



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Etude de l'expression de la GRP94 dans les cellules endothéliales durant l'hypoxie et du rôle de HIF-1 dans sa régulation transcriptionnelle

Denis, Hélène

Award date:
2004

[Link to publication](#)

General rights

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

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

Take down policy

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



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

Faculté des Sciences

**Etude de l'expression de la GRP94 dans les cellules endothéliales durant
l'hypoxie et du rôle de HIF-1 dans sa régulation transcriptionnelle**

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

Hélène DENIS

Juin 2004

Etude de l'expression de la GRP94 dans les cellules endothéliales durant l'hypoxie et du rôle de HIF-1 dans sa régulation transcriptionnelle

DENIS Hélène

Résumé

Les protéines régulées par le glucose sont induites par différents stress physiologiques et environnementaux. En particulier, nous avons montré au laboratoire que l'hypoxie induit l'augmentation de l'expression de la GRP94 (Glucose-regulated protein 94kDa) dans les cellules endothéliales humaines EAhy926.

Au cours de ce mémoire, nous avons tout d'abord étudié cette surexpression aux niveaux ARNm et protéique. Une cinétique de la quantité d'ARNm de la GRP94, suivie par PCR en temps réel, et de la quantité de la protéine GRP94, suivie par Western blot, au cours de l'hypoxie a été réalisée. On observe une augmentation biphasique de la quantité d'ARNm et de l'expression de la protéine GRP94 dans les cellules incubées en hypoxie par rapport aux cellules maintenues en normoxie. De plus, une étude en immunofluorescence a montré que la GRP94 est localisée dans le réticulum endoplasmique des cellules endothéliales, aussi bien en condition de stress hypoxique qu'en normoxie.

La présence plusieurs éléments HRE (Hypoxia Responsive Element) au sein du promoteur du gène *tra-1* suggère que le facteur de transcription HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor-1) pourrait jouer un rôle dans la régulation transcriptionnelle du gène *tra-1* en hypoxie. Nous avons mis en évidence la stabilisation de HIF-1 α ainsi qu'une augmentation de l'activité de liaison à l'ADN de HIF-1 et de son activité transcriptionnelle dans les cellules endothéliales humaines incubées en hypoxie.

Des expériences de compétition pour la liaison de HIF-1 à chaque séquence HRE présente au sein du promoteur de *tra-1*, par rapport à la séquence HRE classique, ont été réalisées. Les résultats indiquent que HIF-1 est capable de lier les séquences HRE du promoteur. Afin de déterminer si HIF-1 augmente effectivement la transcription de *tra-1* en hypoxie, nous avons cloné son promoteur en amont du gène rapporteur luciférase et réalisé des expériences de mutagenèse dirigée. Les résultats obtenus après transfection des différentes constructions et mesure de leur activité montrent que la régulation transcriptionnelle du promoteur de *tra-1* en hypoxie est bien dépendante de HIF-1.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 2004

Promoteur : C. Michiels

C'est avec un regard nostalgique que je me retourne maintenant sur ces quatre années d'étude qui viennent de s'écouler. Je voudrais remercier toutes les personnes qui m'ont soutenu et qui ont contribué de près ou de loin à la réussite de cette aventure.

Ce travail a été réalisé dans le laboratoire de biologie cellulaire des FUNDP sous la direction du Professeur J. Remacle. Je le remercie pour avoir mis à ma disposition les moyens nécessaires à la réalisation de ce mémoire.

Je remercie plus particulièrement ma promotrice Carine Michiels pour sa disponibilité et son encadrement précieux tout au long de ce mémoire.

Mes remerciements vont ensuite à SEP. Travailler avec toi fût une expérience enrichissante. Merci pour tout ce que tu m'as apporté au cours de ce mémoire. Merci également à Sébastien et JPP de l'équipe HIF.

Merci Audrey, Jérôme, Jean-phi, Antoine et Sophie pour les petits coups de main informatiques et autres et pour les moments de distraction.

Merci également à mes quatre biologistes préférées Audrey, Céline, Vanessa et Audrey. Merci pour votre amitié, pour votre écoute et bien évidemment pour votre goût prononcé pour la guindaille.

Enfin, il m'est impossible d'oublier mes grands-parents et mes plus fervents supporters, mes parents. Merci à vous pour vos bonnes pensées, votre soutien et vos encouragements au cours de ces quatre années.

Hélène

Liste des abréviations

ADNc	ADN complémentaire
ARNm	ARN messenger
ARNT	Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator
Asn	Asparagine
bp	base pair(s)
BSA	Bovine serum albumin
bZIP	basic leucine zipper
CBP	CREB binding protein
CMH I	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe I
CT	Cycle threshold
DHG	DMEM high glucose
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
dNTP	déoxynucléotide triphosphate
DTT	Dithiothréitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	acide éthylènediaminetétraacétique
EGFP	Enhanced green fluorescent protein
EGTA	acide éthylèneglycoltétraacétique
ERSE	ER stress element
FCS	Foetal calf serum
FGF	Fibroblast growth factor
GM130	Golgi matrix protein 130 kDa
GRP	Glucose-regulated protein
HAC	Homology to ATF and CREB
HBS	HIF DNA binding site
Hepes	Hydroxylethyl piperazine-ethane sulfonic acid
HIF-1	Hypoxia inducible factor-1
HLH	Helix-loop-helix
HPH	HIF-prolyl hydroxylase
HRE	Hypoxia response element
HSE	Heat shock element
HSF	Heat shock factor
HSP	Heat shock protein
iNOS	Synthase de l'oxyde nitrique inductible
Irelp	High inositol-requiring mutant
kb	kilobase
kDa	kiloDalton
-KDEL	-Lysine-Aspartate-Glutamate-Leucine
LB	Luria bertani
mA	milli Ampère
MEC	Matrice extracellulaire
MOPS	Acide 3-morpholino-propanesulfonique
NO	Monoxyde d'azote
ODD	Oxygen dependent degradation domain
PAS	Per-ARNT-Sim
PBS	Phosphate buffer saline
PCR	Polymerase chain reaction

PDGF	Platelet derived growth factor
PDI	Protein disulfide isomerase
PIB	Phosphatase inhibitor buffer
PIC	Protease inhibitor cocktail
Pro	Proline
QSP	Quantité suffisante pour
RE	Réticulum endoplasmique
rpm	rotation par minute
RT	Reverse transcription
RT	Température ambiante
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SF	Superfect
TAD-C	Transactivation domain C-terminal
TAD-N	Transactivation domain N-terminal
TBE	Tris-borate EDTA
TBS	Tris buffer saline
TG	Thapsigargine
TGF- β	Transforming growth factor- β
<i>Tra-1</i>	Tumor rejection antigen-1
U	Unité enzymatique
UPR	Unfolded protein response
UPRE	Unfolded protein response element
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor
VHL	von-Hippel-Lindau

Table des matières

I Introduction

L'HYPOXIE ET LE FACTEUR DE TRANSCRIPTION HIF-1.....	1
1. L'HYPOXIE	1
2. LE FACTEUR DE TRANSCRIPTION HIF-1	1
2.1 Découverte.....	1
2.2 Structure de HIF-1	1
2.3 Régulation de l'activité de HIF-1.....	2
2.4 Gènes cibles induits par le facteur de transcription HIF-1.....	3
L'ANGIOGÈNESE.....	4
1. L'ANGIOGÈNESE	4
2. LA NÉO-ANGIOGÈNESE TUMORALE	4
2.1 Le switch angiogénique.....	4
2.2 L'angiogénèse, processus multi-séquentiel.....	5
2.3 Caractéristiques des vaisseaux sanguins tumoraux	6
2.4 Régulation de l'angiogénèse par l'hypoxie : rôle de HIF-1.....	6
LES PROTÉINES DE CHOC THERMIQUE ET LES PROTÉINES RÉGULÉES PAR LE GLUCOSE : DEUX FAMILLES DE PROTÉINES INDUITES PAR LE STRESS	9
1. LES PROTÉINES DE CHOC THERMIQUE (HEAT SHOCK PROTEINS)	9
1.1 Découverte de la réponse heat shock.....	9
1.2 Classification des HSP	9
1.3 Les chaperones moléculaires et les protéases dépendantes de l'ATP	10
1.4 Régulation transcriptionnelle des HSP	10
2. CANCER ET HSP	12
2.1 Cancer et dérégulation de l'expression des gènes HSP	12
2.2 HSP et dérégulation de la croissance cellulaire.....	12
2.3 Mort cellulaire et HSP	12
3. LES PROTÉINES RÉGULÉES PAR LE GLUCOSE (GLUCOSE-REGULATED PROTEINS)	13
3.1 Découverte.....	13
3.2 Induction des GRP	14
3.3 Régulation transcriptionnelle des GRP.....	14
3.4 Fonctions multiples des GRP.....	15
4. LA GRP94 (GLUCOSE-REGULATED PROTEIN 94 kDA).....	16
4.1 Caractéristiques moléculaires et structure	16
4.2 Fonctions cellulaires.....	17
Conclusion.....	19
OBJECTIFS DU MÉMOIRE.....	20

II Matériel et Méthodes

1. CULTURE CELLULAIRE.....	21
2. MARQUAGE EN IMMUNOFLUORESCENCE	21
3. WESTERN BLOT.....	22
3.1 Lysats totaux.....	22
3.2 Quantification des protéines par la méthode de Bradford.....	22
3.3 Préparation des échantillons.....	23
3.4 Electrophorèse.....	23
3.5 Transfert	23
3.6 Traitement de la membrane, incubation avec les anticorps et révélation	23
4. REAL-TIME RT PCR.....	24
4.1 Extraction d'ARN total.....	24
4.2 Reverse transcription.....	25
4.3 Real-time PCR.....	25

5. TRANSFECTION	25
5.1 Liste des plasmides utilisés.....	25
5.2 Transfection des cellules EAhy926.....	25
5.3 Transfection des cellules HepG2.....	26
6. TECHNIQUES DE RÉVÉLATION POUR LA TRANSFECTION	26
6.1 Observation de la fluorescence de l'EGFP.....	26
6.2 Système dual-luciférase.....	27
7. DOSAGE COLORIMÉTRIQUE DE L' ACTIVITÉ DE LIAISON DE HIF-1 À L'ADN	27
7.1 Préparation des extraits nucléaires.....	27
7.2 Dosage de l'activité de liaison de HIF-1 à sa séquence consensus.....	28
8. CLONAGE DU PROMOTEUR DE TRA-1	28
8.1 PCR du promoteur de tra-1	29
8.2 Electrophorèse en gel d'agarose.....	29
8.3 Restriction d'ADN.....	29
8.4 Purification.....	29
8.5 Ligation.....	29
8.6 Transformation bactérienne par choc thermique	30
9. EXTRACTION D'ADN PLASMIDIQUE	30
9.1 Mini-préparations d'ADN plasmidique.....	30
9.2 Maxi-préparations d'ADN plasmidique.....	30
10. MUTAGENÈSE DIRIGÉE DU PROMOTEUR DE TRA-1	30

III Résultats et discussion

ETUDE DE L'EXPRESSION DE LA GRP94 DANS LES CELLULES ENDOTHÉLIALES DURANT L'HYPOXIE..... 31

1. SUREXPRESSION DE LA GRP94 EN HYPOXIE.....	31
2. LOCALISATION DE LA GRP94 EN HYPOXIE.....	31
3. ÉTUDE DE LA CINÉTIQUE D'EXPRESSION DE LA GRP94 EN HYPOXIE.....	32
3.1 Evolution de la quantité d'ARNm de la GRP94 au cours de l'hypoxie	32
3.2 Evolution de la quantité de la protéine GRP94 au cours de l'hypoxie.....	33

ETUDE DU PROMOTEUR DU GÈNE TRA-1..... 35

1. ANALYSE DE LA SÉQUENCE DU PROMOTEUR DU GÈNE TRA-1	35
2. MISE EN ÉVIDENCE DE L'ACTIVATION DE HIF-1 DANS LES CELLULES EAHY926 INCUBÉES SOUS HYPOXIE.....	35
2.1 Stabilisation de HIF-1 α en hypoxie	35
2.2 Activité de liaison à l'ADN de HIF-1 α en hypoxie.....	36
2.3 Cinétique d'expression de l'aldolase.....	37
3. ÉTUDE DE LA LIAISON DE HIF-1 À CHACUN DES SITES HRE PRÉSENTS AU SEIN DU PROMOTEUR DU GÈNE TRA-1	37
4. CLONAGE DU PROMOTEUR DE TRA-1	39
5. MUTAGENÈSE DIRIGÉE DES SITES HRE DU PROMOTEUR DE TRA-1.....	40
6. TRANSFECTION DU PROMOTEUR DE TRA-1 ET DE CES VERSIONS MUTÉES DANS LES CELLULES EAHY926	40
6.1 Mise au point d'un protocole de transfection	40
6.2 Transfection des cellules EAhy926 avec les plasmides pGL3 et p6HRE.....	41
7. RÉGULATION DU PROMOTEUR DE TRA-1 PAR HIF-1 EN HYPOXIE.....	41
7.1 Vérification de l'induction du p6HRE en hypoxie dans les cellules HepG2	42
7.2 Régulation du promoteur de tra-1 par HIF-1 en hypoxie	42

IV Conclusion et Perspectives

V Bibliographie

Introduction

L'hypoxie et le facteur de transcription HIF-1

1. L'hypoxie

Toutes les espèces mammifères présentent une dépendance totale vis à-vis de l'oxygène pour leur survie. Son apport constant est indispensable pour maintenir une production d'énergie adéquate et garantir ainsi l'homéostasie des fonctions cellulaires et donc la survie des cellules. Sans un apport adéquat en oxygène, l'organisme est condamné à mourir rapidement. Une diminution de la concentration en oxygène dans l'environnement tissulaire et par conséquent dans les cellules, que l'on définit comme hypoxie, va donc générer un stress et entraîner une réponse physiologique générale de l'organisme pour compenser ce manque. Les cellules réorientent le métabolisme énergétique vers la voie de la glycolyse (métabolisme anaérobie) et la production d'érythrocytes (érythropoïèse) augmente conduisant à une élévation de la capacité de transport de l'oxygène.

Ces mécanismes jouent un rôle clé dans la réponse adaptative des cellules à l'hypoxie. Lors d'une hypoxie prolongée, de l'ordre de quelques heures, bien qu'une inhibition globale de la synthèse protéique puisse être généralement observée, certaines protéines sont surexprimées de manière spécifique, suggérant l'activité de facteurs de transcription spécifiques. Ainsi, durant l'hypoxie (concentration en oxygène inférieure à 5%), le facteur de transcription HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor-1) joue un rôle primordial en induisant l'expression de nombreux gènes participant à la réponse adaptative des cellules à l'hypoxie.

2. Le facteur de transcription HIF-1

2.1 Découverte

HIF-1 fut initialement identifié comme une protéine nucléaire spécifiquement induite par l'hypoxie et capable de se lier à un élément enhancer de 50 nucléotides situé en 3' de la séquence codante du gène de l'érythropoïétine (Semenza et Wang, 1992). Le site de liaison du facteur de transcription HIF-1 a été identifié. La séquence consensus de l'élément cis, nommé HRE (Hypoxia Responsive Element), est 5'-ACGTG-3'.

2.2 Structure de HIF-1

HIF-1 est un complexe hétérodimérique composé de deux sous-unités, HIF-1 α et HIF-1 β /ARNT (Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator). Ces sous-unités ont un poids moléculaire respectif de 120 kDa et 94 kDa pour une longueur de 826 et 789 acides aminés chez l'homme (Wang et Semenza, 1995). ARNT est une protéine constitutivement exprimée, présente au niveau nucléaire et n'est pas la sous-unité spécifique de la réponse à l'hypoxie.

Ces deux sous-unités appartiennent à la même famille de protéines, contenant un domaine bHLH (basic Helix-Loop-Helix) et un domaine PAS (Per -ARNT -Sim) (Wang *et al.*, 1995). Le motif HLH intervient dans la dimérisation des protéines tandis que la région basique qui le précède intervient dans la fixation et la spécificité de liaison de la protéine à

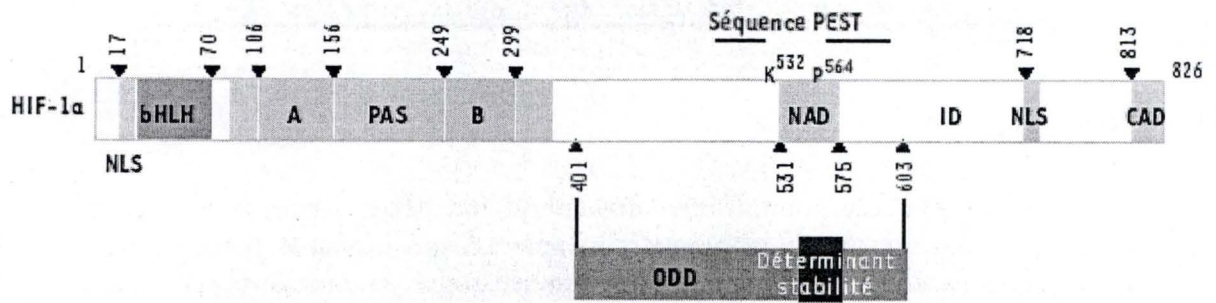


Figure 1 : Domaines fonctionnels de HIF-1 α (Gothié et Pouyssegur, 2002). bHLH : basic Helix-Loop-Helix ; PAS : Per-ARNT-Sim ; ODD : Oxygen dependent Degradation Domain ; NAD et CAD : transActivation Domain N- and C-terminal ; ID : Inhibitory Domain ; NLS : Nuclear Localisation Site.

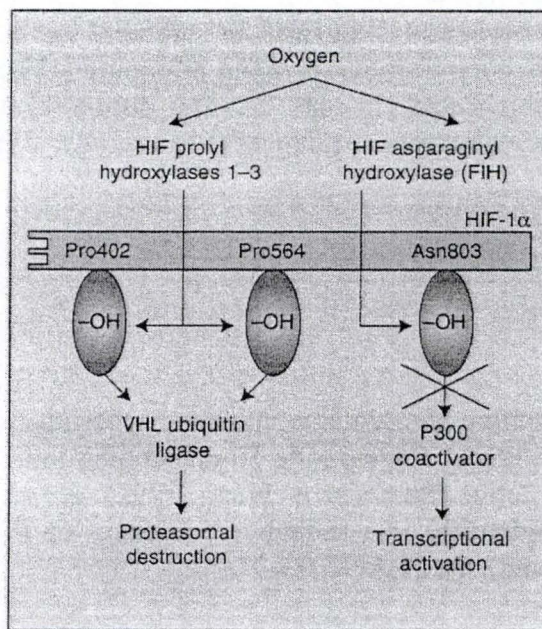


Figure 2 : Dégradation de HIF-1 α et inhibition de son activité transcriptionnelle en normoxie (Pugh et Ratcliffe, 2003). L'hydroxylation de HIF-1 α au niveau de deux résidus proline (Pro402 et Pro564) par la HIF-prolyl hydroxylase (HPH) constitue le motif d'interaction du complexe von Hippel-Lindau (VHL) E3 ubiquitine ligase, qui ubiquitinye la protéine HIF-1 α et la cible pour une dégradation par le protéasome 26. L'hydroxylation du résidu Asn803 du TAD-C par la HIF-asparaginyl hydroxylase (FIH, Factor Inhibiting HIF) bloque l'interaction du TAD-C avec le coactivateur CBP (Creb Binding Protein)/p300 et de ce fait inhibe l'activité transcriptionnelle de HIF-1.

Hypoxia

Normoxia

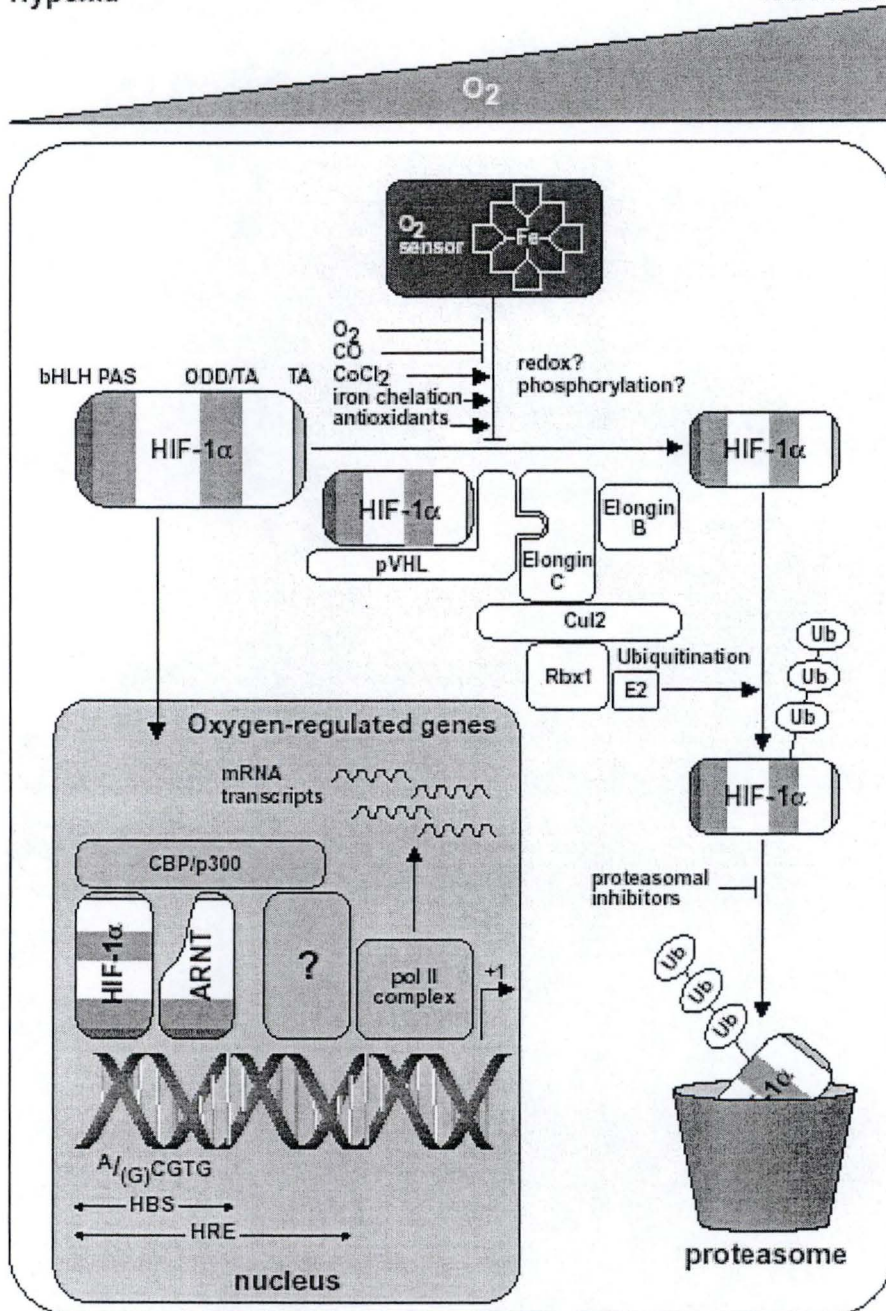


Figure 3 : Régulation de HIF-1 (Wenger, 2000). En normoxie, HIF-1 α est hydroxylé et ubiquitinylé par le complexe von Hippel-Lindau (VHL) E3 ubiquitine ligase qui cible la protéine HIF-1 α pour une dégradation par le protéasome 26S. En hypoxie, HIF-1 α n'est pas hydroxylé et n'interagit donc plus avec le complexe VHL, ce qui conduit à son accumulation. HIF-1 α stabilisé subit des modifications post-traductionnelles, transloque dans le noyau où il hétérodimérise avec la sous-unité ARNT, se lie à l'ADN, recrute des cofacteurs comme le CBP/p300 et induit l'expression de gènes cibles. bHLH : basic Helix-Loop-Helix ; PAS : Per-ARNT-Sim ; ODD : Oxygen dependent Degradation Domain ; pVHL : von-Hippel-Lindau tumour suppressor protein ; Ub : ubiquitin ; ARNT : Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator ; CBP : CREB Binding Protein ; HBS : HIF-1 Binding site ; HRE : Hypoxia Responsive Element.

l'ADN. Le domaine PAS constitue un second motif de dimérisation, mais il participe également à la liaison et à l'interaction avec d'autres protéines impliquées dans la régulation de HIF-1 (figure 1).

D'autres domaines ont été cartographiés sur la protéine HIF-1 α . Ainsi, le domaine ODD (Oxygen dependent Degradation Domain) intervient dans le processus de dégradation de HIF-1 α par le protéasome en normoxie (Huang *et al.*, 1998). HIF-1 α contient également deux domaines essentiels à ses fonctions de transactivation : TAD-N ou NAD (TransActivation Domain N-terminal) et TAD-C ou CAD (TransActivation Domain C-terminal). Entre ces deux domaines se situe un domaine peu connu appelé Inhibitory Domain (ID) (Jiang *et al.*, 1997). Enfin, deux séquences PEST d'environ 20 acides aminés (riches en proline, acide glutamique, sérine et thréonine) et deux séquences de localisation nucléaire ont été décrites pour HIF-1 α (figure 1).

2.3 Régulation de l'activité de HIF-1

En normoxie, bien que la protéine HIF-1 α soit exprimée de façon constitutive, celle-ci est rapidement dégradée par le système ubiquitine-protéasome (figure 2).

En effet, en normoxie, HIF-1 α est hydroxylé au niveau de deux résidus proline (Pro402 et Pro564) du domaine ODD par la HIF-prolyl hydroxylase (HPH) (Pugh et Ratcliffe, 2003). Les HPH sont des dioxygénases utilisant l'oxygène et le 2-oxoglutarate comme substrats. Les HPH transfèrent un atome d'oxygène sur les résidus proline de HIF-1 α ; le second atome d'oxygène réagit avec le 2-oxoglutarate pour former du succinate et du dioxyde de carbone. L'hydroxylation de ces deux résidus proline constitue le motif d'interaction du complexe von Hippel-Lindau (VHL) E3 ubiquitine ligase, qui ubiquitinye la protéine HIF-1 α et la cible pour une dégradation par le protéasome 26S (figure 3). L'acétylation de la lysine 532 par l'acétyltransférase ARD1 favorise également l'interaction de HIF-1 α avec le complexe VHL. La protéine HIF-1 α n'est donc pas présente dans les cellules en normoxie.

En normoxie, HIF-1 α est également hydroxylé au niveau du résidu Asn803 du TAD-C par la HIF-asparaginyl hydroxylase (FIH, Factor Inhibiting HIF). Cette hydroxylation bloque l'interaction du TAD-C avec le coactivateur CBP (CREB Binding Protein)/p300 et de ce fait, inhibe l'activité transcriptionnelle de HIF-1 (Lando *et al.*, 2002). Ce second mécanisme de contrôle permettrait de rendre inactive une protéine HIF-1 α qui aurait échappé au mécanisme de dégradation.

En hypoxie, la HPH est inhibée par manque de l'un de ses substrats, l'oxygène. HIF-1 α n'est donc pas hydroxylé et n'interagit plus avec le complexe VHL, ce qui conduit à son accumulation. Cette stabilisation de la sous-unité HIF-1 α ne suffit cependant pas à l'activer. Des mécanismes supplémentaires sont impliqués dans l'activation de HIF-1 α : la protéine subit des modifications post-traductionnelles (phosphorylations), transloque dans le noyau où elle hétérodimérise avec la sous-unité ARNT, se lie à l'ADN, recrute des cofacteurs comme le CBP/p300 (Kallio *et al.*, 1998) et induit l'expression de gènes cibles (figure 3).

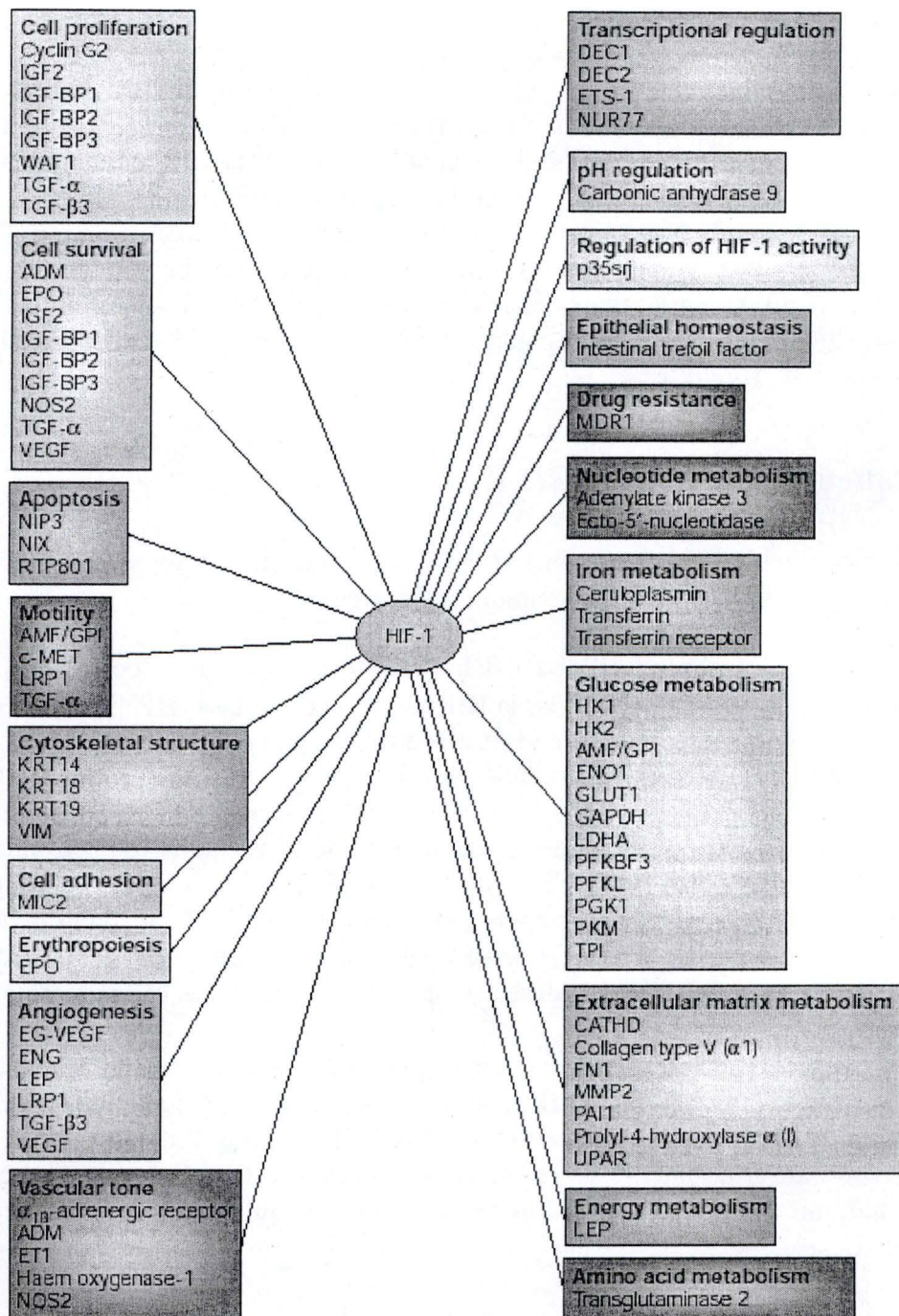


Figure 4 : Gènes cibles induits par le facteur de transcription HIF-1 (Semenza, 2003). ALD : aldolase ; ENO1 : éno1ase 1 ; EPO : érythropoïétine ; GLUT1 ; transporteur de glucose 1 ; GLUT3 : transporteur de glucose 3 ; GAPDH : glycéraldéhyde-3-phosphate-déshydrogénase ; HK : hexokinase ; MMP2 : métalloprotéinase matricielle 2 ; NOS : synthase de l'oxyde nitrique ; PFKL : phosphofructokinase ; TGF : transforming growth factor ; VEGF : vascular endothelial growth factor ; VEGFR : récepteur au VEGF.

2.4 Gènes cibles induits par le facteur de transcription HIF-1

Une fois stabilisé et activé par l'hypoxie, HIF-1 se lie à son site de liaison à l'ADN, HBS (HIF DNA Binding Site) présent dans les HRE d'un grand nombre de gènes régulés par l'hypoxie. La présence du HBS est nécessaire mais pas suffisante pour induire l'activation des gènes. Bien que le HBS soit le domaine minimal requis pour l'interaction avec HIF-1, un domaine fonctionnel HRE contient habituellement des sites voisins de liaison pour d'autres facteurs de transcription. Bien que ces éléments ne soient pas induits par l'hypoxie, ils peuvent amplifier la réponse hypoxique ou conférer une activité tissu-spécifique à une séquence HRE.

HIF-1 s'avère être le régulateur central de l'expression de nombreux gènes sous hypoxie (figure 4). L'ensemble de ces gènes permet, au niveau cellulaire mais aussi à l'échelle de l'organisme, une réponse adaptative à l'hypoxie. HIF-1 est connu pour réguler, au niveau transcriptionnel, des gènes impliqués dans le métabolisme du glucose et du fer, dans l'angiogenèse et le développement vasculaire et dans l'érythropoïèse.

- Erythropoïèse et métabolisme du fer

Le gène de l'érythropoïétine est surexprimé en hypoxie, via HIF-1. Cette hormone glycoprotéique stimule la production des érythrocytes par la moelle osseuse. L'augmentation de leur nombre dans le sang va permettre d'assurer un apport accru d'oxygène aux tissus et constitue un mécanisme d'adaptation contre les hypoxies modérées. C'est notamment ce que l'on observe lors de séjours en haute altitude.

L'hypoxie est également capable d'augmenter l'expression du gène codant pour la transferrine (Rolfs *et al.*, 1997), le récepteur à la transferrine (Tacchini *et al.*, 1999) et la céruloplasmine¹ (Mukhopadhyay *et al.*, 2000). L'organisme développe de la sorte des mécanismes qui vont lui permettre un apport adéquat en fer indispensable pour la formation d'hémoglobine et la genèse des globules rouges.

- Métabolisme du glucose

Lors d'un apport limité en oxygène dans les cellules, la voie de la glycolyse anaérobie devient le moyen prédominant de production d'ATP intracellulaire.

L'expression des gènes codant pour les enzymes glycolytiques comme l'aldolase A, la phosphofruktokinase L, l'énolase (Semenza *et al.*, 1994) et pour les transporteurs de glucose, Glut-1 (Ebert *et al.*, 1995) et Glut-3, est régulée par HIF-1. Cela permet d'augmenter l'activité de la glycolyse et de maintenir une production minimale d'ATP et ce, de façon indépendante des phosphorylations oxydatives, afin de permettre la survie cellulaire dans ces conditions.

D'autres gènes sont également surexprimés en hypoxie via HIF-1. Ces gènes sont impliqués dans la croissance des vaisseaux sanguins. Leurs rôles seront décrits dans le chapitre suivant.

¹ Cette protéine plasmatique possède une activité ferroxidase, c'est-à-dire qu'elle catalyse la conversion de l'ion ferreux en ion ferrique. Cette oxydation est essentielle pour la liaison du fer à son transporteur.

