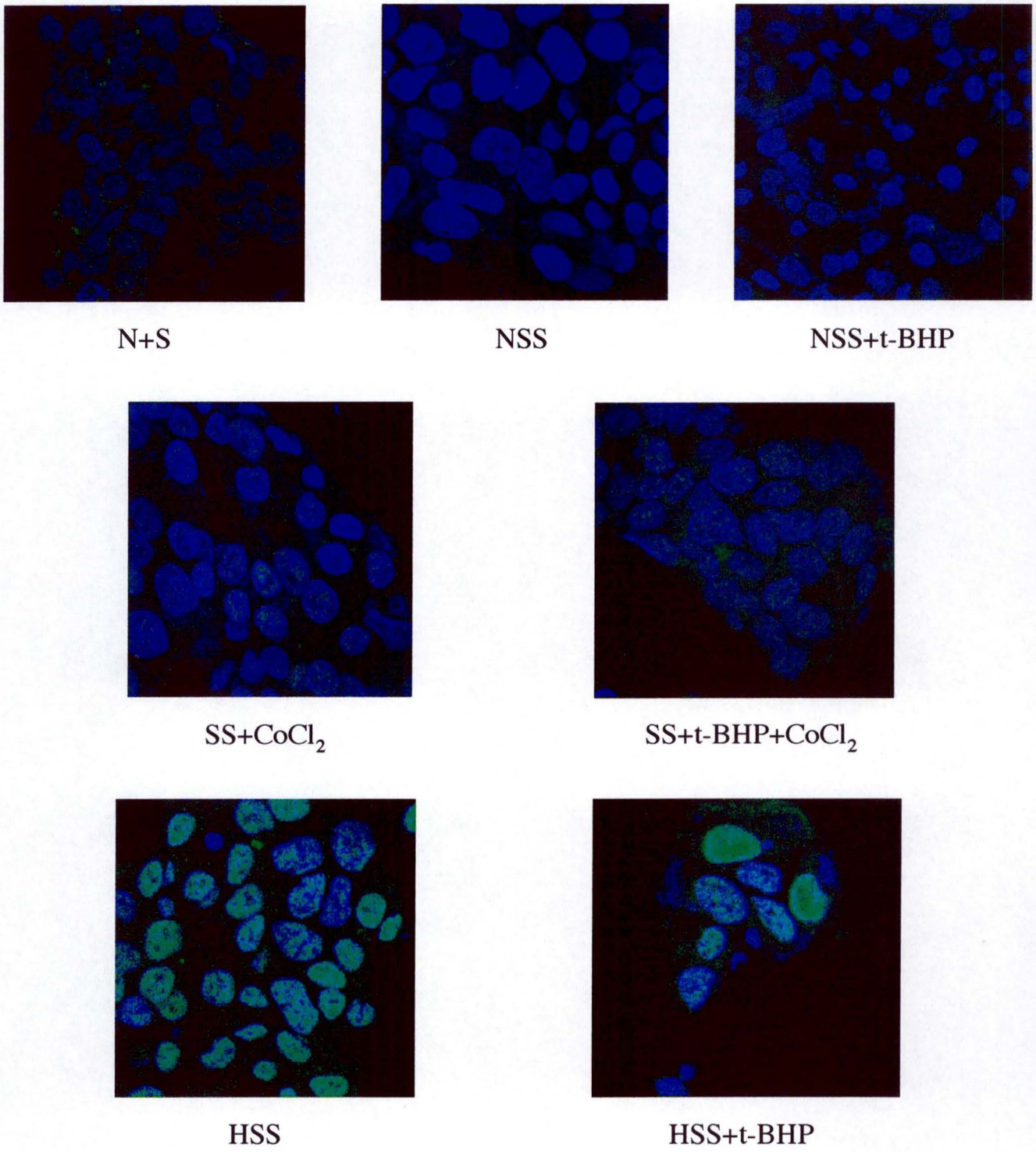
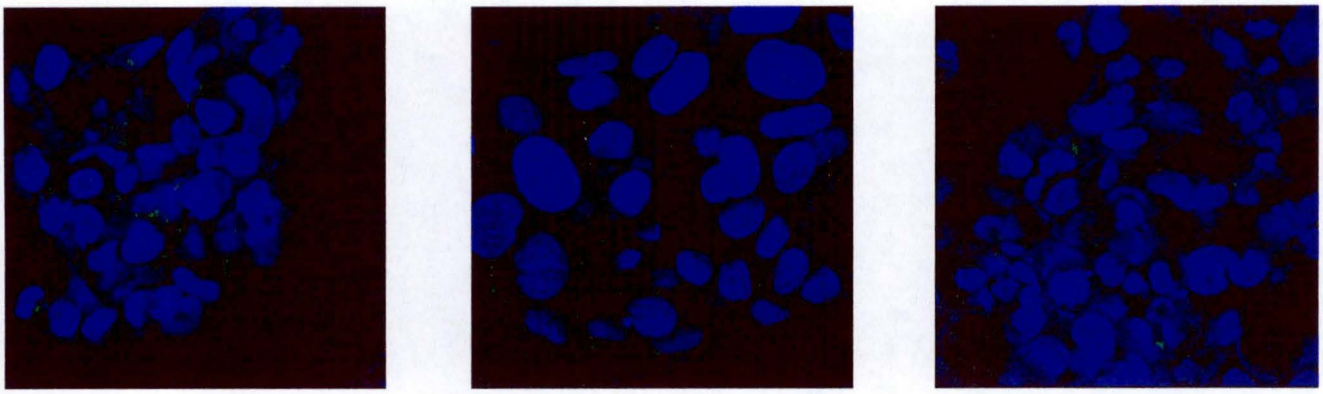
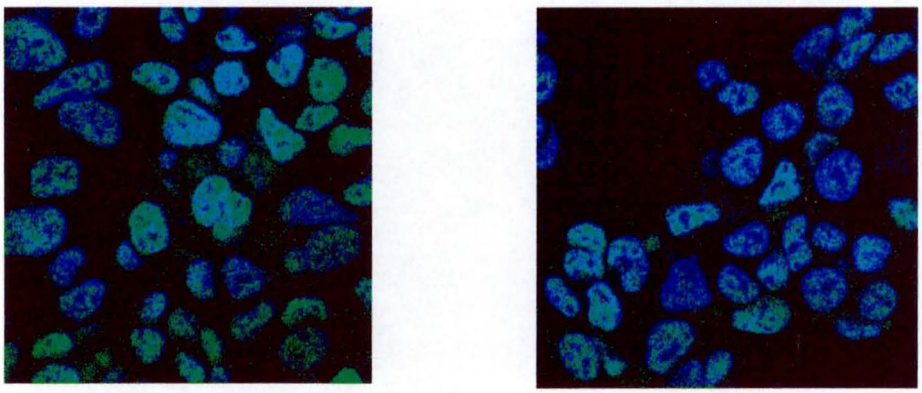


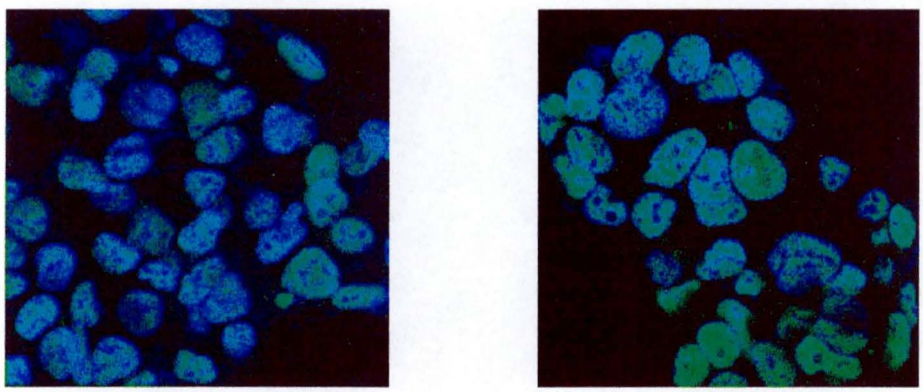
Figure III.2 : Effet de l'hypoxie et du cobalt sur l'expression de HIF-1α. Les cellules HepG2 ont été incubées 24 heures dans du DMEM avec (N+S) ou sans sérum (SS) puis 3 heures dans du milieu CO_2 indépendant sans sérum (sauf N+S) avec ou sans t-BHP à 5.10^{-5}M et en normoxie (N), en présence de $CoCl_2$ (150 μM) ou en hypoxie (H). Les cellules ont ensuite été fixées et la protéine HIF-1α a été détectée par immunofluorescence (vert). Les noyaux ont été colorés au TO-PRO-3 (bleu).



N+S NAS NAS+t-BHP



AS+$CoCl_2$ AS+t-BHP+$CoCl_2$



HAS HAS+t-BHP

Figure III.3 : Effet de l'hypoxie et du cobalt sur l'expression de HIF-1α. Les cellules HepG2 ont été incubées 24 heures dans du DMEM avec sérum (AS) puis 6 heures dans du milieu CO_2 indépendant sans sérum (sauf N+S) avec ou sans t-BHP à 5.10^{-5} M et en normoxie (N), en présence de $CoCl_2$ (150 μM) ou en hypoxie (H). Les cellules ont ensuite été fixées et la protéine HIF-1-α a été détectée par immunofluorescence (vert). Les noyaux ont été colorés au TO-PRO-3 (bleu).

Pour cette expérience, les temps d'incubations en hypoxie ont été de 3 heures et de 6 heures respectivement pour la condition dans laquelle les cellules sont dépourvues de sérum 24 heures avant l'incubation (SS) et pour la condition où le sérum est maintenu pendant ces 24 heures (AS).

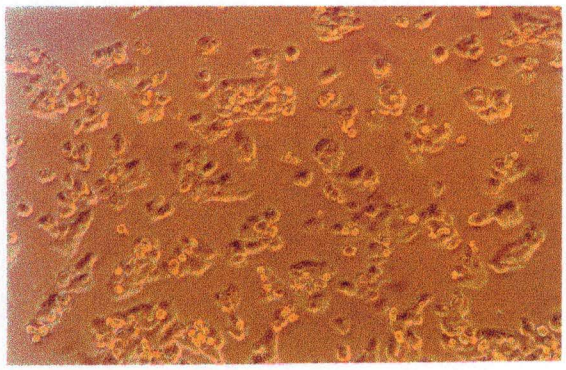
Analyse des résultats

La figure III.2 présente les résultats lorsque les cellules HepG2 sont incubées pendant 24 heures dans du milieu DMEM sans sérum, puis incubées 3 heures dans du milieu CO_2 indépendant sans sérum. Des cellules incubées constamment en présence de sérum (N+S) servent de contrôles.

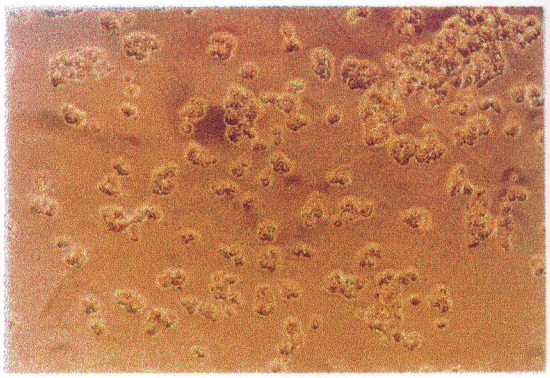
Pour les cellules maintenues en normoxie avec (N+S) ou sans sérum (NSS), aucun marquage de HIF-1α n'apparaît indiquant que, dans ces conditions, HIF-1α n'est pas présent. Le t-BHP par lui-même (NSS+ t-BHP) n'entraîne pas de marquage spécifique pour HIF-1α. Le simple ajout de $CoCl_2$ (SS+$CoCl_2$) dans le milieu entraîne une légère augmentation du marquage indiquant que HIF-1α commence à être stabilisé. L'ajout de t-BHP à cette condition (SS+ t-BHP+$CoCl_2$) n'influence pas ce processus. L'hypoxie quant à elle, avec ou sans t-BHP, entraîne un marquage plus important indiquant une quantité abondante de HIF-1α. Ce marquage met de plus en évidence une localisation nucléaire de HIF-1α.

L'étude de l'abondance de HIF-1α a également été réalisée sur les cellules n'ayant subi la privation de sérum que durant l'incubation (AS). Pour cette étude, les cellules HepG2 ont subi une incubation de 24 heures dans du milieu DMEM avec sérum, puis une incubation de 6 heures dans du milieu CO_2 indépendant sans sérum.

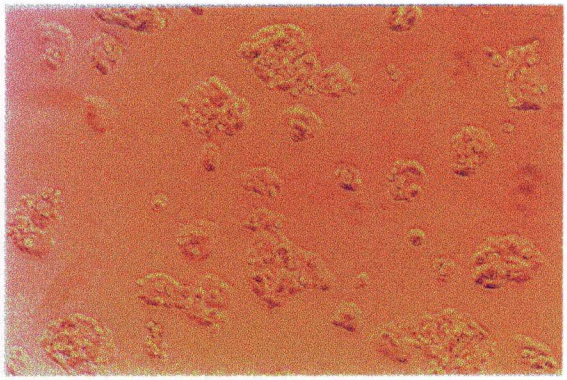
La figure III.3 montre que dans les cellules incubées en normoxie (NAS), il n'y a pas d'accumulation de HIF-1α. Le t-BHP par lui-même (AS+ t-BHP) n'entraîne pas non plus l'accumulation de la protéine. L'ajout de $CoCl_2$ (AS+$CoCl_2$) augmente de façon spectaculaire l'intensité du marquage, indiquant que le cobalt a induit la stabilisation de HIF-1α. L'addition de t-BHP (AS+ t-BHP+$CoCl_2$) ne modifie pas l'intensité de marquage. L'hypoxie, avec ou sans t-BHP, entraîne également une stabilisation importante de HIF-1α. Que se soit en présence de $CoCl_2$ ou en hypoxie, HIF-1α est localisé dans le noyau des cellules.



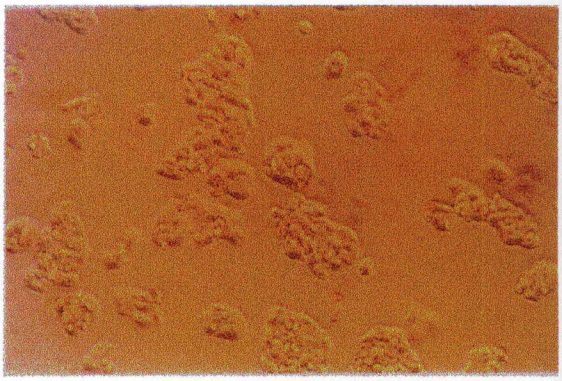
NSS



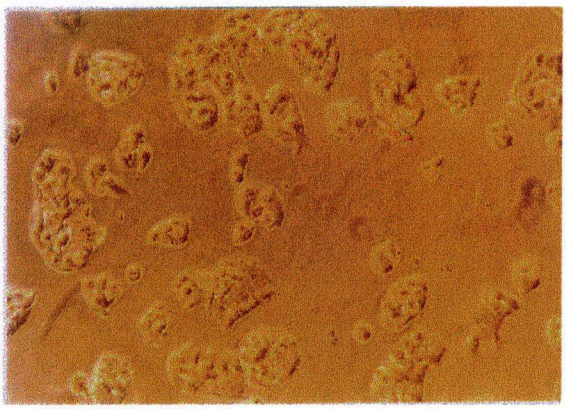
NSS + t-BHP



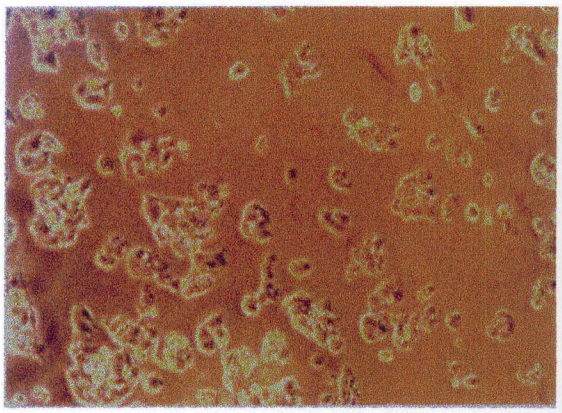
SS + $CoCl_2$



SS + $CoCl_2$ + t-BHP



HSS



HSS + t-BHP

<u>Figure III.4</u> : Etude morphologique de l'effet du t-BHP et du $CoCl_2$ ou de l'hypoxie sur les cellules HepG2. Les cellules ont été incubées 24 heures dans du DMEM sans sérum (SS) puis 8 heures dans du milieu CO_2 indépendant en présence ou en absence de t-BHP (5.10^{-5}M) en normoxie (N), en présence de $CoCl_2$ (150 µM) ou en hypoxie (H).

Discussion

L'accumulation de la sous-unité HIF-1α et sa translocation dans le noyau mises en évidence lors de ces expériences montrent bien que cette sous-unité est bien stabilisée dans nos conditions expérimentales. Le chlorure de cobalt et l'hypoxie inhibent donc la dégradation de la sous-unité HIF-1α, permettant ainsi son accumulation et sa migration dans le noyau. Il est intéressant de noter que l'accumulation de HIF-1α semble plus précoce en cas d'hypoxie réelle qu'en présence de $CoCl_2$. En présence de $CoCl_2$ en effet, HIF-1α est peu détectable après 3 heures d'incubation alors qu'il devient abondant après 6 heures d'incubation.

III.2.2 Etude morphologique

Ayant montré que HIF-1α était bien stabilisé dans les conditions expérimentales utilisées, nous avons ensuite étudié si l'hypoxie et le cobalt pouvaient protéger les cellules HepG2 de l'apoptose induite par le t-BHP.

Une étude morphologique sur les HepG2 a d'abord été réalisée après une incubation de 8 heures dans du milieu CO_2 indépendant sans sérum, en présence ou non de t-BHP (figure III.4). Préalablement, ces cellules ont été incubées avec du milieu DMEM sans sérum pendant 24 heures. Les résultats obtenus suite à cette incubation sont les suivants :

- Lorsque les cellules subissent une incubation de 8 heures en présence de milieu CO_2 indépendant sans sérum (NSS), la morphologie cellulaire ne varie pas par rapport à celle observée avant l'incubation, c'est-à-dire que l'on observe des cellules bien rondes et regroupées en amas.
- L'ajout de t-BHP (5.10^{-5} M) durant l'incubation (NSS+ t-BHP) a un effet très marqué sur la morphologie des cellules. En effet, le t-BHP provoque la mort cellulaire : toutes les cellules apparaissent ratatinées, lysées et ne sont plus regroupées en amas.
- Le chlorure de cobalt (150 µM) à lui seul (SS+$CoCl_2$) n'induit pas de changement morphologique puisque l'on retrouve la morphologie des cellules contrôles (NSS).
- Le $CoCl_2$ semble protéger les cellules de l'effet du t-BHP. En effet, les cellules paraissent bien vivantes et présentent un phénotype comparable aux cellules contrôles.
- La mise sous hypoxie à elle seule (HSS) n'induit pas de changement morphologique.

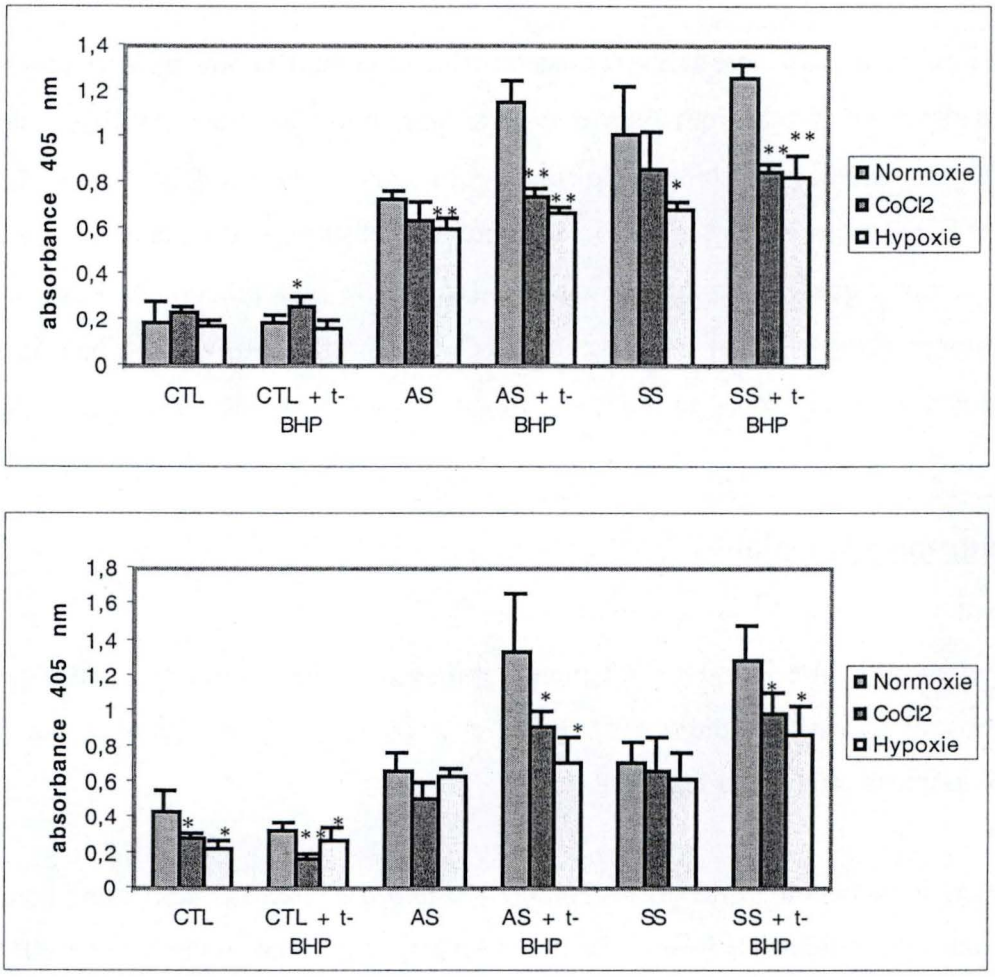


Figure III.5 : Effet de l'hypoxie et du cobalt sur la fragmentation de l'ADN induite par le t-BHP et/ou la déprivation de sérum. Les cellules HepG2 ont été incubées 24 heures dans du milieu DMEM avec (CTL, AS) ou sans sérum (SS) puis incubées 8 heures en présence ou en absence de t-BHP (5.10^{-5} M) et en normoxie, en présence de $CoCl_2$ (150 µM) ou en hypoxie. A la suite de ces incubations, une mesure de la fragmentation de l'ADN a été réalisée.

Les résultats sont présentés en tant que moyennes ± 1 écart-type pour n=3.

* ou ** : significativement différent du contrôle normoxie correspondant avec $P< 0,05$ ou $P< 0,01$ (test t de Student).

- L'hypoxie semble également protéger contre les effets du t-BHP. Néanmoins, la protection semble morphologiquement moins complète que celle observée avec le $CoCl_2$. On observe en effet certaines zones où les cellules sont mortes et d'autres où les cellules ont survécu.

Cette étude morphologique suggère que le $CoCl_2$ et, dans une moindre mesure, l'hypoxie pourraient protéger les cellules de la mort induite par le t-BHP. Cependant, nous n'avons pas d'indication quant au type de mort provoquée par le t-BHP : nécrose ou apoptose. Afin de mettre spécifiquement en évidence cette dernière, une mesure de la fragmentation de l'ADN a été réalisée. Cette fragmentation est en effet caractéristique de l'apoptose et n'est pas observée dans les cellules nécrotiques. De plus, il est également intéressant de vérifier si les protections observées morphologiquement en présence du $CoCl_2$ ou sous hypoxie sont toujours constatées.

III.2.3 Mesure de la fragmentation de l'ADN

Différentes conditions ont été testées pour mieux caractériser l'éventuel rôle anti-apoptotique de l'hypoxie et du cobalt suggéré par l'étude morphologique décrite ci-dessus. Les effets séparés et cumulés de la privation de sérum et de l'ajout de t-BHP ont été ainsi étudiés sur les cellules HepG2.

La fragmentation de l'ADN étant une des dernières étapes de l'apoptose, le temps d'incubation en milieu CO_2 indépendant doit être suffisamment long. Ainsi, comme pour l'étude morphologique, une incubation d'une durée de 8 heures a été réalisée.
Dans les trois conditions décrites précédemment, les effets du $CoCl_2$ et de l'hypoxie ont été étudiés sur la mortalité de la mort par le t-BHP et/ou la déprivation de sérum et les résultats sont illustrés à la figure III.5. L'expérience a été réalisée deux fois et les résultats de ces deux expériences sont présentés. Ils sont tout à fait comparables dans les deux cas.

Analyse des résultats

La fragmentation de l'ADN est faible dans la condition contrôle (CTL) et le $CoCl_2$ de même que l'hypoxie n'entraînent pas à eux seuls une induction de l'apoptose. L'ajout de t-BHP dans cette condition (CTL+ t-BHP) ne montre pas d'effet suggérant que le sérum peut inhiber les effets néfastes du t-BHP.

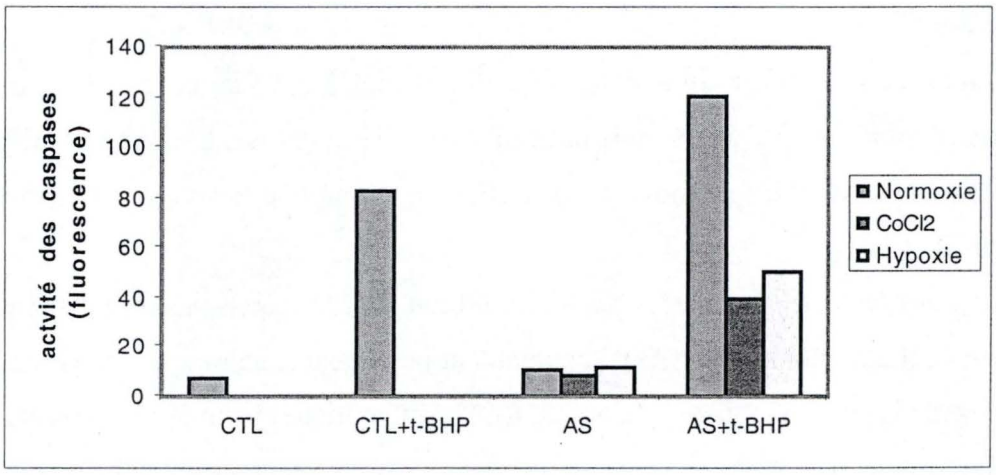
En revanche, pour les cellules privées de sérum durant toute l'expérience (SS), les valeurs obtenues pour la fragmentation de l'ADN augmentent nettement montrant que la privation de sérum à elle seule induit l'apoptose. L'ajout de $CoCl_2$ ou la mise sous hypoxie entraînent une diminution des valeurs d'absorbance suggérant ainsi un effet protecteur du chlorure de cobalt et de l'hypoxie contre l'apoptose induite par la déprivation de sérum. L'ajout de t-BHP dans cette condition (SS + t-BHP) provoque une augmentation de la fragmentation de l'ADN plus grande par rapport à la condition AS. La présence de $CoCl_2$ ou la mise sous hypoxie diminue significativement ces valeurs.

Enfin, pour la condition intermédiaire (AS), il y a une augmentation de la fragmentation de l'ADN par rapport au contrôle mais moins importante que pour la condition sans sérum. Les diminutions induites par le $CoCl_2$ ou l'hypoxie se retrouvent également ici mais de façon moins marquée. L'ajout de t-BHP (AS + t-BHP) a le même effet que dans la condition précédente, à savoir une augmentation nette de la fragmentation de l'ADN et l'hypoxie ou le $CoCl_2$ peuvent inhiber significativement cette augmentation.

Discussion

La mesure de la fragmentation de l'ADN indique que la mort cellulaire induite par le t-BHP et observée lors de l'étude morphologique est bien, au moins en partie, une mort cellulaire par apoptose. Le $CoCl_2$ et l'hypoxie, deux inducteurs de HIF-1, entraînent de façon significative une diminution de la fragmentation de l'ADN induite par le t-BHP. Par ailleurs, la déprivation de sérum entraîne aussi une mort par apoptose, qui peut être également protégée par les conditions qui activent HIF-1.

A)



B)

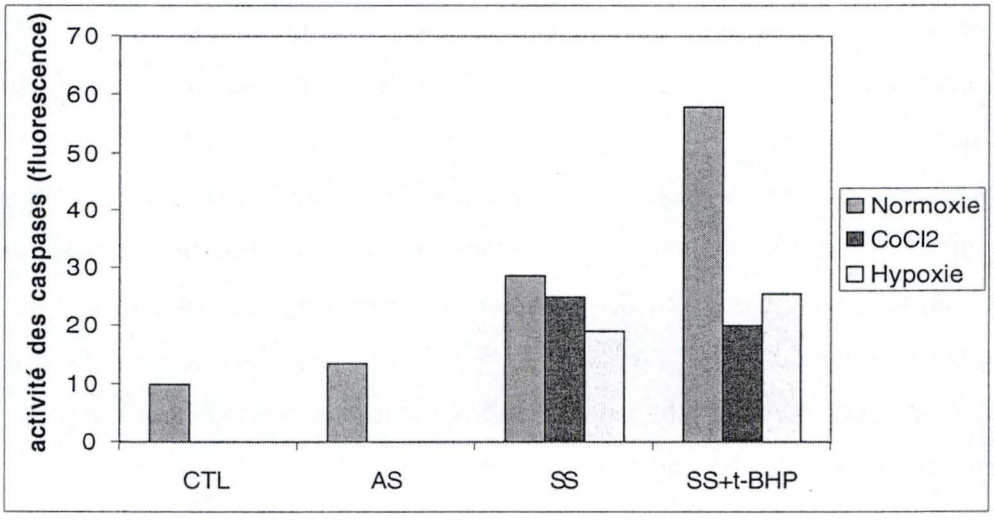


Figure III.6 : Effet de l'hypoxie et du cobalt sur l'activation des caspases induite par le t-BHP ou la déprivation de sérum.
Les cellules HepG2 ont été incubées 24 heures dans du milieu DMEM avec (CTL, AS) ou sans sérum (SS) puis 6 heures (A) ou 3 heures (B) dans du milieu CO_2 indépendant avec (CTL) ou sans sérum (AS, SS) en présence ou en absence de t-BHP à 5.10^{-5}M et en normoxie, en présence de $CoCl_2$ (150 µM) ou en hypoxie. A la suite de ces incubations, une mesure de l'activité des caspases a été réalisée.
Les résultats sont représentés en tant que moyennes pour n=2.

III.2.4 Mesure de l'activité des caspases

Les résultats précédents montrent que les cellules HepG2 incubées en présence de t-BHP meurent au moins en partie par apoptose et que l'hypoxie et le $CoCl_2$ apportent un effet protecteur. Un autre paramètre caractéristique de l'apoptose est l'activation des caspases. Dans la suite du travail, nous avons voulu suivre cette activation et étudier l'éventuelle protection de l'hypoxie et du cobalt sur cette activation.

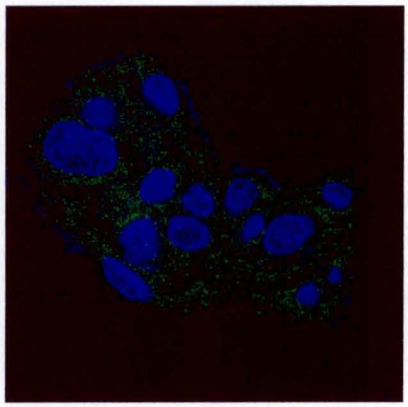
Cette étude a été effectuée sur des HepG2 dans les différentes conditions précitées et une mise au point a dû être réalisée au niveau du temps d'incubation. En effet, à l'inverse de la fragmentation de l'ADN, l'activation des caspases est un phénomène transitoire se déroulant au début du processus apophatique et qui précède la fragmentation de l'ADN. Le temps d'incubation en milieu CO_2 indépendant doit donc être diminué afin de mettre en évidence l'activité des caspases. Ainsi, les cellules privées de sérum (SS) pendant l'incubation et les 24 heures qui la précèdent subiront une incubation en présence de t-BHP de 3 heures tandis que pour les cellules privées de sérum uniquement pendant l'incubation (AS), celle-ci sera de 6 heures. Les résultats obtenus sont représentés graphiquement à la figure III.6.