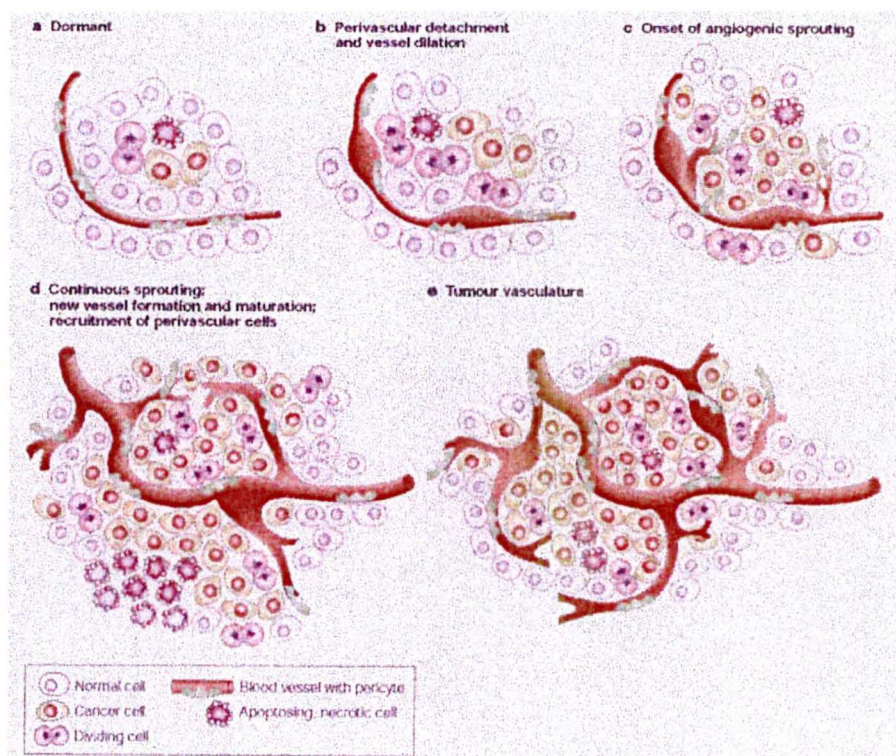


Figure 5 : Le switch angiogénique (Bergers et Benjamin, 2003). La plupart des tumeurs commencent leur croissance comme nodule avasculaire (dormant) (a). Le switch angiogénique se produit alors : les cellules périvasculaires des vaisseaux sanguins, voisins des foyers nécrotiques caractéristiques de la tumeur, se détachent et ces vaisseaux se dilatent (b). De nouveaux capillaires germent ensuite à partir de ces vaisseaux préexistants (c) et maturent (d). La formation de ces vaisseaux sanguins continue tant que la tumeur grandit, apportant oxygène et nutriments essentiels aux zones hypoxiques et nécrotiques, et assurant de la sorte une croissance exponentielle de la tumeur (e).

L'angiogenèse

Dans tous les tissus, l'homéostasie de l'oxygène est régulée par la balance entre l'apport en oxygène et son utilisation. La quantité d'oxygène délivrée aux tissus est principalement déterminée par la distribution et la densité des vaisseaux sanguins.

1. L'angiogenèse

L'angiogenèse est le processus de formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants. Elle est régulée par un équilibre entre les molécules pro-angiogéniques et anti-angiogéniques. Ces molécules peuvent émaner des cellules cancéreuses, des cellules endothéliales, du sang ou de la matrice extracellulaire. L'angiogenèse joue ainsi un rôle important non seulement lors de processus physiologiques comme le développement embryonnaire mais également au cours de processus physiopathologiques comme lors de la cicatrisation, de l'athérosclérose ou du développement d'une tumeur. Les mécanismes moléculaires régissant le processus angiogénique sont décrits au chapitre suivant en prenant comme exemple la néo-angiogenèse tumorale.

2. La néo-angiogenèse tumorale

Dans de nombreux cancers, la croissance rapide du nodule cancéreux provoque le développement en son centre d'une zone hypoxique. En effet, lorsque la tumeur atteint un volume d'approximativement 1 mm^3 , les cellules de la zone intra-tumorale se trouvent à une distance supérieure à $200 \mu\text{m}$ des vaisseaux sanguins du tissu d'origine. L'oxygène qui diffuse à partir de ces vaisseaux sanguins n'atteint pas les cellules situées au centre de la tumeur qui se retrouvent donc en situation hypoxique. Une structure vascularisée se développe au sein de la tumeur afin de compenser ce déficit, permettant ainsi un apport en oxygène et en nutriments aux cellules tumorales. Ce processus de croissance de nouveaux capillaires est appelé néo-angiogenèse.

2.1 Le switch angiogénique (Bergers et Benjamin, 2003)

En condition normale, il existe un équilibre entre les molécules pro-angiogéniques et anti-angiogéniques. Lorsque cet équilibre bascule en faveur des facteurs pro-angiogéniques, l'initiation de l'angiogenèse (switch angiogénique) est déclenchée.

La plupart des tumeurs commencent leur croissance comme nodule avasculaire (dormant). Le switch angiogénique se produit alors : les cellules périvasculaires des vaisseaux sanguins, voisins des foyers nécrotiques caractéristiques de la tumeur, se détachent et ces vaisseaux se dilatent. De nouveaux capillaires germent ensuite à partir de ces vaisseaux préexistants et mûrissent (figure 5). La formation de ces vaisseaux sanguins continue tant que la tumeur grandit, apportant oxygène et nutriments essentiels aux aires hypoxiques et nécrotiques, et assurant de la sorte une croissance exponentielle de la tumeur.

Les tumeurs expriment différents facteurs pro-angiogéniques. Bien que le FGF (Fibroblast Growth Factor) fût le premier découvert, le VEGFA (Vascular Endothelial Growth Factor A) est probablement le plus ubiquiste. D'autres membres de la famille du

Activateurs	Fonctions	Inhibiteurs	Fonctions
Membres de la famille du VEGF	Stimuler l'angiogenèse, la perméabilité	VEGFR-1	Récepteur au VEGF
Récepteurs au VEGF (VEGFR)	Intégrer les signaux angiogéniques	Angiopoïétine-2	Antagoniste de l'Angiopoïétine-1
Angiopoïétine-1 (Ang-1)	Stabiliser les vaisseaux et inhiber la perméabilité	Tissue inhibitors of MMP (TIMP)	Supprimer l'angiogenèse
Platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB) et récepteurs	Recruter les cellules musculaires lisses	Angiostatine	Inhiber la migration et la survie des cellules endothéliales
Transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) et récepteurs	Stabiliser les vaisseaux en stimulant la production de la matrice extracellulaire (MEC)		
Fibroblast growth factor (FGF)	Stimuler l'angiogenèse		
Intégrines $\alpha\beta$	Récepteurs pour les macromolécules matricielles et les protéases		
Vascular endothelial (VE)-cadhérine, PECAM	Molécules de jonction intercellulaire		
Ephrines	Réguler la spécification artérielle/veineuse		
Métalloprotéinases matricielles (MMP)	Remodeler la MEC, libérer et activer les facteurs de croissance		
Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)	Stabiliser les vaisseaux naissants		

Figure 6 : Exemples d'activateurs et d'inhibiteurs de l'angiogenèse (Conway *et al.*, 2001).

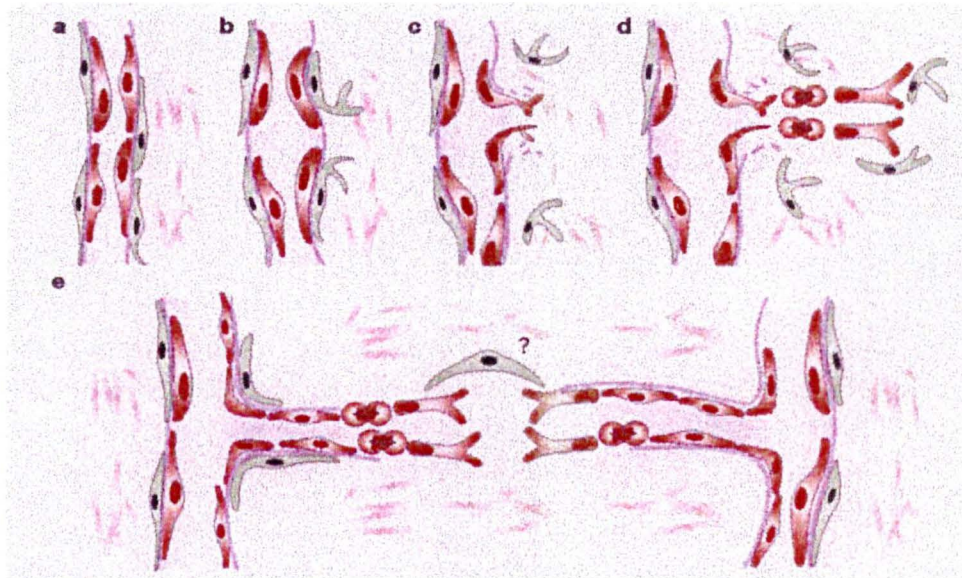


Figure 7 : L'angiogenèse (Bergers et Benjamin, 2003). Les vaisseaux sanguins sont formés à partir de capillaires et veinules post-capillaires préexistants (a). Le VEGF libéré par les cellules cancéreuses provoque la dilatation et le détachement des péricytes des vaisseaux sanguins (b). La membrane basale sous-endothéliale et la matrice extracellulaire sous-jacente sont alors dégradées localement (c). Après dissolution des membranes physiques, les cellules endothéliales migrent dans l'espace périvasculaire, en direction des stimuli angiogéniques chémoattractants. Les cellules endothéliales prolifèrent ensuite dans l'espace périvasculaire et forment une colonne de migration. Elles changent de forme et adhèrent étroitement les unes aux autres pour former une lumière (d). Des cellules périvasculaires sont attirées et une membrane basale est produite autour des vaisseaux sanguins néo-formés.

VEGF, incluant le VEGFC et le VEGFD, sont produits par les tumeurs humaines. Ces différents facteurs de croissance sont des mitogènes chémoattractants puissants pour les cellules endothéliales.

Le processus d'angiogenèse nécessite plusieurs acteurs régulés dans le temps et dans l'espace. Ces acteurs sont, outre les facteurs de croissance, les métalloprotéinases et les éphrines (figure 6).

2.2 L'angiogenèse, processus multi-séquentiel

L'angiogenèse tumorale est un processus complexe qui implique plusieurs étapes successives : la vasodilatation des vaisseaux préexistants, le remodelage de la matrice extracellulaire, la migration des cellules endothéliales, leur prolifération et la maturation des vaisseaux sanguins (figure 7).

- Vasodilatation des vaisseaux préexistants (Conway *et al.*, 2001)

Le VEGF, libéré par les cellules cancéreuses, entraîne la vasodilatation et une augmentation de la perméabilité vasculaire des capillaires et veinules post-capillaires préexistants. Cette augmentation est causée par la formation de fenestrations au niveau des vaisseaux sanguins et la redistribution de molécules d'adhésion intercellulaires comme la VE (Vascular Endothelial)-cadhérine et le PECAM-1 (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule). L'extravasation des protéines plasmatiques qui suit est nécessaire à la création d'une chambre d'accueil pour les cellules endothéliales migrantes.

Si la perméabilité est nécessaire à l'angiogenèse, une perméabilité excessive peut cependant conduire à des conditions pathologiques. Par conséquent, les changements au niveau de la perméabilité vasculaire doivent être fortement régulés (Carmeliet, 2000).

Ces processus de vasodilatation et d'augmentation de la perméabilité vasculaire sont accompagnés du détachement des péricytes² des vaisseaux sanguins.

- Remodelage de la matrice extracellulaire

La membrane basale sous-endothéliale et la matrice extracellulaire sous-jacente sont dégradées localement. Une vingtaine de métalloprotéases matricielles, ou MMP, jouent un rôle central dans la dégradation de la matrice extracellulaire et des structures de la membrane basale ainsi que dans la libération de facteurs de croissance, comme le bFGF (basic Fibroblast Growth Factor), le VEGF et l'IGF-1 (Insulin-like Growth Factor), séquestrés par certains composants de cette matrice extracellulaire.

D'autres protéinases interviennent dans cette dégradation permettant ainsi la progression des cellules endothéliales. C'est le cas notamment de la plasmine et des sérine protéases de type chymotrypsine comme l'élastase. La plasmine dégrade différents composants de la matrice extracellulaire dont la fibrine et la fibronectine.

² Les péricytes sont adjacents et entourent l'endothélium avec lequel ils partagent une membrane basale commune. Il semblerait que ces cellules puissent se différencier en muscle lisse ou en endothélium selon les conditions de maturation du vaisseau sanguin.

- Migration et prolifération des cellules endothéliales

Après dissolution des membranes physiques, les cellules endothéliales migrent dans l'espace périvasculaire, en direction des stimuli angiogéniques chémoattractants. Les cellules endothéliales prolifèrent ensuite dans l'espace périvasculaire et forment une colonne de migration.

Les différentes formes de VEGF ainsi que d'autres facteurs comme les angiopoïétines et les FGF sont impliqués dans ce processus. Les cellules endothéliales migrent en fonction du gradient de concentration du VEGF. L'angiopoïétine-1 est chémoattractante pour les cellules endothéliales et favorise l'interaction entre ces cellules et les cellules péri-endothéliales. Le FGF stimule la croissance des cellules endothéliales.

- Maturation des vaisseaux sanguins

Les cellules endothéliales changent de forme et adhèrent étroitement les unes aux autres pour former une lumière. Celles-ci continuent à proliférer, permettant l'élargissement du diamètre du vaisseau sanguin. Des cellules périvasculaires sont attirées et une membrane basale est produite autour des vaisseaux sanguins néo-formés.

Le PDGF-BB est chémoattractant pour les cellules musculaires lisses. L'angiopoïétine-1 stabilise les interactions entre les cellules endothéliales des nouveaux vaisseaux et les cellules péri-endothéliales, assurant ainsi l'imperméabilité des capillaires. Des membres de la famille du TGF- β induisent la maturation des vaisseaux sanguins en stimulant la différenciation des cellules musculaires lisses et le dépôt de la MEC et en inhibant la prolifération et la migration des cellules endothéliales. D'autres composants de la MEC comme la fibronectine, la laminine, la vitronectine, la fibrine et l'acide hyaluronique, interagissent avec les intégrines, facilitant de la sorte la migration des cellules endothéliales et péri-endothéliales, la formation des vaisseaux sanguins et leur maturation.

2.3 Caractéristiques des vaisseaux sanguins tumoraux

Les vaisseaux sanguins tumoraux diffèrent de leurs équivalents normaux. Ils ne deviennent pas quiescents, permettant une croissance constante. Ils ont des formes irrégulières, sont dilatés et tortueux. Ils ne sont pas organisés en veinules, artérioles et capillaires. Le réseau vasculaire qui se forme dans les tumeurs est souvent percé et hémorragique. Ceci est probablement dû à la surexpression du VEGF qui maintient une perméabilité excessive. Les cellules périvasculaires, qui habituellement sont en contact étroit avec l'endothélium, sont souvent associées aux cellules endothéliales de manière moins proche ou sont moins abondantes. Par conséquent, le flux sanguin dans les vaisseaux tumoraux est irrégulier, se déplaçant plus lentement et peut être oscillant.

2.4 Régulation de l'angiogenèse par l'hypoxie : rôle de HIF-1

Folkman *et al.* (1971) ont mis en évidence qu'un grand nombre de tumeurs développent une hypoxie sévère et secrètent des facteurs stimulant l'angiogenèse. Knighton *et al.* (1983) ont montré que des macrophages cultivés en hypoxie sécrétaient un facteur angiogénique. Suite à la caractérisation moléculaire de plusieurs facteurs de croissance angiogéniques, des études au début des années 1990 ont montré que l'hypoxie pouvait induire

Étapes du processus angiogénique	Activateurs
Vasodilatation	<i>Synthases de l'oxyde nitrique</i>
Augmentation de la perméabilité vasculaire	<i>VEGF</i> <i>Flt-1</i>
Libération de protéines plasmatiques « Sprouting » des cellules endothéliales	<i>VEGF</i> Angiopoïétine-2 Tie-2
Dégradation de la matrice extracellulaire	<i>TIMP-1 (Tissue inhibitor of metalloproteinase)</i> <i>Collagène prolyl-4-hydroxylase</i>
Prolifération et migration des cellules endothéliales	Interaction entre <i>VEGF</i> , angiopoïétines et FGFs MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein) PDGF
Recrutement des péricytes et cellules musculaires lisses	PDGF
Assemblage des cellules endothéliales et acquisition de la lumière	<i>VEGF</i> Tie-2
Stabilisation des vaisseaux néo-formés	<i>PAI-1 (Plasminogen activator inhibitor)</i>

Figure 8 : Résumé de l'action de l'hypoxie sur des molécules impliquées dans les différentes étapes du processus angiogénique (Pugh et Ratcliffe, 2003). En italique, gènes cibles de HIF identifiés comme tels par des études fonctionnelles des HRE présents au sein de leur promoteur.

l'expression des ARN_m du PDGF (Kourembanas *et al.*, 1990) et du VEGF (Shweiki *et al.*, 1992) dans des cultures tissulaires. Dans les tumeurs, l'expression de l'ARN_m du VEGF augmente considérablement dans les zones environnant le foyer nécrotique, suggérant un mécanisme par lequel un microenvironnement hypoxique stimulerait l'angiogenèse tumorale (Plate *et al.*, 1992). Ces études indiquent clairement que la disponibilité en oxygène est un régulateur important de l'angiogenèse.

La mise en évidence que la régulation transcriptionnelle de l'érythropoïétine et de facteurs angiogéniques clés est sous le contrôle d'un facteur de transcription commun, à savoir HIF-1, suggère la possibilité que l'angiogenèse soit régulée par l'oxygène spécifiquement via ce facteur de transcription.

Un grand nombre de gènes impliqués dans les différentes étapes de l'angiogenèse sont induits par l'hypoxie en culture tissulaire. On retrouve la synthèse de l'oxyde nitrique, des facteurs de croissance comme le VEGF, les angiopoïétines, les FGFs et leurs récepteurs, ainsi que des gènes impliqués dans le métabolisme de la matrice extracellulaire, comme les métalloprotéinases et la collagène prolyl hydroxylase. Pour un nombre important de ces gènes, des analyses de leur promoteur ont clairement identifié des HRE interagissant avec HIF-1 (figure 8).

- Gènes cibles de HIF-1 impliqués dans le processus de l'angiogenèse tumorale

Au niveau moléculaire, le processus d'angiogenèse est principalement initié par le facteur angiogénique VEGF. Des études réalisées sur les séquences flanquantes du gène codant pour le VEGF ont permis d'identifier deux sites consensus de liaison du facteur de transcription HIF-1 (HRE) (Minchenko *et al.*, 1994).

Le rôle de HIF-1 dans l'activation du gène codant pour le VEGF et dans la régulation physiologique de la formation de vaisseaux sanguins en réponse à l'hypoxie est très important. Des études ont démontré que l'hypoxie augmente également l'expression du récepteur au VEGF, VEGFR-1 (ou Flt-1), mais pas celle du récepteur VEGFR-2 (ou Flk-1). L'induction hypoxique de VEGFR-1 est associée à la présence d'un élément HRE fonctionnel situé dans la région promotrice du gène VEGFR-1 (Gerber *et al.*, 1997).

Le gène codant pour la forme inductible de l'hème oxygénase-1, une enzyme impliquée dans la production d'une molécule vasodilatatrice, le monoxyde de carbone (CO), est également induit par HIF-1 (Lee *et al.*, 1997).

Le monoxyde d'azote (NO), une autre molécule vasodilatatrice produite notamment par les cellules endothéliales, est également capable d'exercer une fonction relaxatrice sur les cellules musculaires avoisinantes. Une accumulation de NO est observée en hypoxie, elle résulte de la forme inductible de la synthèse de l'oxyde nitrique inductible (iNOS). On retrouve un élément HRE en amont du site d'initiation de la transcription du gène codant pour cette enzyme (Melillo *et al.*, 1995).

L'endothéline-1, un puissant agent vasoconstricteur synthétisé et libéré exclusivement par les cellules endothéliales, est également contrôlé par le facteur de transcription HIF-1 (Hu *et al.*, 1998).

En conclusion, en réponse à l'hypoxie, HIF-1 est capable d'activer des gènes qui vont d'une part gouverner la formation de vaisseaux sanguins et le développement d'une structure vasculaire adéquate et d'autre part, contrôler le flux sanguin. Ces deux phénomènes s'avèrent être essentiels à un apport renouvelé d'oxygène et de nutriments aux tumeurs hypoxiques, favorisant ainsi leur croissance et leur essaimage.

Family	Organism	Chaperones	Location	Functions (reference Nos.)
Hsp100	<i>E. coli</i>	ClpA,B,C	Cytosol	Role in stress tolerance; helps the resolubilization of heat-inactivated proteins from insoluble aggregates (82).
	<i>S. cerevisiae</i>	HSP104	Cytosol	
Hsp90	<i>E. coli</i>	HtpG	Cytosol	Role in signal transduction (e.g., interaction with steroid hormone receptors, tyrosine kinases, serine/threonine kinases); refolds and maintains proteins <i>in vitro</i> ; autoregulation of the heat shock response; role in cell cycle and proliferation (54,55,115-120).
	<i>S. cerevisiae</i>	HSP83	Cytosol	
	Mammals	HSP90 GRP94	Cytosol ER	
Hsp70	<i>E. coli</i>	DnaK	Cytosol	Roles in lambda phage replication; autoregulation of the heat shock response; interaction with nascent chain polypeptides; functions in interorganellar transport; roles in signal transduction; refolds and maintains denatured proteins <i>in vitro</i> ; role in cell cycle and proliferation; antiapoptotic activity; potential antigen-presenting molecule in tumor cells (43-46,86-95).
		Ssa 1-4	Cytosol	
	Ssb 1,2	Cytosol		
	Kar2	ER		
	Mammals	Ssc1	Mitochondria	
		HSC70	Cytosol/nucleus	
Hsp60	<i>E. coli</i>	HSP70	Cytosol/nucleus	
		BIP	ER	
	<i>S. cerevisiae</i>	mHSP70	Mitochondria	
	Mammals	groEL	Cytosol	
HSP60		Mitochondria		
Hsp40	<i>E. coli</i>	Cpn60	Chloroplasts	Refolds and prevents aggregation of denatured proteins <i>in vitro</i> ; may facilitate protein degradation by acting as a cofactor in proteolytic systems; role in the assembly of bacteriophages and Rubisco (an abundant protein in the chloroplast) (82).
		HSP60	Mitochondria	
Small Hsps	<i>E. coli</i>	dnaJ	Cytosol	Essential co-chaperone activity with Hsp70 proteins to enhance rate of adenosine triphosphatase activity and substrate release (43-47).
		Ydj1	Cytosol/nucleus	
	Mammals	Hdj1 and Hdj2	Cytosol	
Small Hsps	<i>E. coli</i>	lbp A and B	Cytosol	Suppresses aggregation and heat inactivation of proteins <i>in vitro</i> ; confers thermotolerance through stabilization of microfilaments; antiapoptotic activity (96,97).
		HSP27	Cytosol	
	Mammals	α A and α B crystallin	Cytosol	
		HSP27	Cytosol	

**E. coli* = *Escherichia coli*, *S. cerevisiae* = *Saccharomyces cerevisiae*, and ER = endoplasmic reticulum.

Figure 9 : Résumé de la nomenclature, de la localisation et des fonctions des principales protéines de choc thermique (heat shock proteins, HSP) (Jolly et Morimoto, 2000).

Les protéines de choc thermique et les protéines régulées par le glucose : deux familles de protéines induites par le stress

L'hypoxie entraîne une réponse spécifique dans les cellules de mammifères. Ces cellules peuvent également répondre à d'autres stress via un mécanisme de défense conservé au cours de l'évolution. Lors de cette réponse globale, des protéines « protectrices » sont synthétisées. Les protéines de choc thermique (Heat Shock Proteins, HSP) et les protéines régulées par le glucose (Glucose-Regulated Proteins, GRP) sont deux familles de protéines induites par les différents types de stress, y compris par l'hypoxie. Les propriétés de ces protéines sont décrites dans le chapitre qui suit.

1. Les protéines de choc thermique (heat shock proteins)

Chez tous les organismes, une brusque élévation de température provoque l'accumulation de protéines dénaturées, présentant une conformation tridimensionnelle altérée, et qui ont tendance à former des agrégats au sein des cellules. Ces protéines « non natives » induisent l'expression d'un groupe de gènes appelés « heat shock » gènes. Les protéines de choc thermique, produits de ces gènes, sont pour la plupart impliquées soit dans le repliement (folding), soit dans la dégradation des protéines non natives.

1.1 Découverte de la réponse heat shock

Au début des années soixante, le scientifique italien Ferruccio Ritossa étudiait le « puffing pattern » des chromosomes géants de glandes salivaires de la drosophile. Il observa, suite à une élévation transitoire de la température, un nouveau « puffing pattern », indiquant la transcription de nouveaux gènes. Il remarqua également qu'un profil similaire pouvait être induit par des traitements chimiques, suggérant que ces deux types de stress modifiaient la transcription génique de la même manière. Il avait ainsi mis en évidence la réponse « heat shock » (Ritossa, 1962).

Depuis lors, il a été montré que cette réponse est ubiquiste et hautement conservée, présente chez tous les organismes. Les gènes codant pour les HSP peuvent être induits non seulement par un changement de température, mais aussi par différents facteurs de stress regroupés en trois classes : les facteurs physico-chimiques (température, pH, osmolarité), les substances métaboliques nocives (éthanol, certains antibiotiques, les métaux lourds, les agents endommageant l'ADN), et des procédés métaboliques complexes (carence en carbone et acides aminés, infection virale). Ces différentes conditions sont toutes capables d'induire la dénaturation des protéines.

1.2 Classification des HSP

Les HSP sont réparties en six familles, en fonction de leur poids moléculaire : HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 et les petites heat shock protéines (figure 9). Au sein de chaque famille, on retrouve des membres qui sont exprimés de façon constitutive ou induite, et/ou localisés dans différents compartiments. Par exemple, HSP90 (Heat shock protein 90kDa) fonctionne à la fois dans les compartiments cytosolique et nucléaire, alors que la

transcription des gènes encodant les HSP via le facteur de transcription spécifique des heat shock proteins-1 (HSF-1).

Par contre, en condition normale, les HSP inhibent leur propre synthèse en empêchant l'activation de ce facteur (Morimoto, 1998).

- Les facteurs de transcription des heat shock proteins (HSF)

L'analyse moléculaire des gènes hsp a permis l'identification de l'élément de choc thermique (heat shock element, HSE), une séquence du promoteur sensible au stress et essentielle à l'induction des HSP. Cette séquence comprend des répétitions multiples, adjacentes et inversées du site de liaison 5'-nGAAn-3'. Les séquences HSE sont plus ou moins éloignées du site d'initiation de la transcription. Chez les vertébrés, l'induction de la transcription nécessite la liaison de facteurs de transcription, heat shock transcription factor (HSF) aux séquences HSE. Trois HSFs (HSF1, HSF2 et HSF4) ont été caractérisés chez l'homme (Wu, 1995 et Morimoto, 1998). HSF1 est exprimé de façon ubiquitaire et joue le rôle principal de l'expression des HSP en condition de stress. HSF2 est activé au cours d'étapes spécifiques du développement, au cours de la différenciation cellulaire et durant l'inhibition du protéasome. HSF4 possède une activité constitutive de liaison à l'ADN.

- Régulation de la réponse « heat shock »

Les chaperones moléculaires, comme HSP70, jouent un rôle direct dans l'autorégulation de la réponse « heat shock » (Schumann, 2001). Chez les eucaryotes supérieurs, HSF1 est présent dans les cellules non stressées et stressées. Cependant, en l'absence de stress, HSF1 est séquestré dans le cytoplasme, sous forme monomérique, lié à HSP70 ou à d'autres chaperones et ne peut induire la transcription génique. En effet, des interactions intramoléculaires et des phosphorylations constitutives répriment l'activité de liaison à l'ADN et le domaine de transactivation des HSF.

En condition de stress (figure 10), l'accumulation de protéines présentant une conformation altérée nécessite leur prise en charge par des chaperones moléculaires comme HSP70 et HSP90 et par la co-chaperone Hdj-1. L'accumulation de protéines endommagées constitue un pool de substrats additionnels qui entre en compétition avec HSF pour la liaison à HSP70. HSF1 libéré de HSP70, peut alors transloquer dans le noyau, former des trimères, se lier aux HSE en amont des gènes encodant les HSP et induire la transcription génique. Bien que l'activation transcriptionnelle des HSF1 nécessite de nouvelles phosphorylations, la kinase impliquée n'est pas connue.

Comme la synthèse des HSP augmente et lorsque la quantité de substrats dénaturés diminue, HSP70 et d'autres chaperones se relocalisent dans le noyau et se lient au domaine de transactivation de HSF, réprimant la transcription des gènes encodant les HSP. L'atténuation de la réponse « heat shock » dépend aussi de HSBP1 (Heat Shock Binding Protein 1) qui se lie à HSF1 et conduit à la dissociation des trimères en monomères. Ce processus permet de terminer la réponse « heat shock » quand le stress n'est plus présent.

GRP94 (Glucose Regulated Protein 94kDa) est localisée dans le réticulum endoplasmique (RE).

1.3 Les chaperones moléculaires et les protéases dépendantes de l'ATP

Un choc thermique exerce son effet destructeur principalement sur les protéines, avec pour conséquence des protéines en partie non repliées (unfolded) et mal repliées (misfolded) qui tendent à former des agrégats. On parle de protéines non-natives. Celles-ci seront prises en charge par les chaperones moléculaires afin d'être repliées ou dégradées par des protéases.

La majorité des HSPs sont soit des protéases dépendantes de l'ATP impliquées dans la dégradation des protéines dénaturées, soit des chaperones moléculaires (Schuman *et al.*, 2001).

- Les chaperones moléculaires

Les chaperones moléculaires représentent un groupe de protéines participant à la biogenèse protéique. Elles régulent la structure et la fonction des protéines aussi bien en condition physiologique normale qu'à la suite d'un stress donnant lieu à des protéines non repliées ou mal repliées. Les chaperones ont une fonction cellulaire commune : stabiliser provisoirement les protéines en partie repliées ou mal repliées et empêcher des interactions inter- et intra-moléculaires résultant en des protéines mal repliées ou agrégées. La fonction chaperone de ces protéines dépend de leur capacité à reconnaître et à se lier aux régions hydrophobes de protéines durant leur synthèse ou après dénaturation des protéines natives suite à un stress environnemental. Cette liaison, non-covalente et réversible, diminue la tendance des protéines non natives à former des agrégats. Malgré cette fonction commune, les structures moléculaires et les mécanismes d'action des différentes chaperones sont remarquablement différents. Le mode d'action, les interactions avec des cochaperones et les spécificités de substrats sont variables.

Les chaperones moléculaires sont divisées en deux catégories en fonction de leur dépendance énergétique. Les chaperones dépendantes et indépendantes de l'ATP agissent ensemble pour garantir la survie des cellules stressées. Alors que les chaperones dépendantes de l'ATP, les « foldases », influencent le repliement des protéines, les chaperones indépendantes de l'ATP, les « holdases », empêchent l'agrégation des protéines mal repliées.

Les chaperones moléculaires et les protéases perçoivent l'état de repliement des protéines et maintiennent l'homéostasie protéique cellulaire. Ces systèmes de contrôle de qualité des protéines sont conservés au niveau fonctionnel et structurel au cours de l'évolution, de *E. coli* à l'homme.

1.4 Régulation transcriptionnelle des HSP

L'accumulation de protéines mal repliées dans les cellules exposées à des stress environnementaux (choc thermique, irradiation UV et produits chimiques toxiques), physiologiques (pression en oxygène augmenté ou diminuée, état métabolique et pH) et physiopathologiques (fièvre, inflammation, infection, ischémie/reperfusion et cancer) active la

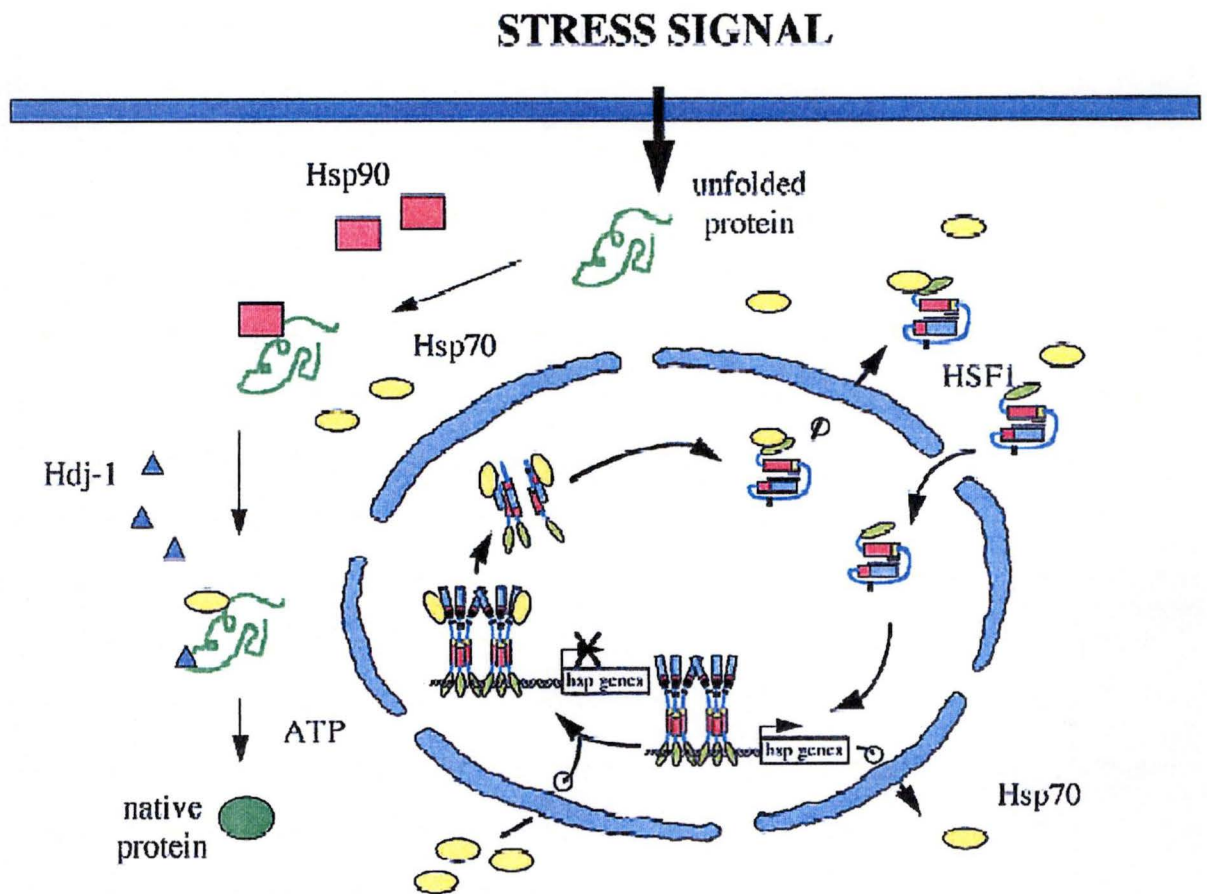


Figure 10 : Régulation de la réponse « heat shock » (Santoro, 2000). En condition de stress, l'accumulation de protéines présentant une conformation altérée nécessite leur prise en charge par des chaperones moléculaires comme HSP70 et HSP90 et par la co-chaperone Hdj-1. Les protéines endommagées entrent en compétition avec HSF1 pour la liaison à HSP70. HSF1 libéré de HSP70, peut alors transloquer dans le noyau, former des trimères, se lier aux HSE en amont des gènes encodant les HSP et induire la transcription génique. Comme la synthèse des HSP augmente et lorsque la quantité de substrats dénaturés diminue, HSP70 et d'autres chaperones se relocalisent dans le noyau et se lient à HSF1, réprimant la transcription des gènes encodant les HSP.

2. Cancer et Hsp

2.1 Cancer et dérégulation de l'expression des gènes HSP

Les cellules et les tissus tumoraux expriment généralement des niveaux atypiques d'une ou plusieurs HSP (Morimoto, 1991 ; Fuller *et al.*, 1994). L'expression altérée de ces HSP pourrait être favorisée par l'environnement hypoxique des tumeurs pauvrement vascularisées. Une augmentation de l'expression de la HSP27 est ainsi observée dans de nombreux cancers, comme les cancers du sein et de l'endomètre et la leucémie. On note également une expression accrue des membres de la famille des HSP70 dans les tumeurs malignes. D'autres membres de la famille des HSP, comme HSP90 et HSP60, sont surexprimés dans les cancers du sein et du poumon et au cours de certaines leucémies (Jolly et Morimoto, 2000).