Analyse des résultats

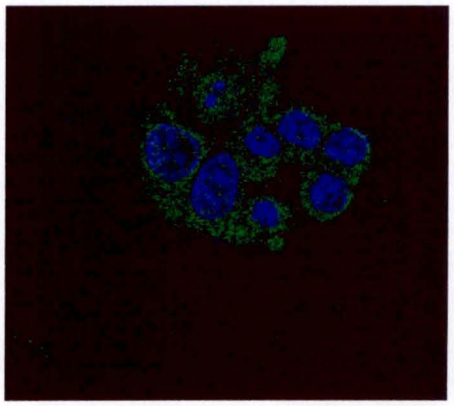
Après les incubations de 3 heures et 6 heures, le t-BHP induit de manière importante l'activation des caspases respectivement dans les conditions SS et AS. Le $CoCl_2$ et l'hypoxie diminuent de manière importante l'activation des caspases induite par le t-BHP dans les deux conditions. Par ailleurs, la privation de sérum induit à elle seule une légère activation des caspases en comparant cette condition (SS) avec les cellules contrôles incubées en présence de sérum durant toute la durée de l'expérience (CTL). Dans ce cas également, l'hypoxie prévient l'activation des caspases.

Discussion

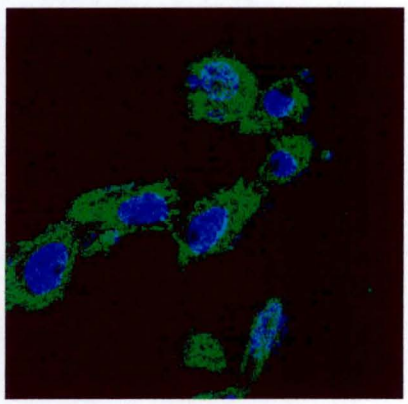
Ces résultats montrent que l'activité des caspases est augmentée si les cellules sont privées de sérum ou si elles sont incubées en présence de t-BHP. Un effet additif des deux conditions est observé. Il est très intéressant de remarquer que cette activité est nettement diminuée suite à la mise sous hypoxie ou à l'ajout de $CoCl_2$, ce qui est tout à fait en concordance avec les



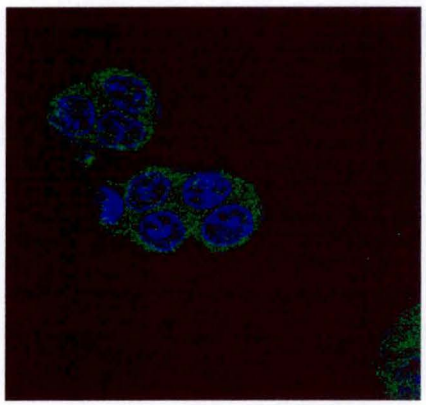
N+S



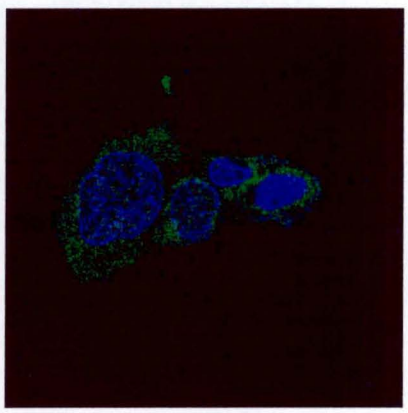
NSS



NSS+t-BHP



SS+t-BHP+$CoCl_2$



HSS+t-BHP

Figure III.7 : Effet de l'hypoxie et du cobalt sur l'activation de la caspase 3 induite par le t-BHP. Les cellules HepG2 ont été incubées 24 heures dans du milieu DMEM avec (N+S) ou sans sérum (SS) puis 3 heures dans du milieu CO_2 indépendant avec (N+S) ou sans sérum, en présence ou en absence de t-BHP à 5.10^{-5}M en normoxie (N), en présence de $CoCl_2$ (150 µM) ou en hypoxie (H). Les cellules ont ensuite été détectée par immunofluorescence (vert). De plus, les noyaux ont été colorés au TO-PRO-3 (bleu).

résultats des expériences précédentes dans lesquelles ces deux conditions pouvaient également inhiber la fragmentation de l'ADN induite par le t-BHP et/ou la déprivation de sérum. Comme ces deux conditions activent HIF-1, ces résultats suggèrent donc que HIF-1 pourrait avoir un rôle anti-apoptotique.

III.2.5 Mise en évidence de l'activité des caspases par immunofluorescence

Les résultats obtenus jusqu'à présent tiennent compte de toute la population cellulaire mais ne donnent pas d'idée précise quant à la proportion des cellules qui meurent par apoptose ni quant à l'étendue de la protection apportée par l'hypoxie ou le cobalt. Afin de mieux suivre le processus d'apoptose dans les cellules de manière individuelle, nous avons réalisé un marquage en immunofluorescence de la caspase 3 active et analysé ce marquage en microscopie confocale. Les conditions testées pour cette expérience sont celles où les cellules sont privées de sérum pendant l'incubation et les 24 heures qui la précèdent (SS). L'effet du $CoCl_2$ et de l'hypoxie sera étudié sur l'effet de t-BHP lors de cette expérience. Les résultats obtenus sont présentés à la figure III.7.

Analyse des résultats

Lors de cette expérience, une condition contrôle (N+S) dans laquelle les cellules sont constamment cultivées en présence de sérum a été ajoutée. Les résultats montrent que l'intensité du marquage révélant la caspase 3 active dans cellules suite à la privation de sérum (NSS) augmente légèrement par rapport aux cellules contrôles, ce qui indique une légère activation de la caspase 3. Le marquage des cellules incubées en présence de t-BHP est très intense par rapport à celui des cellules incubées uniquement sans sérum, indiquant une quantité importante de la caspase 3 active. En revanche, le marquage des cellules incubées en présence de t-BHP et exposées à l'hypoxie ou à l'ajout de $CoCl_2$ est plus faible par rapport à celui des cellules incubées avec du t-BHP seul. Cette observation suggère que l'hypoxie et le $CoCl_2$ sont capables de prévenir l'activation de la caspase 3 induite par le t-BHP.

Discussion

Les résultats de cette expérience montrent que toutes les cellules sont marquées par l'anticorps anti-caspase 3 active, indiquant que la grande majorité des cellules meurent effectivement par apoptose lorsqu'elles sont incubées en présence de t-BHP. La protection observée suite à l'ajout de cobalt ou à la mise sous hypoxie touche également une grande partie de la population.

Ces résultats coïncident avec ceux obtenus en mesurant l'activité des caspases et suggèrent à nouveau que HIF-1 pourrait avoir un rôle anti-apoptotique.

III.2.6 Mesure de la fragmentation de l'ADN sur les cellules Hepa C1 et C4

L'ensemble des résultats décrits jusqu'à présent montre que l'hypoxie et le cobalt protègent les cellules HepG2 de l'apoptose induite par le t-BHP et/ou la déprivation de sérum. De plus, nous avons observé que ces conditions expérimentales conduisent bien à l'activation de HIF-1. Ils suggèrent donc que HIF-1 pourrait avoir un rôle anti-apoptotique. Cependant, nous n'avons pas de preuve directe que c'est bien en activant HIF-1 que l'hypoxie et le cobalt protègent les cellules de la mort apoptotique.

Pour palier à ce manque, certaines des expériences présentées ci-dessus ont été également réalisées sur une autre lignée cellulaire, les cellules Hepa provenant d'un hépatome de souris. Nous disposons en réalité de deux souches différentes :

- Hepa C1 : cette souche possède un génotype sauvage.
- Hepa C4 ARNT-/- : cette souche, comme son nom l'indique, est déficiente pour la sous-unité ARNT de HIF-1.

La comparaison du comportement de ces deux souches vis-à-vis de l'hypoxie devrait nous indiquer si la protection observée est bien due à l'activité de HIF-1. En effet, si HIF-1 a une activité anti-apoptotique comme le suggèrent les précédentes expériences effectuées sur les HepG2, nous devrions en théorie retrouver les mêmes protections dans la souche Hepa C1 mais pas dans la souche Hepa C4 ARNT-/-. En effet, le facteur de transcription HIF-1 n'étant jamais actif dans ces cellules, il ne pourrait pas y assurer son rôle anti-apoptotique.

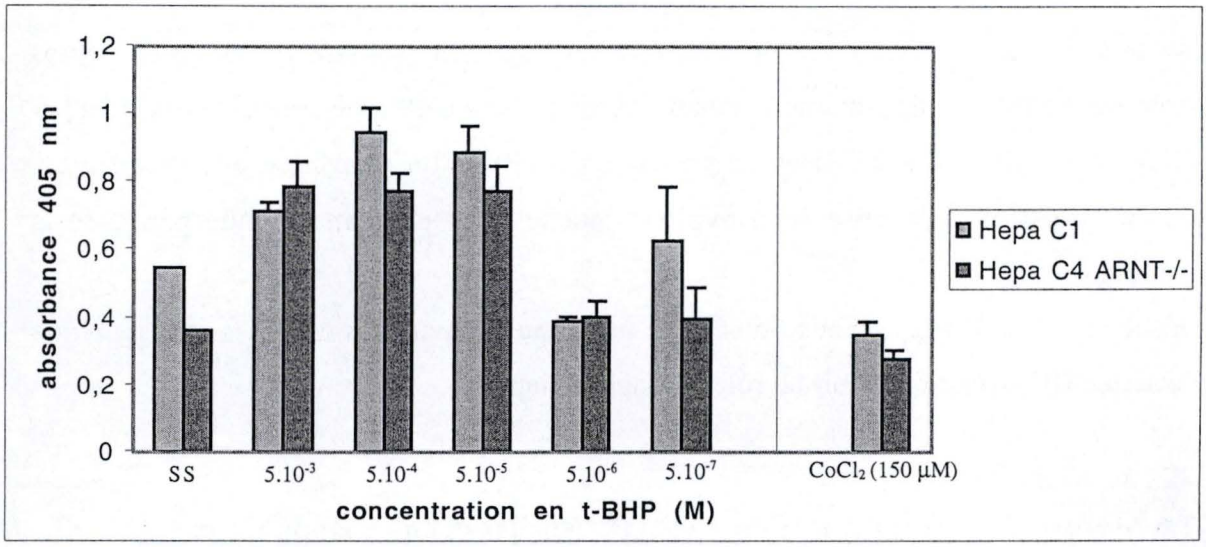


Figure III.8 : Effet du t-BHP sur la fragmentation de l'ADN induite par le t-BHP dans les cellules Hepa. Les cellules Hepa C1 ou C4 ont été incubées 16 heures en présence de concentrations croissantes en t-BHP ou en présence de 150 µM en $CoCl_2$. Les résultats sont présentés en tant que moyennes ± 1 écart type pour n=3, sauf pour la condition SS où n=2.

III.2.6.1 Adaptation du modèle expérimentale sur les cellules Hepa

Etant donné que les cellules Hepa sont caractérisées par une croissance plus rapide que les HepG2, certaines mises au point ont dû être faites pour adapter notre modèle d'induction d'apoptose établi à la base pour les HepG2 aux cellules Hepa. Ainsi, le nombre de cellules présentes par puits a été diminué, en passant de 50.000 cellules à 20.000 cellules par puits. Nous nous sommes aussi rendus compte que les cellules Hepa étaient moins sensibles au t-BHP que ne le sont les HepG2. Nous avons donc étudié l'effet de la concentration en t-BHP sur l'induction de l'apoptose chez les cellules Hepa en suivant la fragmentation de l'ADN. De plus, le temps d'incubation en présence de t-BHP dans le milieu CO_2 indépendant a dû être rallongé, passant à 16 heures au lieu de 8 heures. Enfin, nous avons voulu nous assurer que la concentration en $CoCl_2$ (150 µM) utilisée pour les HepG2 n'était pas toxique pour ces deux souches. Les résultats de cette expérience sont présentés à la figure III.8.

Analyse des résultats

Les résultats montrent que le $CoCl_2$ (150 µM) n'est pas toxique pour les cellules. Les deux concentrations en t-BHP les plus faibles (5.10^{-7}M et 5.10^{-6}M) n'induisent pas la mort cellulaire : on n'observe pas d'augmentation de la fragmentation d'ADN. Par contre, aux concentrations plus élevées, une nette augmentation de la fragmentation de l'ADN est observée. Celle-ci tend à diminuer pour la concentration la plus forte. Ceci avait déjà été précédemment observé pour les cellules HepG2. En fait, cette concentration est tellement toxique pour les cellules que celles-ci meurent plutôt par nécrose que par apoptose et on observe donc une fragmentation de l'ADN, qui est typique de l'apoptose, moins marquée. A la suite de ces résultats, nous avons choisi la concentration de 5.10^{-4} M pour la suite des expériences.

III.2.6.2 Mesure de la fragmentation de l'ADN

Une fois ces conditions mises au point, des expériences similaires à celles réalisées sur les HepG2 ont été faites. Les résultats pour la souche Hepa C1 sont présentés à la figure III.9 et ceux pour la souche Hepa C4 ARNT-/- à la figure III.10.

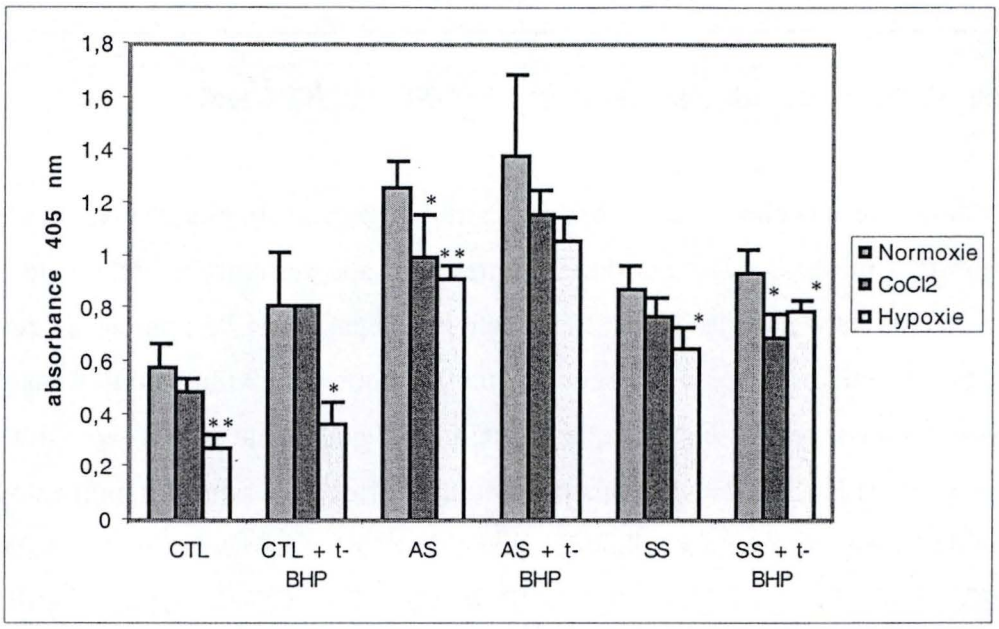


Figure III.9 : Effet de l'hypoxie et du $CoCl_2$ sur la fragmentation de l'ADN induite par le t-BHP et/ou la déprivation de sérum. Les cellules Hepa C1 sont incubées 24 heures dans du milieu DMEM avec (CTL, AS) ou sans sérum (SS) puis 16 heures dans du milieu CO_2 indépendant avec (CTL) ou sans sérum (AS, SS) en présence ou en absence de t-BHP à 5.10^{-5} M et en normoxie, en présence de $CoCl_2$ (150 µM) ou en hypoxie. A la suite de ces incubations, une mesure de la fragmentation de l'ADN a été réalisée. Les résultats sont présentés en tant que moyennes ± 1 écart type pour n=3.
* ou ** : significativement différent du contrôle normoxie correspondant avec $P< 0,05$ ou $P< 0,01$ (test t de student).