L'expression des HSP dans les cancers du sein et de l'estomac est associée à un pronostic peu favorable et à une résistance à la chimiothérapie et à la radiothérapie (Conroy *et al.*, 1996). Dans les tumeurs du sein, l'expression élevée de HSP70 est associée à une courte survie, à la formation de métastases et à un mauvais pronostic parmi les patients traités par chimiothérapie, radiothérapie ou hyperthermie.

2.2 HSP et dérégulation de la croissance cellulaire

Les HSP, via leur activité de chaperone moléculaire, modifient les propriétés de nombreuses protéines importantes dans les cellules cancéreuses, comme des facteurs de transcription et des molécules intervenant dans les voies de transduction du signal. En conséquence, cette dérégulation des HSP pourrait participer à la perte du contrôle de la croissance cellulaire et à l'inhibition des effets de l'apoptose.

Ainsi, la surexpression de chaperones, par transfection stable dans des cultures cellulaires ou dans des animaux transgéniques, provoque la transformation cellulaire et la formation de tumeurs, mettant de ce fait en évidence le lien entre les chaperones et la dérégulation du cycle cellulaire. Cette surexpression n'est, par elle-même, cependant pas suffisante pour causer la transformation cellulaire. Le processus de transformation cellulaire utiliserait des composants de la machinerie de la réponse cellulaire au stress pour modifier la conformation et/ou l'activité de protéines suppresseur de tumeur mutantes. De même, des niveaux atypiques de chaperones moléculaires potentialiseraient l'activité de transformation d'oncogènes, interférant ainsi avec les voies de transduction du signal induites par le stress (Jolly et Morimoto, 2000).

2.3 Mort cellulaire et HSP

Les cellules exposées au stress activent une réponse pour survivre, mais si celui-ci est amplifié, les cellules vont néanmoins mourir par nécrose ou par apoptose.

L'apoptose, ou mort cellulaire programmée, est bien décrite dans le contexte de la morphogenèse embryonnaire et du développement. De nombreux signaux font entrer la cellule en apoptose par modification de l'équilibre entre les protéines pro- et anti-

apoptotiques. Les cellules activent ensuite une cascade de caspases (cystein-containing aspartic-acid specific proteases) responsables du clivage de molécules cibles. Il en résulte une dégradation cellulaire irréversible avec dysfonctionnement des organelles, condensation de la chromatine nucléaire, contraction du cytoplasme, fragmentation nucléaire et formation de corps apoptotiques. Finalement, les corps apoptotiques sont phagocytés et dégradés par les macrophages et les cellules avoisinantes.

Un nombre croissant d'études mettent en évidence le lien entre les voies biologiques de l'apoptose et la réponse au stress. Les conditions de stress, comme un choc thermique, induisent la réponse « heat shock », mais peuvent aussi provoquer l'apoptose ou la nécrose, en fonction de l'intensité et de la durée du stress. Outre son rôle dans le maintien de la structure des protéines, la réponse heat shock peut également protéger les cellules de la mort cellulaire induite par des conditions de stress (Jolly et Morimoto, 2000).

Ces effets ont particulièrement été démontrés pour HSP70. En effet, l'utilisation d'oligonucléotides antisens dirigés contre HSP70 a pour conséquence l'inhibition de la prolifération des cellules tumorales et l'apoptose (Wei *et al.*, 1995). Inversement, un niveau élevé de HSP70 empêche l'apoptose induite par des conditions de stress (Mosser *et al.*, 1997).

Des stress comme l'irradiation UV endommagent l'ADN. L'apoptose qui en résulte est médiée par la libération du cytochrome *c* des mitochondries et l'activation des caspases. La surexpression de HSP70 diminue ou bloque l'activation des caspases et supprime la fragmentation nucléaire. HSP70 inhibe l'apoptose en empêchant le recrutement des procaspases 9 et 3 nécessaires à l'assemblage d'un apoptosome fonctionnel (Beere *et al.*, 2000).

3. Les protéines régulées par le glucose (glucose-regulated proteins)

3.1 Découverte

Ira Pastan a découvert les GRPs en 1977. Il observa que deux protéines, de 78 et 94 kDa respectivement, identifiées ultérieurement comme GRP78 (ou Bip) et GRP94 (ou gp96), étaient fortement induites dans des fibroblastes d'embryon de poulet cultivés dans du milieu sans glucose (Shiu *et al.*, 1977).

La famille des protéines régulées par le glucose (GRP) comprend GRP94, GRP78, Erp72 et GRP58. On retrouve ces protéines dans le réticulum endoplasmique en condition physiologique normale. Elles y sont surexprimées quand la cellule est soumise à un stress perturbant les fonctions du RE.

Deux protéines localisées hors du RE, le transporteur de glucose, GLUT 1, et la glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase, GAPDH, sont régulées de manière semblable aux GRP, c'est-à-dire que leur expression est augmentée en condition de déficience au glucose.

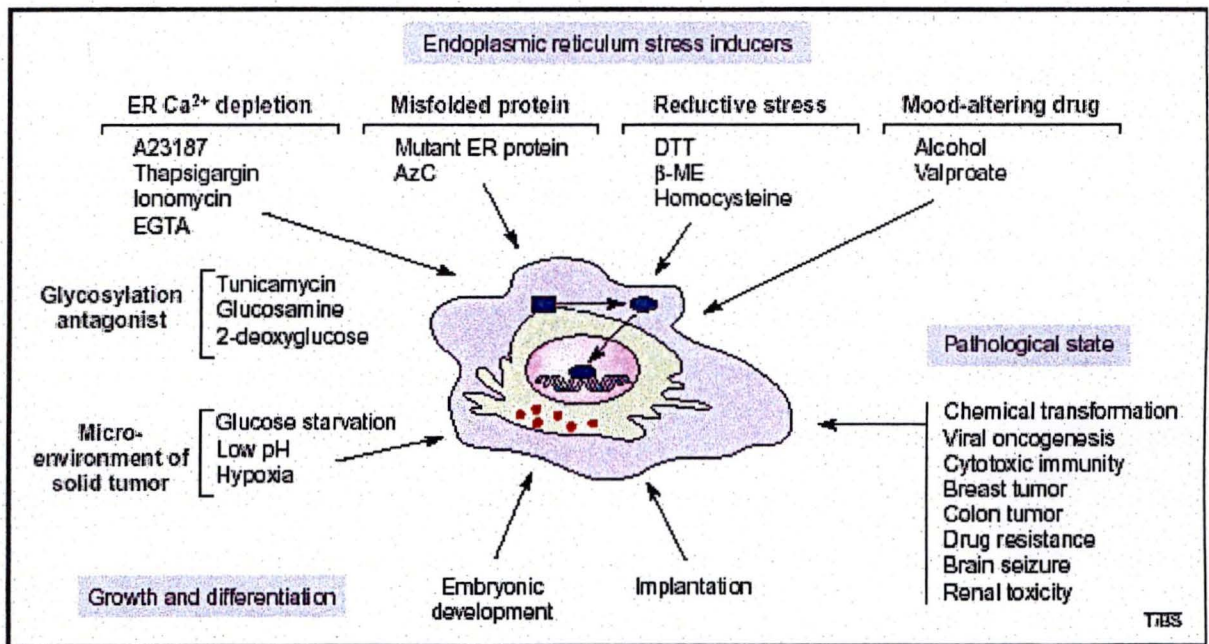


Figure 11 : Résumé des conditions connues pour induire les protéines de la famille des GRP chez les mammifères. Des conditions de stress perturbant l'homéostasie du RE activent des facteurs de transcription spécifiques qui induisent l'expression des GRP (Lee, 2001). A23187 est un ionophore du Ca^{2+} ; AzC : azétidine-2-carboxylique ; β -ME : β -mercaptoéthanol ; DTT : dithiothréitol.

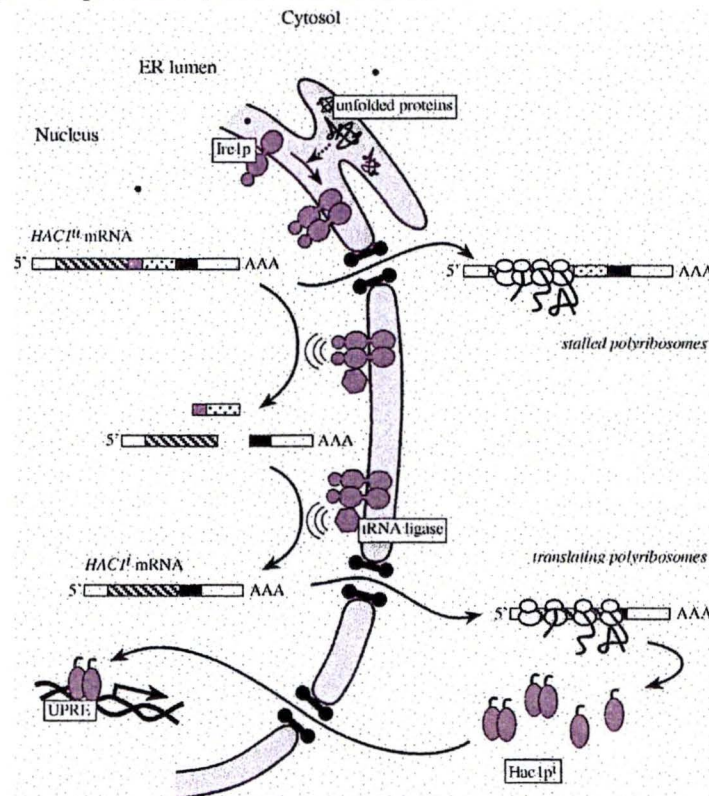


Figure 12 : Réponse UPR chez la levure (Chapman *et al.*, 1998). L'accumulation de protéines dénaturées dans le RE active Ire1p, une protéine transmembranaire. Ire1p clive alors l'ARNm de HAC1, identifié initialement comme homologue de la famille des facteurs de transcription de type bZIP. La tRNA ligase lie ensuite les deux exons de HAC1 et produit l'ARNm épissé de HAC1. Seule cette forme épissée de l'ARNm de HAC1 donne la protéine HAC1. Cette dernière entre alors dans le noyau, se lie à l'UPRE (Unfolded Protein Response Element) et induit la transcription des gènes GRP chez la levure.

3.2 Induction des GRP

En culture cellulaire, l'inhibition de la glycosylation protéique et les agents réducteurs induisent l'expression des gènes GRP chez la levure et dans les cellules de mammifères. Un pH extracellulaire bas, une infection virale et une diminution importante de la quantité de glucose et d'oxygène intracellulaire induisent également la synthèse des protéines de la famille des GRP. D'autres conditions sont connues pour induire spécifiquement l'expression des protéines de la famille des GRP chez les eucaryotes supérieurs (figure 11). La thapsigargine, inhibiteur spécifique de la Ca^{2+} -ATPase du RE, les ionophores du Ca^{2+} comme A23187 et l'ionomycine, ainsi que l'EGTA, réduisent le stock de Ca^{2+} dans le RE et activent, de ce fait, la transcription des GRP. Toutes ces conditions, perturbant l'homéostasie du RE, conduisent généralement à l'accumulation dans le RE de protéines présentant une conformation tridimensionnelle altérée.

In vivo, les GRP sont requises au cours du développement embryonnaire. Par exemple, l'expression de GRP78 est élevée dans le cœur d'embryons de souris (Barnes *et al.*, 2000). On observe des niveaux élevés de la GRP78 et la GRP94 dans les cerveaux de rats immatures, comparativement aux niveaux trouvés dans les cerveaux des animaux adultes. La GRP78 et la GRP94 s'accumulent également dans le cerveau de rats adultes après une ischémie cérébrale, un traumatisme crânien ou une attaque (Little *et al.*, 1996).

Des conditions pathologiques comme la croissance tumorale conduisent également à une surexpression de la GRP78 et de la GRP94 (Little *et al.*, 1994). La déprivation de glucose, l'acidose et l'hypoxie, caractéristiques du microenvironnement des tumeurs pauvrement vascularisées, sont probablement la cause de cette activation de l'expression des gènes GRP (Gazit *et al.*, 1999).

3.3 Régulation transcriptionnelle des GRP

Les GRP sont exprimées de façon constitutive dans tous les types cellulaires. Suite à l'accumulation de protéines mal conformées dans le RE, un signal active sélectivement la transcription des gènes codant les GRP ainsi que ceux codant d'autres protéines localisées dans le RE comme la protéine disulfide isomérase (PDI). Cette réponse est la « Unfolded Protein Response » (UPR). La UPR implique également une diminution transitoire de la synthèse protéique, la dégradation des protéines dénaturées et l'induction de l'apoptose. Elle est initiée en réponse à une perturbation de l'homéostasie du RE.

- Mécanisme d'induction des gènes GRP chez la levure *S. cerevisiae*

L'accumulation de protéines présentant une conformation altérée dans le RE active Ire1p (high Inositol-Requiring mutant), une protéine transmembranaire. Ire1p clive alors l'ARNm de HAC1 (Homology to ATF and CREB), identifié initialement comme homologue de la famille des facteurs de transcription de type bZIP. La tRNA ligase lie ensuite les deux exons de HAC1 et produit l'ARNm épissé de HAC1. Seule cette forme épissée de l'ARNm de HAC1 donne la protéine HAC1. Cette dernière entre alors dans le noyau, se lie à l'UPRE (Unfolded Protein Response Element) et induit la transcription des gènes GRP chez la levure (Chapman *et al.*, 1998) (figure 12).

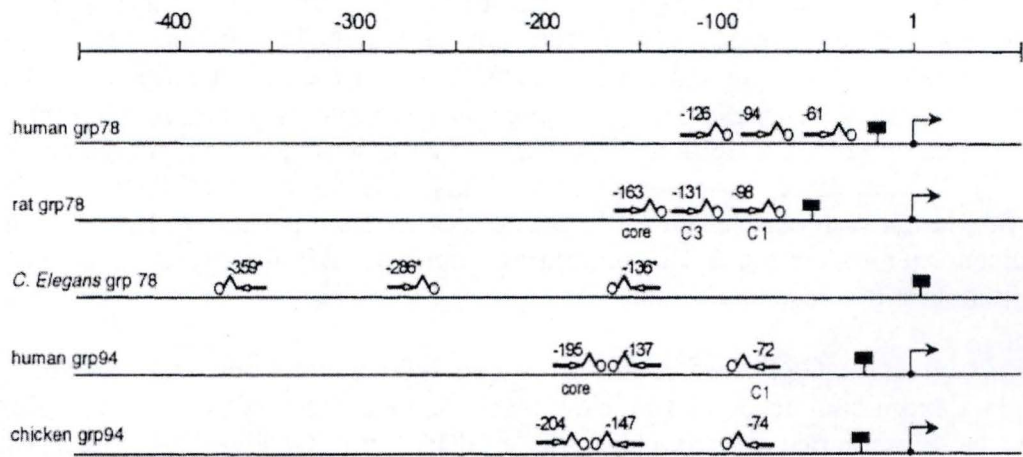


Figure 13 : Représentation schématique des ERSE dans le promoteur de gènes encodant des protéines du RE (Roy et Lee, 1999). Les éléments ERSE des promoteurs de la GRP78 et de la GRP94 sont représentés. Ils présentent un motif CCAAT (→) et un motif CCACG (o) séparés par une répétition de 9 pb (^). La TATA box est indiquée par \blacksquare et le site d'initiation de la transcription par \rightarrow

Chapman *et al.* (1998) propose un modèle d'activation de Ire1p, similaire au mécanisme de régulation de HSF1 par HSP70. Ire1p serait lié à une chaperone en l'absence de protéines présentant une conformation altérée dans le RE. Cette liaison maintiendrait Ire1p sous forme inactive. Lorsque la concentration de protéines dénaturées augmenterait, la chaperone libérerait Ire1p et permettrait de la sorte son activation.

- Mécanisme d'induction des gènes GRP de mammifères

Une caractéristique commune aux promoteurs des gènes GRP de mammifères est qu'ils contiennent des copies multiples de l'élément ERSE (ER stress element) (figure 13). La séquence consensus de cet ERSE est CCAAT-(N₉)CCACG (Yoshida *et al.*, 1998) et s'avère plus complexe que le UPRE de levure. La séquence de 9 paires de bases, remarquablement riche en GC, est une partie intégrale de la structure nécessaire pour permettre à l'ERSE de fonctionner ainsi que pour la liaison de nouveaux complexes induits par le stress. Alors qu'une seule copie de l'ERSE est insuffisante pour conférer l'inductibilité suite à un stress touchant le RE, les copies en tandem de l'ERSE sont toutes fonctionnelles et peuvent agir indépendamment de leur orientation.

Bien que la réponse UPR soit bien caractérisée chez la levure, le mécanisme de la UPR de mammifère est peu connu. Alors que deux homologues de Ire1p, Ire1 α et Ire1 β , sont identifiés dans les génomes humain et murin, l'homologue de HAC1 n'a pas encore été identifié chez les mammifères.

Yoshida *et al.* (1998) ont également isolé une protéine de type bZIP, ATF6, qui surexprimée induit la promoteur de la GRP78 de manière dépendante des ERSE.

D'autres facteurs de transcription, comme NF-Y, YY1 et TFII-I, peuvent aussi lier et activer l'ERSE. Le facteur NF-Y, se liant à la séquence CCAAT (CCAAT-Binding Factor, CBF), est requis à la fois pour la transcription basale et la transcription induite par le stress des gènes GRP (Yoshida *et al.*, 2001). Le facteur de transcription Ying Yang, YY1, lie le motif CCACG en retard sur gel (Li *et al.*, 1997). NF-Y et YY1 sont connus pour interagir avec des protéines modifiant l'acétylation des histones et avec des composants de la machinerie transcriptionnelle basale. Le facteur de transcription TFII-I lie, quant à lui, le motif riche en GC (Parker *et al.*, 2001).

3.4 Fonctions multiples des GRP

- Chaperones moléculaires

La majorité des GRP sont des chaperones moléculaires du RE qui participent au repliement et à l'assemblage des protéines. Par exemple, dans les cellules immunitaires, GRP78 (Bip) lie les chaînes lourdes et légères de l'immunoglobuline avant leur assemblage. GRP78 s'associe également à des protéines HA (hémagglutinine) qui sont incapables de se replier correctement toutes seules (Little *et al.*, 1994).

- Rôle anti-apoptotique des GRP

Des études de surexpression et des approches utilisant la technique antisens ou des ribozymes montrent que la GRP94 et la GRP78 peuvent protéger les cellules de la mort

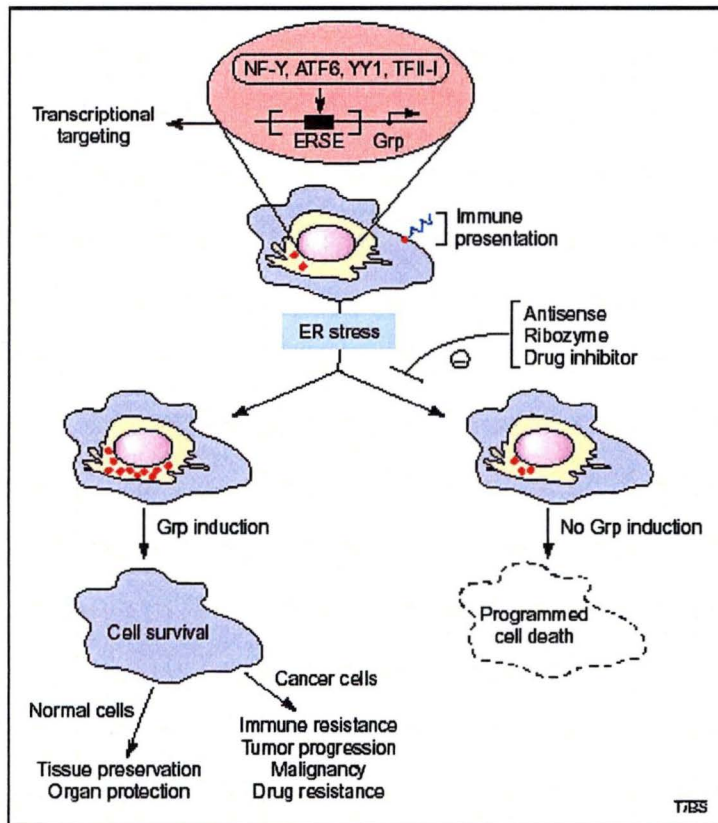


Figure 14 : Induction et rôle protecteur des GRP (Lee, 2001). Des conditions de stress perturbant l'homéostasie de RE induisent l'expression des GRP. L'utilisation d'inhibiteurs comme la génistéine ainsi que des approches utilisant la technique antisens ou des ribozymes montrent que les GRP peuvent protéger les cellules de la mort cellulaire. L'induction des GRP peut ainsi préserver les organes et les tissus exposés à des stress. On observe également les GRP dans les cellules néoplasiques où leur fonction anti-apoptotique participe à la progression de la tumeur et à la résistance aux médicaments.

cellulaire (figure 14). L'induction des GRP peut ainsi préserver les organes et les tissus exposés à des stress. Une induction de la GRP78 est, par exemple, observée dans les cellules endothéliales endommagées par un stress réducteur causé par l'hyperhomocystéinémie³ (Outinen *et al.*, 1999).

Bien que le mécanisme expliquant l'effet anti-apoptotique des GRP ne soit pas compris, un mutant de la GRP78, incapable d'hydrolyser l'ATP, activité requise pour son rôle de chaperone, perd son effet protecteur. On peut donc penser que son activité de chaperone est nécessaire à son effet anti-apoptotique.

- Les GRP et la chimiothérapie anti-cancéreuse

On observe les GRP dans les cellules néoplasiques où leur fonction anti-apoptotique participe à la progression de la tumeur et à la résistance aux médicaments (figure 14). Dans de nombreuses tumeurs malignes, les niveaux de GRP78 et GRP94 sont élevés.

La suppression de l'induction de GRP78 augmente l'apoptose des cellules cancéreuses, inhibe la croissance tumorale (Jamora *et al.*, 1996) et augmente la mortalité des cellules hypoxiques (Koong *et al.*, 1994). Par conséquent, supprimer l'expression ou l'activité des GRPs dans les cellules cancéreuses représente une nouvelle approche potentielle de la chimiothérapie anti-cancéreuse.

- Utilisation du promoteur de la GRP78 en thérapie génique

Les zones d'acidose, de déprivation en nutriments et d'hypoxie des tumeurs pauvrement vascularisées activent spécifiquement le promoteur de la GRP78. L'utilisation de ce promoteur pour cibler l'expression de gènes thérapeutiques au niveau des tumeurs faiblement perfusées offre une nouvelle approche de thérapie génique. De plus, le promoteur de la GRP78 est induit par une forme de thérapie au laser (la thérapie photodynamique), ce qui permet de contrôler l'expression spatiale et temporelle des gènes thérapeutiques.

4. La GRP94 (Glucose-regulated protein 94 kDa)

La GRP94, aussi appelée gp96 ou endoplasmine, est la glycoprotéine la plus abondante dans le RE. Alors que les autres GRPs sont conservées de la levure à l'homme, la GRP94 a seulement été identifiée chez les vertébrés.

4.1 Caractéristiques moléculaires et structure

La GRP94 est encodée par le gène *tra-1* (tumor rejection antigen-1), localisé sur le chromosome 12 (12q24.2-12q24.3).

La GRP94 est une glycoprotéine (N-glycosylation et O-glycosylation) dont le profil de glycosylation peut changer après un stress cellulaire. Ainsi, suite à une déprivation de glucose ou un traitement à la tunicamycine, la GRP94 induite est sous forme non glycosylée. Certains types de tumeurs montrent une variation du profil de glycosylation de la GRP94 (Feldweg et Srivastava, 1995). La GRP94 partage approximativement 50% d'homologie avec

³ L'hyperhomocystéinémie est associée à un risque élevé d'athérosclérose et de maladies coronariennes.

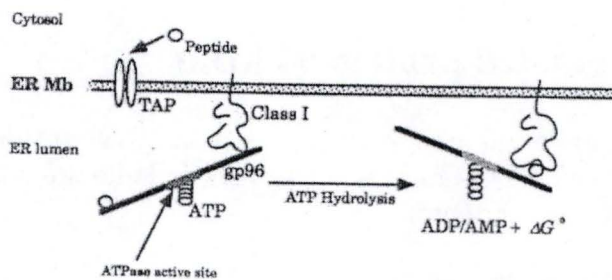


Figure 15: Présentation de peptides au CMH1 (Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe 1) par la GRP94 (Li et Srivastava, 1993). L'interaction entre le CMH1 et la GRP94 stimule son activité ATPase. L'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP permet le transfert des peptides de la GRP94 au CMH1.

son équivalent cytoplasmique, HSP90. Comme ce dernier, la GRP94 forme des dimères et est phosphorylée par de nombreuses kinases. Le degré de phosphorylation *in vivo* peut varier en fonction du type cellulaire. La dimérisation est favorisée par des interactions hydrophobes entre deux molécules de GRP94. Un pont disulfure peut éventuellement stabiliser la dimérisation. La GRP94 est également capable d'hétérodimériser avec HSP90.

Bien que la GRP94 soit une protéine hydrophobe et tende à s'associer avec la membrane du RE, la majorité de la protéine est localisée dans la lumière du RE (lisse). Le domaine C-terminal de la GRP94 contient la séquence -KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu), qui est le signal de rétention des protéines du réticulum endoplasmique.

Cependant, en condition de stress, la GRP94 se retrouve également dans l'appareil de Golgi (Booth et Koch, 1989), dans le noyau (Welch *et al.*, 1983) ; et est en partie libérée dans l'espace extracellulaire (cellules nécrotiques) (Takemoto *et al.*, 1992) ou au niveau de la membrane plasmique (Altmeyer *et al.*, 1996). Cette expression en surface de cellules stressées est confirmée par de nombreux laboratoires. De plus, Srivastava *et al.* (1986) observent l'expression de la GRP94 en surface de différentes cellules tumorales, chez l'homme. Actuellement, le détail moléculaire de l'attachement en surface de la GRP94 et le mécanisme exact de sa sécrétion ne sont pas connus.

4.2 Fonctions cellulaires

- Contrôle de qualité des protéines du réticulum endoplasmique

Les protéines nouvellement synthétisées sont transloquées et retenues dans le RE où elles s'associent aux chaperones moléculaires. La GRP94 s'associe à de nombreux intermédiaires de folding de ces protéines dans la lumière du RE où elle exerce son activité de chaperone.

La GRP94 s'associe à de nombreuses autres chaperones du RE, comme la GRP78, la calréticuline, la calnexine, la protéine disulfide isomérase Erp72, etc. Le mécanisme exact de coopération entre les chaperones, ainsi que le rôle de la GRP94 dans ce processus n'est pas clair. Melnick *et al.* (1994) suggèrent cependant que la GRP94 peut se lier aux protéines après une étape précédente de « pré-folding » réalisée par la GRP78. Ainsi, durant leur transit dans le RE, les chaînes légères et lourdes de l'immunoglobuline nouvellement synthétisées s'associent avec GRP78 et GRP94. La GRP78 lie un intermédiaire précoce des chaînes légères et s'en dissocie après quelques minutes. La GRP94 s'y lierait ensuite.

- Présentation de peptides antigéniques

Dans de nombreuses lignées cellulaires cancéreuses, le niveau de la GRP94 est élevé. La GRP94 est, par exemple, surexprimée dans l'adénocarcinome du colon (Menoret *et al.*, 1994), dans des fibrosarcomes murins (Cai *et al.*, 1993) et dans les cancers du sein (Haverty, 1997).

L'immunisation de souris avec des préparations de GRP94/gp96, purifiées à partir de tumeurs, provoque l'immunité cellulaire contre ces tumeurs (Srivastava *et al.*, 1986). Srivastava *et al.* (1991) proposent que la GRP94 ne soit pas immunogénique *per se*, mais peut chaperonner des peptides antigéniques. Li et Srivastava (1993) proposent un modèle selon lequel GRP94 agit comme accepteur des peptides antigéniques dans le RE, qu'elle présente ensuite au complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH I) (figure 15).

Suto et Srivastava (1995) proposent un mécanisme par lequel les complexes HSP-peptide stimulent la réponse immunitaire. Les antigènes chaperonnés par les HSP comme GRP94/gp96 sont pris en charge spécifiquement par les cellules présentatrices d'antigènes

(APC) et re-présentés par les molécules du CMH I. La présentation de ces peptides en surface des APC conduit à la stimulation des lymphocytes T CD8⁺.

Binder *et al.* (2000) ont identifié un récepteur de la GRP94 dans les membranes des phagocytes comme étant la protéine CD91, déjà connue comme récepteur de l' α_2 -macroglobuline.

Des complexes GRP94-peptides, isolés à partir de cellules ou reconstitués *in vitro*, ont servi d'immunogènes pour provoquer des réponses immunes spécifiques aux peptides antigéniques chaperonnés par GRP94. Des immunisations de souris avec de faibles concentrations en complexes GRP94-peptides inhibent la croissance tumorale. On n'observe pas d'auto-immunité, ce qui renforce l'idée que la réponse immune cible les peptides et non la GRP94. Des études pilotes sur des patients cancéreux, « vaccinés » avec des préparations de GRP94 en provenance de leur tumeur, ont été réalisées (Janetzki *et al.*, 2000). Les résultats de ces études sont encourageants : le profil de toxicité des vaccins GRP94-peptides est faible, la réponse immune est positive chez une proportion significative de patients immunisés et il est possible d'obtenir des quantités suffisantes de HSP à partir d'une petite quantité de tissu tumoral, ce qui montre la faisabilité du test.

- Mort cellulaire et apoptose

La GRP94 joue un rôle protecteur de la mort cellulaire suivant un stress touchant le RE. En effet, l'expression de la GRP94 augmente dans les cellules neuroblastomiques humaines (cellules SH-SY5Y) exposées à un stress hypoxie/réoxygénation. Ce stress provoque la mort cellulaire de ces cellules et est associé à une activation de la caspase-3 et de la calpaine, ainsi qu'à une élévation de la concentration en calcium intracellulaire. Diminuer l'expression de la GRP94 réduit la viabilité des cellules SH-SY5Y sujettes au stress, comparativement aux cellules sauvages ou à des cellules surexprimant la GRP94. La suppression de l'expression de la GRP94 conduit à une apoptose accélérée tandis que la surexpression de la GRP94, en tant que protéine de stress, supprime la mort neuronale causée par un stress oxydatif et stabilise l'homéostasie du calcium dans le RE. *In vivo*, les neurones de gerbille surexprimant la GRP94 sont résistants aux dommages ischémiques (Bando *et al.*, 2003). De même, Vitadello *et al.* (2003) ont démontré que la surexpression de la GRP94 réduit la nécrose des cardiomyocytes causée par une surcharge de calcium ou par l'ischémie.

La GRP94 prévient également l'apoptose induite par la thapsigargine (TG). En effet, l'induction de GRP78/GRP94 est critique pour maintenir la viabilité des cellules épithéliales et des fibroblastes après un traitement à la TG. Des manipulations sur d'autres types cellulaires suggèrent une corrélation entre l'induction des GRP78/GRP94 et la résistance à l'apoptose induite par la TG (McCormick *et al.*, 1997).

Durant l'apoptose induite par l'étoposide⁴, la GRP94 est clivée par la calpaine. Cette étude montre que la GRP94, en plus de sa fonction de cytoprotection, est la cible de protéases durant l'apoptose (Reddy *et al.*, 1999).

La GRP94 possède donc des propriétés anti-apoptotiques. Cependant la relation entre celles-ci et la machinerie apoptotique ainsi que son rôle dans l'homéostasie du calcium dans le RE, ne sont pas encore compris.

⁴ Inhibiteur de la topoisomérase II

Conclusion

Les protéines de choc thermique et les protéines régulées par le glucose sont deux familles de protéines induites en condition de stress. Les HSP et les GRP sont des molécules anti-apoptotiques qui jouent un rôle de protection contre les stress. L'expression de ces deux familles de protéines dans les cellules tumorales est probablement liée à l'environnement hypoxique caractéristique des tumeurs. Des études concernant l'induction des HSP et GRP en hypoxie devraient donc nous éclairer sur leur rôle de cytoprotection face à un tel stress.

Objectifs du mémoire

Dans le cadre d'études menées au laboratoire concernant le rôle de l'hypoxie dans le développement des tumeurs, des travaux visant à étudier la réponse adaptative des cellules endothéliales à l'hypoxie sont menés. Ainsi, Sébastien Paris a étudié le profil d'expression protéique, par une approche en gels 2D, des cellules endothéliales humaines incubées *in vitro* dans des conditions hypoxiques. Parmi les protéines identifiées comme étant surexprimées en hypoxie, la GRP94 nous a paru très intéressante. En effet, cette protéine est induite dans différentes conditions de stress et participe à la réponse adaptative des cellules. L'objectif de ce mémoire était donc de mieux caractériser la surexpression de la GRP94 dans des cellules endothéliales humaines, les EAhy926, en hypoxie. La régulation de la transcription de la GRP94 en hypoxie a ensuite été étudiée.

La première partie de ce mémoire a consisté à étudier le profil d'évolution de la quantité d'ARNm de la GRP94 d'une part, et le profil d'évolution de la quantité de protéines d'autre part, au cours de l'hypoxie. Pour cette étude, nous avons réalisé des PCR en temps réel et des Western blots à différents temps d'incubation en hypoxie.

Une étude en immunofluorescence a également été réalisée afin d'étudier la localisation subcellulaire de la GRP94.

L'étude du promoteur du gène *tra-1*, codant pour la GRP94 humaine, a constitué la deuxième partie de ce mémoire. L'analyse de la séquence de ce promoteur a révélé la présence de plusieurs séquences HRE fixant potentiellement HIF-1. Des expériences de compétition pour la liaison de HIF-1 sur chacun des sites HRE présents au sein du promoteur de *tra-1* ont été réalisées. Nous avons également cloné le promoteur du gène *tra-1* humain, en amont du gène rapporteur luciférase, et réalisé des expériences de mutagenèse dirigée. Ces constructions ont été transfectées dans des cellules qui ont été ensuite incubées en hypoxie afin de mesurer l'activité promotrice de ces différentes constructions.

L'ensemble de ces expériences devrait nous permettre de mieux comprendre la régulation de l'expression de la GRP94 en hypoxie dans les cellules endothéliales humaines ainsi que la réponse adaptative de ces cellules à des conditions de stress, telles que celles observées au sein des tumeurs.

Matériel
et
Méthodes

Milieux	Composition
Milieu complet utilisé pour les EAhy926	Milieu DMEM contenant 4,5 g/l de glucose (Invitrogen) Antibiotiques : Pénicilline (50 U/ml, BioWhittaker) Streptomycine (50 µg/ml, BioWhittaker) 10% de sérum de veau foetal (Gibco)
Milieu complet utilisé pour les HepG2	Milieu DMEM contenant 1 g/l de glucose (Invitrogen) Antibiotiques : Pénicilline (50 U/ml, BioWhittaker) Streptomycine (50 µg/ml, BioWhittaker) 10% de sérum de veau foetal (Gibco)
Milieu CO₂ indépendant complet	Milieu CO ₂ indépendant (Gibco) 0,5 mM L-glutamine (Sigma)

Tableau 1: Composition des milieux utilisés pour la culture cellulaire.

Anticorps primaires	GRP94 (SPA-850, Stressgen) dilué 100 × dans du PBS- BSA 1% GM130 (G65120, Transduction Laboratories) dilué 100 × dans du PBS-BSA 1% PDI (MA3-019, Affinity BioReagent) dilué 100 × dans du PBS-BSA 1%
Anticorps secondaires	Anticorps anti-IgG de rat couplé à l'Alexa 488 (Molecular Probes) dilué 1000 × dans du PBS- BSA 1% Anticorps anti-IgG de souris couplé à l'Alexa 568 (Molecular Probes) dilué 1000 × dans du PBS- BSA 1%
Solution de ToPro 3	ToPro3 (Molecular Probes) dilué 80 × dans une solution de RNase (ICN Biomedicals) à 2 mg/ml dans du PBS

Tableau 2 : Solutions utilisées pour les marquages immunofluorescence.