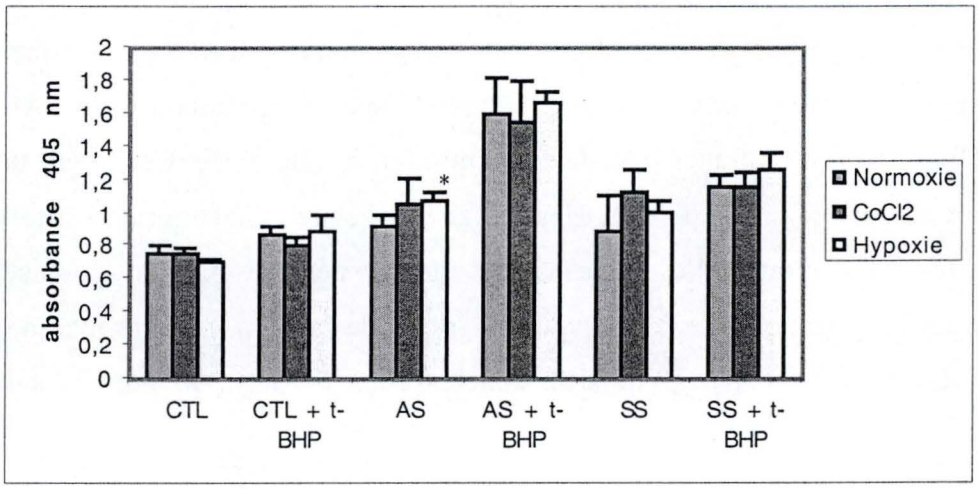


Figure III.10 : Effet de l'hypoxie et du $CoCl_2$ sur la fragmentation de l'ADN induite par le t-BHP et/ou la déprivation de sérum. Les cellules Hepa C4 sont incubées 24 heures dans du milieu DMEM avec (CTL, AS) ou sans sérum (SS) puis16 heures dans du milieu CO_2 indépendant avec (CTL) ou sans sérum (AS, SS) en présence ou en absence de t-BHP à 5.10^{-5} M et en normoxie, en présence de $CoCl_2$ (150 µM) ou en hypoxie. A la suite de ces incubations, une mesure de la fragmentation de l'ADN a été réalisée. Les résultats sont présentés en tant que moyennes ± 1 écart type pour n=3.
* ou ** : significativement différent du contrôle normoxie correspondant avec $P< 0,05$ ou $P< 0,01$ (test t de student).

Analyse des résultats

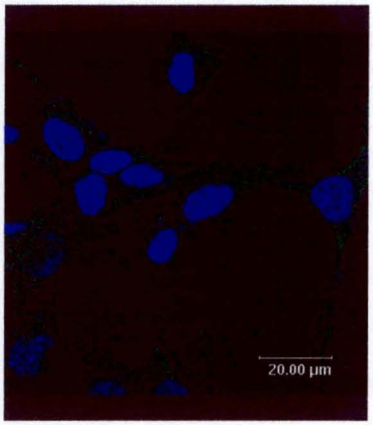
Pour cette expérience, les cellules Hepa C1 et C4 ont été incubées 24 heures dans du DMEM avec ou sans sérum puis incubées dans du milieu CO_2 indépendant avec ou sans sérum, en présence ou non de t-BHP pendant une durée de 16 heures. Les effets de la mise sous hypoxie ou l'ajout de cobalt sur l'apoptose induite par le t-BHP et la déprivation de sérum ont été étudiés.

- *Hepa C1* : Les résultats obtenus pour cette souche sont comparables à ceux obtenus pour les cellules HepG2. En d'autres termes, la fragmentation de l'ADN est faible dans la condition contrôle (CTL) et le $CoCl_2$ de même que l'hypoxie n'entraînent pas à eux seuls une induction de l'apoptose. L'ajout de t-BHP dans cette condition (CTL+ t-BHP) ne montre que peu d'effet suggérant que le sérum peut inhiber en partie les effets néfastes du t-BHP. L'hypoxie exerce un rôle protecteur contre l'apoptose induite par le t-BHP dans cette condition.

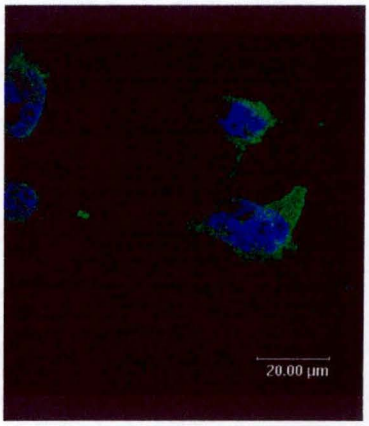
  Pour les cellules privées de sérum durant toute l'expérience (SS), les valeurs obtenues pour la fragmentation de l'ADN augmentent faiblement. L'ajout de t-BHP dans cette condition (SS+ t-BHP) ne provoque pas d'augmentation nette de la fragmentation de l'ADN. L'ajout de cobalt ou la mise sous hypoxie dans ces deux conditions entraînent une certaine diminution des valeurs d'absorbance suggérant un effet protecteur du chlorure de cobalt et de l'hypoxie contre l'apoptose induite dans ces conditions.

  Enfin, pour la condition intermédiaire (AS), une augmentation de la fragmentation de l'ADN est observée par rapport au contrôle. Les diminutions induites par le $CoCl_2$ ou l'hypoxie se retrouvent également mais de façon plus significative. L'ajout de t-BHP (AS+ t-BHP) n'entraîne qu'une faible augmentation de la fragmentation de l'ADN et l'hypoxie ou le $CoCl_2$ sembleraient inhiber cette augmentation.

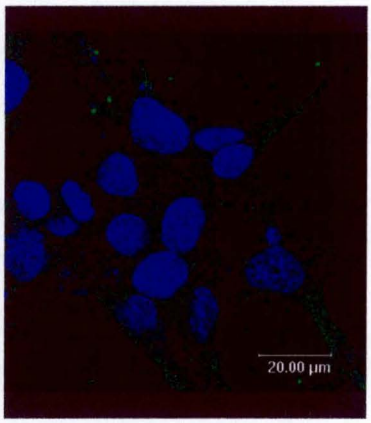
- *Hepa C4 ARNT-/-* : L'ajout de t-BHP induit une augmentation de la fragmentation de l'ADN dans les cellules incubées en présence de sérum pendant les 24 heures précédent l'incubation en absence de sérum (AS). La mise sous hypoxie ou l'ajout de $CoCl_2$ ne protègent pas contre l'apoptose induite par l'ajout de t-BHP. Il est important de noter que les cellules Hepa C4 prolifèrent plus vite que les cellules Hepa C1 et semblent moins sensibles que celles-ci à l'apoptose induite par la déprivation de sérum. La raison de ce comportement n'est pas connue.



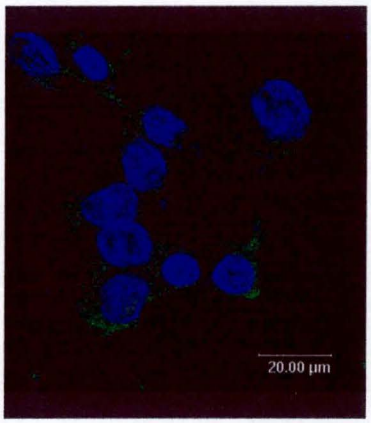
NSS



NSS+t-BHP



SS+$CoCl_2$



SS+$CoCl_2$+t-BHP

Figure III.11 : Effet de l'hypoxie et du cobalt sur l'activation de la caspase 3 induite par le t-BHP. Les cellules Hepa C1 ont été incubées 24 heures dans du milieu DMEM sans sérum (SS) puis 10 heures dans du milieu CO_2 indépendant sans sérum, en présence ou en absence de t-BHP à 5.10^{-5}M en normoxie (N), en présence de $CoCl_2$ (150 µM) ou en hypoxie (H). Les cellules ont ensuite été fixées et la caspase 3 active a été détectée par immunofluorescence (vert). Les noyaux ont été colorés au TO-PRO-3 (bleu).

Discussion

Les résultats décrits ci-dessus montrent que l'hypoxie et le cobalt protègent les cellules Hepa C1 qui possèdent un facteur HIF-1 actif de l'apoptose induite par le t-BHP ou par la déprivation de sérum. Par contre, les cellules Hepa C4, qui ne possèdent pas de HIF-1 fonctionnel, ne sont pas protégées.

Cette expérience fournit donc un argument important suggérant que HIF-1 serait responsable des protections observées tant morphologiquement qu'expérimentalement en hypoxie ou en présence de cobalt. HIF-1, une fois actif, jouerait donc un rôle anti-apoptotique.

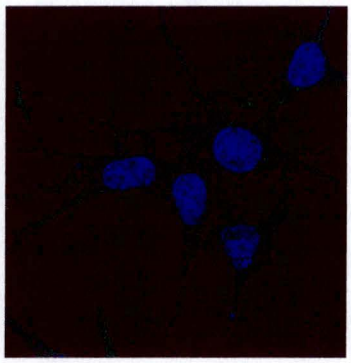
Afin de vérifier ces résultats, une expérience a été réalisée en suivant l'activation de la caspase 3 dans les cellules Hepa C1 et C4 par marquage en immunofluorescence.

III.2.7 Etude de l'activité des caspases sur les cellules Hepa

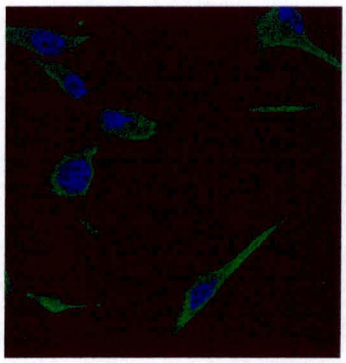
Le marquage de la caspase 3 active en immunofluorescence a été réalisé pour les deux souches et ce, pour la condition dans laquelle les cellules ont été privées de sérum durant toute l'expérience (SS). Comme pour la mesure de la fragmentation de l'ADN, certaines mises au point ont dû être effectuées. Rappelons que l'activation des caspases précède la fragmentation de l'ADN. Ainsi, le temps d'incubation des cellules en présence de t-BHP est passé de 3 heures pour les HepG2 à 10 heures pour les deux souches Hepa. D'autre part, le nombre de cellules par puits a dû être augmenté parce que les cellules Hepa n'adhèrent pas bien aux lames porte-objet. Les résultats de cette expérience sont illustrés à la figure III.11 pour les Hepa C1 et à la figure III.12 pour les Hepa C4.

Analyse des résultats

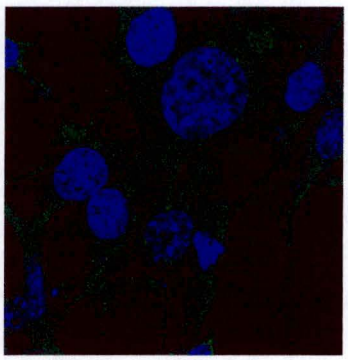
- *Hepa C1* : Le marquage de la caspase 3 active dans les cellules contrôles est très faible indiquant que la caspase 3 n'est pas active dans cette condition. En revanche, l'incubation en présence de t-BHP (NSS+ t-BHP) pendant 10 heures augmentent nettement l'activation de la caspase 3. Le chlorure de cobalt à lui seul (SS+$CoCl_2$) n'induit pas d'activation de la caspase 3. Par contre, le cobalt diminue nettement l'intensité du marquage par rapport aux cellules incubées en présence de t-BHP suggérant une inhibition par le cobalt de l'activation des caspases induite par le t-BHP. Les lames correspondant aux conditions



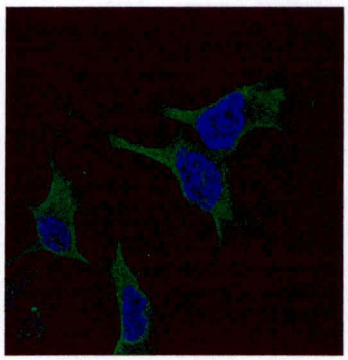
NSS



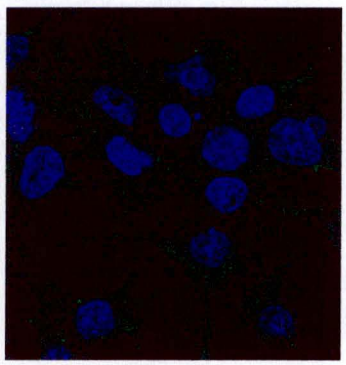
NSS+t-BHP



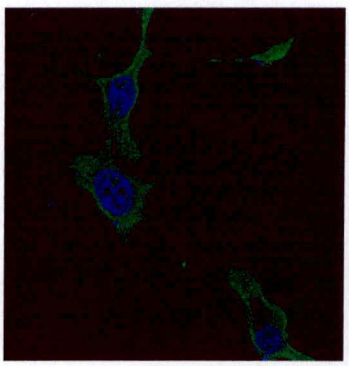
SS+$CoCl_2$



SS+$CoCl_2$+t-BHP



HSS



HSS+t-BHP

<u>Figure III.12</u> : Effet de l'hypoxie et du cobalt sur l'activation de la caspase 3 induite par le t-BHP. Les cellules Hepa C4 ARNT-/- ont été incubées 24 heures dans du milieu DMEM sans sérum (SS) puis 10 heures dans du milieu CO_2 indépendant sans sérum, en présence ou en absence de t-BHP à 5.10^{-5}M en normoxie (N), en présence de $CoCl_2$ (150 µM) ou en hypoxie (H). Les cellules ont ensuite été fixées et la caspase 3 active a été détectée par immunofluorescence (vert). Les noyaux ont été colorés au TO-PRO-3 (bleu).

d'hypoxie n'ont pu être analysées pour les cellules Hepa C1 car les cellules n'étaient pas bien fixées.

- *Hepa C4 ARNT-/-* : Le marquage de la caspase 3 active dans les cellules contrôles est très faible. Lorsque le t-BHP est ajouté aux cellules, un marquage nettement plus intense est observé suggérant une activation de la caspase 3 dans cette condition. Le cobalt et l'hypoxie n'influencent pas par eux-mêmes l'activation de la caspase 3. Le cobalt ne modifie pas l'intensité du marquage induit par le t-BHP. Le cobalt ne protègerait donc pas les cellules de l'effet du t-BHP dans cette souche. D'une manière similaire, l'hypoxie ne diminue pas l'activation de la caspase 3 provoquée par le t-BHP. L'hypoxie, tout comme le $CoCl_2$, ne protègerait donc pas les cellules de l'effet du t-BHP dans cette souche.

Discussion

Les résultats de cette étude en immunofluorescence apportent un argument supplémentaire suggérant un rôle du facteur de transcription HIF-1 dans la protection de l'apoptose induite par le t-BHP. En effet, dans la souche Hepa C1 qui peut exprimer HIF-1, le $CoCl_2$ peut inhiber l'activation de la caspase 3 induite par le t-BHP. Il reste à vérifier que l'hypoxie a le même effet. En revanche, pour la souche Hepa C4 qui ne peut pas activer HIF-1, ni le $CoCl_2$ ni l'hypoxie ne peuvent empêcher l'activation de la caspase 3, mise en évidence par un marquage en immunofluorescence.