1. Culture cellulaire

Le modèle cellulaire utilisé est la lignée humaine EAhy926. Il s'agit d'une lignée permanente obtenue à partir de la fusion entre des cellules HUVEC, cellules endothéliales humaines de cordon ombilical et des cellules de la lignée permanente A549, issues d'un carcinome pulmonaire humain (Edgell *et al.*, 1983). Les cellules HepG2, issues d'un hépatome humain, ont également été utilisées lors de ce mémoire.

Conditions de culture

Les cellules sont maintenues en culture dans des boîtes de culture de 75 cm² (T75) (Costar) contenant 15 ml de milieu de culture complet (tableau 1) et placées dans une étuve à 37°C (5% CO₂, 95% air atmosphérique, 90% hygrométrie). Lorsqu'elles sont confluentes, les cellules sont repiquées selon le protocole suivant :

Le milieu de culture est décanté et les cellules sont rincées deux fois dans 10 ml de PBS (Phosphate Buffer Saline, 0,9% NaCl- 10 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄- pH 7,4) stérile. Les cellules sont ensuite détachées au moyen de 1 ml de solution stérile de trypsine 0,05%- EDTA 0,53 mM qu'on laisse agir environ deux minutes. Afin de neutraliser les effets de la trypsine, 9 ml de milieu complet stérile sont ajoutés à la suspension cellulaire. Celle-ci est alors transvasée dans un tube de 10 ml et centrifugée. Les cellules sont réparties, éventuellement après comptage à l'aide d'une cellule de Neubauer (Marenfield), dans des boîtes de culture (T75 ou T25) ou dans des plaques multipuits (Costar), contenant un volume *ad hoc* de milieu de culture complet et selon la densité désirée.

Lors des expériences en condition hypoxique, le milieu de culture des cellules est remplacé par du milieu CO₂ indépendant complet (tableau 1) : 500 µl/puits pour les plaques 24 puits, 4 ml et 10 ml pour les T25 et T75 respectivement. Les boîtes sont ensuite ouvertes et placées dans un incubateur à 37°C (99 % d'azote, 1% O₂). Des boîtes contrôles sont incubées dans les mêmes conditions mais en normoxie (atmosphère normale).

2. Marquage en immunofluorescence

Le marquage en immunofluorescence permet de visualiser et de localiser une protéine d'intérêt au sein d'une cellule grâce à l'utilisation d'un anticorps spécifique dirigé contre celle-ci. Cet anticorps est ensuite détecté au moyen d'un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome qui émet de la fluorescence après excitation à une longueur d'onde déterminée.

Deux jours avant le marquage, les cellules EAhy926 sontensemencées dans des boîtes 24 puits sur des lamelles couvre-objet stérilisées à l'alcool, à une densité de 10⁵ cellules par puits. La veille du marquage, les cellules sont incubées sous hypoxie ou normoxie pendant 16 h. Après ces incubations les cellules sont rincées avec du PBS et fixées pendant 10 min avec 1 ml de PBS- paraformaldéhyde 4% (Merck). Après une nouvelle série de 3 rinçages avec du PBS, les cellules sont perméabilisées pendant 4 min avec 1 ml de PBS- Triton X100 1% (Merck). Les cellules sont à nouveau rincées 3 fois 5 min avec du PBS- BSA (Sigma).

Incubation avec l'anticorps primaire (tableau 2) : On dépose 30 µl d'anticorps dilué dans du PBS- BSA 1% sur un parafilm placé en chambre humide. La face de la lamelle couvre-objet portant les cellules est placée sur la goutte d'anticorps pendant 2 h à température

Protéines à détecter	Composition des tampons de lyse
GRP94	7 M Urée (Amersham) 2 M Thiourée (Amersham) 4% CHAPS (Amersham) 60 mM DTT (Amersham) 2% Pharmalyte (Amersham) 0,4 ml Pefabloc (Roche)
HIF-1	40 mM Tris (Merck) 150 mM KCl (Merck) 1% Triton X-100 (Sigma) PIC 1 × (Protease Inhibitor Cocktail, Roche) ¹ PIB 1 × (Phosphatase Inhibitor Buffer) ¹ pH 7,5

Tableau 3 : Composition des solutions de lyse utilisées pour obtenir les lysats totaux, en fonction de la protéine à détecter.

¹ Compositions du PIC et du PIB dans le tableau 10

ambiante. Les lamelles sont ensuite replacées dans la boîte de culture et rincées 3 fois 5 min avec du PBS- BSA 1% pour éliminer l'excès d'anticorps non fixé.

Incubation avec l'anticorps secondaire (tableau 2) : La méthode est la même que celle décrite pour l'anticorps primaire. Cependant, l'incubation en présence de l'anticorps secondaire dure 1 h à température ambiante et se déroule dans l'obscurité afin de préserver le fluorochrome. On rince alors les cellules 3 fois 5 min avec du PBS.

Marquage des noyaux au ToPro 3 : Le marquage des noyaux se fait grâce à l'utilisation du ToPro 3, un agent intercalant. L'incubation de 30 min se fait à l'abri de la lumière. Les lamelles sont finalement rincées 3 fois au PBS.

Montage : Une goutte de Mowiol (Sigma-Aldrich), préchauffé à 56°C, est déposée sur une lame porte-objet. La lamelle est retournée sur la goutte en évitant la formation de bulles. Les lames sont placées pendant 16 h à 4°C avant l'observation des cellules au microscope confocal (Leica).

3. Western blot

La technique de Western blot permet de mettre en évidence, dans un extrait cellulaire, la présence d'une protéine à l'aide d'un anticorps spécifique de celle-ci. Le niveau d'expression de cette protéine d'intérêt peut être évalué de façon semi-quantitative en normalisant sa quantité par rapport à celle de l' α -tubuline.

Après la lyse cellulaire et le dosage protéique, les protéines sont séparées en fonction de leur poids moléculaire par une électrophorèse en gel de polyacrylamide. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane et détectées par un système de marquage indirect impliquant un anticorps primaire reconnaissant la protéine d'intérêt et un anticorps secondaire, reconnaissant l'anticorps primaire, et couplé à un système de révélation.

3.1 Lysats totaux

Après incubation en hypoxie ou en normoxie, les boîtes de culture T25 sont placées sur glace et décantées.

Si la protéine à détecter est la GRP94, les cellules sont raclées et récupérées dans 500 μ l de PBS froid, puis transférées dans un Eppendorf. Les échantillons sont alors centrifugés 4 min à 2500 rpm et le surnageant retiré. Les cellules sont ensuite lysées avec 100 μ l de tampon de lyse (tableau 3) et le lysat est centrifugé 15 min à 13000 rpm. Le surnageant est alors récupéré et placé dans un nouvel Eppendorf. Les échantillons sont conservés à -80°C.

Si la protéine à détecter est HIF-1, les cellules sont raclées et récupérées dans 200 μ l de tampon de lyse froid (tableau 3), puis transférées dans un Eppendorf. Les échantillons sont alors centrifugés à 4°C pendant 5 min et à 13000 rpm. Le surnageant est alors récupéré et aliquoté dans de nouveaux Eppendorfs. Les échantillons sont conservés à -80°C.

3.2 Quantification des protéines par la méthode de Bradford

Un volume déterminé d'échantillon à tester est prélevé et ajouté à 1 ml de réactif Bradford (Bio-Rad Laboratories, Allemagne) dilué 5 \times dans de l'eau distillée et filtré. Après 5 min de réaction, la densité optique est mesurée au spectrophotomètre (Ultrospec 2100 pro UVI visible spectrophotometer) à 595 nm. On calcule alors la concentration en protéines grâce à un étalon BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma) de concentration connue (5 mg/2,5 μ l) selon la formule suivante :

Solutions	Composition
Tampon de migration (1 litre)	50 ml de NuPAGE MOPS SDS running (Invitrogen) 950 ml d'eau distillée (0,25% NuPAGE antioxydant (Invitrogen))
Tampon de transfert (200 ml)	10 ml de NuPAGE Transfer Buffer (Invitrogen) 40 ml de méthanol (Acros Organics) 150 ml d'eau distillée 200 µl de NuPAGE antioxydant (Invitrogen)
TBS 10x (Tris Buffer Saline)	200 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, pH 7,4
TBS-T (TBS-Tween) 0,1%	100 ml TBS 10x 900 ml d'eau distillée 1 ml Tween 20 (Sigma) (3% lait en poudre Gloria (Nestlé))

Tableau 4 : Composition des solutions utilisées pour le Western blot.

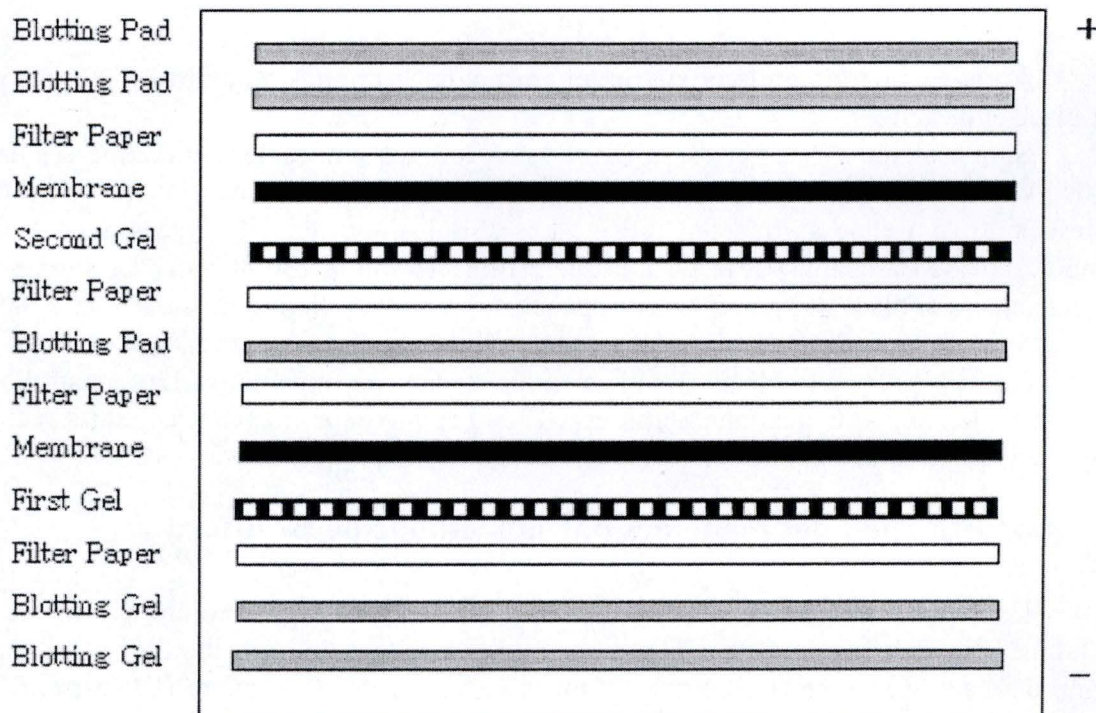


Figure 1 : Système sandwich, cas de deux gels à transférer.

$$[\mu\text{g}/\mu\text{l}] = \left(\frac{\text{DO}_{\text{échantillon}} - \text{DO}_{\text{blanc échantillon}}}{\text{DO}_{\text{étalon}} - \text{DO}_{\text{blanc étalon}}} \right) \times 5 \mu\text{g} / \text{Nombre } \mu\text{l ajoutés}$$

3.3 Préparation des échantillons

Un volume de lysat cellulaire correspondant à 10 μg de protéines est prélevé et porté à 28 μl avec de l'eau distillée. On ajoute ensuite 9 μl de Bleu (NuPAGE LDS Sample, Invitrogen) et 1 μl de DTT 0,5 M. Les échantillons sont alors dénaturés à 70°C pendant 15 min et centrifugés 30 s à 13000 rpm.

3.4 Electrophorèse

Les gels précoulés NuPage 10% Bis-Tris (Invitrogen) sont placés dans une cuve de transfert Novex (Invitrogen) qui peut recevoir deux gels. Le tampon de migration contenant l'antioxydant (tableau 4) est versé dans le compartiment entre les deux gels, au contact des puits. Les compartiments extérieurs reçoivent le tampon de migration dépourvu d'antioxydant. Les 38 μl d'échantillon ou les 7 μl d'étalon de poids moléculaire (See Blue Plus2, Invitrogen) sont chargés sur le gel. La migration des protéines est réalisée en appliquant un voltage constant de 200 V pendant 50 min.

3.5 Transfert

Lorsque la migration est terminée, le gel est démoulé et un montage en « sandwich » (figure 1) est réalisé dans une cuve de transfert Novex. Le montage, constitué d'éponges, de papiers Whatman (Macherey-Nagel), d'une membrane de PVDF (PolyVinylidène Fluoride, Amersham) et du/des gel(s), est placé entre deux électrodes pendant 150 min à une différence de potentiel de 30 V et un ampérage constant de 200 mA. Le compartiment contenant le montage baigne dans du tampon de transfert (tableau 4) ; le compartiment extérieur reçoit de l'eau distillée.

3.6 Traitement de la membrane, incubation avec les anticorps et révélation

Pour la révélation des protéines, les anticorps primaires et secondaires suivants ont été utilisés :

- Anticorps de rat anti-GRP94 (SPA-850, Stressgen) dilué 5000 \times
- Anticorps de souris anti-HIF-1 α (H72320, Transduction Laboratories) dilué 5000 \times
- Anticorps de souris anti- α -tubuline (T 5168, Sigma) dilué 5000 \times
- Anticorps anti-IgG de rat couplé à la peroxydase (Amersham) dilué 30000 \times
- Anticorps anti-IgG de souris couplé à la peroxydase (Amersham) dilué 30000 \times

Le traitement de la membrane, ou blocking, permet la diminution des liaisons non spécifiques des anticorps par saturation de la membrane avec des protéines du lait. Il s'effectue pendant 1 h à température ambiante.

	GRP94	HIF-1α	α-tubuline
Blocking	O/N à 4°C TBS-T 0,1%- Gloria 3%	O/N à 4°C TBS-T 0,1%- Gloria 3%	1h à RT TBS-T 0,1%- Gloria 3%
Anticorps primaire	2 h à RT TBS-T 0,1%- Gloria 3%	2 h à RT TBS-T 0,1%- Gloria 3%	1 h à RT TBS-T 0,1%- Gloria 3%
Lavages	3 x 15 min à RT TBS-T 0,1%- Gloria 3%	3 x 15 min à RT TBS-T 0,1%- Gloria 3%	3 x 15 min à RT TBS-T 0,1%- Gloria 3%
Anticorps secondaire	45 min à RT TBS-T 0,1%- Gloria 3%	45 min à RT TBS-T 0,1%- Gloria 3%	30 min à RT TBS-T 0,1%- Gloria 3%
Lavages	2 fois 5 min à RT TBS-T 0,1%- Gloria 3% 2 fois 5 min à RT TBS-T 0,1%	2 fois 5 min à RT TBS-T 0,1%- Gloria 3% 2 fois 5 min à RT TBS-T 0,1%	2 fois 5 min à RT TBS-T 0,1%- Gloria 3% 2 fois 5 min à RT TBS-T 0,1%

Tableau 5 : Traitement de la membrane selon la protéine d'intérêt. O/N : plus de 16 h ; RT : température ambiante.

La membrane est ensuite incubée avec l'anticorps primaire spécifique de la protéine d'intérêt. La détection se fait de manière indirecte avec un anticorps secondaire couplé à la Horseradish peroxydase. Les dilutions des anticorps primaires, les temps d'incubation en présence de ces anticorps et les temps de rinçage sont fonction de la protéine à détecter (tableau 5).

La membrane est alors incubée 5 min dans la solution de révélation ECL (Enhanced Chemiluminescence, Amersham), puis placée dans une cassette avec un film autoradiographique (Hyperfilm, Amersham). Après exposition, le film est révélé, rincé et fixé par des bains successifs dans une solution de révélation (Ilford Imaging), de l'eau, une solution de fixation (Ilford Imaging) et de l'eau.

4. Real-Time RT PCR

La real-time RT PCR a pour but la quantification de l'ARNm d'un gène d'intérêt. La première étape consiste en l'extraction de l'ARN total des cellules. Ensuite, une rétrotranscription de l'ARNm en ADNc est réalisée en utilisant une amorce polyT.

La troisième étape est la PCR (Polymerase Chain Reaction) en temps réel. Le SYBR Green, un agent intercalant fluorescent, permet de suivre cycle par cycle l'accumulation des amplicons. La quantification repose sur le concept de cycle seuil ou CT (cycle threshold). Celui-ci représente le cycle PCR au cours duquel la fluorescence émise se distingue du bruit de fond. Le CT est inversement proportionnel à la quantité d'ADN cible de départ, elle-même proportionnelle à la quantité d'ARNm. L'analyse nécessite de passer par une normalisation par rapport à un gène de maintenance, l' α -tubuline dans notre cas.

Afin de s'assurer de la spécificité de l'amplification, une courbe de dissociation est réalisée en fin de PCR où un seul pic doit être observé, témoin de la spécificité des amorces utilisées.

4.1 Extraction d'ARN total

(Kit RNAgents Total RNA Isolation System, Promega)

L'extraction d'ARN total nécessite de travailler dans un environnement dépourvu de RNase pour éviter toute possibilité de dégradation de l'ARN. Le matériel utilisé ainsi que la surface de travail sont préalablement nettoyés avec du SDS 1% (ICN Biomedicals).

Après incubation des cellules dans des boîtes de culture T25, le milieu de culture est décanté et les cellules sont rincées avec 10 ml de PBS froid. Les cellules sont raclées dans 600 μ l de tampon de dénaturation (Promega) et le lysat est transféré dans un Eppendorf. 60 μ l d'acétate de sodium 2 M (Promega) et 600 μ l de phénol/chloroforme/isoamyl alcool (Sigma) sont ajoutés successivement et les échantillons sont vortexés. Après une incubation sur glace de 15 min et une centrifugation de 15 min à 13000 rpm et 4°C, la phase supérieure (contenant l'ARN) est récupérée et transférée dans un Eppendorf. La précipitation de l'ARN par 600 μ l d'isopropanol (Merck) se fait à -20°C pendant environ 30 min. L'échantillon est centrifugé à 13000 rpm et 4°C pendant 10 minutes. Le culot d'ARN est lavé avec 1 ml d'éthanol 75% refroidi sur glace. Finalement, l'ARN est resuspendu dans 30 μ l d'eau sans RNase (Promega) et stocké à -70°C. 2 μ l sont prélevés pour le dosage de la quantité d'ARN au spectrophotomètre.

Mélange réactionnel	4 µl de Buffer RT 5× (Invitrogen) 2 µl de DTT 0,1M 1 µl de RNAsin Ribonuclease Inhibitor 40 U/µl (Promega) 1 µl de dNTP mix (Eurogentec) 1 µl d'eau sans RNase
----------------------------	--

Tableau 6 : Composition du mélange réactionnel pour la rétrotranscription.

Gènes	Séquences	Concentrations
<i>tra-1</i>	Amorce sens 5'-GAATTGGATGAAAGATAAAGCCCTTA-3' Amorce antisens 5'-TTGCCAGACCATCCGTACTG-3'	9 µM
<i>α-tubuline</i>	Amorce sens 5'-CCCGAGGGCACTACACCAT-3' Amorce antisens 5'-CAGGGAGGTGAACCCAGAAC-3'	3 µM
<i>aldolase</i>	Amorce sens 5'-GAATTGGATGAAAGATAAAGCCCTTA-3' Amorce antisens 5'-TTGCCAGACCATCCGTACTG-3'	3 µM

Tableau 7 : Séquences des amorces (Applied Biosystem) utilisées en real-time PCR.

	ratio	Superfect (0,5 µg ADN)	Lipofectine (1µg ADN)
pCMV-Myc (carrier)	10/13	380 ng	770 ng
pRL-SV40 (normalisation)	1/13	38 ng	77 ng
pRapporteur (pEGFP, pGL ₃ enhancer, p6HRE ou pPROM)	2/13	77 ng	152 ng

Tableau 9 : Quantité de plasmides utilisée lors des expériences de transfection des cellules EAhy926.

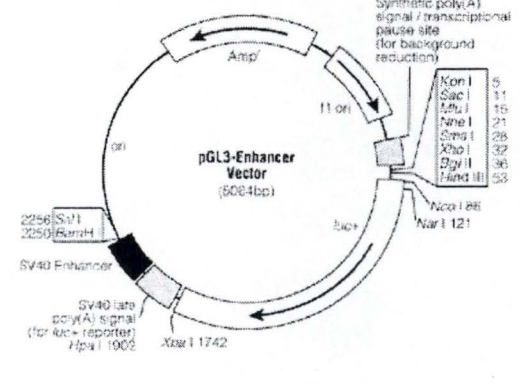
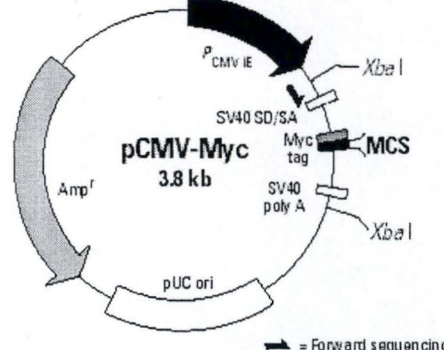
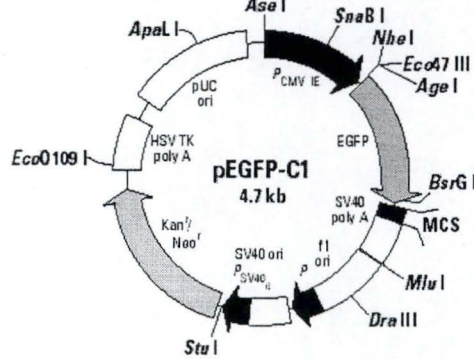
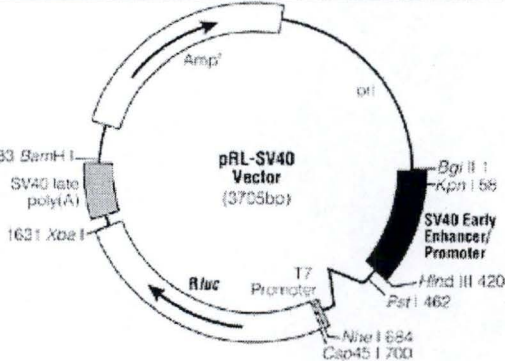
Plasmides	Caractéristiques
 <p>The diagram shows a circular plasmid with the following features: Amp^r (antibiotic resistance), ori (origin of replication), SV40 Enhancer, SV40 late poly(A) signal (for luc+ reporter), HpaI 1002, XbaI 1742, Synthetic poly(A) signal / transcriptional pause site (for background reduction), f1 ori, and a multiple cloning site (MCS) with sites: KpnI 5, SacI 11, SmaI 15, NheI 21, SmaI 28, XbaI 32, DpnII 36, HindIII 53, and NarI 121. A NotI site is also present.</p>	<p>Le pGL3-SV40 ou pGL3 enhancer utilise le gène de la <i>firefly luciferase</i> comme gène rapporteur. Il possède un enhancer SV40 localisé en aval du gène <i>luc+</i> et un site multiple de clonage dans lequel des boîtes HRE ou un promoteur authentique peut être cloné.</p> <p>Le plasmide pGL3 enhancer est utilisé en tant que contrôle négatif du système rapporteur lors des expériences de transfection.</p>
 <p>The diagram shows a circular plasmid with the following features: P_{CMV} IE (CMV promoter), XbaI sites, SV40 SD/SA, Myc tag, MCS (multiple cloning site), SV40 poly A, pUC ori (origin of replication), and Amp^r (antibiotic resistance). A forward sequencing primer is indicated by an arrow.</p>	<p>Le pCMV-Myc est un vecteur d'expression contenant un promoteur fort CMV en amont d'un épitope de 13 acides aminés de type c-Myc et d'un site multiple de clonage.</p> <p>Il est utilisé comme carrier pour les expériences de transfection.</p>
 <p>The diagram shows a circular plasmid with the following features: P_{CMV} IE (CMV promoter), EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein), SV40 poly A, MCS (multiple cloning site), BsrGI, MluI, DraIII, StuI, AseI, SmaBI, NheI, EcoA7 III, AgeI, ApaI, pUC ori (origin of replication), HSV TK poly A, Kan^r (kanamycin resistance), Neo^r (neomycin resistance), and EcoO109 I.</p>	<p>Le pEGFP-C1 est un plasmide contenant l'ADnc de la EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) codant pour une GFP humanisée afin d'augmenter sa stabilité dans les cellules de mammifères mais également sa fluorescence.</p>
 <p>The diagram shows a circular plasmid with the following features: Amp^r (antibiotic resistance), ori (origin of replication), SV40 Early Enhancer/Promoter, T7 Promoter, R/luc (Renilla luciferase gene), BglII, KpnI, Hinf III 420, PstI 462, NheI 584, and Cla45 I 700.</p>	<p>Le plasmide pRL-SV40 est un vecteur rapporteur contenant le gène de la <i>Renilla luciférase</i>, <i>Rluc</i>. Il contient un enhancer et un promoteur SV40 permettant une expression constitutive élevée de cette luciférase.</p> <p>Il sert de vecteur contrôle pour la normalisation dans les expériences de transfection.</p>

Tableau 8 : Plasmides commerciaux utilisés.

4.2 Reverse transcription

Au départ d'une amorce polyT qui s'hybride sur la queue polyA de l'ARNm, une transcriptase inverse va synthétiser de l'ADNc.

5 µg d'ARN total dans un volume total de 7,5 µl sont mélangés à 2 µl d'oligo-dT (Invitrogen) et incubés pendant 10 min à 70°C. Les échantillons sont alors immédiatement mis sur glace pendant 5 min. 9 µl de mélange réactionnel (tableau 6) sont ensuite ajoutés aux échantillons. Après 5 min d'incubation à température ambiante, on ajoute 1,5 µl de Superscript II (200 U/µl) (Invitrogen) et on incube les échantillons durant 1 h 30 à 42°C. La Superscript est ensuite inactivée en incubant 15 min à 70°C. Afin d'éliminer les brins d'ARNm toujours liés à l'ADNc, on ajoute 1 µl de RNaseH (2U/µl) (Invitrogen) et on incube 20 min à 37°C. Les ADNc sont ensuite stockés à -20°C.

4.3 Real-time PCR

Pour chaque gène, un mélange réactionnel contenant 12,5 µl de mix SYBR Green (Applied Biosystem), 2,5 µl d'amorces reverse (tableau 7) (Applied Biosystem), 2,5 µl d'amorces forward (tableau 7) (Applied Biosystem) et 2,5 µl d'eau distillée est réalisé. 20 µl du mélange réactionnel ainsi que 5 µl d'ADNc dilué 100 × sont placés dans les puits (Optical tubes ou 96-well optical reaction plate, Applied Biosystem). Pour les blancs, on remplace les 5 µl d'ADNc par de l'eau. Les tubes sont fermés (Optical caps, Applied Biosystem), centrifugés quelques secondes et placés dans l'ABI Prism 7000 (Applied Biosystem) pour réaliser l'amplification PCR.

5. Transfection

La transfection est une technique qui consiste à incorporer du matériel génétique exogène dans des cellules eucaryotes en vue de l'expression de celui-ci.

5.1 Liste des plasmides utilisés

Le pGL3-SV40 ou pGL3 enhancer (Promega), le pCMV-Myc (Biosciences Clontech), le pEGFP-C₁ (Biosciences Clontech) et le pRL-SV40 (Promega) sont les différents plasmides utilisés au cours de ce mémoire. Leurs caractéristiques sont décrites au tableau 8.

5.2 Transfection des cellules EAhy926

Transfection utilisant le Superfect

Le Superfect (SF) est un dendrimère polycationique possédant une architecture sphérique, capable de complexer l'ADN en une structure compacte, facilitant ainsi son entrée dans la cellule.

Les cellules sontensemencées dans des plaques 24 puits à raison de 10⁵ cellules par puits. Le jour suivant, les cellules sont transfectées avec 0,5 µg d'ADN par puits selon le protocole suivant :

Le mélange d'ADN (tableau 9) est resuspendu dans 60 µl d'OptiMEM (Invitrogen). Après 5 min, 1,5 µl de Superfect 3mg/ml (Qiagen) sont ajoutés pour un temps de

complexation de 15 min. Après cette incubation, 350 µl d'OptiMEM- 5% FCS sont ajoutés au mélange de transfection.

Le milieu de culture des cellules est décanté et remplacé par le mélange de transfection. Les cellules restent alors en contact avec les complexes ADN-SF pendant 4 h dans l'étuve à 37°C. Après 4 h, le milieu est aspiré et remplacé par 1 ml de milieu DHG complet.

Transfection utilisant la lipofectine

La lipofectine est un lipide cationique capable de complexer l'ADN.

Comme pour le SF, les cellules sontensemencées dans des plaques 24 puits à raison de 10^5 cellules par puits. Le jour suivant, les cellules sont transfectées avec 1 µg d'ADN par puits selon le protocole suivant :

Parallèlement à la resuspension du mélange d'ADN (tableau 9) dans 50 µl d'OptiMEM, 3 µl de lipofectine 1 mg/ml (Invitrogen) sont ajoutés à 50 µl d'OptiMEM. Après 5 min d'incubation, les deux volumes sont mélangés durant 20 min afin de former les complexes ADN-lipofectine.

Le milieu de culture des cellules est décanté et remplacé par le mélange de transfection. Les cellules restent alors en contact avec les complexes ADN-lipofectine pendant 4 h dans l'étuve à 37°C. Après cette incubation, 1 ml de milieu DHG complet est ajouté par puits.

Transfection utilisant la lipofectamine 2000

Les cellules sont transfectées selon un protocole identique à celui décrit pour la lipofectine si ce n'est que la lipofectine est remplacée par la lipofectamine 2000 (Invitrogen).

5.3 Transfection des cellules HepG2

Les cellules HepG2 sontensemencées dans des plaques 24 puits à raison de $5 \cdot 10^4$ cellules par puits. Le jour suivant, les cellules sont transfectées avec 3 µg d'ADN par puits selon le protocole suivant :

Le mélange d'ADN contenant 1/13 de pRL-SV40, 10/13 de pCMV-Myc et 2/13 du plasmide rapporteur testé est resuspendu dans du PBS stérile. 6 µl de Superfect 3 mg/ml (Qiagen) sont alors ajoutés pour un temps de complexation de 10 min. Après cette incubation, 1 ml de DMEM est ajouté au mélange de transfection.

Le milieu de culture des cellules est décanté et remplacé par le mélange de transfection. Les cellules restent alors en contact avec les complexes ADN-SF pendant 3 h dans l'étuve à 37°C. Après ces 3 h, le milieu est aspiré et remplacé par 1 ml de milieu DMEM contenant 10% de sérum de veau foetal.

6. Techniques de révélation pour la transfection

6.1 Observation de la fluorescence de l'EGFP

Les cellules ayant incorporé le plasmide codant pour la EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) sont capables, suite à l'expression de cette protéine, d'émettre après excitation UV, de la fluorescence dans la gamme des longueurs d'onde émettant dans le vert.

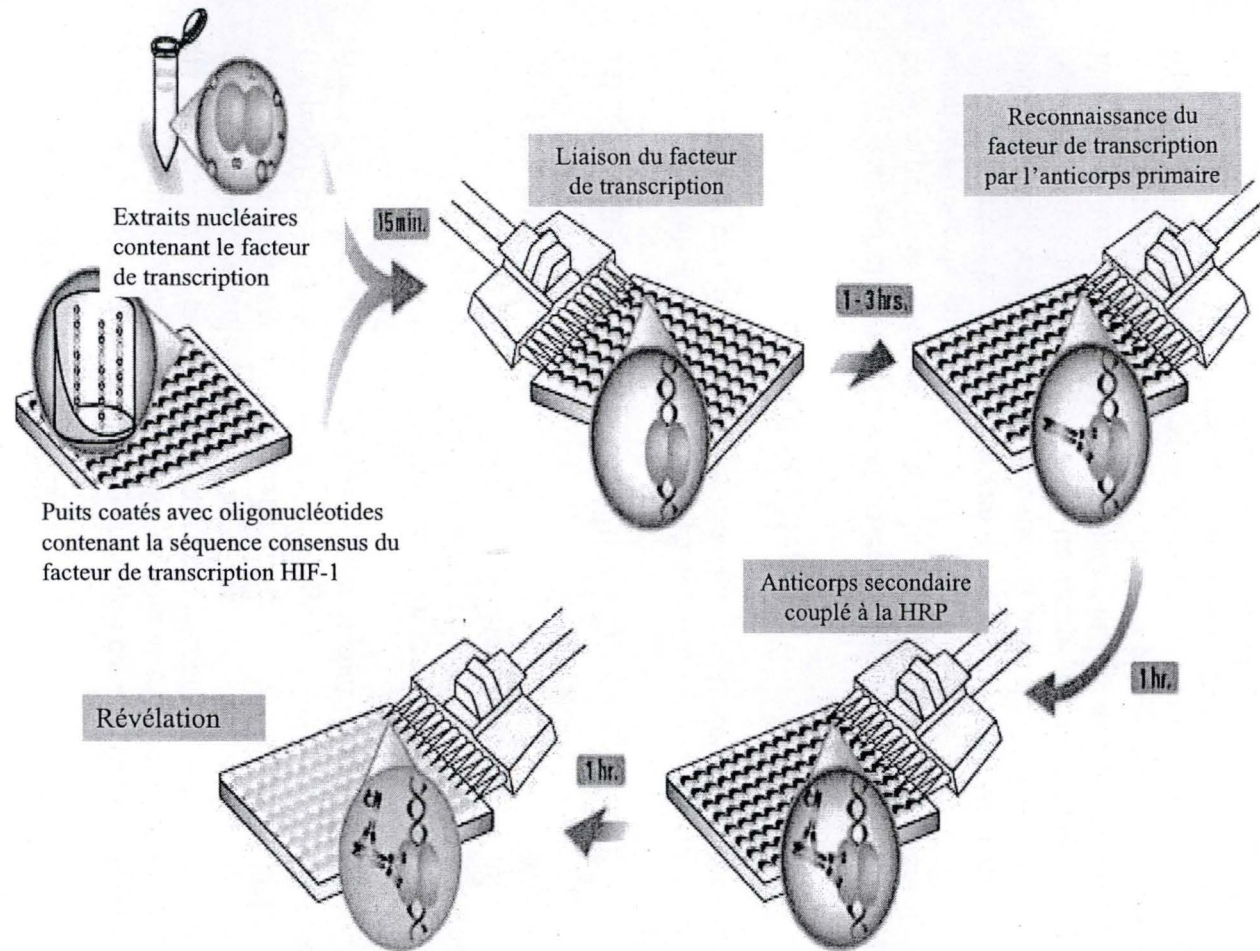


Figure 2 : Représentation schématique du test Trans-AM. Dans une plaque 96 puits dont les puits sont recouverts de streptavidine, on fixe un oligonucléotide double brin biotinylé contenant la séquence consensus du facteur de transcription HIF-1. Des extraits nucléaires préparés sont incubés dans les puits. Après plusieurs lavages, la liaison éventuelle du facteur de transcription à sa séquence cible est mise en évidence par une incubation avec un anticorps primaire dirigé contre HIF-1 α . Après une seconde série de rinçages, un anticorps secondaire conjugué à la peroxydase est ajouté. La révélation est réalisée en présence du substrat de l'enzyme. L'absorbance du produit de cette réaction colorimétrique est mesurée au spectrophotomètre.

On utilise la microscopie confocale pour détecter les cellules fluorescentes et ainsi quantifier l'efficacité de la transfection.

24 h après la transfection, les cellules sont rincées 3 fois au PBS et montées directement sur une lame porte-objet en présence de Mowiol.

6.2 Système dual-luciférase

(Kit Dual-Luciférase Reporter Assay System, Promega)

Le pGL3-SV40/6HRE contient 6 copies de l'élément HRE régulant l'expression du gène rapporteur *firefly luciferase*. Il permet de mesurer l'activité transcriptionnelle de HIF-1 dans différentes conditions.

Le milieu est décanté et les cellules sont lysées pendant 10 à 15 min, en présence de 100 μ l de PLB (Passive Lysis Buffer, Promega) dilué 5 \times dans de l'eau. Deux activités luciférase sont ensuite mesurées séquentiellement à partir du même échantillon. L'activité de la firefly luciférase, rapportant l'activité du facteur de transcription, est mesurée après ajout de 20 μ l (EAhy926) ou de 2 μ l (HepG2) de lysat cellulaire à 100 μ l de « luciférase assay substrate » (Promega). Après avoir mesuré ce premier signal lumineux, on ajoute 100 μ l de « Stop & Glo substrate » (Promega) dilué 50 \times dans du « Stop & Glo Buffer » (Promega) de manière à inhiber la firefly luciférase et initier la réaction enzymatique de la renilla luciférase, engendrant ainsi un deuxième signal lumineux mesuré au luminomètre (Biocounter). La renilla luciférase est constitutivement exprimée dans les cellules transfectées et va permettre de normaliser les résultats. Les résultats sont exprimés en tant que rapport des activités firefly luciférase/renilla luciférase.

7. Dosage colorimétrique de l'activité de liaison de HIF-1 à l'ADN

Dans une plaque 96 puits dont les puits sont recouverts de streptavidine, on fixe un oligonucléotide double brin biotinyllé contenant la séquence consensus du facteur de transcription HIF-1. Des extraits nucléaires préparés à partir de EAhy926 sont incubés dans les puits. Après plusieurs lavages, la liaison éventuelle du facteur de transcription à sa séquence cible est mise en évidence par une incubation avec un anticorps primaire dirigé contre HIF-1 α . Après une seconde série de rinçage, un anticorps secondaire conjugué à la peroxydase est ajouté. La révélation est réalisée en présence du substrat de l'enzyme. L'absorbance du produit de cette réaction colorimétrique est mesurée au spectrophotomètre (figure 2).

En parallèle, des expériences de compétition pour la liaison de HIF-1 ont été réalisées. Dans ce but, des sondes sauvages et mutées correspondant à chaque site HRE présent au sein du promoteur du gène *tra-1* ont été utilisées.

7.1 Préparation des extraits nucléaires

Toutes les étapes de préparation des extraits nucléaires sont réalisées à 4°C et les tampons sont maintenus sur glace (tableau 10).

Le milieu de culture est enlevé et les cellules sont rincées une premièrement fois avec 10 ml de PBS, puis avec du PBS contenant du NaF et du Na₂MoO₄. Elles sont incubées sur glace pendant 3 min dans 10 ml de tampon HB 1 \times . Le tampon hypotonique fait gonfler les

Solutions	Composition
PBS	10 mM tampon phosphate pH 7,4- NaCl 0,9% 1 mM Na ₂ MoO ₄ (Sigma) 5 mM NaF (Merck)
HB 10x (Hypotonic Buffer)	200 mM Hepes (Acros Organics) 50 mM NaF (Merck) 10 mM Na ₂ MoO ₄ (Sigma) 1mM EDTA (Merck) pH 7,9
Tampon de lyse	HB 1× 0,5% NP-40 (Nonidet P-40, Sigma)
PIB (Phosphatase Inhibitor Buffer) Cette solution stock (25×) est fractionnée et conservée à -20°C	25 mM NaVO ₃ (Sigma) 250 mM PNPP (p-NitroPhényl Phosphate) (Sigma) 250 mM β-glycérophosphate (Sigma) 125 mM NaF (Merck)
PIC (Protease Inhibitor Cocktail) Cette solution stock (25×) est fractionnée et conservée à -20°C	Une tablette de Complete [®] (Roche) 2 ml d'eau
Tampon de resuspension (RE)	HB 1× 20 % Glycérol (Merck) PIC et PIB ajoutés extemporanément
Tampon salin (SA)	HB 1× 20 % Glycérol (Merck) 0,8 M NaCl (Merck) PIC et PIB ajoutés extemporanément

Tableau 10 : Solutions utilisées pour l'extraction nucléaire.

Solutions	Composition
Tampon de liaison 5× (stock)	50 mM Tris-HCl 50 mM EDTA (Merck) 250 mM NaCl (Merck) 25% Glycérol (Merck) pH 7,8
Tampon de liaison complet (à préparer extemporanément)	1 ml de tampon de liaison 5× 3 ml d'eau 5 µl de DTT 0,5 M
Tampon de lyse	1 ml de tampon de resuspension (RE) 1 ml de tampon salin (SA) 2 µl de DTT 1 M 80 µl de PIC 80 µl de PIB
PBS 50	10 mM Phosphate 50 mM NaCl pH 7,5

Tableau 11 : Solutions utilisées pour le test Trans-AM.

cellules. Après ce temps d'incubation, le HB est décanté et l'on ajoute 500 μ l de tampon de lyse. Les cellules lysées sont récupérées par raclage et transférées dans un Eppendorf qui est ensuite centrifugé 30 s à 13000 rpm. Le surnageant est éliminé et le culot, qui contient les noyaux, est resuspendu dans 50 μ l de tampon de resuspension (RE). Une fois le culot resuspendu, 50 μ l de tampon salin (SA) sont ajoutés. L'extraction des protéines nucléaires est réalisée dans un Eppendorf placé sur une roue pendant au moins 30 min à 4°C. On centrifuge alors à 4°C pendant 10 min à 13000 rpm pour éliminer l'ADN et les débris membranaires. Le surnageant contenant les protéines nucléaires est récupéré, aliquoté et stocké à -70°C. Un dosage protéique par la méthode de Bradford est réalisé sur un aliquot afin de déterminer la concentration en protéines des échantillons.

7.2 Dosage de l'activité de liaison de HIF-1 à sa séquence consensus

Solutions (tableau 11)

Fixation de trappeurs double brin sur puits préconditionnés à la streptavidine : Par puits, on dépose 4 pmoles de trappeurs biotinylés dilués dans du PBS. Après 1 h d'incubation à 37°C, les puits sont lavés 2 fois avec 100 μ l de PBS50- Tween 0,1% et 1 fois avec 200 μ l d'eau. Les puits sont séchés 1 h en chambre chaude. La plaque peut ensuite être stockée à 4°C durant plusieurs mois.

Liaison du facteur de transcription : Par puits, on dépose 40 μ l de tampon de liaison complet, contenant ou non les sondes sauvages ou mutées (tableau 12) correspondant à chaque site HRE présent au sein du promoteur de *tra-1*, et 10 μ l d'extrait de protéines nucléaires dilués dans du tampon de lyse à une concentration finale de 5 μ g/10 μ l. L'incubation dure 1 h sous légère agitation. Les puits sont ensuite lavés 3 fois avec 200 μ l de PBS50- Tween 0,1%- BSA 0,1%.

Reconnaissance du facteur de transcription par l'anticorps primaire : Dans chaque puits, on ajoute 100 μ l d'anticorps primaire anti-HIF-1 α (BD Biosciences) dilué 1000 \times dans du PBS50- BSA 0,1%. Après 1 h d'incubation, les puits sont rincés 3 fois avec 200 μ l de PBS50- Tween 0,1%- BSA 0,1%.

Anticorps secondaire : L'anticorps secondaire anti-IgG de souris couplé à la HRP (Santa Cruz) est dilué 1000 \times dans du PBS50- Gloria 1% et 100 μ l de cette dilution sont ajoutés par puits. Après 1 h d'incubation, les puits sont rincés 4 fois avec 200 μ l de PBS50- Tween 0,1%- BSA 0,1% avant la révélation.

Révélation : 100 μ l de TMB (tétra-méthyl benzidine, Biosource) sont déposés dans chaque puits. L'incubation est réalisée à l'abri de la lumière pendant 10 min. Au terme de cette incubation, on ajoute 100 μ l de solution stop (Biosource). La densité optique est mesurée au spectrophotomètre (Ultramarck Microplate Imaging System, Bio-Rad) à 450 nm (référence 655 nm).

8. Clonage du promoteur de *tra-1*

Après amplification du promoteur de *tra-1*, par PCR à partir d'ADN génomique, l'amplicon est restreint et cloné dans le plasmide pGL3 enhancer restreint par les mêmes enzymes.

Sondes	Séquences
Sonde HRE1	5'-CTGGGGGAACCGTGAAGAAGAAAGG-3'
Sonde HRE1 muté	5'-CTGGGGGAAAATAAAGAAAGG-3'
Sonde HRE2	5'-GTGAAGAACACGTTGCCATGG-3'
Sonde HRE2 muté	5'-GTGAAGAATATTTTGGCCATGG-3'
Sonde HRE3	5'-GCGGTCCCACGTGTGAGGGGC-3'
Sonde HRE3 muté	5'-GCGGTCCCAAATATGAGGGGC-3'
Sonde HRE4	5'-GGCGTTGAACGTGGGAGGGGG-3'

Tableau 12 : Séquences des sondes utilisées pour les expériences de compétition Trans-AM. Les séquences des sites HRE sont ombrées et les bases mutées sont soulignées.

Pfu Buffer 10× (Promega)	10 µl
Amorces sens (Eurogentec) 5'-GGGGTACCCCATGGAGATCCTGGAATAGGCA-3'	1 µM
Amorces antisens (Eurogentec) 5'-GAAGATCTTCTGAGTCTCAAGTCCCCTTCGA-3'	1 µM
dNTPmix 20 mM (Eurogentec)	4 µl
ADN génomique	100 ng
Pfu DNA polymerase (Promega)	1 µl
eau distillée	QSP 100 µl

Tableau 13 : Mélange PCR utilisé pour l'amplification du promoteur du gène *tra-1*.

Etapes	Durée	Température
Dénaturation initiale	2 min	94°C
Série de cycles (30)		
• Dénaturation	30 s	94°C
• Hybridation	1 min	50°C
• Polymérisation	2 min	72°C
Elongation finale	10 min	72°C

Tableau 14 : Programme PCR suivi pour l'amplification du promoteur du gène *tra-1*.

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

Tableau 15 : Concentration optimale en agarose à utiliser selon la taille des molécules d'ADN à séparer.

8.1 PCR (Polymerase Chain Reaction) du promoteur de *tra-1*

Le mélange réactionnel (tableau 13) contenant le tampon de réaction, les amorces sens et antisens, le dNTPmix, l'ADN génomique, l'eau distillée et la Pfu DNA polymerase est réalisé et placé dans le thermocycleur (PTC-225 Peltier Thermal Cycler, BIOzym TC).

Le programme PCR suivi est décrit dans le tableau 14.

8.2 Electrophorèse en gel d'agarose

Cette technique consiste à séparer des molécules d'ADN selon leur taille sous l'action d'un champ électrique constant appliqué sur gel d'agarose. La taille des différents fragments d'ADN est estimée en faisant co-migrer un marqueur de taille (1 kb ou 100 bp DNA ladder, Promega). Pour visualiser les fragments dans le gel, on ajoute une solution de bromure d'éthidium, molécule fluorescente s'intercalant entre les bases appariées. L'ADN ainsi marqué est visualisé sous illumination UV.

Suivant la taille des molécules d'ADN à séparer dans le gel (tableau 15), de l'agarose (Sigma) est ajouté à 80 ml de tampon TBE 1× (Tris-borate 0,9 M- EDTA 2 mM). Le mélange est porté à ébullition de manière à obtenir une solution limpide. Après ajout de 20 µl de bromure d'éthidium (Sigma), la solution est coulée sur le support *ad hoc* muni de 1 ou 2 peigne(s). Le gel polymérisé est ensuite placé dans la cuve d'électrophorèse remplie de tampon TBE 1×. Les échantillons auxquels on a préalablement ajouté du bleu de charge (Blue/Orange 6× Loading Dye, Promega) sont déposés dans les puits. La migration se fait à un voltage compris entre 80 et 120V.

8.3 Restriction d'ADN

Les enzymes de restriction clivent l'ADN bicaténaire au niveau de courtes séquences palindromiques appelées sites de restriction.

La restriction se fait à 37°C en présence de 2 à 10 unités d'enzyme par µg d'ADN et du tampon de restriction spécifique de l'enzyme (tableau 16).

8.4 Purification

(Kit Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega)

Cette technique permet d'extraire et de purifier des fragments d'ADN de 100 pb à 10 kb à partir de gels d'agarose ou de purifier des produits PCR (élimination des nucléotides et primers en excès).

Ce kit a été utilisé, au cours de ce mémoire, pour purifier l'amplicon du promoteur de *tra-1* extrait du gel d'agarose et pour purifier des produits de restriction.

8.5 Ligation

Afin de liguer le promoteur de *tra-1* au plasmide pGL3 enhancer, le mélange réactionnel contenant 100 ng de vecteur, 60 ng d'insert, le tampon ligase 10× (Promega), 0,1 à 1 U de T4 DNA ligase (Promega) et de l'eau sans nucléase en quantité suffisante pour atteindre un volume final de 10 µl, est incubé une nuit à 4°C.

Enzymes	Sites de reconnaissance	Tampons de restriction
<i>Bam</i> HI	5'-G [∇] GATCC-3'	Tampon E
<i>Bgl</i> II	5'-A [∇] GATCT-3'	Tampon D
<i>Kpn</i> I	5'-GGTAC [∇] C-3'	Tampon J

Tableau 16 : Sites de reconnaissance et tampons de restriction (Promega) des enzymes (Promega) utilisées pour le clonage du promoteur du gène *tra-1* humain.

Milieux	Composition
Milieu LB liquide	LB Broth Lennox (Difco) 10g/500 ml d'eau
Milieu LB liquide sélectif	LB Broth 10g/500 ml, ampicilline (Sigma) 100 µg/ml
Milieu LB solide sélectif	LB Broth 10g/500 ml, ampicilline 100 µg/ml Bacto TM Agar (Biosciences) 10g/500 ml

Tableau 17 : Composition des milieux de culture pour bactéries.

Mutations du site HRE1	Amorce sens 5'-GGGCTCTGGCAAAGACACGCTGGGGGA AAATAAAGAAAGGGCCAAA ACTACGC-3'
Mutations du site HRE3	Amorce sens 5'-GGCAAAGGGGCGGTCCCAAATATGAGG GGCCCGAGCC-3'

Tableau 18 : Séquences des amorces (Eurogentec) utilisées pour la mutagenèse dirigée des sites HRE du promoteur du gène *tra-1* humain. Les séquences des sites HRE sont ombrées et les bases mutées sont soulignées.

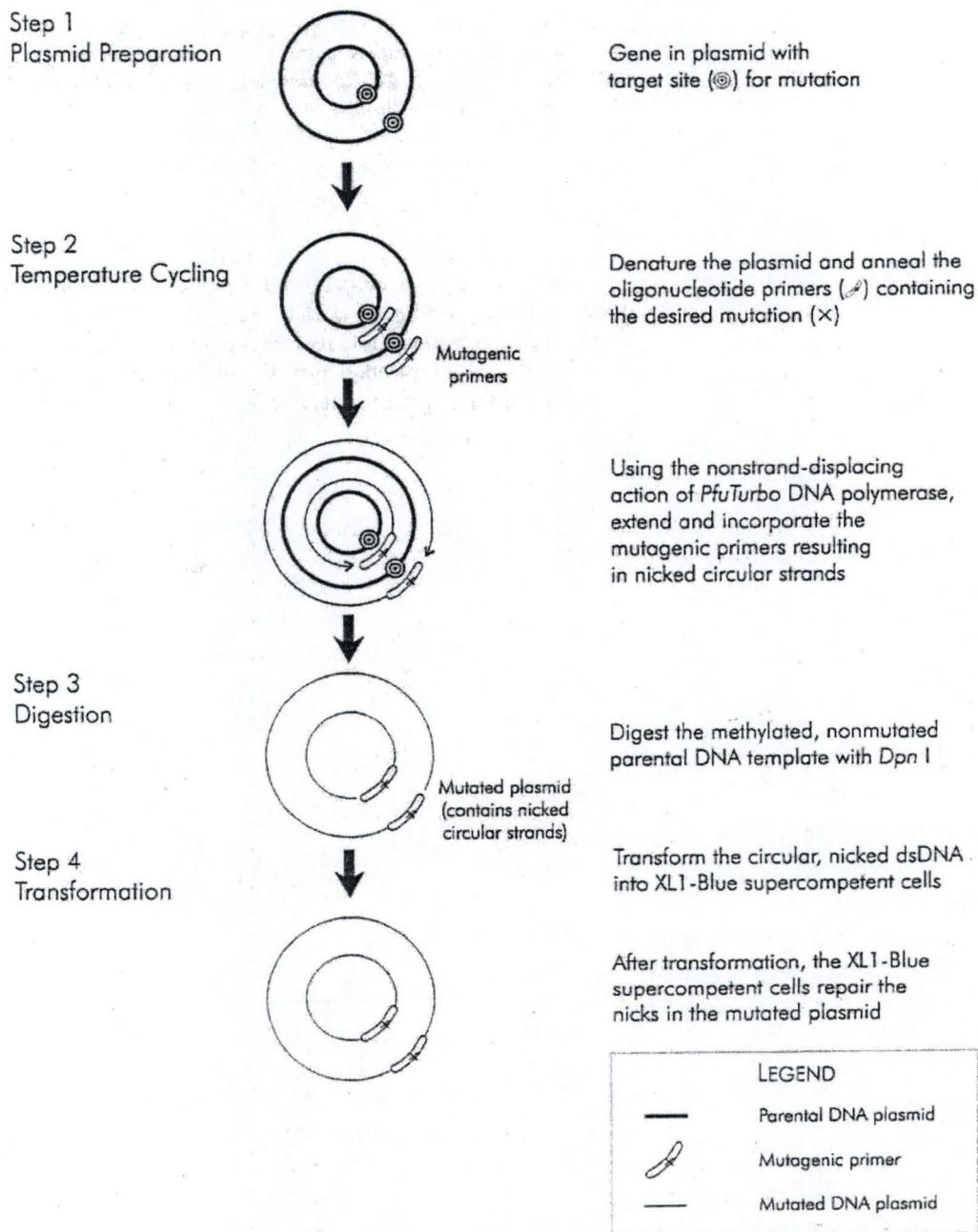


Figure 3 : Etapes de la mutagenèse dirigée. Le principe est basé sur la réalisation d'une amplification PCR classique sur un plasmide parental double brin et ce, grâce à deux amorces oligonucléotidiques synthétiques contenant la mutation désirée. L'amplification PCR génère au cours des différents cycles un plasmide muté qui diffère du plasmide parental par l'absence de sites méthylés. Le plasmide parental est alors digéré par l'endonucléase *Dpn*I qui ne reconnaît que les sites méthylés. Seul le plasmide muté peut alors ensuite être incorporé dans les bactéries XL-I Blue Supercompetent.

8.6 Transformation bactérienne par choc thermique

Le produit de ligation est ajouté à 200 µl de bactéries *E. coli* SURE¹ (Stratagene) préalablement décongelées et maintenues sur glace. Après 10 min d'incubation sur glace, les bactéries sont soumises à un choc thermique à 42°C pendant 2 min. 250 µl de milieu LB sans antibiotique (tableau 17) sont ensuite ajoutés. Après 1 h à 37°C, les bactéries sont étalées sur milieu solide sélectif et incubées pendant une nuit à 37°C.

Des colonies de bactéries transformées sont isolées et mises en culture de manière à les amplifier.

9. Extraction d'ADN plasmidique

9.1 Mini-préparations d'ADN plasmidique

(QIAprep Spin Miniprep Kit protocol, Qiagen)

La mini-préparation permet de purifier de petites quantités d'ADN plasmidique.

9.2 Maxi-préparations d'ADN plasmidique

(QIAGEN Plasmid purification, Qiagen)

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

10. Mutagenèse dirigée du promoteur de *tra-1*

(QuickChange[®] Site-Directed Mutagenesis Kit, Stratagene)

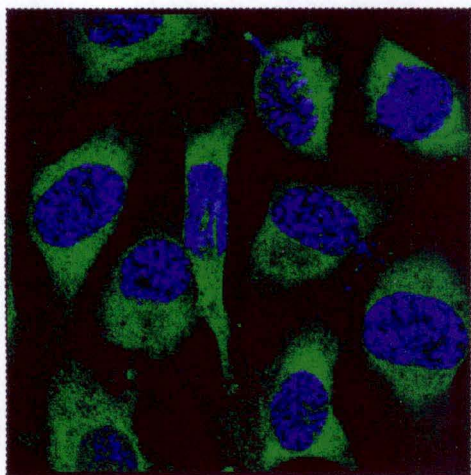
Cette technique (figure 3) est utilisée pour générer des mutations ponctuelles, des délétions ou des incorporations simples ou multiples d'acides aminés. Le principe est basé sur la réalisation d'une amplification PCR classique sur un plasmide parental double brin et ce, grâce à deux amorces oligonucléotidiques synthétiques contenant la mutation désirée. L'amplification PCR génère au cours des différents cycles un plasmide muté qui diffère du plasmide parental par l'absence de sites méthylés. Le plasmide parental est ensuite digéré par l'endonucléase *DpnI* qui ne reconnaît que les sites méthylés. Seul le plasmide muté peut alors être incorporé dans les bactéries XL-I Blue Supercompetent. Nous avons suivi scrupuleusement le protocole fourni avec le kit afin d'introduire des mutations dans les sites HRE1 et HRE3 du promoteur du gène *tra-1* humain (tableau 18).

Après amplification des bactéries et extraction d'ADN plasmidique, les plasmides sont séquencés afin de vérifier la présence des mutations.

¹ Génotype : e14- (McrA-) D(mcrCB-hsdSMR-mrr)171 endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5 (Kanr) uvrC [F' proAB lacIqZDM15 Tn10 (Tetr)]

Résultats
et
Discussion

Normoxie



Hypoxie

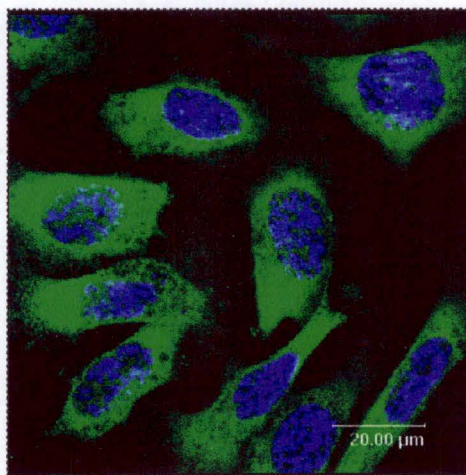


Figure 1 : Effet de l'hypoxie sur l'expression de la GRP94. Après 16 h d'incubation en normoxie ou en hypoxie, les cellules EAhy926 sont immunomarquées à l'aide d'un anticorps anti-GRP94 dilué 100 × (vert). Les noyaux sont marqués au ToPro3 (bleu) et les cellules sont observées au microscope confocal avec un photomultiplicateur constant.

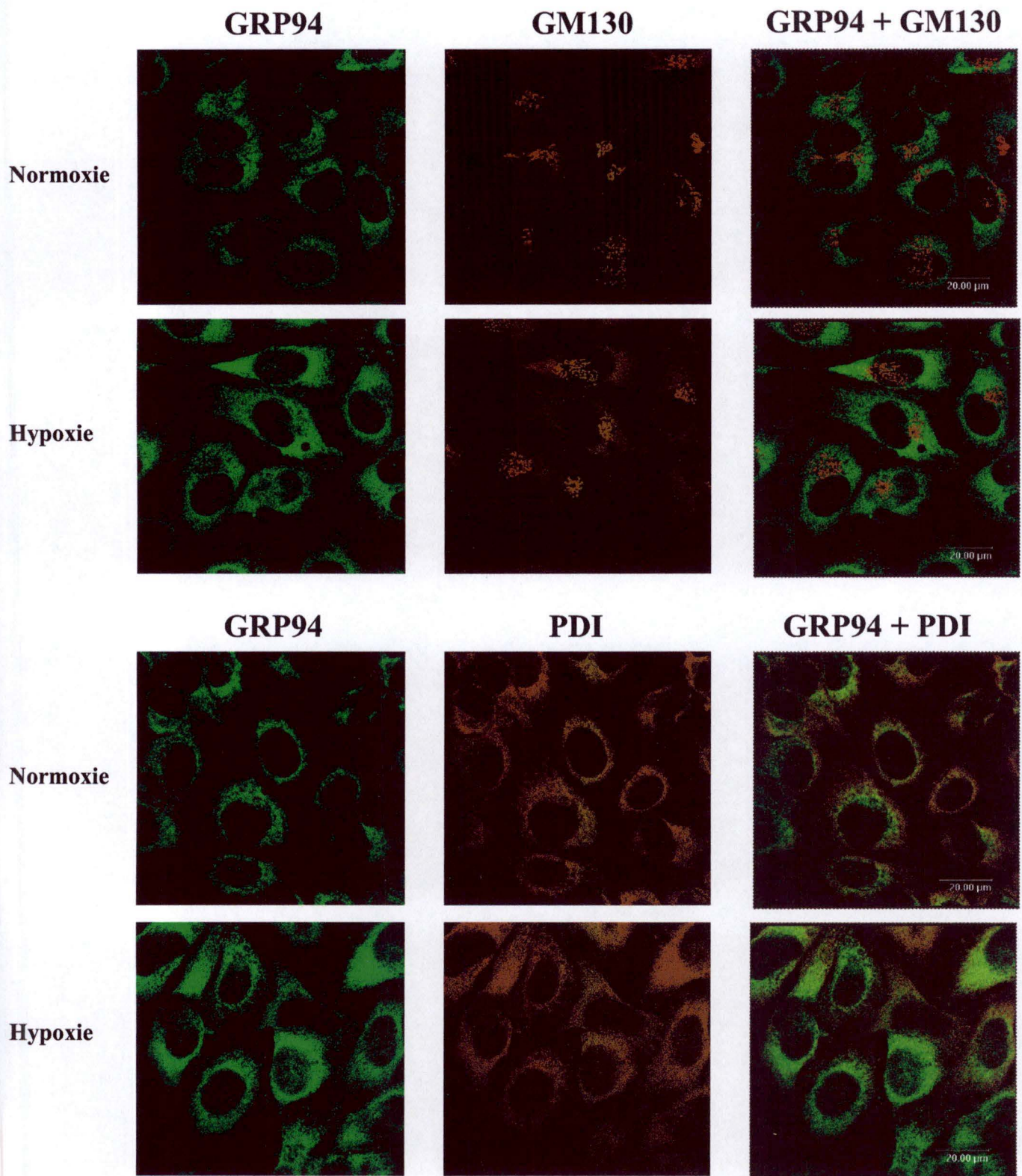


Figure 2: Etude de la localisation de la GRP94. Après 16 h d'incubation en normoxie ou en hypoxie, les cellules EAhy926 sont fixées. La GRP94 est détectée par un système de marquage indirect impliquant un anticorps primaire de rat anti-GRP94 et un anticorps secondaire anti-IgG de rat couplé à l'Alexa 488 (vert). La GM130 (Golgi Matrix protein 130 kDa), une protéine spécifique de l'appareil de Golgi ainsi que la PDI (Protein disulfide isomerase), une protéine du RE sont également détectées par un système de marquage indirect impliquant un anticorps primaire de souris et un anticorps secondaire anti-IgG de souris couplé à l'Alexa 568 (rouge). La fluorescence est observée, après excitation aux longueurs d'onde spécifiques, au microscope confocal avec un photomultiplicateur constant.

Dans le cadre d'une étude en gels 2D visant à étudier la réponse adaptative des cellules endothéliales humaines à l'hypoxie, Sébastien Paris a mis en évidence une surexpression de la GRP94 (94 kDa Glucose-Regulated Protein) après 16 h d'hypoxie.

La première partie de ce mémoire a consisté à étudier le profil d'évolution de la quantité d'ARNm de la GRP94 d'une part, et le profil d'évolution de la quantité de protéine d'autre part, au cours de l'hypoxie. Pour cette étude, nous avons réalisé des PCR en temps réel et des Western blots après différents temps d'incubation en hypoxie.

L'étude du promoteur du gène *tra-1*, codant pour la GRP94 humaine, a constitué la deuxième partie de ce mémoire. L'analyse de la séquence de ce promoteur a révélé la présence de plusieurs séquences HRE fixant potentiellement HIF-1. Des expériences de compétition pour la liaison de HIF-1 sur chacun des sites HRE présents au sein du promoteur du gène *tra-1* ont été réalisées. Nous avons également cloné le promoteur du gène *tra-1* dans le plasmide pGL3 enhancer, en amont du gène rapporteur luciférase, et réalisé des expériences de mutagenèse dirigée. Les différentes constructions ont ensuite été transfectées afin de suivre leur activité.

Etude de l'expression de la GRP94 dans les cellules endothéliales durant l'hypoxie

1. Surexpression de la GRP94 en hypoxie

Dans le but de confirmer l'augmentation de l'expression de la protéine GRP94 en hypoxie observée en gels 2D, une expérience d'immunofluorescence a été réalisée. Cette approche a permis de visualiser la GRP94 au sein des cellules endothéliales EAhy926 après 16 heures d'hypoxie, par rapport à des cellules maintenues en normoxie.

Différentes dilutions en anticorps monoclonal de rat anti-GRP94 ont été testées. Cet anticorps a ensuite été détecté au moyen d'un anticorps anti-IgG de rat couplé à l'Alexa 488. Les noyaux sont marqués au ToPro3 et la fluorescence est observée, après excitation aux longueurs d'onde spécifiques, au microscope confocal (figure 1).

Cette expérience d'immunofluorescence met en évidence une augmentation de l'expression de la GRP94 dans les cellules EAhy926 après 16 heures d'hypoxie, comparativement aux cellules maintenues 16 heures en normoxie. Elle confirme ainsi les résultats obtenus en gels 2D.

2. Localisation de la GRP94 en hypoxie

Afin d'étudier la localisation subcellulaire de la GRP94 en hypoxie et en normoxie, une expérience d'immunofluorescence a été réalisée, en utilisant en parallèle un marquage d'antigènes présents dans différents organites. Cette approche a permis de visualiser la GRP94, la GM130 (Golgi Matrix protein 130 kDa), une protéine spécifique de l'appareil de

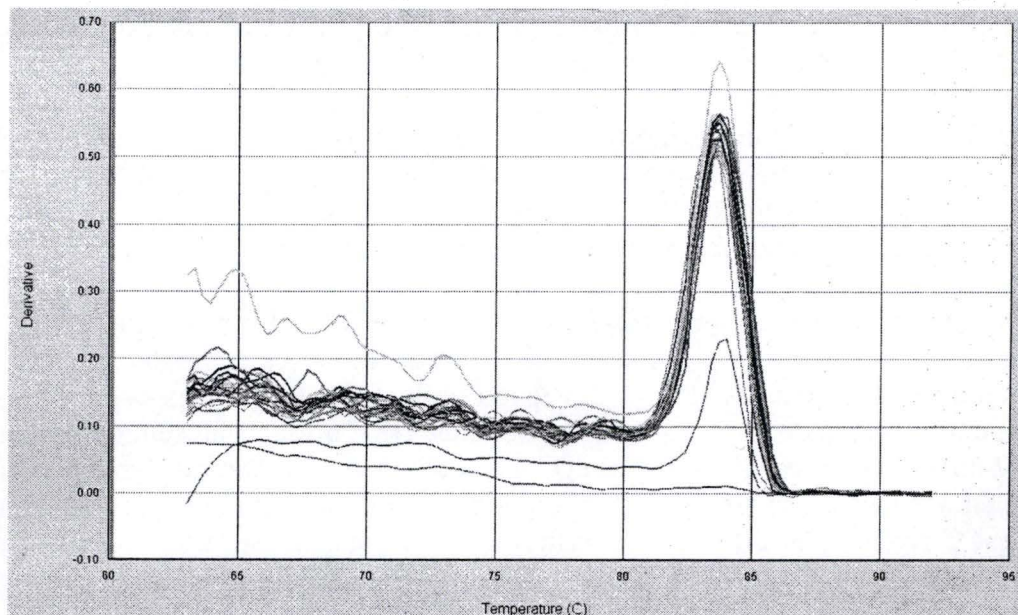


Figure 3 : Courbes de dissociation obtenues après PCR en temps réel des ADNc de la GRP94 issus des différentes conditions testées. La température est représentée en abscisse, la dérivée de la fluorescence, en ordonnée.

A

GRP94	1	2	MOY	Tubu 1	Tubu 2	tub MOY	δCt	$\delta\delta Ct$	Expression	E %
1N	21,26	21,28	21,27	18,18	18,31	18,25	3,03			
1H	20,03	19,48	19,76	17,30	17,38	17,34	2,42	-0,61	1,526	153
2N	20,19	20,05	20,12	17,35	17,59	17,47	2,65			
2H	20,07	19,98	20,03	17,52	17,44	17,48	2,55	-0,11	1,075	108
3N	19,70	19,76	19,73	17,05	17,06	17,06	2,68			
3H	18,92	18,93	18,93	16,07	16,16	16,12	2,81	0,13	0,911	91
4N	22,24	22,17	22,21	19,70	19,58	19,64	2,57			
4H	18,63	18,53	18,58	16,05	16,20	16,13	2,46	-0,11	1,079	108
6N	19,30	19,39	19,35	17,11	17,02	17,07	2,28			
6H	19,68	19,60	19,64	17,56	17,78	17,67	1,97	-0,31	1,240	124
8N	20,02	20,02	20,02	17,83	17,64	17,74	2,29			
8H	18,96	19,04	19,00	17,47	17,29	17,38	1,62	-0,66	1,586	159
16N	19,10	19,32	19,21	17,53	17,45	17,49	1,72			
16H	19,96	19,98	19,97	19,14	19,05	19,10	0,88	-0,84	1,796	180
24N	21,90	21,88	21,89	19,79	20,08	19,94	1,96			
24H	21,17	21,12	21,15	20,41	20,45	20,43	0,72	-1,24	2,362	236
40N	20,81	20,59	20,70	19,13	18,97	19,05	1,65			
40H	21,68	21,52	21,60	20,77	20,65	20,71	0,89	-0,76	1,693	169

B

GRP94	1	2	MOY	Tubu 1	Tubu 2	tub MOY	δCt	$\delta\delta Ct$	Expression	E %
1N	18,22	18,34	18,28	15,58	15,68	15,63	2,65			
1H	18,63	18,58	18,61	16,02	16,03	16,03	2,58	-0,07	1,050	105
2N	19,21	19,14	19,18	16,15	16,21	16,18	3,00			
2H	18,59	18,39	18,49	15,79	15,73	15,76	2,73	-0,26	1,202	120
3N	18,46	18,41	18,44	15,70	15,82	15,76	2,68			
3H	19,48	19,35	19,42	16,54	16,53	16,54	2,88	0,20	0,868	87
4N	18,68	18,69	18,69	16,16	16,17	16,17	2,52			
4H	18,21	18,16	18,19	15,85	16,00	15,93	2,26	-0,26	1,197	120
6N	18,08	18,25	18,17	15,93	16,03	15,98	2,19			
6H	18,51	18,47	18,49	16,37	16,54	16,46	2,04	-0,15	1,110	111
8N	18,39	18,29	18,34	16,07	16,00	16,04	2,31			
8H	17,51	17,37	17,44	15,90	15,96	15,93	1,51	-0,79	1,735	174
16N	18,67	18,62	18,65	16,48	16,68	16,58	2,07			
16H	18,38	18,39	18,39	16,98	17,01	17,00	1,39	-0,68	1,597	160
24N	21,84	22,00	21,92	19,67	19,84	19,76	2,17			
24H	20,88	20,94	20,91	20,09	19,97	20,03	0,88	-1,29	2,437	244
40N	20,87	20,88	20,88	18,65	18,27	18,46	2,42			
40H	21,74	21,69	21,72	20,04	20,00	20,02	1,70	-0,72	1,647	165

Figure 4 : Valeurs des CT de la GRP94 et de l' α -tubuline pour les différentes conditions (1, 2, 3, 4, 6, 8, 16, 24, et 40 heures d'hypoxie ou de normoxie). Le δCt ($Ct_{GRP94} - Ct_{tubuline}$), le $\delta\delta Ct$ ($\delta Ct_{hypoxie}$ (situation test) - $\delta Ct_{normoxie}$ (situation contrôle)) et le pourcentage d'expression ($2^{-\delta\delta Ct} \times 100$) ont été calculés pour les différentes conditions. Deux expériences indépendantes, A et B, ont été réalisées.