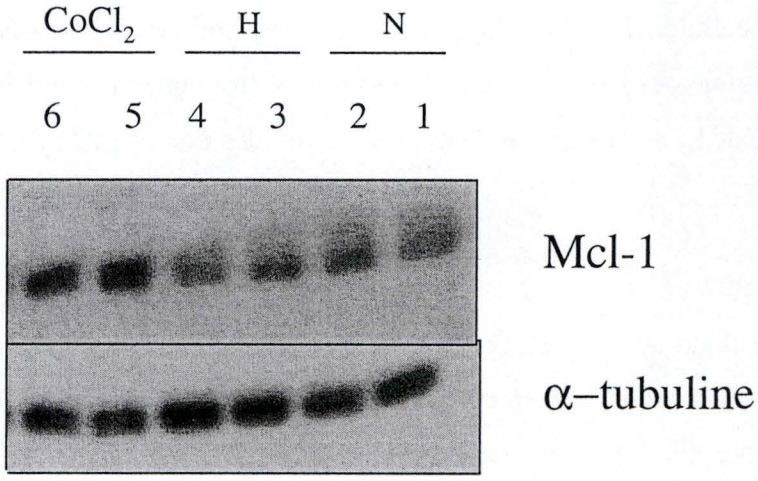


Figure III.13 : Effet de l'hypoxie et du cobalt sur l'expression de Mcl-1. Les cellules HepG2 ont été incubées 24 heures dans du milieu DMEM sans sérum puis 3 heures dans du milieu CO_2 indépendant sans sérum, avec (pistes 2, 4, 6) ou sans (pistes 1, 3, 5) t-BHP, en normoxie (N), en présence de $CoCl_2$ (150 µM) ou en hypoxie (H). Elles ont ensuite été lysées et l'abondance de la protéine Mcl-1 a été détectée dans les extraits cellulaires par Western blot.

Un contrôle de charge a été réalisé grâce à la révélation de l'α-tubuline.

III.3 Mise en évidence d'une régulation de protéines anti-apoptotiques par HIF-1

L'ensemble des résultats présentés jusqu'à présent avaient pour but de caractériser le rôle anti-apoptotique du facteur de transcription HIF-1. Comme les résultats indiquent que ce facteur serait directement impliqué dans la protection apportée par l'hypoxie ou le cobalt contre l'apoptose induite par deux stimuli différents, nous avons, dans la dernière partie de ce travail, tenté de mettre en évidence un effet de l'hypoxie ou du cobalt sur l'expression de protéines anti-apoptotiques. Ces expériences ont pour but de déterminer le mécanisme par lequel HIF-1 pourrait exercer son effet anti-apoptotique.

Pour ce faire, l'expression de deux protéines connues dans la littérature pour avoir un rôle anti-apoptotique a été étudiée dans nos conditions. Il s'agit de Mcl-1 et de Bcl-2, deux protéines appartenant à la famille Bcl-2. Nous avons décidé de nous intéresser à ces deux protéines car il est décrit dans la littérature que l'expression des protéines Mcl-1 (Leuenroth *et al.*, 2000a; Leuenroth *et al.*, 2000b) et Bcl-2 (Park *et al.*, 2002) augmente en hypoxie.

Comme pour les expériences précédentes, nous avons tout d'abord étudié l'expression de ces deux protéines dans les cellules HepG2. Deux approches expérimentales différentes ont été envisagées : une étude par Western blot et une étude par immunofluorescence. Dans un deuxième temps, l'expression de Mcl-1 a été suivie par immunofluorescence dans les deux souches de la lignée cellulaire Hepa.

III.3.1 Etude par Western blot

III.3.1.1 Expression de Mcl-1

L'étude de l'expression de la protéine Mcl-1 a été réalisée à différents temps en fonction des conditions expérimentales. Ainsi, dans un premier temps, nous nous sommes limités à la condition dans laquelle les cellules HepG2 sont privées de sérum pendant l'incubation et les 24 heures qui la précèdent (SS) et l'effet de l'hypoxie et du $CoCl_2$ a été étudié en absence et en présence de t-BHP. Nous avons choisi un temps de 3 heures d'incubation dans du milieu CO_2 indépendant dans un premier temps car une protection de

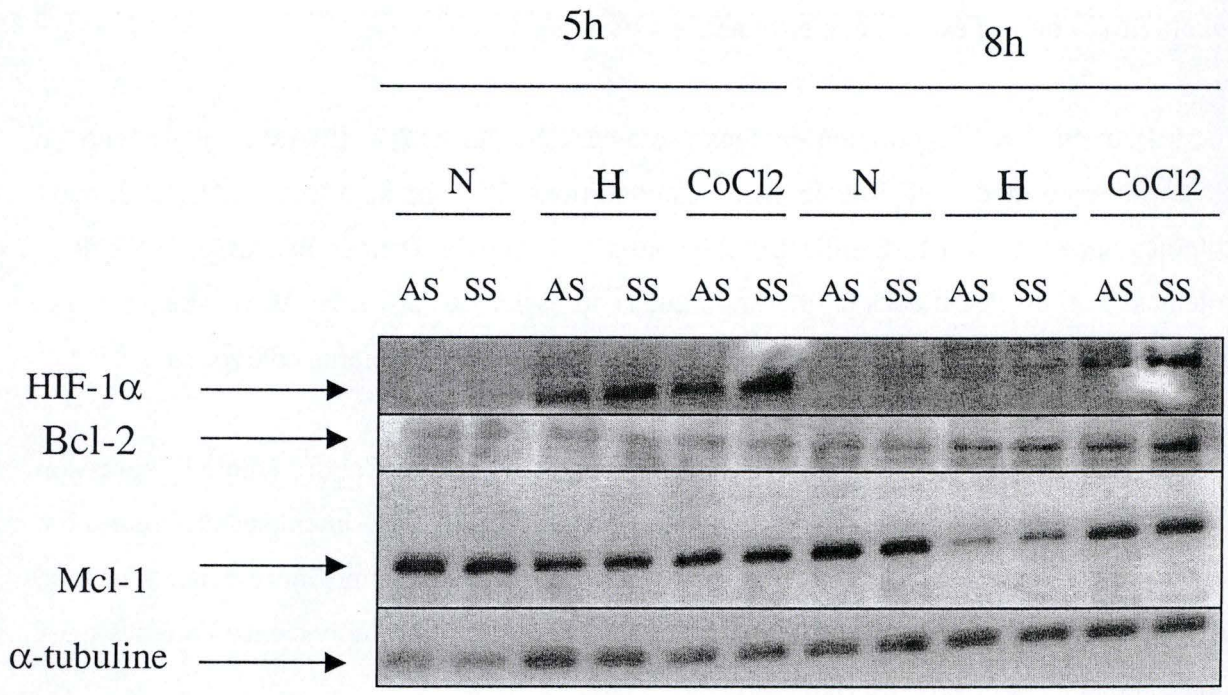


Figure III.14 : Effet de l'hypoxie et du cobalt sur l'expression de Mcl-1, de Bcl-2 et de HIF-1α. Les cellules HepG2 ont été incubées 24 heures dans du milieu DMEM avec (AS) ou sans sérum (SS) puis 5 heures ou 8 heures dans du milieu CO_2 indépendant sans sérum, en normoxie (N), en présence de $CoCl_2$ (150 µM) ou en hypoxie (H). Elles ont ensuite été lysées et l'abondance des protéines Mcl-1, Bcl-2 et HIF-1α a été détectée dans les extraits cellulaires par Western blot.

Un contrôle de charge a été réalisé grâce à la révélation de l'α-tubuline.

l'activation des caspases induite par le t-BHP est déjà observée à ce moment, ce qui signifie que le mécanisme anti-apoptotique est déjà en place. Par la suite, nous avons allongé les temps d'incubation pour voir si l'effet était maintenu dans le temps. Deux temps d'incubation différents ont été testés. Ainsi, nous avons choisi d'incuber les HepG2 pendant 5 heures et 8 heures à la fois pour la condition dans laquelle les cellules sont privées de sérum pendant l'incubation et les 24 heures qui la précèdent (SS) mais aussi pour la condition intermédiaire dans laquelle les cellules ne sont privées de sérum que lors de l'incubation (AS). Les résultats sont présentés aux figures III.13 et III.14.

Analyse des résultats

Comme le montre la figure III.13. La protéine Mcl-1 est présente dans les cellules incubées 3 heures en normoxie (piste 1). Après 3 heures d'incubation, une augmentation de l'expression de Mcl-1 est observée lorsque les cellules sont incubées en présence de cobalt (piste 5). Le t-BHP ne semble pas influencer cette augmentation (piste 6). Par contre, l'hypoxie ne semble pas influencer l'expression de Mcl-1 après 3 heures d'incubation (pistes 3 et 4). Un contrôle de charge a été effectué en révélant la protéine α-tubuline. Il montre que la charge est équivalente pour chaque condition.

Afin de voir si des temps d'incubation plus longs pouvaient accentuer l'effet observé à 3 heures, des temps de 5 heures et 8 heures ont ensuite été testés. De plus, nous avons comparés cet effet sur des cellules ayant été privées de sérum 24 heures avant l'incubation (SS) aux cellules qui ne l'ont pas été (AS). Nous avons également révélé la protéine HIF-1α dans ces conditions. Les résultats sont illustrés à la figure III.14 montrent que 5 heures et 8 heures d'incubation en hypoxie ou en présence de $CoCl_2$ permettent bien la stabilisation de HIF-1α dans les deux conditions AS et SS. Après 5 heures d'incubation, aucune différence du niveau d'expression de Mcl-1 n'est observée ni pour l'hypoxie, ni suite à l'ajout de $CoCl_2$. Après 8 heures d'incubation, nous observons une diminution de Mcl-1 dans les cellules ayant été incubées sous hypoxie.

Discussion

Ces résultats montrent que le $CoCl_2$ induit une augmentation transitoire de l'expression de Mcl-1 qu'on observe après 3 heures d'incubation mais plus à des temps plus longs. En revanche, l'hypoxie n'induit pas cet effet et semble diminuer l'expression de Mcl-1 après des temps longs d'incubation.

III.3.1.2 Expression de Bcl-2

L'étude de l'expression de Bcl-2 a également été réalisée par Western blot sur des extraits protéiques de cellules HepG2 incubées 5 heures ou 8 heures en hypoxie ou en présence de cobalt. Un contrôle de charge a été réalisé en révélant l'α-tubuline.

Analyse des résultats

Après 5 heures d'incubation, une faible augmentation de l'expression de Bcl-2 en hypoxie et en présence de $CoCl_2$ est observée. Après 8 heures d'incubation, cette augmentation de l'expression de Bcl-2 est plus marquée surtout en présence de $CoCl_2$.

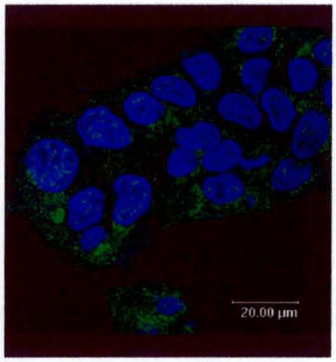
Discussion

L'expression de Bcl-2 semble augmenter suite à une incubation des cellules sous hypoxie ou en présence de $CoCl_2$ et ce, déjà après 5 heures d'incubation. Cette augmentation de l'expression de Bcl-2 est plus marquée pour des temps d'incubation plus longs.

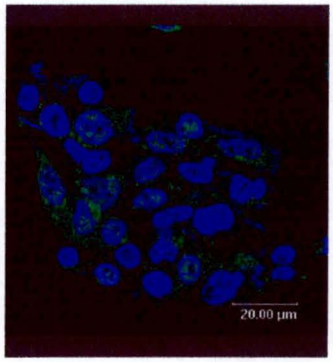
III.3.2 Etude par immunofluorescence

III.3.2.1 Marquage de Mcl-1 dans les HepG2

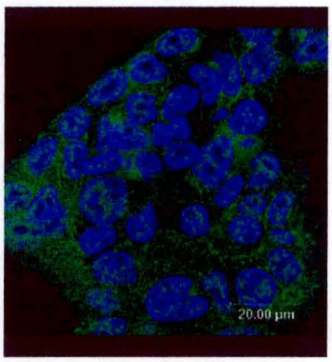
Etant donné qu'une augmentation de l'expression de Mcl-1 est observée après 3 heures d'incubation en présence de $CoCl_2$ mais pas en hypoxie, nous avons voulu confirmer ces résultats en utilisant une autre technique, l'immunofluorescence.



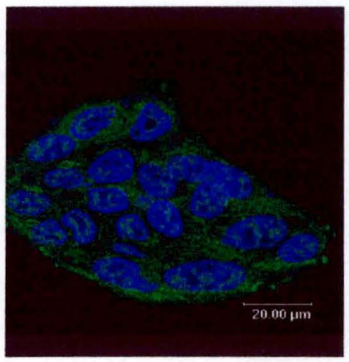
NSS



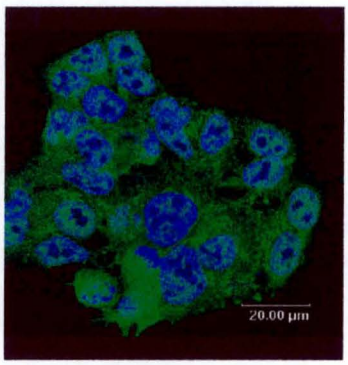
NSS+t-BHP



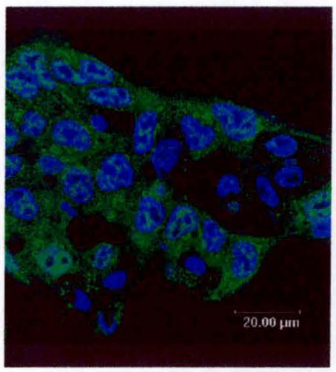
SS+$CoCl_2$



SS+t-BHP+$CoCl_2$



HSS



HSS+t-BHP

Figure III.15 : Effet de l'hypoxie et du cobalt sur la quantité de la protéine Mcl-1. Les cellules HepG2 ont été incubées 24 heures dans du milieu DMEM sans sérum (SS) puis 3 heures dans du milieu CO_2 indépendant sans sérum, en présence ou en absence de t-BHP à 5.10^{-5} M en normoxie (N), en présence de $CoCl_2$ (150 µM) ou en hypoxie (H). Les cellules ont ensuite été fixées et la protéine Mcl-1 a été détectée par immunofluorescence (vert). Les noyaux ont été colorés au TO-PRO-3 (bleu).

Afin d'étudier l'expression de Mcl-1 par immunofluorescence, nous avons repris les mêmes conditions expérimentales que celles utilisées pour le Western blot. Les cellules HepG2 sont incubées 24 heures dans du milieu DMEM sans sérum, puis incubées 3 heures avec du milieu CO_2 indépendant sans sérum, en normoxie, en hypoxie ou en présence de $CoCl_2$ et en présence ou non de t-BHP. Les résultats du marquage sont présentés à la figure III.15.

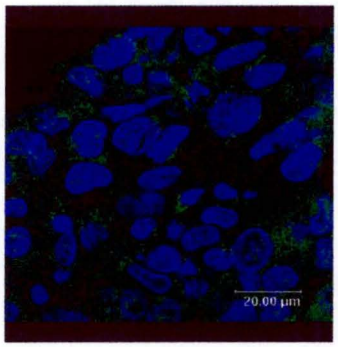
Analyse des résultats

On observe un léger marquage des cellules contrôles (NSS) attestant une expression constitutive faible de Mcl-1. Le t-BHP à lui seul (NSS+ t-BHP) n'influence pas ce marquage. Ceci montre que le t-BHP seul ne change pas l'expression de Mcl-1. En revanche, l'ajout de $CoCl_2$ (SS+$CoCl_2$) entraîne une augmentation du marquage suggérant une augmentation de l'expression de Mcl-1. Le t-BHP n'a pas d'influence sur cette augmentation. L'hypoxie, avec ou sans t-BHP (HSS ; HSS+ t-BHP), entraîne un marquage très important suggérant qu'elle augmente de façon nette l'expression de Mcl-1.

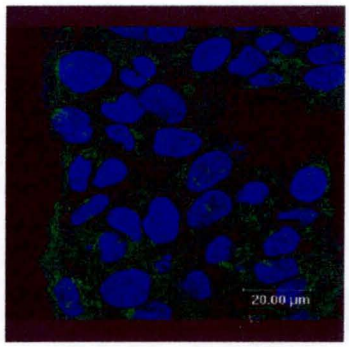
Discussion

Ces résultats indiquent que les conditions qui activent HIF-1 (mise sous hypoxie et ajout de $CoCl_2$) entraînent une augmentation de la quantité de Mcl-1 après 3 heures d'incubation. Il faut cependant noter que si une augmentation de la quantité de Mcl-1 par l'hypoxie est observée en immunofluorescence, aucun effet n'avait été noté lorsque l'abondance de la protéine Mcl-1 avait été analysée par Western blot. La raison de cette discordance n'est pas connue.

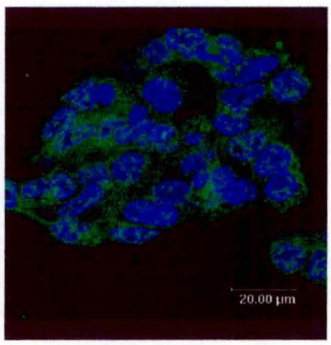
Parallèlement, une expérience similaire a été réalisée en incubant les HepG2 durant 24 heures dans du milieu DMEM avec sérum puis 6 heures dans du milieu CO_2 indépendant sans sérum en normoxie, en hypoxie ou en présence de $CoCl_2$ et en présence ou non de t-BHP. Les résultats sont illustrés à la figure III.16.



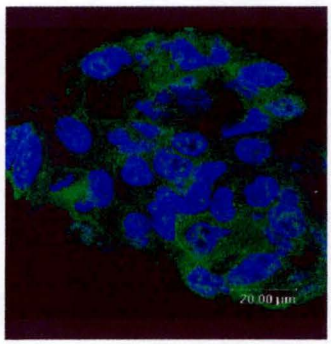
NAS



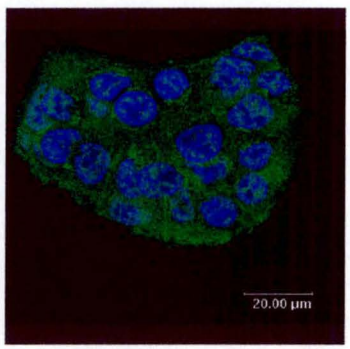
NAS+t-BHP



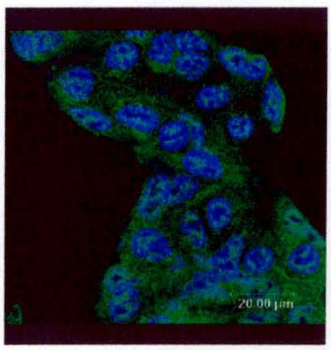
AS+$CoCl_2$



AS+t-BHP+$CoCl_2$



HAS



HAS+t-BHP

Figure III.16 : Effet de l'hypoxie et du cobalt sur la quantité de la protéine Mcl-1. Les cellules HepG2 ont été incubées 24 heures dans du milieu DMEM avec sérum (AS) puis 6 heures dans du milieu CO_2 indépendant sans sérum, en présence ou en absence de t-BHP à 5.10^{-5} M en normoxie (N), en présence de $CoCl_2$ (150 µM) ou en hypoxie (H). Les cellules ont ensuite été fixées et la protéine Mcl-1 a été détectée par immunofluorescence (vert). Les noyaux ont été colorés au TO-PRO-3 (bleu).

Analyse des résultats

Comme pour la condition précédente, les cellules incubées 6 heures sans sérum (NAS) montrent un marquage de Mcl-1 faible. Le t-BHP à lui seul (NAS+ t-BHP) ne provoque pas de changement de la quantité de Mcl-1. L'ajout de $CoCl_2$ (AS+$CoCl_2$) entraîne une augmentation de l'intensité du marquage suggérant une augmentation de l'expression de Mcl-1 par le cobalt. Le t-BHP n'influence pas cette augmentation. Pour ce qui est de l'hypoxie, avec ou sans t-BHP (HSS; HSS+ t-BHP), le signal du marquage est très intense, indiquant que l'hypoxie augmente fortement l'expression de Mcl-1.

Discussion

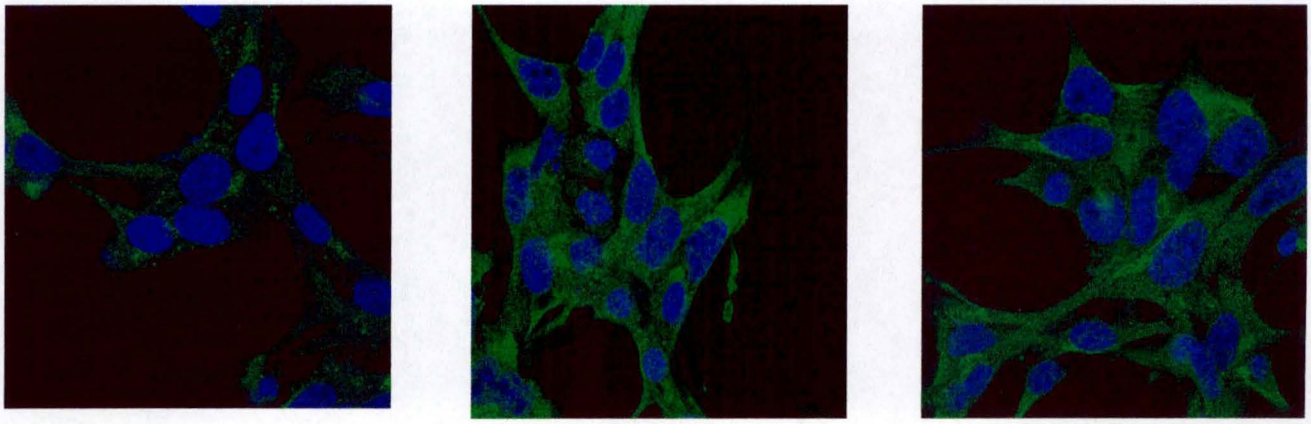
Comme pour l'expérience précédente, le cobalt et l'hypoxie induisent une augmentation de la quantité de Mcl-1 dans les cellules HepG2 après un temps d'incubation de 6 heures. De nouveau, la raison de la différence concernant les effets du cobalt et de l'hypoxie observée entre le Western blot et l'immunofluorescence n'est pas connue.

III.3.2.2 Expression de Mcl-1 chez les cellules Hepa

L'hypoxie et le cobalt semblent augmenter l'expression de la protéine anti-apoptotique Mcl-1 dans les cellules HepG2. Si nous avons montré que ces conditions conduisent à l'activation de HIF-1, nous n'avons pas la preuve que c'est bien via HIF-1 que l'hypoxie et le cobalt augmentent l'expression de Mcl-1. Afin de répondre à cette question, nous avons à nouveau utilisé les cellules Hepa C1 et C4 déficientes pour ARNT et comparé l'effet de l'hypoxie et du cobalt sur l'expression de Mcl-1 dans ces deux souches cellulaires.

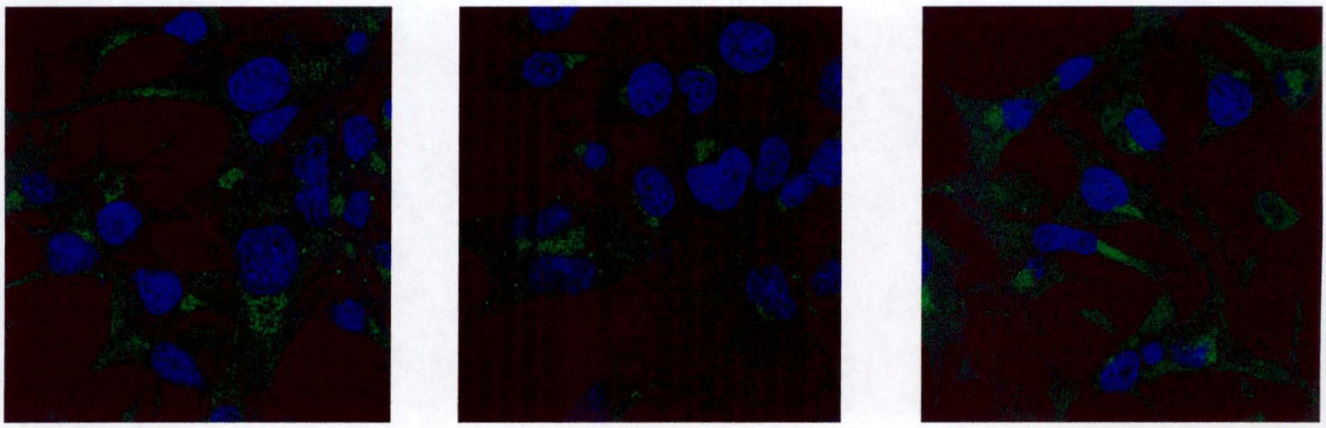
Pour cette étude, le modèle expérimental est le suivant :
Les cellules Hepa sont repiquées le premier jour dans du milieu DMEM avec sérum à raison de 40.000 cellules par puits. Le jour suivant, le milieu est renouvelé par du milieu DMEM frais sans sérum pour une durée de 24 heures. Enfin, le dernier jour, les cellules sont incubées, en normoxie, en hypoxie ou en présence de $CoCl_2$, dans du milieu CO_2 indépendant et ce pour une durée de 10 heures (figure III.17) ou de 16 heures (figure III.18). Suite à ces incubations, un marquage de la protéine Mcl-1 en immunofluorescence a été réalisé.

A) Hepa C1



NSS SS+$CoCl_2$ HSS

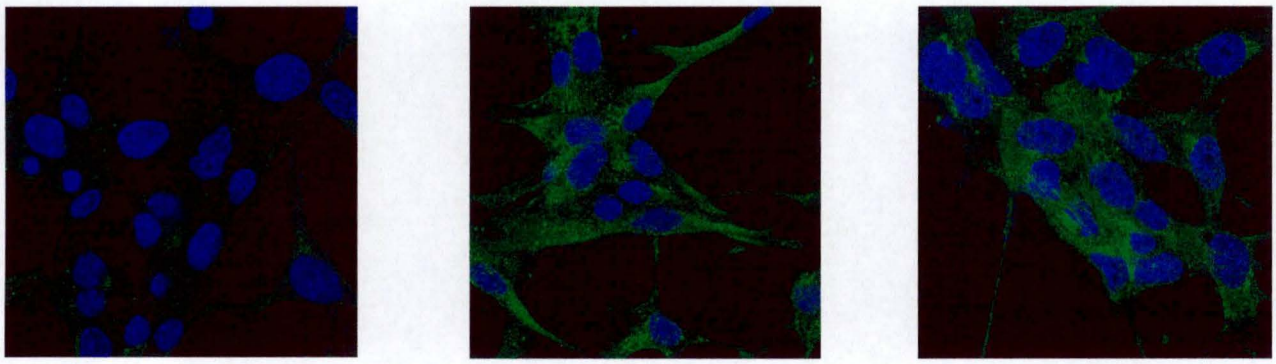
B) Hepa C4 ARNT-/-



NSS SS+$CoCl_2$ HSS

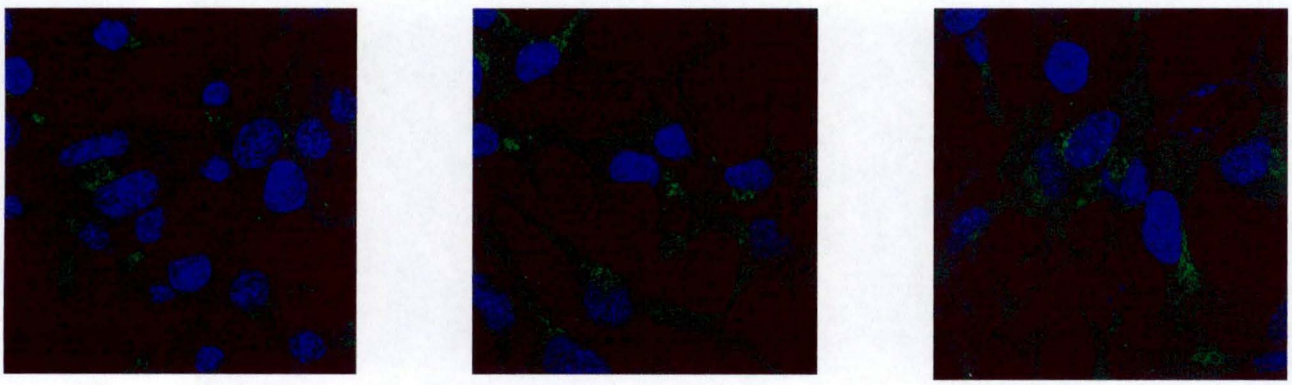
Figure III.17 : Effet de l'hypoxie et du cobalt sur la quantité de la protéine Mcl-1. Les cellules Hepa C1 et C4 ont été incubées 24 heures dans du milieu DMEM sans sérum puis 10 heures dans du milieu CO_2 indépendant sans sérum, en normoxie (N), en présence de $CoCl_2$ (150 µM) ou en hypoxie (H). Les cellules ont ensuite été fixées et la protéine Mcl-1 a été détectée par immunofluorescence (vert). Les noyaux ont été colorés au TO-PRO-3 (bleu).

A) Hepa C1



NSS **NSS+$CoCl_2$** **HSS**

B) Hepa C4 ARNT-/-



NSS **NSS+$CoCl_2$** **HSS**

Figure III.18 : Effet de l'hypoxie et du cobalt sur la quantité de la protéine Mcl-1. Les cellules Hepa C1 et C4 ont été incubées 24 heures dans du milieu DMEM sans sérum puis 16 heures dans du milieu CO_2 indépendant sans sérum, en normoxie (N), en présence de $CoCl_2$ (150 µM) ou en hypoxie (H). Les cellules ont ensuite été fixées et la protéine Mcl-1 a été détectée par immunofluorescence (vert). Les noyaux ont été colorés au TO-PRO-3 (bleu).

Analyse des résultats

- *Hepa C1* : L'expression de Mcl-1 est faible dans les cellules Hepa C1 incubées en normoxie. Par contre, la mise sous hypoxie ainsi que l'ajout de $CoCl_2$ provoquent une augmentation nette de l'intensité du marquage pour Mcl-1. Des résultats similaires sont obtenus après 10 et 16 heures d'incubation.

- *Hepa C4 ARNT-/-* : L'expression de Mcl-1 est faible dans les cellules Hepa C4 ARNT-/- en condition de normoxie. Après 10 heures d'incubation, ni la mise sous hypoxie, ni l'ajout de chlorure de cobalt ne provoque d'augmentation du marquage de Mcl-1 par rapport aux cellules maintenues en normoxie. Les mêmes observations peuvent être réalisées après 16 heures d'incubation.

Discussion

Dans la souche déficiente pour la sous-unité ARNT de HIF-1, l'hypoxie et le cobalt, deux inducteurs de HIF-1, n'entraînent pas d'augmentation de l'expression de Mcl-1 contrairement à ce qui est observé pour la souche sauvage Hepa C1.

Cette étude par immunofluorescence sur les cellules Hepa apportent donc un argument qui indique que le facteur de transcription HIF-1 pourrait être impliqué dans l'augmentation de l'expression du gène anti-apoptotique Mcl-1 lorsque les cellules sont incubées sous hypoxie ou en présence de $CoCl_2$.

Conclusion et Perspectives

IV. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Lorsque la concentration en O_2 diminue dans l'environnement, la cellule perçoit ce changement grâce à un senseur à oxygène. En situation d'hypoxie, ce senseur est à la base d'une série d'adaptations des cellules visant à maintenir leur homéostasie. Ces adaptations consistent à court terme en une réorientation du métabolisme énergétique aérobie vers la glycolyse, et à plus long terme, en une augmentation de la synthèse de facteurs de croissance tels que l'EPO et le VEGF responsables respectivement de l'érythropoïèse et de la néoangiogenèse.

L'activation du facteur de transcription HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor-1) constitue une des étapes clé de la voie de transduction induite par l'hypoxie. Ce facteur joue un rôle essentiel dans la réponse adaptative des cellules à l'hypoxie en augmentant l'expression des gènes cités ci-dessus. HIF-1 est un hétérodimère constitué de la sous-unité HIF-1α et de la sous-unité ARNT. Seule la sous-unité HIF-1α est régulée par l'hypoxie.