Golgi ainsi que la PDI (Protein disulfide isomerase), une protéine du RE possédant la séquence de rétention -KDEL, au sein des cellules endothéliales EAhy926 après 16 heures d'hypoxie, par rapport à des cellules maintenues en normoxie.

La GRP94 est détectée par un système de marquage indirect impliquant un anticorps primaire de rat anti-GRP94 et un anticorps secondaire anti-IgG de rat couplé à l'Alexa 488 (vert). La GM130 et la PDI sont également détectées par un système de marquage indirect impliquant un anticorps primaire de souris reconnaissant ces protéines et un anticorps secondaire anti-IgG de souris couplé à l'Alexa 568 (rouge). La fluorescence est observée, après excitation aux longueurs d'onde spécifiques, au microscope confocal (figure 2).

Cette expérience d'immunofluorescence met en évidence à nouveau une augmentation de l'expression de la GRP94 dans les cellules EAhy926 après 16 heures d'hypoxie, comparativement aux cellules maintenues 16 heures en normoxie. On n'observe pas de co-localisation de la GRP94 avec la GM130 dans les cellules EAhy926 après 16 heures d'hypoxie ou de normoxie. Par contre, la GRP94 co-localise avec la PDI aussi bien en normoxie qu'en hypoxie car on observe une superposition de leur marquage respectif.

Ces résultats montrent qu'en condition de stress hypoxique, comme en normoxie, la GRP94 est localisée dans le RE. L'hypoxie n'induit donc pas de changement de localisation de la GRP94.

3. Etude de la cinétique d'expression de la GRP94 en hypoxie

Afin de mieux caractériser le profil d'expression de la GRP94 dans les cellules endothéliales EAhy926 au cours d'incubations de durée croissante sous hypoxie, une cinétique a été réalisée.

En pratique, 2 T25 sont placées en hypoxie et 2 en normoxie pendant des temps croissants. La première T25 est utilisée pour étudier l'évolution de la quantité d'ARNm de la GRP94 au cours du temps, analyse se faisant par PCR en temps réel après extraction de l'ARN total et sa rétrotranscription en ADNc. Des lysats totaux sont réalisés à partir de la deuxième T25. L'analyse par Western blot des extraits a permis d'étudier l'évolution de la quantité de la protéine GRP94 durant l'hypoxie.

3.1 Evolution de la quantité d'ARNm de la GRP94 au cours de l'hypoxie

Afin d'étudier l'évolution de la quantité de l'ARNm de la GRP94 au cours de l'hypoxie, les cellules EAhy926 sont incubées en hypoxie ou en normoxie. Après 1, 2, 3, 4, 6, 8, 16, 24 et 40 heures d'hypoxie ou de normoxie, l'ARN total est extrait et les ARNm sont rétrotranscrits en ADNc. L'ADNc de la GRP94 est alors amplifié par PCR en temps réel grâce à l'utilisation d'amorces spécifiques. Cette technique utilise le SYBR Green comme agent intercalant fluorescent pour suivre, cycle par cycle, l'accumulation des amplicons.

Afin de s'assurer de la spécificité de l'amplification, une courbe de dissociation est réalisée en fin de PCR. La figure 3 représente les courbes de dissociation obtenues après les réactions d'amplification de l'ADNc de la GRP94. Un seul pic est observé, montrant que l'amplification de l'ADNc de la GRP94 ne génère qu'un amplicon.

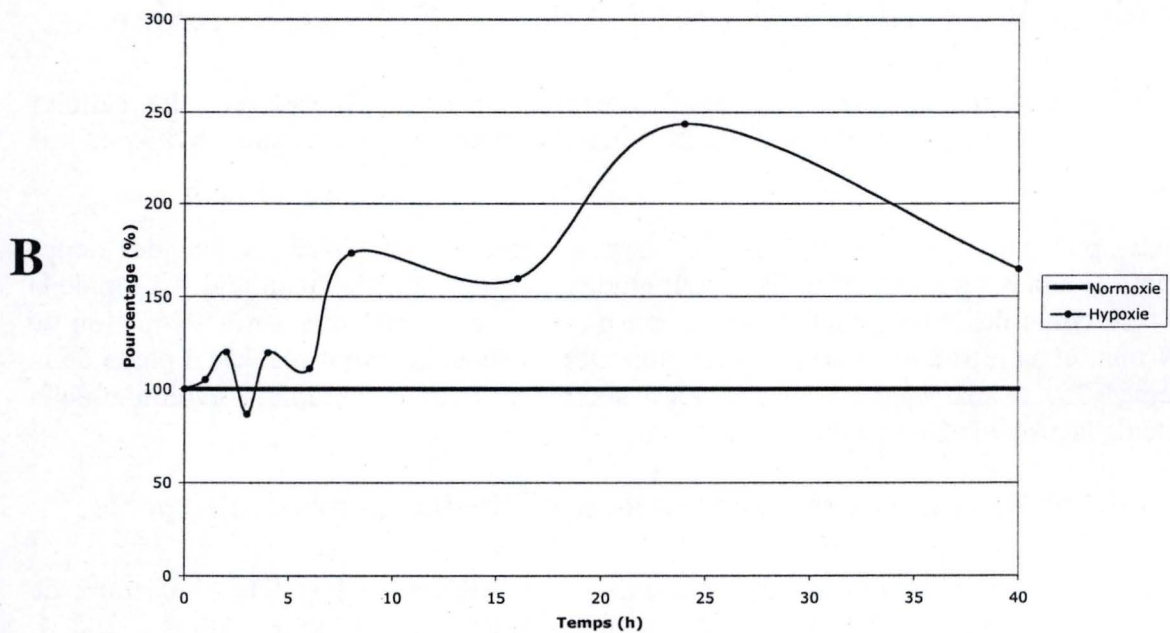
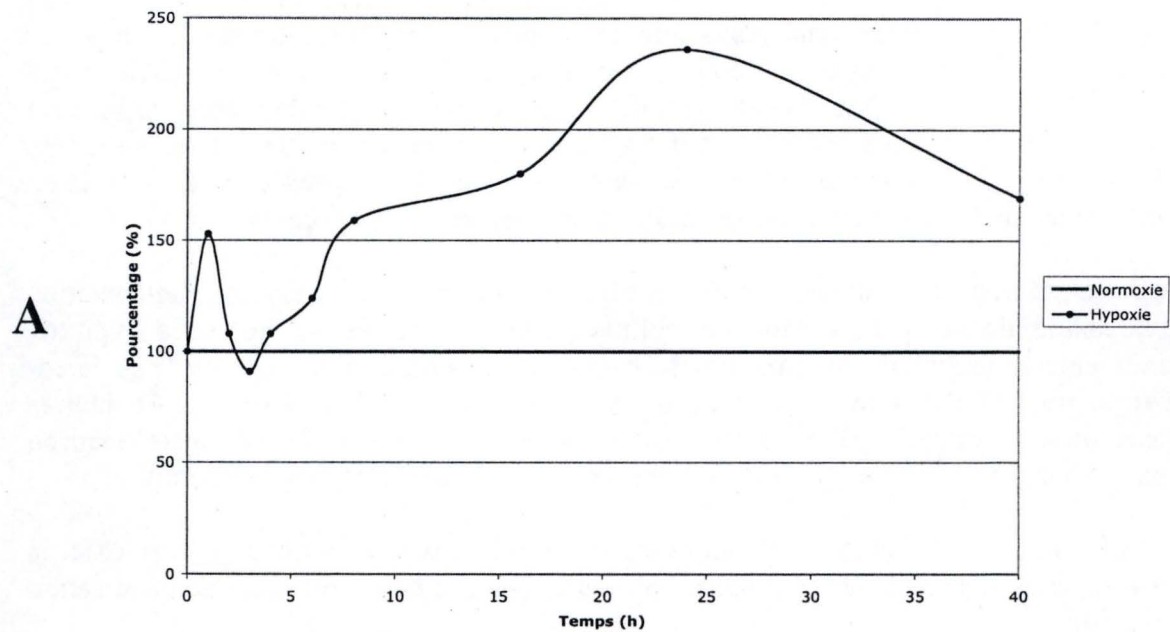


Figure 5 : Cinétique d'évolution de la quantité d'ARNm de la GRP94 au cours de l'hypoxie. La quantité d'ARNm de la GRP94 est déterminée par PCR en temps réel. Les valeurs sont exprimées en pourcentage d'expression après normalisation avec l' α -tubuline, 100% correspondant à la normoxie. Deux expériences indépendantes, **A** et **B**, ont été réalisées.

La quantification de l'ARNm de la GRP94 repose sur le concept du cycle seuil (cycle threshold), cycle PCR au cours duquel la fluorescence émise se distingue significativement du bruit de fond. Le cycle threshold (CT) est inversement proportionnel à la quantité d'ADNc cible de départ, elle-même proportionnelle à la quantité d'ARNm. L'analyse nécessite de passer par une normalisation par rapport à un gène de maintenance, l' α -tubuline dans notre cas.

Les valeurs de CT pour l'amplification des ADNc (ARNm) de la GRP94 et de l' α -tubuline sous les différentes conditions (1, 2, 3, 4, 6, 8, 16, 24, et 40 heures d'hypoxie ou de normoxie) sont rapportées à la figure 4A. Les calculs des δ CT ($CT_{GRP94} - CT_{tubuline}$), des $\delta\delta$ CT ($\delta CT_{hypoxie (situation\ test)} - \delta CT_{normoxie (situation\ contrôle)}$) et des pourcentages d'expression ($2^{-\delta\delta CT} \times 100$) sont réalisés pour les différentes conditions.

Le profil d'expression de l'ARNm de la GRP94 au cours de l'hypoxie est représenté graphiquement (figure 5A). On observe une augmentation rapide de la quantité de l'ARNm de la GRP94 après une heure d'hypoxie, suivie d'une diminution à 3 heures d'hypoxie. Les quantités d'ARNm présentes à 8 heures et 24 heures d'hypoxie réaugmentent et sont respectivement 1,6 fois et 2,4 fois plus élevées qu'en normoxie. Après 40 heures d'hypoxie, la quantité d'ARNm en hypoxie reste élevée par rapport à la normoxie.

Une deuxième expérience indépendante a été réalisée afin de confirmer les résultats obtenus ci-dessus. A nouveau, les cellules EAhy926 sont placées en hypoxie ou en normoxie pendant des temps croissants et la quantité d'ARNm de la GRP94 est évaluée par PCR en temps réel. Les valeurs de δ CT, $\delta\delta$ CT et les pourcentages d'expression sont rapportés à la figure 4B.

Le profil d'expression de l'ARNm de la GRP94 au cours de l'hypoxie est représenté sous forme graphique (figure 5B). On observe une légère augmentation de la quantité de l'ARNm de la GRP94 après une heure d'hypoxie, suivie d'une diminution à 3 heures d'hypoxie. Les quantités d'ARNm présentes après 8 heures et 24 heures d'hypoxie réaugmentent et sont respectivement 1,7 fois et 2,4 fois plus élevées qu'en normoxie. Après 40 heures d'hypoxie, la quantité d'ARNm en hypoxie reste élevée par rapport à la normoxie.

La cinétique d'évolution de la quantité d'ARNm de la GRP94 en fonction du temps d'hypoxie est similaire à la cinétique précédente et confirme ainsi les résultats obtenus au cours de cette première expérience.

En résumé, la quantité d'ARNm de la GRP94 est plus importante en hypoxie qu'en normoxie. On observe de plus, deux ou trois pics d'accumulation respectivement à 1 h, 8 h et 24 h. Cette accumulation peut être expliquée par une augmentation de la transcription du gène *tra-1* codant pour la GRP94 humaine ou par une stabilisation de l'ARNm de la GRP94.

3.2 Evolution de la quantité de la protéine GRP94 au cours de l'hypoxie

Afin d'étudier l'évolution de la quantité de la protéine GRP94 au cours de l'hypoxie, les cellules EAhy926 sont incubées en hypoxie ou en normoxie pendant des temps croissants. Les boîtes contenant les cellules sont placées pendant 1, 2, 3, 4, 6, 8, 16, 24 et 40 heures en hypoxie ou en normoxie. Des lysats totaux sont réalisés après ces différents temps en utilisant

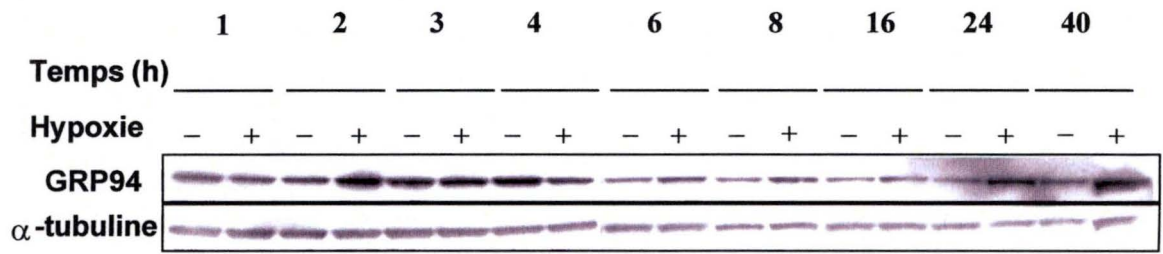


Figure 6 : Niveaux d'expression de la GRP94 et de l' α -tubuline révélés par Western blot. Les cellules EAhy926 sont placées en hypoxie (+) ou en normoxie (-) pendant 1, 2, 3, 4, 6, 8, 16, 24 et 40 heures et les extraits protéiques totaux sont préparés aux différents temps.

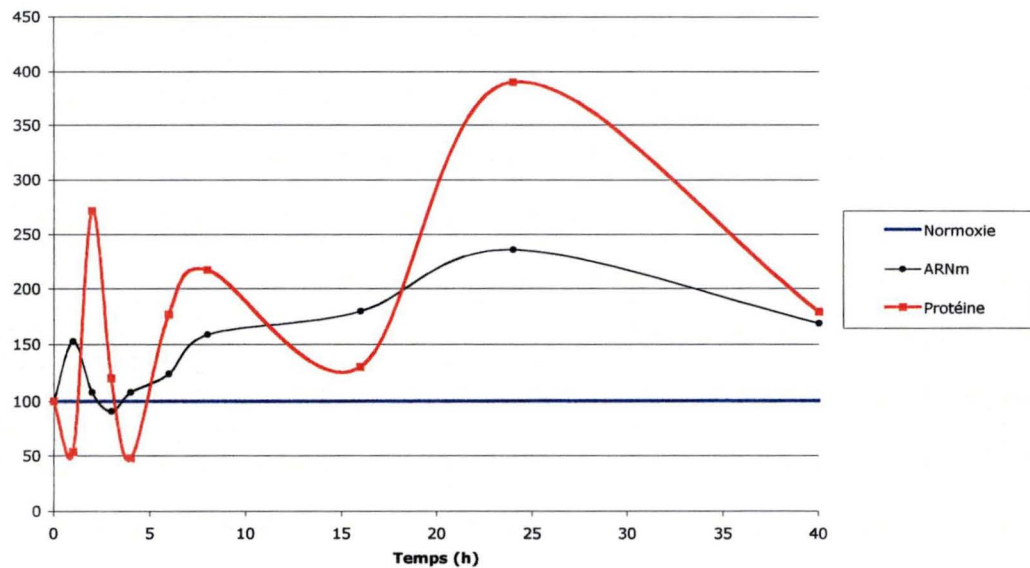


Figure 7 : Cinétique d'évolution de la quantité de la protéine GRP94 au cours de l'hypoxie. Les valeurs sont exprimées en pourcentage d'expression après normalisation avec l' α -tubuline, 100% correspond à la normoxie. La courbe correspondante d'évolution de la quantité d'ARNm est également représentée.

le même tampon de lyse que celui utilisé pour l'étude en gels 2D. Les échantillons protéiques sont dosés selon la méthode de Bradford et les protéines sont séparées par électrophorèse en gels de polyacrylamide. Après transfert des protéines sur membrane, la GRP94 est détectée par un système de marquage indirect impliquant un anticorps primaire anti-GRP94 et un anticorps secondaire, reconnaissant l'anticorps primaire et couplé à un système de révélation. L' α -tubuline est également révélée. En effet, le niveau d'expression de la GRP94 est évalué de façon semi-quantitative en normalisant sa quantité par rapport à celle de l' α -tubuline.

Les films autoradiographiques (figure 6) montrent une bande à environ 94 kDa dans toutes les conditions (normoxie (-) et hypoxie (+)). Cette bande correspond à la protéine GRP94. On observe une augmentation de l'expression de cette dernière après 2, 8, 24 et 40 heures d'hypoxie. Les bandes correspondant à l' α -tubuline (55 kDa) sont de même intensité pour toutes les conditions, témoignant d'un chargement protéique homogène sur les différents gels.

Les films autoradiographiques ont été scannés, l'intensité des bandes quantifiée et les résultats normalisés par rapport à l' α -tubuline. Les données numériques ainsi obtenues ont permis de tracer un graphique de l'évolution de la protéine GRP94 (ratio GRP94/ α -tubuline) au cours de l'hypoxie (figure 7). La courbe de l'évolution de la quantité de l'ARNm de la GRP94 aux différents temps d'hypoxie est également représentée sur ce graphe.

A l'instar de ce qui a précédemment été observé pour l'évolution de la quantité d'ARNm, on observe une cinétique triphasique. Une augmentation rapide de la quantité de la protéine GRP94 est observée après 2 heures d'hypoxie. La GRP94 est surexprimée également après 8 et 24 heures d'hypoxie, avec 2 à 4 fois plus de protéines en hypoxie par rapport à la normoxie. La quantité de protéines après 40 heures est toujours plus importante dans les cellules EAhy926 incubées en hypoxie par rapport aux cellules maintenues en normoxie.

La GRP94 est surexprimée en hypoxie. Cette augmentation de l'expression de la protéine peut être due à une stabilisation de la protéine GRP94 en hypoxie bien que le parallélisme entre les courbes d'évolution des quantités de l'ARNm et de la protéine au cours de l'hypoxie suggère plutôt une augmentation de la traduction *de novo* de la GRP94 en hypoxie. Cette augmentation peut être due à une augmentation de la transcription du gène encodant cette protéine. C'est pourquoi, nous avons étudié le promoteur de ce gène.

```

1  acaatggaga tcttgaata ggcacatata tctacgtaat cagaacgaga tgtaacatct
61  aagacgcagg gcagggctct ggcaaagaca cgctggggga acgtgaagaa agggccaaaa
121 ctacgcagct ggtcctcaga gaccaaagac tacgaccccc agcattcaat gcagtgaacc
181 cctaggacgt tgcattgccg gagctgtagt ttcattacca ccgccacccc cccgcccccc
241 cgccatctga aagcgttcta ggggatttgc aacctctctc gtgtgtttct tctttccgag
301 aagcgcgcc acacgagaaa gctggccgcg aaagtgcgtc tggatcact tccaacgaaa
361 cccagggcat agatgggaaa gggggaagaa cacgttgcca tggctaccgt ttccccggtc
421 acggaataaa cgctctctag gatccggaag tagttccgcc gcgacctctc taaaaggatg
481 gatgtgttct ctgcttacct tcattggacg ttttccetta gaggccaagg ccgccaggc
541 aaaggggagg tcccacgtgt gaggggcccg cggagccatt tgattggaga aaagctgcaa
601 accctgacca atcgggaagga gccacgcttc gggcatcggc caccgcacct ggacagctcc
661 gattgggtgga cttccgcccc cctcacgaa tcctcattgg gtgcctggg tgcgtgggtgc
721 ggcgcgattg gtgggttcat gtttcccgtc ccccgcccgc gggaggtggg gtgaaaaagc
781 ggcccgacct gcttgcggtg tagtgggagg accgcgcggc tggaggtgtg aggatccgaa
841 cccaggggtg ggggggtggag gcggctcctg cgatcgaagg ggacttgaga ctaccggcc
901 gcacgccatg agggccctgt ggggtgctggg cctctgctgc gtcctgctga ccttcgggtga
961 gtgattctgg aggagcagac gtccccctc cacacacgcg gccgcttctc gaaggtcctg
1021 ggggcgttga acgtgggagg ggggatcccc gggcctgcgg tgggccaagg gacgtcacca
1081 ttcctcgaaa gagggcaagg gaattacgtt tattctcttc tctctctgga aataaaaaa
1141 gagagcaaca tcattctaact gccctacaga tctaatagta tctc...

```

Légende

acgtg : HRE (Hypoxia responsive element)

ccaat-(N₉)-ccacg : ERSE (Endoplasmic reticulum stress element)

gtgaa : TATA box

gtggg : partie non codante de l'ARNm (5'UTR)

tgctg : Exon I

acgcg : Intron I

Figure 8 : Séquence du promoteur et de la partie 5' du gène *tra-1*, codant pour la GRP94 humaine. Ce promoteur contient 3 copies de l'élément ERSE (Endoplasmic Reticulum Stress Element) dont la séquence consensus est 5'-CCAAT-(N₉)-CCACG-3'. Ces éléments sont situés en -90, -155 et -195 par rapport au site d'initiation de la transcription. Outre ces éléments ERSE, on retrouve trois sites HRE (Hypoxia Responsive Element) dont la séquence consensus est 5'-ACGTG-3'. Ils sont situés en -702 (HRE1), -412 (HRE2) et -248 (HRE3) par rapport au site d'initiation de la transcription. Un élément HRE (HRE4) est également présent au niveau du premier intron. Il est situé en +228 par rapport au site d'initiation de la transcription.

Etude du promoteur du gène *tra-1*

1. Analyse de la séquence du promoteur du gène *tra-1*

La séquence du promoteur du gène *tra-1*, codant pour la GRP94 humaine, est représentée à la figure 8 (Maki *et al.*, 1990). Comme les autres promoteurs des gènes *GRP* de mammifères, le promoteur du gène *tra-1* contient des copies multiples de l'élément ERSE (Endoplasmic Reticulum Stress Element) dont la séquence consensus est 5'-CCAAT-(N₉)-CCACG-3'. Trois copies de l'ERSE sont présentes au niveau du promoteur du gène *tra-1* et situées en -90, -155 et -195 par rapport au site d'initiation de la transcription. On retrouve la séquence des éléments ERSE situées en -90 et -155 sur le brin antisens tandis que celle située en -195 se trouve sur le brin sens. Les copies multiples de l'ERSE, présentes au sein des promoteurs des gènes *GRP* de mammifères, sont toutes fonctionnelles et peuvent agir indépendamment de leur orientation.

Outre ces éléments ERSE, on retrouve dans le promoteur du gène *tra-1* trois sites potentiels de liaison du facteur de transcription HIF-1. Les copies de l'élément HRE, dont la séquence consensus est 5'-ACGTG-3', sont situées en -702 (HRE1), -412 (HRE2) et -248 (HRE3) par rapport au site d'initiation de la transcription. La séquence consensus de l'élément HRE1 se lit sur le brin sens, celle de HRE2 sur le brin antisens et celle de l'élément HRE3 peut se lire sur le brin sens et antisens. Un élément HRE (HRE4) est également présent au niveau du premier intron. Il est situé en +228 par rapport au site d'initiation de la transcription.

La présence de ces éléments HRE dans le promoteur suggère que le facteur de transcription HIF-1 pourrait jouer un rôle dans la régulation transcriptionnelle du gène codant pour la GRP94 humaine, durant l'hypoxie. La fonctionnalité de ces éléments sera donc étudiée dans la suite du travail.

2. Mise en évidence de l'activation de HIF-1 dans les cellules EAhy926 incubées sous hypoxie

Avant d'étudier les éléments HRE du promoteur du gène *tra-1*, nous avons voulu vérifier si HIF-1 était bien activé dans nos conditions expérimentales. Pour ce faire, la stabilisation de la sous-unité HIF-1 α du facteur de transcription HIF-1 ainsi que son activité de liaison à l'ADN et son activité transcriptionnelle ont été étudiées.

2.1 Stabilisation de HIF-1 α en hypoxie

La stabilisation en hypoxie de la sous-unité HIF-1 α du facteur de transcription HIF-1 est la première étape du processus d'activation de HIF-1 en hypoxie. Nous l'avons donc tout d'abord mesurée.

En pratique, les cellules EAhy926 sont placées en hypoxie ou en normoxie pendant 1, 3, 8 et 16 heures. Les lysats totaux sont obtenus aux différents temps et les extraits protéiques

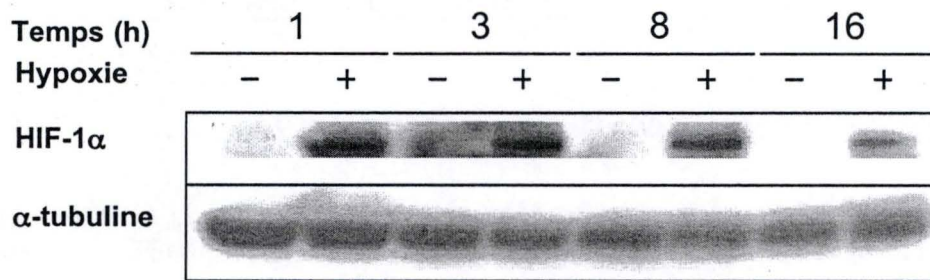


Figure 9 : Stabilisation de HIF-1 α en hypoxie. Les cellules EAhy926 sont placées en hypoxie (+) ou en normoxie (-) pendant 1, 3, 8 et 16 heures et les extraits protéiques totaux sont préparés aux différents temps. Les niveaux d'expression de HIF-1 α et de l' α -tubuline sont évalués par Western blot.

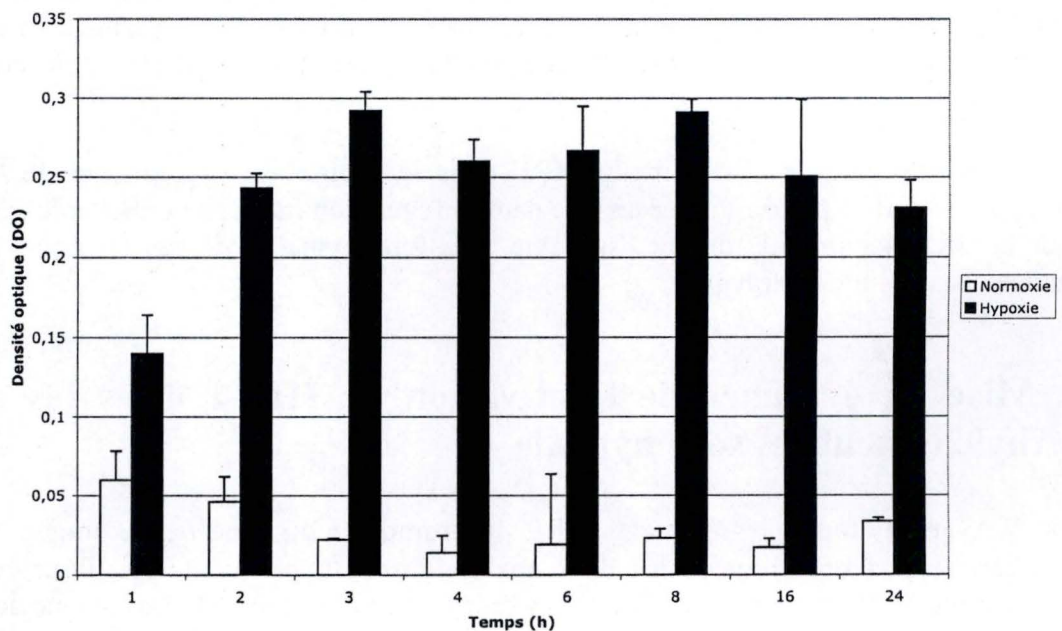


Figure 10 : Activité de liaison à l'ADN de HIF-1 α en hypoxie. Les extraits nucléaires sont préparés à partir de cellules EAhy926 incubées en hypoxie ou en normoxie pendant 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 16 et 24 heures. La liaison de HIF-1 à sa séquence cible fixée au fond des puits est mise en évidence par une incubation avec un anticorps primaire dirigé contre HIF-1 α (test Trans-AM). Les résultats sont exprimés en densité optique (DO) en tant que moyennes \pm 1 écart-type (n=3).

sont dosés selon la méthode de Bradford. Les protéines sont séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide et transférées sur membrane. HIF-1 α est détecté par un système de marquage indirect impliquant un anticorps primaire anti-HIF-1 α et un anticorps secondaire, couplé à un système de révélation. L' α -tubuline est également révélée. En effet, le niveau d'expression de HIF-1 α est évalué de façon semi-quantitative en normalisant sa quantité par rapport à l' α -tubuline.

Les films autoradiographiques (figure 9) montrent une bande à environ 120 kDa en hypoxie (+), alors que cette bande n'est pas présente en normoxie (-). Celle-ci correspond à la sous-unité HIF-1 α .

HIF-1 est donc stabilisé rapidement dans les cellules endothéliales EAhy926 placées en hypoxie puisqu'il est observé dès 1 h d'incubation. Sa présence est maintenue au moins jusqu'à 16 heures d'incubation avec peut-être une diminution de son abondance pour les longs temps d'incubation, comme cela a déjà été observé pour les cellules HepG2 (Mottet *et al.*, 2003).

2.2 Activité de liaison à l'ADN de HIF-1 α en hypoxie

La liaison à l'ADN de HIF-1 α est mesurée par un test colorimétrique (Trans-AM). Dans une plaque 96 puits dont les puits sont recouverts de streptavidine, un oligonucléotide double brin biotinylé contenant la séquence consensus du facteur de transcription HIF-1 a été fixé. La quantité de trappeurs fixés au fond des puits a été estimée à 1,6 pmoles (dosage au picogreen).

Les cellules EAhy926 sont incubées en hypoxie ou en normoxie pendant 1, 2, 3, 4, 6, 8, 16 et 24 heures. Des extraits nucléaires sont préparés aux différents temps et incubés dans les puits, sauf dans les puits « blanc » qui ne contiennent pas d'extrait. Après plusieurs lavages, la liaison de HIF-1 α à sa séquence cible fixée au fond des puits est mise en évidence par une incubation avec un anticorps primaire dirigé contre HIF-1 α . Après incubation en présence de l'anticorps secondaire conjugué à la peroxydase, la révélation est réalisée en présence du substrat de l'enzyme. L'absorbance du produit de cette réaction colorimétrique est mesurée au spectrophotomètre. La valeur du blanc retirée, les résultats sont présentés sous forme graphique (figure 10).

Des valeurs élevées de densité optique sont le reflet de la liaison importante de HIF-1 à sa séquence consensus fixée au fond des puits. On observe ainsi la liaison à son trappeur de HIF-1 α , extrait de cellules EAhy926 incubées sous hypoxie. On observe déjà une activité de liaison à l'ADN de HIF-1 après 1 heure d'incubation sous hypoxie. Cette activité augmente encore jusqu'à 2 heures pour se stabiliser ensuite. Les valeurs faibles de densité optique, obtenues pour les extraits réalisés à partir des cellules maintenues en normoxie, indiquent qu'il n'y a pas de HIF-1 capable de se lier à l'ADN dans ces extraits. En effet, HIF-1 α n'est pas présent dans ces conditions (cf. figure 9).

aldolase	1	2	MOY	Tubu 1	Tubu 2	tub MOY	δ CT	$\delta\delta$ CT	Expression	E %
1N	21,88	21,84	21,86	18,54	18,82	18,68	3,18			
1H	21,25	21,15	21,20	17,77	17,90	17,84	3,37	0,18	0,880	88
2N	21,26	21,14	21,20	18,15	18,11	18,13	3,07			
2H	20,82	20,80	20,81	18,03	18,01	18,02	2,79	-0,28	1,214	121
3N	20,90	21,14	21,02	17,49	17,56	17,53	3,50			
3H	19,68	19,90	19,79	17,20	17,27	17,24	2,56	-0,94	1,919	192
4N	23,61	23,49	23,55	20,79	20,91	20,85	2,70			
4H	19,31	19,20	19,26	16,90	17,01	16,96	2,30	-0,40	1,320	132
6N	20,19	20,19	20,19	17,39	17,40	17,40	2,80			
6H	20,44	20,14	20,29	17,46	18,30	17,88	2,41	-0,39	1,306	131
8N	20,80	20,68	20,74	18,39	18,30	18,35	2,40			
8H	19,95	19,83	19,89	18,11	18,14	18,13	1,77	-0,63	1,548	155
16N	20,49	20,38	20,44	18,03	17,99	18,01	2,43			
16H	19,70	19,75	19,73	19,67	19,32	19,50	0,23	-2,20	4,579	458
24N	21,57	21,40	21,49	19,39	19,42	19,41	2,08			
24H	18,62	18,59	18,61	17,97	19,07	18,52	0,09	-2,00	3,986	399
40N	19,57	19,74	19,66	17,38	17,44	17,41	2,25			
40H	19,02	18,92	18,97	19,38	19,18	19,28	-0,31	-2,56	5,877	588

Figure 11 : Valeurs des CT de l'aldolase et de l' α -tubuline pour les différentes conditions (1, 2, 3, 4, 6, 8, 16, 24, et 40 heures d'incubation en hypoxie ou en normoxie). Les δ CT ($CT_{GRP94} - CT_{tubuline}$), les $\delta\delta$ CT ($\delta CT_{hypoxie}$ (situation test) - $\delta CT_{normoxie}$ (situation contrôle)) et les pourcentages d'expression ($2^{-\delta\delta CT} \times 100$) ont été calculés pour les différentes conditions.

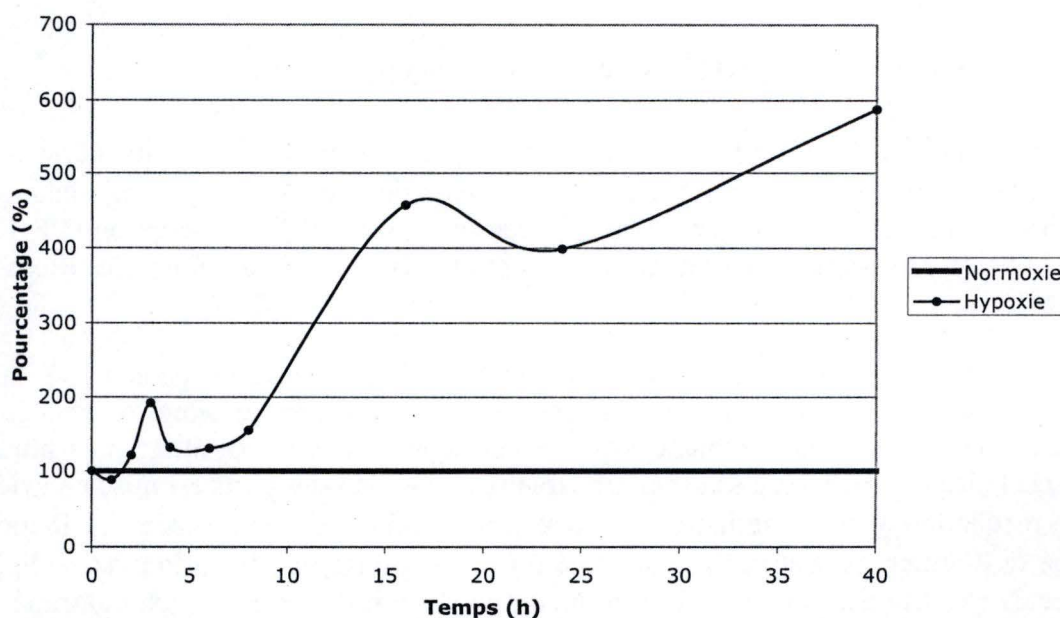


Figure 12 : Cinétique d'évolution de la quantité d'ARNm de l'aldolase au cours de l'hypoxie. Les valeurs sont exprimées en pourcentage d'expression après normalisation avec l' α -tubuline, 100% correspondant à la normoxie.