En plus de son rôle dans l'adaptation des cellules à l'hypoxie, certaines données de la littérature suggèrent que HIF-1 serait impliqué dans la modulation de l'apoptose. Cette hypothèse a été émise suite à une série de recherches réalisées ces dernières années sur des cellules cancéreuses. En effet, lorsqu'une tumeur se développe, les régions situées au centre de cette tumeur subissent une diminution de l'apport en O_2 et en glucose suite à la faible vascularisation dans ces régions.

Dans ces zones hypoxiques, HIF-1 est activé et augmente l'expression du VEGF qui va agir sur les capillaires adjacents pour initier la néovascularisation de ces zones hypoxiques. Ce faisant, il favorise la croissance de la tumeur ainsi que la dispersion des cellules tumorales pour former des métastases.

La croissance tumorale des cellules déficientes pour HIF-1α est soit favorisée, soit ralentie selon les travaux décrits dans la littérature. La croissance serait défavorisée parce que lorsque HIF-1 n'est pas présent, les cellules tumorales ne produisent plus de VEGF en réponse à l'hypoxie et la tumeur n'est pas irriguée (Ryan *et al.*, 1998). D'autre part, Carmeliet et son équipe montrent quant à eux que la croissance est favorisée parce que les cellules

dépourvues de HIF-1α sont protégées de l'apoptose (Carmeliet *et al.*, 1998). Le rôle pro-apoptotique de HIF-1 est attribué à sa capacité de stabilisation de p53, une protéine pro-apoptotique (An *et al.*, 1998). Cependant, Akakura et son équipe montrent que dans certaines conditions, HIF-1α protège les cellules de l'apoptose (Akakura *et al.*, 2001). Le rôle de HIF-1 dans la régulation de l'apoptose reste donc très controversé.

Sur base de ces différentes données, Suzuki et son équipe ont établi un modèle qui tente de concilier à la fois le rôle pro-apoptotique et le rôle anti-apoptotique de HIF-1 (Suzuki *et al.*, 2001). Selon lui, le rôle de HIF-1 dans la modulation de l'apoptose varierait en fonction du degré et/ou de la durée de l'hypoxie. Ainsi, en situation d'hypoxie sévère (0,1% O_2) ou prolongée, HIF-1 aurait un rôle pro-apoptotique alors qu'en situation d'hypoxie légère, il aurait plutôt un rôle anti-apoptotique.

Le but de ce mémoire consistait dans un premier temps à mettre en évidence et caractériser le rôle anti-apoptotique du facteur de transcription HIF-1 en réponse à l'hypoxie légère. Dans un deuxième temps, nous avons tenté d'apporter des éléments qui pourraient expliquer le mécanisme par lequel HIF-1 exercerait son effet anti-apoptotique.

La première étape fut de s'assurer que la sous-unité HIF-1α était bien stabilisée dans nos conditions expérimentales. Pour ce faire, la stabilisation de HIF-1α sur les cellules HepG2 a été suivie par Western blot et par immunofluorescence lorsque les cellules sont incubées sous hypoxie ou en présence de $CoCl_2$ (hypoxie chimique). Les résultats révèlent que l'abondance de cette sous-unité est augmentée, ce qui indique que HIF-1α est bien stabilisé et ce après seulement 3 heures d'incubation en hypoxie ou en présence de $CoCl_2$. Elle est de plus transloquée du cytosol vers le noyau en réponse à l'hypoxie ou au $CoCl_2$ La stabilisation de cette sous-unité est donc un phénomène précoce.

Puisque nous avons observé que l'hypoxie ou la présence de cobalt induisait bien la stabilisation de HIF-1α, nous pouvions donc étudier si ces deux conditions dans lesquelles HIF-1 est activé pouvaient protéger les cellules de l'apoptose. Lors de ce travail, deux stimuli différents induisant l'apoptose ont été utilisés : le ter-butyl hydroperoxyde (t-BHP) et la déprivation de sérum.

Le t-BHP est un hydroperoxyde capable de générer des espèces réactives dérivées de l'oxygène provoquant l'initiation de la peroxydation lipidique. Cette dernière conduit à la perte de l'intégrité membranaire qui peut, si elle est trop importante, conduire à la mort des cellules (Rubin *et al.*, 1984). Le t-BHP peut aussi conduire à la mort cellulaire en faisant chuter la production d'ATP (Nieminen *et al.*, 1997).

La présence de sérum retarde l'apparition du processus d'apoptose. Le sérum utilisé pour la culture cellulaire contient entre autres des facteurs de croissance. Or, nous avons vu dans l'introduction que les facteurs de croissance peuvent se fixer sur les cellules grâce à un récepteur situé dans la membrane plasmique. Il s'en suit une transduction du signal qui aboutit à l'activation de la kinase Akt. Cette kinase phosphoryle Bad, une protéine pro-apoptotique qui ne peut alors plus interagir au niveau de la membrane mitochondriale externe où elle est capable d'initier l'apoptose. La phosphorylation de Bad inhibe donc son action pro-apoptotique (Kelekar *et al.*, 1998). En retirant le sérum du milieu de culture, on enlève ainsi les facteurs externes favorisant la survie de la cellule, Akt n'est plus activée et Bad n'est plus phosphorylé. Il peut alors se fixer à Bax au niveau de la membrane mitochondriale externe et induire l'apoptose.

Que se soit en présence de t-BHP ou suite à la déprivation de sérum, les cellules HepG2 meurent par apoptose. Nous observons en effet une augmentation de l'activité des caspases et de la fragmentation de l'ADN. Les résultats montrent que l'hypoxie réelle ou chimique (ajout de $CoCl_2$) protège de l'apoptose induite par la déprivation de sérum et/ou l'ajout de t-BHP. Ainsi, on observe une inhibition de la fragmentation de l'ADN, de l'activité des caspases ainsi que de l'activation de la caspase 3 mise en évidence par immunofluorescence lorsque les cellules sont incubées en hypoxie ou en présence de $CoCl_2$.

Pour s'assurer que cet effet anti-apoptotique de l'hypoxie et du $CoCl_2$ observé au niveau des cellules HepG2 était bien dû à l'activation du facteur HIF-1, nous avons réalisé ces mêmes expériences sur les cellules Hepa sauvages ou déficientes pour la sous-unité ARNT du facteur de transcription HIF-1. Les résultats obtenus montrent que les protections observées pour les HepG2 se retrouvent pour la souche sauvage mais pas pour la souche ARNT-/-. Ceci suggère donc que la protection de l'hypoxie ou du $CoCl_2$ face à l'apoptose induite par la déprivation de sérum et/ou l'ajout de t-BHP est due à l'activation de HIF-1.

D'autres résultats obtenus par d'autres équipes montrent également que l'hypoxie peut protéger les cellules de l'apoptose. Ainsi, Dong et son équipe ont montré que l'hypoxie entraînait une augmentation de l'expression de IAP-2 (Inhibitor of Apoptosis Protein-2), une protéine anti-apoptotique (Dong *et al.*, 2001). Cependant, il semblerait que l'induction de IAP-2 par l'hypoxie soit indépendante de HIF-1 parce que le cobalt ne mime pas l'effet de l'hypoxie et parce que l'induction de IAP-2 par l'hypoxie est toujours observée dans des fibroblastes embryonnaires de souris déficients pour HIF-1α.

Une autre étude réalisée par Baek et son équipe montre que l'hypoxie protège les cellules HepG2 de l'apoptose induite par la déprivation de sérum (Baek *et al.*, 2000). Ces auteurs suggèrent que c'est en augmentant la sécrétion de VEGF que l'hypoxie protège de l'apoptose. Le VEGF agirait alors comme facteur de survie. En effet, ils observent que la protection apportée par l'hypoxie est inhibée par des anticorps neutralisants anti-VEGF ou par la présence d'inhibiteurs de la tyrosine kinase du recepteur au VEGF. Il serait donc très intéressant d'étudier, si dans nos conditions également, l'augmentation de l'expression du VEGF induite par l'hypoxie joue un rôle dans la protection apportée par l'hypoxie ou le $CoCl_2$.

Dans un deuxième temps, nous avons voulu étudier le mécanisme par lequel HIF-1 pourrait protéger les cellules de l'apoptose. Pour ce faire, l'expression de deux protéines anti-apoptotiques, Mcl-1 et Bcl-2, a été suivie lorsque les cellules sont incubées en hypoxie ou en présence de $CoCl_2$ dans nos conditions expérimentales.

Park et son équipe avaient déjà montré que l'hypoxie augmentait l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (Park *et al.*, 2002). Cette protéine pouvait donc être un candidat intéressant dans le cadre de ce travail.

Une augmentation de l'expression de Bcl-2 est observée au cours de temps croissants d'incubation. Ainsi, après 8 heures d'incubation, l'abondance de Bcl-2 est plus importante qu'après 5 heures d'incubation. Néanmoins, cette augmentation est tardive : Bcl-2 s'accumule après 8 heures alors que les caspases sont actives dans les mêmes conditions déjà après 3 heures d'incubation et qu'une protection peut déjà être observée à ce moment. Cette protection n'est donc probablement pas due à une augmentation de l'expression de Bcl-2. Néanmoins, une étude dans les mêmes conditions réalisée pour les cellules Hepa C1 et C4 afin de voir si Bcl-2 est régulé ou pas par HIF-1 reste très intéressante.

Comme Bcl-2 ne semble pas être impliqué, un autre mécanisme par lequel l'hypoxie et HIF-1 protègent les cellules doit être envisagé : Mcl-1 pourrait être un candidat dont l'expression serait augmentée par HIF-1 et qui inhiberait l'apoptose.
En effet, la protéine Mcl-1 est décrite dans la littérature pour être induite par l'hypoxie et ainsi supprimer l'apoptose des polymorphonucléaires neutrophiles (Leuenroth *et al.*, 2000b).
Pour Mcl-1, nous constatons une augmentation transitoire de son expression. En effet, suite à une étude par Western blot, on observe que l'abondance de cette protéine augmente après 3 heures d'incubation en présence de $CoCl_2$ mais pas suite à la mise sous hypoxie. Ensuite, plus aucune différence dans l'expression de Mcl-1 par rapport aux cellules contrôles maintenues en normoxie n'est observé après 5 heures d'incubation. En revanche, après 8 heures d'incubation, on observe même une diminution de l'abondance de la protéine Mcl-1 dans les cellules ayant été incubées sous hypoxie.
La diminution observée après 8 heures d'incubation en hypoxie peut s'expliquer par le fait que la protéine Mcl-1 a un temps de demi-vie relativement court et que l'hypoxie provoque une diminution de la synthèse protéique globale (Gorlach *et al.*, 2000).

Ces observations n'ont pas été confirmées par les études réalisées en immunofluorescence. En effet, une nette augmentation de la quantité de Mcl-1 est observée dans les cellules incubées en hypoxie et en présence de $CoCl_2$ après 3 heures et 6 heures d'incubation. Une hypothèse pourrait être émise pour expliquer cette discordance : le $CoCl_2$ étant un activateur artificiel, certains gènes pourraient être induits par le $CoCl_2$ et pas par l'hypoxie ou inversement. Il faut cependant noter que la quantité de Mcl-1 est également augmentée dans les cellules Hepa C1 incubées sous hypoxie ou en présence de $CoCl_2$. Cette augmentation n'est pas observée dans les cellules Hepa C4, déficientes pour ARNT, ce qui suggère que HIF-1 est nécessaire à cette induction.

Afin de confirmer l'incubation de Mcl-1 pour l'hypoxie et le $CoCl_2$, une PCR en temps réel (Real Time PCR) a été réalisée au laboratoire pour suivre la quantité de l'ARNm de Mcl-1 en normoxie ou en hypoxie. Il en ressort que la quantité d'ARNm codant pour Mcl-1 augmente en condition d'hypoxie ou suite à l'ajout de $CoCl_2$ après une incubation de 24 heures dans du milieu DMEM avec (AS) ou sans sérum (SS) suivie d'une incubation de 5 heures dans du milieu CO_2 indépendant sans sérum. Ces résultats confirment que l'hypoxie et le cobalt sont bien capables d'induire Mcl-1.

Les résultats décrits dans ce travail suggérant que HIF-1 joue un rôle anti-apoptotique tout au moins dans certaines conditions expérimentales. Cette protection s'observe lorsque l'apoptose est induite par des stimuli très différents, comme un stress oxydant ou la déprivation, de sérum. Afin de confirmer une implication directe de HIF-1 dans la protection contre l'apoptose induite chez les cellules HepG2 par le t-BHP et/ou la déprivation de sérum, il serait intéressant de développer des lignées stables de cellules surexprimant de manière constitutive la sous-unité HIF-1α du facteur de transcription HIF-1 ou un mutant dominant négatif de cette sous-unité. L'effet de ces protéines surexprimées sur l'apoptose induite par le t-BHP, la déprivation de sérum ou d'autres stimuli pro-apoptotiques sera ensuite étudié.

L'ensemble des résultats présentés ci-dessus, suggèrent que le facteur de transcription HIF-1, une fois activé, joue un rôle anti-apoptotique. Cette protection pourrait notamment être exercée par une régulation de l'expression de Mcl-1. Afin de confirmer une régulation positive du gènes codant pour Mcl-1 par HIF-1, il sera alors intéressant de "disséquer" le promoteur de ce gène (Mcl-1) pour voir s'il ne contient pas éventuellement de boîte(s) HRE (Hypoxia Responsive Element). On pourrait également inhiber l'expression de la protéine candidate et voir si on perd la protection.
Néanmoins, d'autres gènes codant pour des protéines anti-apoptotiques pourraient également être régulés par HIF-1.

Afin d'étudier ces gènes, deux approches peuvent être envisagées :

- Une approche à priori : en se référant à la littérature, il est aisé de trouver des gènes connus pour avoir un rôle anti-apoptotique. Ainsi, les membres de la famille IAP (ex : IAP-2) pourrait constituer une cible potentielle de HIF-1. Il faudrait alors étudier si à la suite d'une incubation en hypoxie, la protéine IAP-2 s'accumule et si elle intervient dans la protection anti-apoptotique.

- Une approche sans à priori : à partir d'extraits cellulaires ayant subi une incubation en normoxie ou en hypoxie, de l'ARN peut être extrait et rétro-transcrit en ADN complémentaire (cDNA). Il est ensuite aisé d'étudier quels sont les gènes qui sont surexprimés en hypoxie par exemple en utilisant des microdamiers à ADN. C'est en utilisant cette approche que Shoshani et son équipe ont mis en évidence la surexpression d'un gène pro-apoptotique (RTP801) en hypoxie (Shoshani *et al.*, 2002).

L'ensemble de ces expériences permettront d'apporter des renseignements quant aux mécanismes par lesquels HIF-1 exerce son effet anti-apoptotique. Le rôle physiologique de cette fonction de HIF-1 reste néanmoins à être déterminé.

Bibliographie

- Akakura N., M. Kobayashi, I. Horiuchi, A. Suzuki, J. Wang, J. Chen, H. Niizeki, K. Kawamura, M. Hosokawa and M. Asaka, *Constitutive expression of hypoxia-inducible factor-1alpha renders pancreatic cancer cells resistant to apoptosis induced by hypoxia and nutrient deprivation*, Cancer Res, 61, 6548-54., 2001.

- An W. G., M. Kanekal, M. C. Simon, E. Maltepe, M. V. Blagosklonny and L. M. Neckers, *Stabilization of wild-type p53 by hypoxia-inducible factor 1alpha*, Nature, 392, 405-8, 1998.

- Arany Z., L. E. Huang, R. Eckner, S. Bhattacharya, C. Jiang, M. A. Goldberg, H. F. Bunn and D. M. Livingston, *An essential role for p300/CBP in the cellular response to hypoxia*, Proc Natl Acad Sci U S A, 93, 12969-73, 1996.

- Baek J. H., J. E. Jang, C. M. Kang, H. Y. Chung, N. D. Kim and K. W. Kim, *Hypoxia-induced VEGF enhances tumor survivability via suppression of serum deprivation-induced apoptosis*, Oncogene, 19, 4621-31., 2000.

- Carmeliet P., Y. Dor, J. M. Herbert, D. Fukumura, K. Brusselmans, M. Dewerchin, M. Neeman, F. Bono, R. Abramovitch, P. Maxwell, C. J. Koch, P. Ratcliffe, L. Moons, R. K. Jain, D. Collen, E. Keshert and E. Keshet, *Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis*, Nature, 394, 485-90, 1998.

- Chandel N. S., D. S. McClintock, C. E. Feliciano, T. M. Wood, J. A. Melendez, A. M. Rodriguez and P. T. Schumacker, *Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1alpha during hypoxia: a mechanism of O2 sensing*, J Biol Chem, 275, 25130-8., 2000.

- Chaudhary D., K. O'Rourke, A. M. Chinnaiyan and V. M. Dixit, *The death inhibitory molecules CED-9 and CED-4L use a common mechanism to inhibit the CED-3 death protease*, J Biol Chem, 273, 17708-12, 1998.

- Desagher S. and J. C. Martinou, *Mitochondria as the central control point of apoptosis*, Trends Cell Biol, 10, 369-77., 2000.

- Dong Z., M. A. Venkatachalam, J. Wang, Y. Patel, P. Saikumar, G. L. Semenza, T. Force and J. Nishiyama, *Up-regulation of apoptosis inhibitory protein IAP-2 by hypoxia. Hif-1-independent mechanisms*, J Biol Chem, 276, 18702-9., 2001.

- Dudley D. T., L. Pang, S. J. Decker, A. J. Bridges and A. R. Saltiel, *A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade*, Proc Natl Acad Sci U S A, 92, 7686-9, 1995.

- Ebert B. L. and H. F. Bunn, *Regulation of transcription by hypoxia requires a multiprotein complex that includes hypoxia-inducible factor 1, an adjacent transcription factor, and p300/CREB binding protein*, Mol Cell Biol, 18, 4089-96, 1998.

- Ellis H. M. and H. R. Horvitz, *Genetic control of programmed cell death in the nematode C. elegans*, Cell, 44, 817-29, 1986.

- Finucane D. M., E. Bossy-Wetzel, N. J. Waterhouse, T. G. Cotter and D. R. Green, *Bax-induced caspase activation and apoptosis via cytochrome c release from mitochondria is inhibitable by Bcl-xL*, J Biol Chem, 274, 2225-33, 1999.

- Gleadle J. M., B. L. Ebert and P. J. Ratcliffe, *Diphenylene iodonium inhibits the induction of erythropoietin and other mammalian genes by hypoxia. Implications for the mechanism of oxygen sensing*, Eur J Biochem, 234, 92-9, 1995.

- Gorlach A., G. Camenisch, I. Kvietikova, L. Vogt, R. H. Wenger and M. Gassmann, *Efficient translation of mouse hypoxia-inducible factor-1alpha under normoxic and hypoxic conditions*, Biochim Biophys Acta, 1493, 125-34., 2000.

- Gothié E. and J. Pouysségur, *HIF-1: régulateur central de l'hypoxie*, Medecine sciences, 18, 70-8, 2002.

- Gradin K., J. McGuire, R. H. Wenger, I. Kvietikova, M. L. fhitelaw, R. Toftgard, L. Tora, M. Gassmann and L. Poellinger, *Functional interference between hypoxia and dioxin signal transduction pathways: competition for recruitment of the Arnt transcription factor*, Mol Cell Biol, 16, 5221-31, 1996.

- Graeber T. G., C. Osmanian, T. Jacks, D. E. Housman, C. J. Koch, S. W. Lowe and A. J. Giaccia, *Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours*, Nature, 379, 88-91, 1996.

- Graeber T. G., J. F. Peterson, M. Tsai, K. Monica, A. J. Fornace, Jr. and A. J. Giaccia, *Hypoxia induces accumulation of p53 protein, but activation of a G1- phase checkpoint by low-oxygen conditions is independent of p53 status*, Mol Cell Biol, 14, 6264-77, 1994.

- Guillemin K. and M. A. Krasnow, *The hypoxic response: huffing and HIFing*, Cell, 89, 9-12., 1997.

- Halliwell B. and J. M. Gutteridge, *Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease*, Biochem J, 219, 1-14, 1984.

- Hanahan D. and J. Folkman, *Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis*, Cell, 86, 353-64, 1996.

- Hofmann K., P. Bucher and J. Tschopp, *The CARD domain: a new apoptotic signalling motif*, Trends Biochem Sci, 22, 155-6, 1997.

- Hofmann K. and J. Tschopp, *The death domain motif found in Fas (Apo-1) and TNF receptor is present in proteins involved in apoptosis and axonal guidance*, FEBS Lett, 371, 321-3, 1995.

- Holmgren L., M. S. O'Reilly and J. Folkman, *Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression*, Nat Med, 1, 149-53, 1995.

- Horvitz H. R., S. Shaham and M. O. Hengartner, *The genetics of programmed cell death in the nematode Caenorhabditis elegans*, Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 59, 377-85, 1994.

- Huang L. E., Z. Arany, D. M. Livingston and H. F. Bunn, *Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit*, J Biol Chem, 271, 32253-9, 1996.

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

- Iyer N. V., L. E. Kotch, F. Agani, S. W. Leung, E. Laughner, R. H. Wenger, M. Gassmann, J. D. Gearhart, A. M. Lawler, A. Y. Yu and G. L. Semenza, *Cellular and developmental control of O2 homeostasis by hypoxia- inducible factor 1 alpha*, Genes Dev, 12, 149-62, 1998a.

- Iyer N. V., S. W. Leung and G. L. Semenza, *The human hypoxia-inducible factor 1alpha gene: HIF1A structure and evolutionary conservation*, Genomics, 52, 159-65, 1998b.

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

- Jiang B. H., F. Agani, A. Passaniti and G. L. Semenza, *V-SRC induces expression of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and transcription of genes encoding vascular endothelial growth factor and enolase 1: involvement of HIF-1 in tumor progression*, Cancer Res, 57, 5328-35, 1997.

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

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

- Kelekar A. and C. B. Thompson, *Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis*, Trends Cell Biol, 8, 324-30., 1998.

- Ladoux A. and C. Frelin, *Cardiac expressions of HIF-1 alpha and HLF/EPAS, two basic loop helix/PAS domain transcription factors involved in adaptative responses to hypoxic stresses*, Biochem Biophys Res Commun, 240, 552-6, 1997.

- Leuenroth S. J., P. S. Grutkoski, A. Ayala and H. H. Simms, *The loss of Mcl-1 expression in human polymorphonuclear leukocytes promotes apoptosis*, J Leukoc Biol, 68, 158-66., 2000a.

- Leuenroth S. J., P. S. Grutkoski, A. Ayala and H. H. Simms, *Suppression of PMN apoptosis by hypoxia is dependent on Mcl-1 and MAPK activity*, Surgery, 128, 171-7., 2000b.

- Levine A. J., *p53, the cellular gatekeeper for growth and division*, Cell, 88, 323-31, 1997.

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

- Liu Y., S. R. Cox, T. Morita and S. Kourembanas, *Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. Identification of a 5' enhancer*, Circ Res, 77, 638-43, 1995.

- Michiels C., E. Minet, G. Michel, D. Mottet, J. P. Piret and M. Raes, *HIF-1 and AP-1 cooperate to increase gene expression in hypoxia: role of MAP kinases*, IUBMB Life, 52, 49-53., 2001.

- Mignon A., N. Rouquet and V. Joulin, *Les caspases, les protéases à cystéines de l'apoptose : un enjeu thérapeutique pour demain?*, Medecine sciences, 14, 9-17, 1998.

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

- Minet E., I. Ernest, G. Michel, I. Roland, J. Remacle, M. Raes and C. Michiels, *HIF1A gene transcription is dependent on a core promoter sequence encompassing activating and inhibiting sequences located upstream from the transcription initiation site and cis elements located within the 5'UTR*, Biochem Biophys Res Commun, 261, 534-40, 1999.

- Minet E., G. Michel, D. Mottet, M. Raes and C. Michiels, *Transduction pathways involved in Hypoxia-Inducible Factor-1 phosphorylation and activation*, Free Radic Biol Med, 31, 847-55., 2001.

- Minet E., G. Michel, J. Remacle and C. Michiels, *Role of HIF-1 as a transcription factor involved in embryonic development, cancer progression and apoptosis (review)*, Int J Mol Med, 5, 253-9., 2000b.

- Miura M., H. Zhu, R. Rotello, E. A. Hartwieg and J. Yuan, *Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 beta-converting enzyme, a mammalian homolog of the C. elegans cell death gene ced-3*, Cell, 75, 653-60, 1993.

- Muzio M., B. R. Stockwell, H. R. Stennicke, G. S. Salvesen and V. M. Dixit, *An induced proximity model for caspase-8 activation*, J Biol Chem, 273, 2926-30, 1998.

- Nieminen A. L., A. M. Byrne, B. Herman and J. J. Lemasters, *Mitochondrial permeability transition in hepatocytes induced by t- BuOOH: NAD(P)H and reactive oxygen species*, Am J Physiol, 272, C1286-94., 1997.

- Nunez G., M. A. Benedict, Y. Hu and N. Inohara, *Caspases: the proteases of the apoptotic pathway*, Oncogene, 17, 3237-45., 1998.

- O'Reilly M. S., L. Holmgren, C. Chen and J. Folkman, *Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice*, Nat Med, 2, 689-92, 1996.

- Palmer L. A., G. L. Semenza, M. H. Stoler and R. A. Johns, *Hypoxia induces type II NOS gene expression in pulmonary artery endothelial cells via HIF-1*, Am J Physiol, 274, L212-9, 1998.

- Parangi S., M. O'Reilly, G. Christofori, L. Holmgren, J. Grosfeld, J. Folkman and D. Hanahan, *Antiangiogenic therapy of transgenic mice impairs de novo tumor growth*, Proc Natl Acad Sci U S A, 93, 2002-7, 1996.

- Park S. Y., T. R. Billiar and D. W. Seol, *Hypoxia inhibition of apoptosis induced by tumor necrosis factor- related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)*, Biochem Biophys Res Commun, 291, 150-3., 2002.

- Piret J. P., D. Mottet, M. Raes and C. Michiels, *Is HIF-1 alpha a pro- or an anti-apoptotic protein*, Biochem Pharmacia, 2002.

- Ravi R., B. Mookerjee, Z. M. Bhujwalla, C. H. Sutter, D. Artemov, Q. Zeng, L. E. Dillehay, A. Madan, G. L. Semenza and A. Bedi, *Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia- inducible factor 1alpha*, Genes Dev, 14, 34-44., 2000.

- Reed J. C., *Bcl-2 family proteins*, Oncogene, 17, 3225-36., 1998.

- Rubin R. and J. L. Farber, *Mechanisms of the killing of cultured hepatocytes by hydrogen peroxide*, Arch Biochem Biophys, 228, 450-9, 1984.

- Ryan H. E., J. Lo and R. S. Johnson, *HIF-1 alpha is required for solid tumor formation and embryonic vascularization*, Embo J, 17, 3005-15, 1998.

- Saikumar P., Z. Dong, V. Mikhailov, M. Denton, J. M. Weinberg and M. A. Venkatachalam, *Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease*, Am J Med, 107, 489-506., 1999.

- Saikumar P., Z. Dong, Y. Patel, K. Hall, U. Hopfer, J. M. Weinberg and M. A. Venkatachalam, *Role of hypoxia-induced Bax translocation and cytochrome c release in reoxygenation injury*, Oncogene, 17, 3401-15, 1998.

- Sanghavi D. M., M. Thelen, N. A. Thornberry, L. Casciola-Rosen and A. Rosen, *Caspase-mediated proteolysis during apoptosis: insights from apoptotic neutrophils*, FEBS Lett, 422, 179-84, 1998.

- Semenza G. L., *Expression of hypoxia-inducible factor 1: mechanisms and consequences*, Biochem Pharmacol, 59, 47-53., 2000.

- Seshagiri S. and L. K. Miller, *Caenorhabditis elegans CED-4 stimulates CED-3 processing and CED-3- induced apoptosis*, Curr Biol, 7, 455-60, 1997.

- Shoshani T., A. Faerman, I. Mett, E. Zelin, T. Tenne, S. Gorodin, Y. Moshel, S. Elbaz, A. Budanov, A. Chajut, H. Kalinski, I. Kamer, A. Rozen, O. Mor, E. Keshet, D. Leshkowitz, P. Einat, R. Skaliter and E. Feinstein, *Identification of a novel hypoxia-inducible factor 1-responsive gene, RTP801, involved in apoptosis*, Mol Cell Biol, 22, 2283-93., 2002.

- Spector M. S., S. Desnoyers, D. J. Hoeppner and M. O. Hengartner, *Interaction between the C. elegans cell-death regulators CED-9 and CED- 4*, Nature, 385, 653-6, 1997.

- Srinivasula S. M., M. Ahmad, T. Fernandes-Alnemri and E. S. Alnemri, *Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization*, Mol Cell, 1, 949-57, 1998.

- Steller H., *Mechanisms and genes of cellular suicide*, Science, 267, 1445-9, 1995.

- Suzuki H., A. Tomida and T. Tsuruo, *Dephosphorylated hypoxia-inducible factor 1alpha as a mediator of p53- dependent apoptosis during hypoxia*, Oncogene, 20, 5779-88, 2001.

- Thornberry N. A., T. A. Rano, E. P. Peterson, D. M. Rasper, T. Timkey, M. Garcia-Calvo, V. M. Houtzager, P. A. Nordstrom, S. Roy, J. P. Vaillancourt, K. T. Chapman and D. W. Nicholson, *A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis*, J Biol Chem, 272, 17907-11, 1997.

- Wang G. L., B. H. Jiang, E. A. Rue and G. L. Semenza, *Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O2 tension*, Proc Natl Acad Sci U S A, 92, 5510-4, 1995a.

- Wang G. L. and G. L. Semenza, *Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia*, J Biol Chem, 268, 21513-8, 1993a.

- Wang G. L. and G. L. Semenza, *General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia*, Proc Natl Acad Sci U S A, 90, 4304-8, 1993b.

- Wang G. L. and G. L. Semenza, *Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1*, J Biol Chem, 270, 1230-7, 1995b.

- Warner H. R., *Aging and regulation of apoptosis*, Curr Top Cell Regul, 35, 107-21, 1997.

- Wenger R. H. and M. Gassmann, *Oxygen(es) and the hypoxia-inducible factor-1*, Biol Chem, 378, 609-16., 1997a.

- Wenger R. H., I. Kvietikova, A. Rolfs, M. Gassmann and H. H. Marti, *Hypoxia-inducible factor-1 alpha is regulated at the post-mRNA level*, Kidney Int, 51, 560-3, 1997b.

- White E., *Life, death, and the pursuit of apoptosis*, Genes Dev, 10, 1-15, 1996.

- Wiener C. M., G. Booth and G. L. Semenza, *In vivo expression of mRNAs encoding hypoxia-inducible factor 1*, Biochem Biophys Res Commun, 225, 485-8, 1996.

- Woods D. B. and K. H. Vousden, *Regulation of p53 function*, Exp Cell Res, 264, 56-66, 2001.

- Wu D., H. D. Wallen and G. Nunez, *Interaction and regulation of subcellular localization of CED-4 by CED- 9*, Science, 275, 1126-9, 1997.

- Yang X., H. Y. Chang and D. Baltimore, *Autoproteolytic activation of pro-caspases by oligomerization*, Mol Cell, 1, 319-25, 1998a.

- Yang X., H. Y. Chang and D. Baltimore, *Essential role of CED-4 oligomerization in CED-3 activation and apoptosis*, Science, 281, 1355-7, 1998b.

- Yuan J., *Evolutionary conservation of a genetic pathway of programmed cell death*, J Cell Biochem, 60, 4-11, 1996.

- Zhong H., F. Agani, A. A. Baccala, E. Laughner, N. Rioseco-Camacho, W. B. Isaacs, J. W. Simons and G. L. Semenza, *Increased expression of hypoxia inducible factor-1alpha in rat and human prostate cancer*, Cancer Res, 58, 5280-4, 1998.