Sondes	Séquences
Sonde HRE1	5'-CTGGGGGA <u>AC</u> GTGAAGAAGAAAGG-3'
Sonde HRE1 muté	5'-CTGGGGGA <u>AAATA</u> AAGAAAGG-3'
Sonde HRE2	5'-GTGAAGAA <u>AC</u> CGTTGCCATGG-3'
Sonde HRE2 muté	5'-GTGAAGAA <u>TATTT</u> TGCCATGG-3'
Sonde HRE3	5'-GCGGTCC <u>AC</u> GTGTGAGGGGC-3'
Sonde HRE3 muté	5'-GCGGTCC <u>AAATA</u> TGAGGGGC-3'
Sonde HRE4	5'-GGCGTTGA <u>AC</u> GTGGGAGGGGG-3'

Figure 13 : Séquences des sondes utilisées pour les expériences de compétition Trans-AM. Les séquences des sites HRE sont ombrées et les bases mutées sont soulignées.

2.3 Cinétique d'expression de l'aldolase

L'*aldolase* est un gène dont l'expression est spécifiquement régulée par le facteur de transcription HIF-1 en hypoxie. Une cinétique montrant l'évolution de la quantité d'ARNm de l'aldolase au cours de l'hypoxie a été réalisée. Cette cinétique peut être une indication de la manière dont HIF-1 régule la transcription de ses gènes cibles en hypoxie.

L'analyse se fait par PCR en temps réel et les ADNc requis pour cette expérience sont les mêmes que ceux utilisés lors de l'amplification par PCR en temps réel du gène *tra-1*. L'ADNc de l'aldolase est alors amplifié par PCR en temps réel grâce à l'utilisation d'amorces spécifiques.

Les valeurs de CT pour l'amplification des ADNc (ARNm) de l'aldolase et de l' α -tubuline sous les différentes conditions (1, 2, 3, 4, 6, 8, 16, 24, et 40 heures d'hypoxie ou de normoxie) sont rapportées à la figure 11. Les calculs des δ CT ($CT_{aldolase} - CT_{tubuline}$), des $\delta\delta$ CT ($\delta CT_{hypoxie (situation\ test)} - \delta CT_{normoxie (situation\ contrôle)}$) et des pourcentages d'expression ($2^{-\delta\delta CT} \times 100$) sont réalisés pour les différentes conditions. Le profil d'expression de l'ARNm de l'aldolase au cours de l'hypoxie est représenté graphiquement (figure 12).

On observe une augmentation de la quantité de l'ARNm de l'aldolase après 3 heures d'hypoxie. Les quantités d'ARNm présentes à 16 heures et 24 heures d'hypoxie sont respectivement 4,6 fois et 4 fois plus élevées qu'en normoxie. Après 40 heures d'hypoxie, la quantité d'ARNm en hypoxie continue d'augmenter pour être 5,9 fois plus élevée qu'en normoxie.

Il est intéressant de noter qu'on observe un certain parallélisme avec la cinétique d'évolution de la quantité d'ARNm de la GRP94, même si les pics semblent légèrement décalés vers des temps d'incubation plus longs.

3. Etude de la liaison de HIF-1 à chacun des sites HRE présents au sein du promoteur du gène *tra-1*

Puisque nous avons montré que HIF-1 est bien activé dans les cellules EAhy926 incubées en hypoxie, nous avons ensuite étudié la fonctionnalité des sites HRE présents dans le promoteur du gène *tra-1*.

Des expériences de compétition pour la liaison de HIF-1 au site HRE présent sur le trappeur (W18) fixé au fond des puits du Trans-AM avec chacun des sites HRE présents au sein du promoteur du gène *tra-1* ont été réalisées, afin de déterminer si HIF-1 est capable de se lier à chacun de ces sites HRE. Dans ce but, des sondes sauvages ou mutées (figure 13) correspondant à chaque site HRE ont été utilisées. Le site HRE présent au sein des sondes est muté de telle façon que les bases cytosine et guanine de la séquence HRE soient remplacées par des bases alanine. Semenza *et al.* (1992) ont montré que de telles mutations ne permettent plus la liaison de HIF-1.

Les cellules EAhy926 sont placées en hypoxie ou en normoxie pendant 4 heures et les extraits nucléaires sont alors préparés. Ceux-ci sont alors incubés en présence du tampon de liaison contenant soit les sondes sauvages correspondant à chaque site HRE présent au sein du

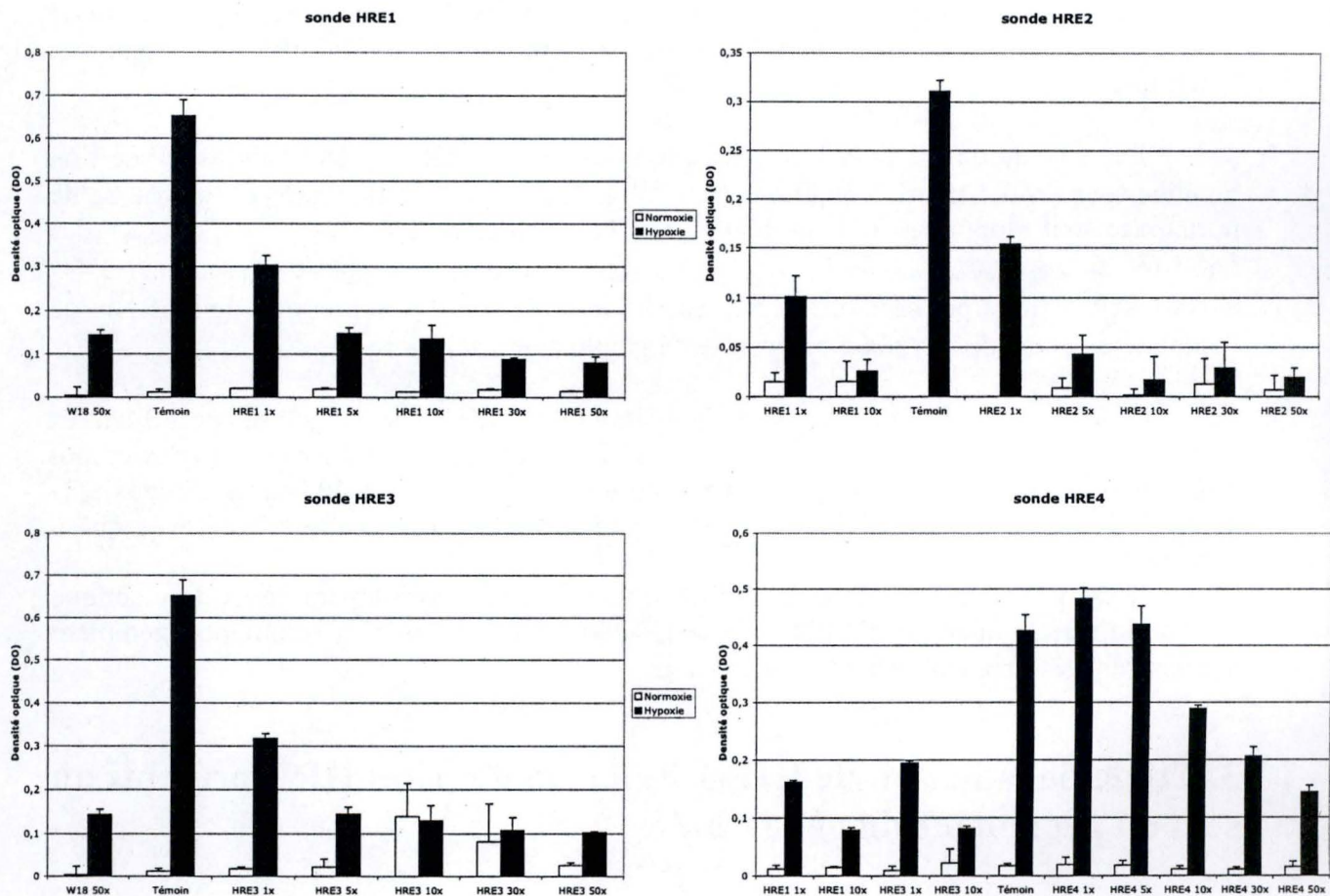


Figure 14 : Etude de la liaison de HIF-1 à des sondes sauvages correspondant à chaque site HRE (HRE1, HRE2, HRE3 et HRE4) présent au sein du promoteur du gène *tra-1*. La sonde W18 est connue pour lier HIF-1 (Semenza *et al.*, 1992). Différentes concentrations en sondes sont testées : les quantités de sondes dans le tampon de liaison sont de 1 ×, 5 ×, 10 ×, 30 × ou 50 × plus importantes que la quantité de trappeurs fixés au fond des puits. Le témoin positif de liaison ne contient pas de sonde. La liaison de HIF-1 à son trappeur est mise en évidence par une incubation avec un anticorps primaire dirigé contre HIF-1 α . Les résultats sont exprimés en densité optique (DO) en tant que moyennes \pm 1 écart-type (n=3).

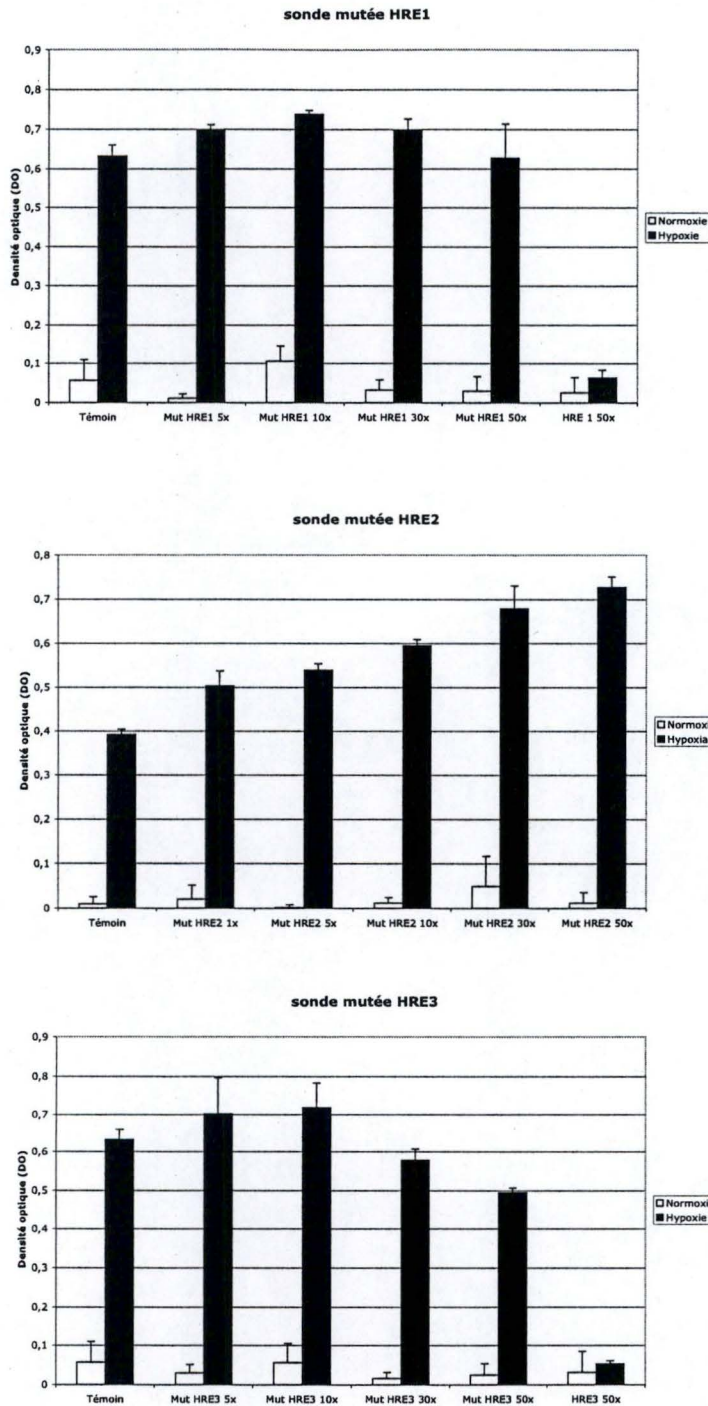


Figure 15 : Etude de la liaison de HIF-1 à des sondes mutées correspondant à chaque site HRE (HRE1, HRE2 et HRE3) présent au sein du promoteur du gène *tra-1*. Différentes concentrations en sondes sont testées : les quantités de sondes ajoutées dans le tampon de liaison sont de 1 ×, 5 ×, 10 ×, 30 × ou 50 × plus importantes que la quantité de trappeurs fixés au fond des puits. Le témoin positif de liaison ne contient pas de sonde. La liaison de HIF-1 à son trappeur est mise en évidence par une incubation avec un anticorps primaire dirigé contre HIF-1 α . Les résultats sont exprimés en densité optique (DO) en tant que moyennes \pm 1 écart-type (n=3).

promoteur de *tra-1*, soit la sonde W18 (18 nucléotides) connue pour lier HIF-1 (Semenza *et al.*, 1992), dans les puits tapissés de trappeurs HIF-1. Différentes concentrations en sondes ont été testées : les quantités de sondes ajoutées dans le tampon de liaison sont de 1 ×, 5 ×, 10 ×, 30 × ou 50 × plus importantes que la quantité de sondes (trappeurs) fixées au fond des puits. Un témoin positif de liaison ne contenant pas de sonde dans le tampon de liaison est également incubé en présence d'extraits nucléaires. Après plusieurs lavages, la liaison de HIF-1 à sa séquence cible fixée au fond des puits est mise en évidence par une incubation avec un anticorps primaire dirigé contre HIF-1 α , suivie d'une incubation en présence de l'anticorps secondaire conjugué à la peroxydase. La révélation est réalisée en présence du substrat de l'enzyme et l'absorbance du produit de cette réaction colorimétrique est mesurée. Le test colorimétrique a également été réalisé sur un puits blanc ne contenant ni sonde dans le tampon de liaison, ni extrait de protéines nucléaires. La valeur de ce blanc retirée, les résultats sont présentés sous forme graphique (figure 14).

Une valeur de densité optique (DO) plus faible que la DO mesurée pour le témoin positif de liaison est le reflet de la liaison de HIF-1 aux sondes présentes dans le tampon de liaison plutôt qu'aux trappeurs fixés au fond des puits. En effet, si HIF-1 se lie aux sondes présentes dans le tampon de liaison, il est éliminé par les lavages en même temps que celles-ci et ne pourra plus être reconnu par l'anticorps primaire dirigé contre HIF-1 α .

On observe ainsi que HIF-1, extrait de cellules EAhy926 placées en hypoxie pendant 4 heures, peut se lier aux sondes sauvages correspondant aux sites HRE1, HRE2 et HRE3 présents au sein du promoteur du gène *tra-1*. La liaison de HIF-1 à la sonde correspondant au site HRE4 présent au niveau du premier intron du gène *tra-1* n'est observée que lorsque la quantité de sondes dans le tampon de liaison est 10 à 30 × plus importante que la quantité de sondes fixées au fond des puits ; ce qui n'a aucune valeur physiologique. Ces résultats suggèrent que HIF-1 reconnaît HRE1, HRE2, HRE3 mais pas HRE4.

L'absence de HIF-1 dans les extraits de protéines nucléaires obtenus à partir de cellules EAhy926 contrôles placées en normoxie explique les valeurs faibles de DO obtenues avec ces extraits.

Afin de s'assurer de la spécificité de liaison du facteur de transcription HIF aux différents sites HRE, le test Trans-AM a également été réalisé en présence de sondes présentant un site HRE muté (figure 15). Le protocole est le même que celui décrit pour les sondes sauvages. Différentes concentrations en sondes mutées ont à nouveau été testées.

Les valeurs de DO observées pour les sondes mutHRE1 (HRE1 muté), mutHRE2 (HRE2 muté) et mutHRE3 (HRE3 muté) sont similaires à celle observée pour le témoin positif de liaison ne contenant pas de sonde. HIF-1 se lie donc aux trappeurs fixés au fond des puits et non aux sondes mutées, ce qui indique que la liaison observée sur les sondes sauvages est bien spécifique.

En conclusion de cette étude, on a montré que HIF-1 était capable de se lier aux sites HRE1, HRE2 et HRE3 présents au sein du promoteur du gène *tra-1* codant pour la GRP94 humaine, alors qu'il ne se lie pas au site HRE4 présent au niveau du premier intron. Ceci suggère que ces sites pourraient être actifs.

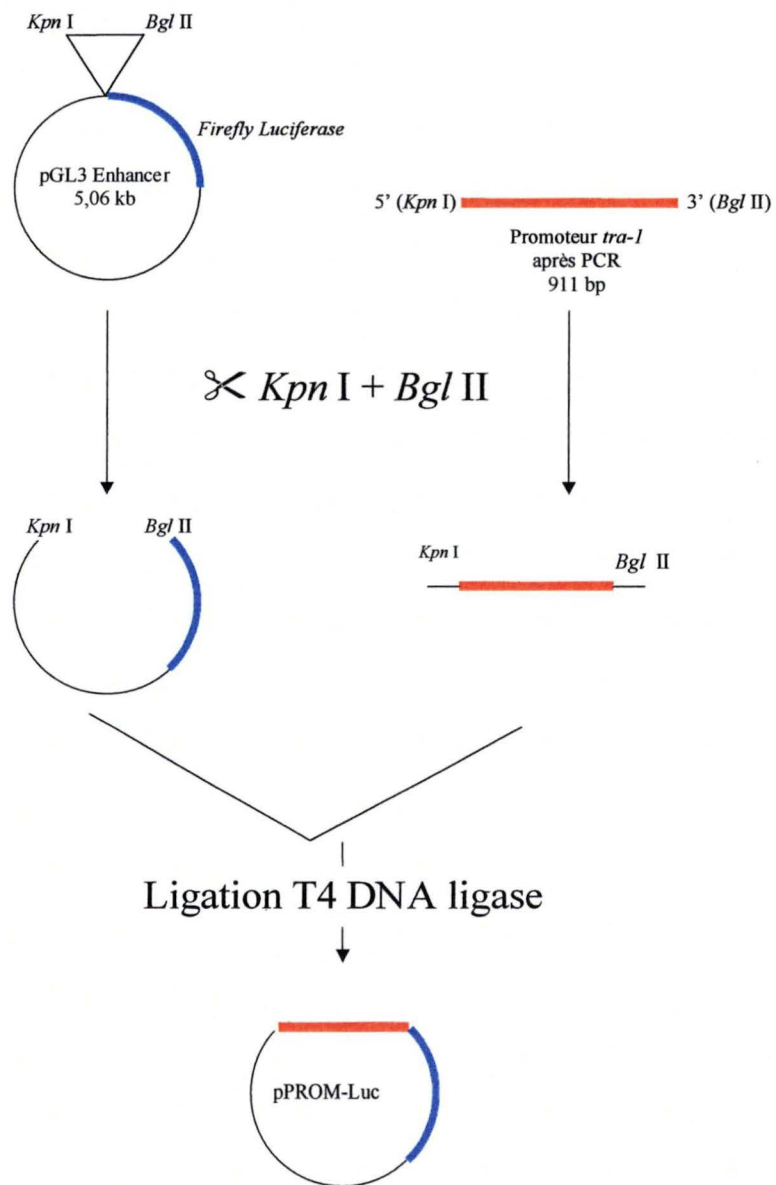


Figure 16 : Représentation schématique des différentes étapes du clonage du promoteur de *tra-1* dans le plasmide pGL3 enhancer. La première étape est l'amplification d'un fragment de 911 pb du promoteur de *tra-1* à partir d'ADN génomique à l'aide d'amorces 5' et 3' contenant respectivement un site de restriction *Kpn* I et *Bgl* II. Promoteurs et plasmides sont alors restreints par ces deux enzymes de restriction, puis ligués par la T4 DNA ligase.

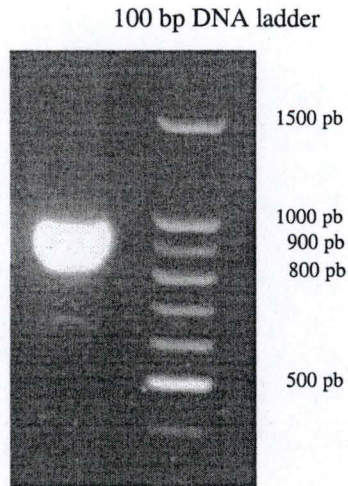


Figure 17 : Séparation sur gel d'agarose du produit PCR obtenu après amplification du promoteur de *tra-1* à l'aide d'amorces spécifiques. La taille attendue de l'amplicon est de 911 pb.

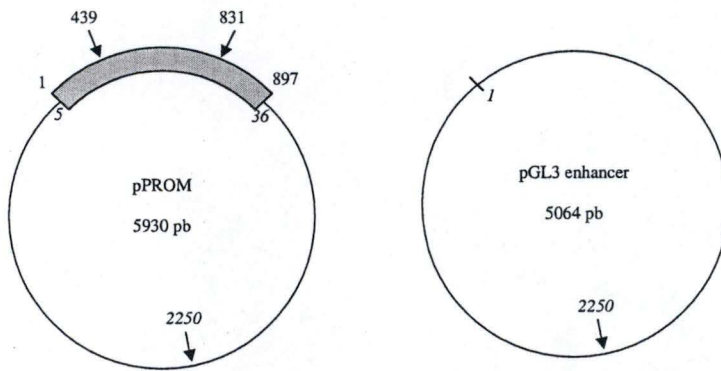


Figure 18 : Représentation schématique des sites de restriction de l'enzyme *Bam* HI au niveau du plasmide pPROM, ayant incorporé le promoteur de *tra-1* et du pGL3 enhancer vide. *Bam* HI coupe deux fois dans l'insert et une fois dans le plasmide pGL3 enhancer, générant des fragments d'ADN de 3258, 2280 et 392 pb. Le pGL3 vide est coupé une seule fois par *Bam* HI, générant de la sorte un plasmide linéaire de 5064 pb. Les sites de restriction *Bam* HI sont indiqués par des flèches.

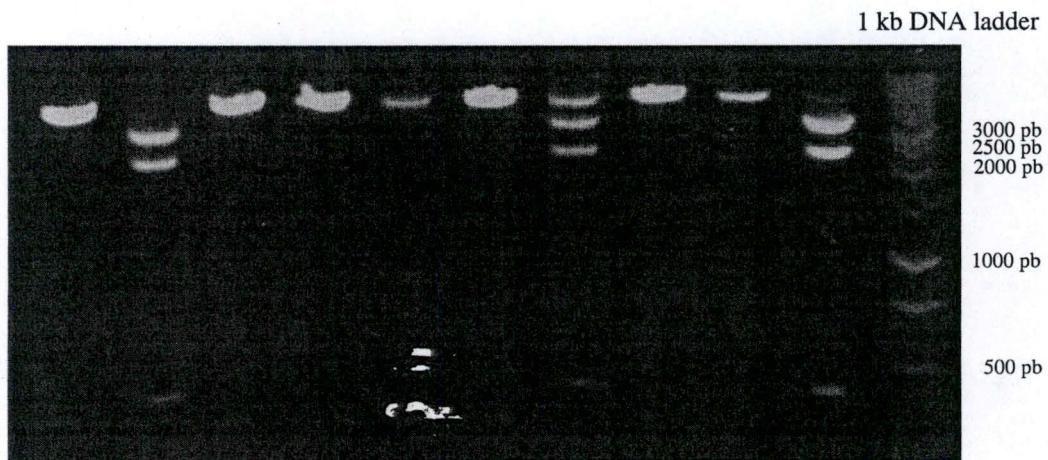


Figure 19 : Séparation sur gel d'agarose des produits de la restriction diagnostique (*Bam* HI) de plusieurs minipréparations d'ADN plasmidique.

4. Clonage du promoteur de *tra-1*

Le facteur de transcription HIF-1 est capable de se lier aux sites HRE présents au sein du promoteur de *tra-1*. Afin d'étudier si HIF-1 augmente la transcription de *tra-1* en hypoxie et afin de déterminer via quel site HRE il agit, nous avons cloné son promoteur dans le plasmide pGL3 enhancer, en amont du gène rapporteur luciférase, et réalisé des expériences de mutagenèse dirigée. Les différentes constructions ont ensuite été transfectées afin de suivre leur activité.

Les différentes étapes du clonage sont reprises à la figure 16. Le promoteur de *tra-1* est d'abord amplifié par PCR à partir d'ADN génomique. L'amorce sens utilisée contient la séquence consensus reconnue par l'enzyme de restriction *Kpn* I, l'amorce antisens celle de l'enzyme *Bgl* II. 10 µl du produit PCR sont ensuite séparés sur gel d'agarose contenant du bromure d'éthidium et l'ADN est ensuite observé sous illumination UV (figure 17). La taille attendue de l'amplicon est de 911 pb et est estimée sur gel d'agarose en faisant co-migrer un marqueur de taille (100 bp DNA ladder).

On observe une bande à environ 900 pb correspondant à l'amplification du promoteur de *tra-1*.

L'amplicon est extrait du gel d'agarose et purifié (Kit Wizard[®] SV gel and PCR Clean-Up System). Le promoteur de *tra-1* et le pGL3 enhancer sont alors restreints par *Bgl* II, puis par *Kpn* I de manière à générer une extrémité 5'cohésive et une extrémité 3'cohésive. Comme le tampon de restriction est différent pour les deux enzymes, il est nécessaire de passer par une étape de purification (Kit Wizard[®] SV gel and PCR Clean-Up System) après la première digestion.

Promoteurs et plasmides sont à nouveau purifiés, dosés et ligués afin d'obtenir des plasmides pGL3 enhancer recombinants contenant le promoteur de *tra-1*.

Des bactéries *E. coli* SURE sont transformées avec le produit de ligation et étalées sur milieu solide sélectif. Des colonies de bactéries transformées sont isolées et mises en culture de manière à les amplifier.

Des mini-préparations d'ADN plasmidique sont réalisées à partir de mini-cultures (QIAprep Spin Miniprep Kit Protocol, Qiagen). 1 µl de chacune de ces mini-préparations d'ADN plasmidique est ensuite digéré par l'enzyme de restriction *Bam* HI de manière à discriminer les plasmides pGL3 enhancer recombinants ayant incorporé le promoteur de *tra-1*, des plasmides pGL3 vides. En effet, cette enzyme coupe deux fois dans l'insert et une fois dans le plasmide pGL3 enhancer, générant des fragments d'ADN de 3258, 2280 et 392 pb. Le pGL3 vide est coupé une seule fois par *Bam* HI, générant de la sorte un plasmide linéaire de 5064 pb (figure 18).

Les produits des digestions diagnostiques sont séparés sur gel d'agarose et l'ADN est observé sous illumination UV. La taille des fragments d'ADN est estimée sur gel en faisant co-migrer le marqueur de taille, 1 kb DNA ladder.

Des fragments d'environ 3000, 2000 et 400 pb sont observés dans plusieurs pistes (figure 19). 5 clones positifs ont ainsi été obtenus. Les 5 mini-préparations d'ADN plasmidique correspondantes contiennent le plasmide pGL3 enhancer ayant incorporé le promoteur de *tra-1*.

Mutations du site HRE1	Amorce sens 5'-GGGCTCTGGCAAAGACACGCTGGGGGA <u>AAATA</u> AAGAAAGGGCCAAACTACGC-3'
Mutations du site HRE3	Amorce sens 5'-GGCAAAGGGGCGGTCCCA <u>AAAT</u> ATGAGG GGCCCGAGCC-3'

Figure 20 : Séquences des amorces (Eurogentec) utilisées pour la mutagenèse dirigée des sites HRE du promoteur de *tra-1*. Les séquences des sites HRE sont ombrées et les bases mutées sont soulignées.

		10	20	30	40
				
pPROM	1	ATGGAGATCCTGGAATAGGCACATATCTCTACGTAATCAG			40
pPROMutHRE1	1	ATGGAGATCCTGGAATAGGCACATATCTCTACGTAATCAG			40
		50	60	70	80
				
pPROM	41	AACGAGATGTAACATCTAAGACGCAGGGCAGGGCTCTGGC			80
pPROMutHRE1	41	AACGAGATGTAACATCTAAGACGCAGGGCAGGGCTCTGGC			80
		90	100	110	120
				
pPROM	81	AAAGACACGCTGGGGGAACTGAAGAAAGGGCCAAACTA			12
pPROMutHRE1	81	AAAGACACGCTGGGGGAA <u>ATA</u> AAGAAAGGGCCAAACTA			12
		130	140	150	160
				
pPROM	121	CGCAGCTGGTCCTCAGAGACCAAAGACTACGACCCCCAGC			16
pPROMutHRE1	121	CGCAGCTGGTCCTCAGAGACCAAAGACTACGACCCCCAGC			16
		170	180	190	200
				
pPROM	161	ATTCAATGCAGTGAACCCCTAGGACGTTGCATGCCGGGAG			20
pPROMutHRE1	161	ATTCAATGCAGTGAACCCCTAGGACGTTGCATGCCGGGAG			20

Figure 21 : Alignement de la séquence du pPROMutHRE1 avec la séquence de pPROM sauvage. Les bases mutées du site HRE sont mises en évidence.

Les 5 mini-préparations d'ADN plasmidique contenant les plasmides positifs sont dosées et les plasmides séquencés. Un de ces clones contient la séquence exacte du promoteur de *tra-1*. Ce clone, nommé pPROM, sera utilisé dans les expériences ultérieures.

5. Mutagenèse dirigée des sites HRE du promoteur de *tra-1*

Des expériences de mutagenèse dirigée ont été réalisées sur le plasmide pPROM afin de muter les séquences HRE1 ou HRE3 présentes au sein du promoteur de *tra-1* car ce sont celles-ci que HIF-1 reconnaît dans le test Trans-AM (cf. figure 14). HRE2 sera fait ultérieurement.

Le principe est basé sur la réalisation d'une amplification PCR classique sur le plasmide parental pPROM, grâce à deux amorces oligonucléotidiques synthétiques contenant les mutations désirées (figure 20). Le choix des paires d'amorces a été fait de telle manière que la séquence initiale du site HRE (5'-ACGTG-3') soit remplacée par la séquence mutée 5'-AAATA-3'. Au total, deux mutants ont été générés : pPROMutHRE1, portant le site HRE1 muté et pPROMutHRE3 portant le site HRE3 muté.

L'amplification PCR a généré au cours des différents cycles des plasmides pPROM mutés qui diffèrent du plasmide parental par l'absence de sites méthylés. Ce plasmide parental a ensuite été restreint par l'endonucléase *Dpn I* qui clive les séquences d'ADN méthylé, mais pas le plasmide muté. Seul celui-ci a donc pu être incorporé dans les bactéries XL-I Blue Supercompetent.

Après amplification des bactéries et extraction d'ADN plasmidique, les plasmides ont été séquencés afin de vérifier la présence des mutations.

Le séquençage du pPROMutHRE1 (HRE1 muté) et du pPROMutHRE3 (HRE3 muté), puis l'alignement de leur séquence avec la séquence de pPROM sauvage (figure 21) confirment la présence des mutations désirées au niveau des 2 sites HRE.

6. Transfection du promoteur de *tra-1* et de ces versions mutées dans les cellules EAhy926

Afin de suivre l'activité du promoteur de *tra-1* et de ces versions mutées, les plasmides correspondant doivent être transfectés dans les cellules EAhy926. Comme aucun protocole de transfection n'était disponible pour ce type cellulaire, nous avons mis au point celui-ci.

6.1 Mise au point d'un protocole de transfection

Afin de mettre au point un protocole de transfection efficace des cellules EAhy926, différents agents transfectant ont été évalués. Il s'agit du Superfect, de la lipofectine et de la lipofectamine 2000.

La veille de la transfection, 10^5 cellules EAhy926 sontensemencées dans des plaques 24 puits sur des lamelles couvre-objet stérilisées à l'alcool. Les cellules ont ensuite été co-



Figure 22 : Transfection des cellules EAhy926 avec le plasmide pEGFP. L'agent transfectant utilisé est la lipofectine et les cellules sont observées au microscope confocal 24 heures après la tranfection.

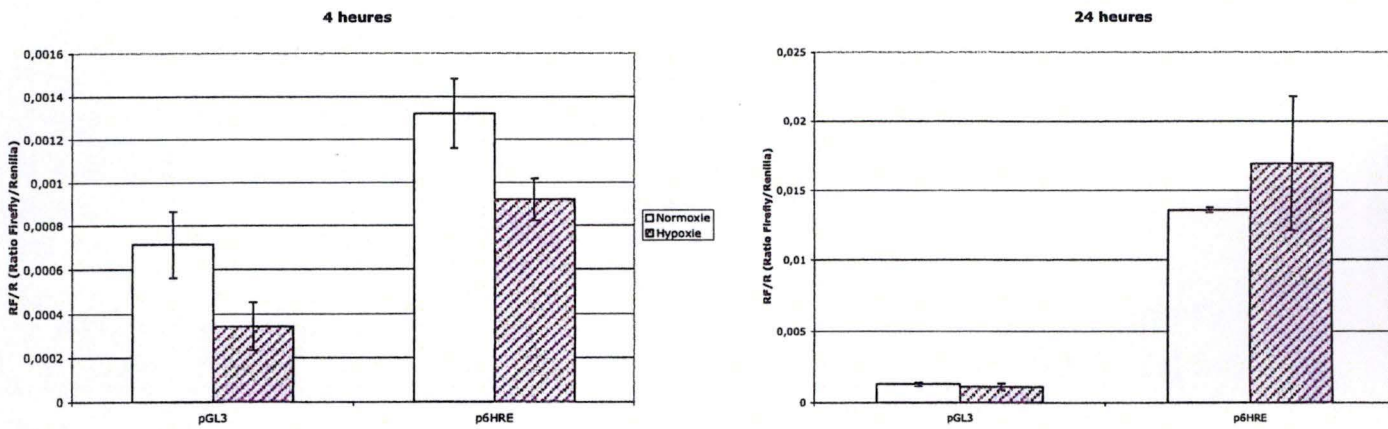


Figure 23 : Mesure de l'activité transcriptionnelle de HIF-1. Les cellules EAhy926 sont co-transfectées avec les plasmides pCMV-Myc, pRL-SV40 et les plasmides rapporteurs pGL3-SV40/6HRE ou pGL3 enhancer vide et incubées en hypoxie ou en normoxie pendant 4 ou 24 heures. Le plasmide p6HRE possède 6 copies de l'élément HRE régulant l'expression du gène rapporteur *luc+*. Le plasmide pGL3 sert de contrôle négatif. Les résultats sont exprimés en tant que rapports de l'activité de la luciférase firefly sur l'activité de la luciférase renilla (moyennes \pm 1 écart-type, n=3).

transfectées avec le mélange d'ADN contenant les plasmides pCMV-Myc, pRL-SV40 et pEGFP.

Les cellules ayant incorporé le plasmide codant pour la EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) sont capables suite à l'expression de la protéine, d'émettre, après excitation UV, de la fluorescence dans la gamme des longueurs d'onde émettant dans le vert. On utilise la microscopie confocale pour détecter les cellules fluorescentes et ainsi évaluer l'efficacité de la transfection.

Les cellules transfectées sont également observées au microscope photonique inversé afin d'évaluer la mort cellulaire inhérente à la transfection.

La lipofectine présente un double avantage. Elle est moins cytotoxique que le Superfect et elle permet une meilleure transfection des cellules EAhy926 que la lipofectamine 2000 (figure 22). Cet agent transfectant sera donc utilisé dans la suite du travail pour les expériences de transfection des cellules EAhy926.

6.2 Transfection des cellules EAhy926 avec les plasmides pGL3 et p6HRE

Avant de transfecter les cellules EAhy926 avec les différentes constructions obtenues au cours de ce mémoire, nous avons voulu vérifier la fonctionnalité d'un système rapporteur répondant à l'hypoxie.

En pratique, les cellules EAhy926 ont été co-transfectées avec les plasmides pCMV-Myc (porteur), pRL-SV40 et les plasmides rapporteurs pGL3-SV40/6HRE ou pGL3 enhancer vide. Le plasmide pRL-SV40 contient le gène de la renilla luciférase. Il sert de vecteur contrôle pour la normalisation des résultats de transfection. Le plasmide pGL3-SV40 (p6HRE) possède 6 copies de l'élément HRE de l'érythropoïétine et régule de manière dépendante de HIF-1 l'expression du gène rapporteur *luc+* codant pour la firefly luciférase. Il permet ainsi de mesurer l'activité transcriptionnelle de HIF-1. Le plasmide pGL3 sert de contrôle négatif.

24 heures après la transfection, les cellules sont incubées pendant 4 heures ou 24 heures en hypoxie ou en normoxie. Les activités des luciférases firefly et renilla sont ensuite mesurées. Les résultats sont exprimés en tant que rapports de l'activité de la luciférase firefly sur l'activité de la luciférase renilla (figure 23).

L'activité transcriptionnelle du facteur HIF-1 dans les cellules transfectées avec le p6HRE et placées en hypoxie n'augmente pas par rapport à l'activité de HIF-1 observée dans les cellules transfectées et laissées en normoxie, et ce quelque soit le temps d'incubation. Le système rapporteur utilisé ne fonctionne donc vraisemblablement pas dans les cellules EAhy926 alors qu'il est fonctionnel dans plusieurs autres types cellulaires comme les HepG2, les cellules Cos et les cellules CHO.

7. Régulation du promoteur de *tra-1* par HIF-1 en hypoxie

Afin de contourner le problème de fonctionnalité du plasmide p6HRE dans les cellules EAhy926 en hypoxie, nous avons changé de type cellulaire et utilisé les cellules HepG2.

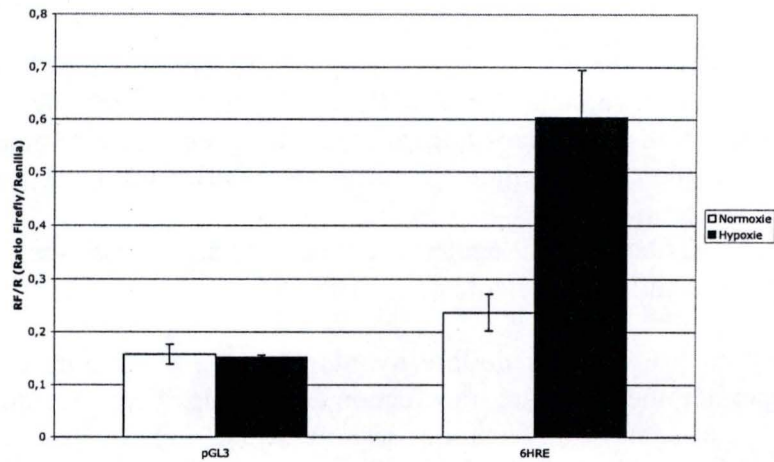


Figure 24 : Mesure de l'activité transcriptionnelle de HIF-1. Les cellules HepG2 sont co-transfectées avec les plasmides pCMV-Myc, pRL-SV40 et les plasmides rapporteurs pGL3-SV40/6HRE ou pGL3 enhancer vide et incubées en hypoxie ou en normoxie pendant 8 heures. Le plasmide p6HRE possède 6 copies de l'élément HRE régulant l'expression du gène rapporteur *luc+*. Le plasmide pGL3 sert de contrôle négatif. Les résultats sont exprimés en tant que rapports de l'activité de la luciférase firefly sur l'activité de la luciférase renilla (moyennes \pm 1 écart-type, n=3).

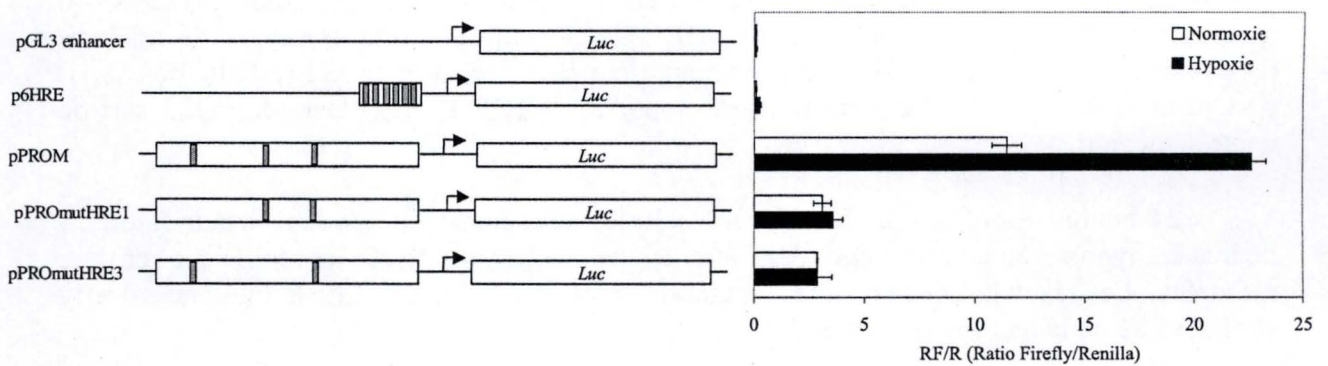


Figure 25 : Mesure de l'activité du promoteur sauvage et muté du gène *tra-1*. Les cellules HepG2 sont co-transfectées avec les plasmides pCMV-Myc, pRL-SV40 et les plasmides rapporteurs pGL3, p6HRE, pPROM, pPROMutHRE1 ou pPROMutHRE3. Après 8 heures d'incubation en hypoxie ou en normoxie, les activités luciférase sont mesurées et les résultats présentés en tant que rapports de l'activité de la luciférase firefly sur l'activité de la luciférase renilla (moyennes \pm 1 écart-type, n=3).

L'utilisation de ces dernières pour l'étude des sites HRE du promoteur de *tra-1* s'avère tout à fait appropriée dans la mesure où l'expression de HIF-1 en hypoxie est bien caractérisée dans ces cellules et que l'utilisation du p6HRE aboutit effectivement à une augmentation de l'expression en hypoxie.

7.1 Vérification de l'induction du p6HRE en hypoxie

Afin de confirmer l'augmentation de l'expression de la luciférase sous la dépendance des sites HRE dans le p6HRE en hypoxie, les cellules HepG2 ont été co-transfectées avec les plasmides pCMV-Myc (carrier), pRL-SV40 et les plasmides rapporteurs pGL3-SV40/6HRE ou pGL3 enhancer vide.

16 h après la transfection, les cellules sont incubées pendant 8 heures en hypoxie ou en normoxie. Les activités des luciférase firefly et renilla sont mesurées et les résultats sont représentés sous forme graphique (figure 24).

Le ratio de l'activité de la firefly sur l'activité de la renilla (RF/R) est plus élevé pour les cellules transfectées avec le p6HRE et placées en hypoxie par rapport aux cellules transfectées et maintenues en normoxie. L'utilisation du p6HRE dans les cellules HepG2 aboutit donc bien à une augmentation de l'expression de la luciférase firefly en hypoxie, indiquant une activité accrue du facteur HIF-1.

7.2 Régulation du promoteur de *tra-1* par HIF-1 en hypoxie

Disposant d'un système rapporteur fonctionnel, nous pouvons maintenant étudier l'activité du promoteur sauvage ou muté de *tra-1*, cloné en amont du gène codant pour la luciférase.

Les cellules HepG2 ont ainsi été co-transfectées avec les plasmides pCMV-Myc, pRL-SV40 et les différents plasmides rapporteurs : pGL3-SV40/6HRE, pGL3 enhancer vide, pPROM, pPROMutHRE1 ou pPROMutHRE3. 16 heures après la transfection, les cellules sont incubées pendant 8 heures en hypoxie ou en normoxie. Les activités des luciférase firefly et renilla sont mesurées et les résultats sont exprimés en tant que rapports de l'activité de la luciférase firefly sur l'activité de la luciférase renilla (figure 25).

On observe que pour les cellules transfectées avec pPROM, le ratio de l'activité de la firefly luciférase sur l'activité de la renilla luciférase (RF/R) est deux fois plus élevé lorsque les cellules ont été placées en hypoxie par rapport aux cellules incubées en normoxie. Ceci témoigne de l'induction transcriptionnelle du gène *luc+* via le promoteur de *tra-1* en hypoxie. Le ratio élevé observé en normoxie témoigne, quant à lui, d'une activité transcriptionnelle basale constitutive importante du promoteur de *tra-1*.

Lorsque les cellules sont transfectées avec les plasmides pPROMutHRE1 ou pPROMutHRE3 et incubées en hypoxie ou en normoxie, on observe une chute de l'activité de la luciférase. Ces résultats suggèrent d'une part que chacun des 2 sites HRE est nécessaire à la transcription du gène en normoxie. D'autre part, comme plus aucune induction n'est observée en hypoxie, ces résultats suggèrent que chacun de ces 2 sites HRE est nécessaire à l'induction en hypoxie.

Ces expériences de transfection montrent que le promoteur de *tra-1* possède une activité transcriptionnelle constitutive importante et qu'il est induit en hypoxie. Les expériences de transfection utilisant les plasmides pPROmutHRE montrent également que la régulation du promoteur de *tra-1* est dépendante de HIF-1.

Conclusion
et
Perspectives

Les protéines de choc thermique et les protéines régulées par le glucose sont deux familles de protéines induites par différents stress physiologiques et environnementaux. En particulier, dans le cadre d'une étude en gels 2D visant à étudier la réponse adaptative des cellules endothéliales à l'hypoxie, Sébastien Paris, au laboratoire, a mis en évidence une augmentation de l'expression de la GRP94 (Glucose-regulated protein 94kDa) dans les cellules endothéliales humaines EAhy926 après 16 heures d'hypoxie. La GRP94, aussi appelée gp96 ou tra-1 (tumor rejection antigen-1), est une glycoprotéine abondante du RE.

Afin de mieux caractériser le profil d'expression de la GRP94 dans les cellules endothéliales au cours d'incubations de durée croissante sous hypoxie, une cinétique a été réalisée. Aucune étude du profil d'expression de la GRP94 en hypoxie n'a pas pu être trouvée dans la littérature. L'évolution de la quantité de l'ARNm de la GRP94 a été suivie par PCR en temps réel. Deux expériences indépendantes ont été réalisées et montrent un profil d'expression de la quantité d'ARNm de la GRP94 semblable. L'augmentation légère de la quantité de l'ARNm de la GRP94 après 1 heure d'hypoxie est suivie par une deuxième augmentation à 8 heures et un pic maximal d'induction après 24 heures d'hypoxie. Les quantités d'ARN présentes à 8 heures et 24 heures d'hypoxie sont respectivement 1,6 et 2,4 fois plus élevées qu'en normoxie. La cinétique d'évolution de la quantité de l'ARNm de la GRP94 que nous avons observée est similaire à la cinétique que Graven *et al.* (2002) ont obtenu pour les ARNm de la PDI (Protein Disulfide Isomerase), une autre protéine chaperone du RE induite par l'hypoxie. A savoir, on observe une augmentation rapide de la quantité d'ARNm après 1 heure d'hypoxie suivie par deux pics d'induction après 8 heures et 24 heures. L'accumulation de la quantité de l'ARNm de la GRP94 en hypoxie peut être expliquée par une augmentation de la transcription du gène *tra-1* codant pour la GRP94 humaine ou par une stabilisation de l'ARNm.

L'évolution de la quantité de la protéine GRP94 a été suivie par Western blot. Le profil d'expression de la protéine est similaire à celui obtenu pour son ARNm. Une augmentation rapide de la quantité de protéines est observée après 2 heures d'hypoxie, suivie de deux pics de surexpression protéique à 8 heures et 24 heures, avec 2 à 4 fois plus de protéines en hypoxie par rapport à la normoxie. Le parallélisme entre les courbes d'évolution de la quantité de l'ARNm et de la protéine au cours de l'hypoxie suggère plutôt une augmentation de la traduction *de novo* de la GRP94 plutôt qu'une stabilisation de la protéine GRP94 en hypoxie, même si celle-ci devrait être vérifiée à l'avenir. Un tel parallélisme est également observé entre les courbes d'évolution des quantités de l'ARNm de la PDI et de la protéine PDI au cours de l'hypoxie (Graven *et al.*, 2002).

Une étude en immunofluorescence montre également que GRP94 co-localise, aussi bien en normoxie qu'en hypoxie, avec la PDI (Protein Disulfide Isomerase), une protéine résidant dans le réticulum endoplasmique, et confirme ainsi la localisation de la GRP94 dans le réticulum endoplasmique. L'hypoxie n'entraîne donc pas de changement de localisation de la GRP94, suggérant que l'hypoxie n'a pas le même effet que les ionophores à calcium sur la localisation subcellulaire de la GRP94 (Booth et Koch, 1989). On n'observe pas de co-localisation de la GRP94 avec la GM130 (Golgi Matrix 130 kDa), une protéine spécifique du Golgi. La GRP94 n'est donc pas localisée dans l'appareil de Golgi dans les cellules endothéliales, contrairement à ce qui a été précédemment décrit dans les cellules de fibrome (Welch *et al.*, 1983).

L'augmentation de la quantité d'ARNm est vraisemblablement due à une augmentation de la transcription, comme cela a déjà été observé lorsque les cellules sont

soumises à d'autres stress. Par exemple, une expérience de « run on » met en évidence que l'accumulation de l'ARNm de la GRP94, dans les cellules K12 incubées en présence de β -mercaptoéthanol, est due à une transcription active du gène codant pour la GRP94 (Kim et Lee, 1987). Nous avons donc étudié le promoteur du gène *tra-1*, codant pour la GRP94 humaine.

L'analyse du promoteur de *tra-1* révèle la présence de trois éléments HRE (Hypoxia Responsive Element) au sein du promoteur proprement dit et d'un quatrième élément HRE au niveau du premier intron du gène *tra-1*. Ces éléments HRE sont des sites potentiels de liaison du facteur de transcription HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor-1). La présence de ces éléments HRE suggère donc que HIF-1 pourrait jouer un rôle dans la régulation transcriptionnelle du gène *tra-1* en hypoxie.

Avant d'étudier la fonctionnalité des éléments HRE du promoteur du gène *tra-1*, nous avons voulu vérifier si HIF-1 était bien activé dans nos conditions expérimentales. La stabilisation en hypoxie de la sous-unité HIF-1 α ainsi que son activité de liaison à l'ADN ont ainsi été étudiées dans les cellules endothéliales humaines. On peut ainsi observer, par Western blot, la présence de HIF-1 α en d'hypoxie et, en utilisant un test trans-AM, une activité importante de liaison à l'ADN de HIF-1. Notons cependant qu'il semble ne pas y avoir de parallélisme strict entre une quantité élevée de protéines en hypoxie et une activité importante de liaison à l'ADN. Par exemple, un niveau élevé de HIF-1 α à 1 heure d'hypoxie correspond à une activité de liaison à l'ADN moyenne au même temps d'incubation. Inversement, une faible quantité de HIF-1 α correspond à une activité importante de liaison à l'ADN après 16 heures d'incubation en hypoxie.

L'activité transcriptionnelle de HIF-1 en hypoxie a également été mise en évidence dans les cellules EAhy926. L'évolution de la quantité de l'ARNm de l'aldolase, un gène régulé par HIF-1 en hypoxie, peut être une indication de la manière dont HIF-1 régule la transcription de ses gènes cibles en hypoxie. Un certain parallélisme avec la cinétique d'évolution de la quantité de l'ARNm de la GRP94 est observé, même si les pics d'induction de l'ARNm de l'aldolase semblent légèrement décalés vers des temps d'incubation plus longs. Ce délai peut être expliqué en partie par les fonctions biologiques de la GRP94 et de l'aldolase. La GRP94 est une protéine de la famille des protéines de choc thermique (Heat Shock Proteins). Or, ces protéines sont rapidement activées en condition de stress afin d'exercer leur activité de chaperone. L'aldolase est une enzyme impliquée dans l'adaptation du métabolisme cellulaire à l'hypoxie, elle est donc requise dans un second temps.

Puisque nous avons montré que HIF-1 est bien activé dans les cellules EAhy926 incubées en hypoxie, nous avons ensuite étudié la fonctionnalité des sites HRE présents dans le promoteur du gène *tra-1*. Des expériences de compétition pour la liaison de HIF-1 au site HRE présent sur le trappeur fixé au fond des puits du Trans-AM avec chacun des sites HRE du promoteur de *tra-1* indiquent clairement que HIF-1 lie les trois séquences HRE présentes dans le promoteur proprement dit, alors qu'il ne se lie pas au site HRE présent au niveau du premier intron. L'utilisation de sondes mutées confirme la spécificité de la liaison de HIF-1. Ces résultats suggèrent que ces sites pourraient être actifs *in vivo*. Semenza *et al.* (1986) avaient déjà mis en évidence la liaison éventuelle de HIF-1 aux différents sites HRE du promoteur du gène de l'énolase par une expérience de compétition similaire en retard sur gel.

Afin d'étudier si HIF-1 augmente effectivement la transcription de *tra-1* en hypoxie et afin de déterminer via quel site HRE il agit, nous avons cloné son promoteur en amont du

gène rapporteur luciférase et réalisé des expériences de mutagenèse dirigée des séquences HRE présentes au sein du promoteur. Après transfection du promoteur de *tra-1* sauvage et mesure de son activité, il est apparu que le promoteur sauvage montre une activité transcriptionnelle importante en normoxie. En hypoxie, cette activité est 2 fois plus importante, confirmant ainsi les résultats observés par PCR en temps réel pour un même temps d'incubation en hypoxie (8 h). En normoxie, comme en hypoxie, l'activité du promoteur de *tra-1* muté au niveau des séquences HRE chute. Ces résultats montrent d'une part que les sites HRE sont nécessaires à la transcription du gène en normoxie et d'autre part, comme plus aucune induction n'est observée en hypoxie, que chacun de ces sites est nécessaire à cette induction. Ils suggèrent donc que la régulation du promoteur de *tra-1* est dépendante de HIF-1. De la même façon, Semenza *et al.* avaient mis en évidence, en 1986, l'activation de la transcription du gène de l'énolase par HIF-1 grâce à des expériences de transfection du promoteur sauvage et muté de l'énolase.

Cette étude nous éclaire sur le profil d'expression de la GRP94 dans les cellules endothéliales humaines et sur le rôle joué par le facteur de transcription HIF-1 dans la régulation transcriptionnelle de ce gène en hypoxie. Comme l'hypoxie est une des caractéristiques des tumeurs peu vascularisées et que la GRP94 possède vraisemblablement des propriétés anti-apoptotiques (Bando *et al.*, 2003), la surexpression de cette protéine pourrait protéger les cellules tumorales de la mort cellulaire en hypoxie. Des études complémentaires devraient être envisagées afin de mieux comprendre le rôle protecteur exact joué par cette protéine en hypoxie. Dans ce but, des études de l'effet de l'inhibition de la GRP94 grâce à l'utilisation de siRNA ou d'inhibiteurs et, inversement, de sa surexpression sur l'induction de l'apoptose et/ou de la nécrose cellulaire pourraient être envisagées.

La recherche de partenaires protéiques interagissant avec la GRP94 pourrait être également une perspective intéressante afin de mieux comprendre son mode d'action.

Bien que la liaison de HIF-1 à la séquence HRE2 du promoteur de *tra-1* a été mise en évidence au cours de ce mémoire, les expériences de mutagenèse dirigée et de transfection des versions mutées du promoteur au niveau du site HRE2 restent encore à réaliser.

Le facteur de transcription HIF-1 jouerait donc un rôle clé dans le développement tumoral par son action angiogénique via le contrôle de l'expression du VEGF mais également par son action de protection de la mort cellulaire via le contrôle de l'expression de la GRP94. HIF-1 s'avère donc bel et bien une cible appropriée de la thérapie anti-cancéreuse.

Bibliographie

Altmeyer, A., Maki, R. G., Feldweg, A. M., Heike, M., Protopopov, V. P., Masur, S. K. & Srivastava, P. K. Tumor-specific cell surface expression of the-KDEL containing, endoplasmic reticular heat shock protein gp96. *Int J Cancer* **69**, 340-349 (1996).

Bando, Y., Katayama, T., Kasai, K., Taniguchi, M., Tamatani, M. & Tohyama, M. GRP94 (94 kDa glucose-regulated protein) suppresses ischemic neuronal cell death against ischemia/reperfusion injury. *Eur J Neurosci* **18**, 829-840 (2003).

Barnes, J. A. & Smoak, I. W. Glucose-regulated protein 78 (GRP78) is elevated in embryonic mouse heart and induced following hypoglycemic stress. *Anat Embryol (Berl)* **202**, 67-74 (2000).

Beere, H. M., Wolf, B. B., Cain, K., Mosser, D. D., Mahboubi, A., Kuwana, T., Taylor, P., Morimoto, R. I., Cohen, G. M. & Green, D. R. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol* **2**, 469-475 (2000).

Bergers, G. & Benjamin, L. E. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* **3**, 401-410 (2003).

Binder, R. J., Han, D. K. & Srivastava, P. K. CD91: a receptor for heat shock protein gp96. *Nat Immunol* **1**, 151-155 (2000).

Booth, C. & Koch, G. L. Perturbation of cellular calcium induces secretion of luminal ER proteins. *Cell* **59**, 729-737 (1989).

Cai, J. W., Henderson, B. W., Shen, J. W. & Subjeck, J. R. Induction of glucose regulated proteins during growth of a murine tumor. *J Cell Physiol* **154**, 229-237 (1993).

Carmeliet, P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* **6**, 389-395 (2000).

Chapman, R., Sidrauski, C. & Walter, P. Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus. *Annu Rev Cell Dev Biol* **14**, 459-485 (1998).

Conroy, S. E. & Latchman, D. S. Do heat shock proteins have a role in breast cancer? *Br J Cancer* **74**, 717-721 (1996).

Conway, E. M., Collen, D. & Carmeliet, P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res* **49**, 507-521 (2001).

Ebert, B. L., Firth, J. D. & Ratcliffe, P. J. Hypoxia and mitochondrial inhibitors regulate expression of glucose transporter-1 via distinct Cis-acting sequences. *J Biol Chem* **270**, 29083-29089 (1995).

Edgell, C. J., McDonald, C. C. & Graham, J. B. Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 3734-3737 (1983).

Feldweg, A. M. & Srivastava, P. K. Molecular heterogeneity of tumor rejection antigen/heat shock protein GP96. *Int J Cancer* **63**, 310-314 (1995).

Folkman, J., Merler, E., Abernathy, C. & Williams, G. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J Exp Med* **133**, 275-288 (1971).

Fuller, K. J., Issels, R. D., Slosman, D. O., Guillet, J. G., Soussi, T. & Polla, B. S. Cancer and the heat shock response. *Eur J Cancer* **30A**, 1884-1891 (1994).

Gazit, G., Hung, G., Chen, X., Anderson, W. F. & Lee, A. S. Use of the glucose starvation-inducible glucose-regulated protein 78 promoter in suicide gene therapy of murine fibrosarcoma. *Cancer Res* **59**, 3100-3106 (1999).

Gerber, H. P., Condorelli, F., Park, J. & Ferrara, N. Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia. *J Biol Chem* **272**, 23659-23667 (1997).

Gothié, E. & Pouyssegur, J. HIF-1 : régulateur central de l'hypoxie. *MEDECINE/SCIENCES* **18**, 70-78 (2002).

Graven, K. K., Molvar, C., Roncarati, J. S., Klahn, B. D., Lowrey, S. & Farber, H. W.

- Identification of protein disulfide isomerase as an endothelial hypoxic stress protein. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **282**, L996-1003 (2002).
- Haverty, A. A., Harmey, J. H., Redmond, H. P. & Bouchier-Hayes, D. J. Interleukin-6 upregulates GP96 expression in breast cancer. *J Surg Res* **69**, 145-149 (1997).
- Hu, J., Discher, D. J., Bishopric, N. H. & Webster, K. A. Hypoxia regulates expression of the endothelin-1 gene through a proximal hypoxia-inducible factor-1 binding site on the antisense strand. *Biochem Biophys Res Commun* **245**, 894-899 (1998).
- Huang, L. E., Gu, J., Schau, M. & Bunn, H. F. Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 7987-7992 (1998).
- Jamora, C., Dennert, G. & Lee, A. S. Inhibition of tumor progression by suppression of stress protein GRP78/BiP induction in fibrosarcoma B/C10ME. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 7690-7694 (1996).
- Janetzki, S., Palla, D., Rosenhauer, V., Lochs, H., Lewis, J. J. & Srivastava, P. K. Immunization of cancer patients with autologous cancer-derived heat shock protein gp96 preparations: a pilot study. *Int J Cancer* **88**, 232-238 (2000).
- Jiang, B. H., Zheng, J. Z., Leung, S. W., Roe, R. & Semenza, G. L. Transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor 1alpha. Modulation of transcriptional activity by oxygen tension. *J Biol Chem* **272**, 19253-19260 (1997).
- Jolly, C. & Morimoto, R. I. Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. *J Natl Cancer Inst* **92**, 1564-1572 (2000).
- Kallio, P. J., Okamoto, K., O'Brien, S., Carrero, P., Makino, Y., Tanaka, H. & Poellinger, L. Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1alpha. *Embo J* **17**, 6573-6586 (1998).
- Kim, Y. K. & Lee, A. S. Transcriptional activation of the glucose-regulated protein genes and their heterologous fusion genes by beta-mercaptoethanol. *Mol Cell Biol* **7**, 2974-2976 (1987).
- Knighton, D. R., Hunt, T. K., Scheuenstuhl, H., Halliday, B. J., Werb, Z. & Banda, M. J. Oxygen tension regulates the expression of angiogenesis factor by macrophages. *Science* **221**, 1283-1285 (1983).
- Koong, A. C., Chen, E. Y., Lee, A. S., Brown, J. M. & Giaccia, A. J. Increased cytotoxicity of chronic hypoxic cells by molecular inhibition of GRP78 induction. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **28**, 661-666 (1994).
- Kourembanas, S., Hannan, R. L. & Faller, D. V. Oxygen tension regulates the expression of the platelet-derived growth factor-B chain gene in human endothelial cells. *J Clin Invest* **86**, 670-674 (1990).
- Lando, D., Peet, D. J., Whelan, D. A., Gorman, J. J. & Whitelaw, M. L. Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science* **295**, 858-861 (2002).
- Lee, A. S. The glucose-regulated proteins: stress induction and clinical applications. *Trends Biochem Sci* **26**, 504-510 (2001).
- Lee, P. J., Jiang, B. H., Chin, B. Y., Iyer, N. V., Alam, J., Semenza, G. L. & Choi, A. M. Hypoxia-inducible factor-1 mediates transcriptional activation of the heme oxygenase-1 gene in response to hypoxia. *J Biol Chem* **272**, 5375-5381 (1997).
- Li, W. W., Hsiung, Y., Wong, V., Galvin, K., Zhou, Y., Shi, Y. & Lee, A. S. Suppression of grp78 core promoter element-mediated stress induction by the dbpA and dbpB (YB-1) cold shock domain proteins. *Mol Cell Biol* **17**, 61-68 (1997).
- Li, Z. & Srivastava, P. K. Tumor rejection antigen gp96/grp94 is an ATPase: implications for protein folding and antigen presentation. *Embo J* **12**, 3143-3151 (1993).

Little, E., Ramakrishnan, M., Roy, B., Gazit, G. & Lee, A. S. The glucose-regulated proteins (GRP78 and GRP94): functions, gene regulation, and applications. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **4**, 1-18 (1994).

Little, E., Tocco, G., Baudry, M., Lee, A. S. & Schreiber, S. S. Induction of glucose-regulated protein (glucose-regulated protein 78/BiP and glucose-regulated protein 94) and heat shock protein 70 transcripts in the immature rat brain following status epilepticus. *Neuroscience* **75**, 209-219 (1996).

Maki, R. G., Old, L. J. & Srivastava, P. K. Human homologue of murine tumor rejection antigen gp96: 5'-regulatory and coding regions and relationship to stress-induced proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 5658-5662 (1990).

McCormick, T. S., McColl, K. S. & Distelhorst, C. W. Mouse lymphoma cells destined to undergo apoptosis in response to thapsigargin treatment fail to generate a calcium-mediated grp78/grp94 stress response. *J Biol Chem* **272**, 6087-6092 (1997).

Melillo, G., Musso, T., Sica, A., Taylor, L. S., Cox, G. W. & Varesio, L. A hypoxia-responsive element mediates a novel pathway of activation of the inducible nitric oxide synthase promoter. *J Exp Med* **182**, 1683-1693 (1995).

Melnick, J., Dul, J. L. & Argon, Y. Sequential interaction of the chaperones BiP and GRP94 with immunoglobulin chains in the endoplasmic reticulum. *Nature* **370**, 373-375 (1994).

Menoret, A., Meflah, K. & Le Pendu, J. Expression of the 100-kda glucose-regulated protein (GRP100/endoplasmic reticulum chaperone) is associated with tumorigenicity in a model of rat colon adenocarcinoma. *Int J Cancer* **56**, 400-405 (1994).

Minchenko, A., Salceda, S., Bauer, T. & Caro, J. Hypoxia regulatory elements of the human vascular endothelial growth factor gene. *Cell Mol Biol Res* **40**, 35-39 (1994).

Morimoto, R. I. Heat shock: the role of transient inducible responses in cell damage, transformation, and differentiation. *Cancer Cells* **3**, 295-301 (1991).

Morimoto, R. I. Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev* **12**, 3788-3796 (1998).

Mosser, D. D., Caron, A. W., Bourget, L., Denis-Larose, C. & Massie, B. Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* **17**, 5317-5327 (1997).

Mottet, D., Dumont, V., Deccache, Y., Demazy, C., Ninane, N., Raes, M. & Michiels, C. Regulation of hypoxia-inducible factor-1 α protein level during hypoxic conditions by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/glycogen synthase kinase 3 β pathway in HepG2 cells. *J Biol Chem* **278**, 31277-31285 (2003).

Mukhopadhyay, C. K., Mazumder, B. & Fox, P. L. Role of hypoxia-inducible factor-1 in transcriptional activation of ceruloplasmin by iron deficiency. *J Biol Chem* **275**, 21048-21054 (2000).

Outinen, P. A., Sood, S. K., Pfeifer, S. I., Pamidi, S., Podor, T. J., Li, J., Weitz, J. I. & Austin, R. C. Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress and growth arrest leads to specific changes in gene expression in human vascular endothelial cells. *Blood* **94**, 959-967 (1999).

Parker, R., Phan, T., Baumeister, P., Roy, B., Cheriya, V., Roy, A. L. & Lee, A. S. Identification of TFII-I as the endoplasmic reticulum stress response element binding factor ERSF: its autoregulation by stress and interaction with ATF6. *Mol Cell Biol* **21**, 3220-3233 (2001).

Plate, K. H., Breier, G., Weich, H. A. & Risau, W. Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo. *Nature* **359**, 845-848 (1992).

- Pugh, C. W. & Ratcliffe, P. J. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med* **9**, 677-684 (2003).
- Reddy, R. K., Lu, J. & Lee, A. S. The endoplasmic reticulum chaperone glycoprotein GRP94 with Ca(2+)-binding and antiapoptotic properties is a novel proteolytic target of calpain during etoposide-induced apoptosis. *J Biol Chem* **274**, 28476-28483 (1999).
- Ritossa, F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* **18**, 571-573 (1962).
- Rolfs, A., Kvietikova, I., Gassmann, M. & Wenger, R. H. Oxygen-regulated transferrin expression is mediated by hypoxia-inducible factor-1. *J Biol Chem* **272**, 20055-20062 (1997).
- Roy, B. & Lee, A. S. The mammalian endoplasmic reticulum stress response element consists of an evolutionarily conserved tripartite structure and interacts with a novel stress-inducible complex. *Nucleic Acids Res* **27**, 1437-1443 (1999).
- Santoro, M. G. Heat shock factors and the control of the stress response. *Biochem Pharmacol* **59**, 55-63 (2000).
- Schumann, W. Heat Shock Response. *Encyclopedia of life sciences*, 1-7 (2001).
- Semenza, G. L. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **3**, 721-732 (2003).
- Semenza, G. L., Jiang, B. H., Leung, S. W., Passantino, R., Concordet, J. P., Maire, P. & Giallongo, A. Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* **271**, 32529-32537 (1996).
- Semenza, G. L., Roth, P. H., Fang, H. M. & Wang, G. L. Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* **269**, 23757-23763 (1994).
- Semenza, G. L. & Wang, G. L. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* **12**, 5447-5454 (1992).
- Shiu, R. P., Pouyssegur, J. & Pastan, I. Glucose depletion accounts for the induction of two transformation-sensitive membrane proteins in Rous sarcoma virus-transformed chick embryo fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**, 3840-3844 (1977).
- Shweiki, D., Itin, A., Soffer, D. & Keshet, E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* **359**, 843-845 (1992).
- Srivastava, P. K., DeLeo, A. B. & Old, L. J. Tumor rejection antigens of chemically induced sarcomas of inbred mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**, 3407-3411 (1986).
- Srivastava, P. K. & Heike, M. Tumor-specific immunogenicity of stress-induced proteins: convergence of two evolutionary pathways of antigen presentation? *Semin Immunol* **3**, 57-64 (1991).
- Suto, R. & Srivastava, P. K. A mechanism for the specific immunogenicity of heat shock protein-chaperoned peptides. *Science* **269**, 1585-1588 (1995).
- Tacchini, L., Bianchi, L., Bernelli-Zazzera, A. & Cairo, G. Transferrin receptor induction by hypoxia. HIF-1-mediated transcriptional activation and cell-specific post-transcriptional regulation. *J Biol Chem* **274**, 24142-24146 (1999).
- Takemoto, H., Yoshimori, T., Yamamoto, A., Miyata, Y., Yahara, I., Inoue, K. & Tashiro, Y. Heavy chain binding protein (BiP/GRP78) and endoplasmic reticulum chaperone are exported from the endoplasmic reticulum in rat exocrine pancreatic cells, similar to protein disulfide-isomerase. *Arch Biochem Biophys* **296**, 129-136 (1992).
- Vitadello, M., Penzo, D., Petronilli, V., Michieli, G., Gomirato, S., Menabo, R., Di Lisa, F. & Gorza, L. Overexpression of the stress protein Grp94 reduces cardiomyocyte necrosis due to calcium overload and simulated ischemia. *Faseb J* **17**, 923-925 (2003).
- Wang, G. L., Jiang, B. H., Rue, E. A. & Semenza, G. L. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci*

USA **92**, 5510-5514 (1995).

Wang, G. L. & Semenza, G. L. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* **270**, 1230-1237 (1995).

Wei, Y. Q., Zhao, X., Kariya, Y., Teshigawara, K. & Uchida, A. Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by abrogation of heat-shock protein (HSP) 70 expression in tumor cells. *Cancer Immunol Immunother* **40**, 73-78 (1995).

Welch, W. J., Garrels, J. I., Thomas, G. P., Lin, J. J. & Feramisco, J. R. Biochemical characterization of the mammalian stress proteins and identification of two stress proteins as glucose- and Ca²⁺-ionophore-regulated proteins. *J Biol Chem* **258**, 7102-7111 (1983).

Wenger, R. H. Mammalian oxygen sensing, signalling and gene regulation. *J Exp Biol* **203 Pt 8**, 1253-1263 (2000).

Wu, C. Heat shock transcription factors: structure and regulation. *Annu Rev Cell Dev Biol* **11**, 441-469 (1995).

Yoshida, H., Haze, K., Yanagi, H., Yura, T. & Mori, K. Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors. *J Biol Chem* **273**, 33741-33749 (1998).

Yoshida, H., Okada, T., Haze, K., Yanagi, H., Yura, T., Negishi, M. & Mori, K. Endoplasmic reticulum stress-induced formation of transcription factor complex ERSF including NF-Y (CBF) and activating transcription factors 6alpha and 6beta that activates the mammalian unfolded protein response. *Mol Cell Biol* **21**, 1239-1248 (2001).

16 JUN 2004

SECRETARIAT BIOLOGIE
F.U.N.D.P.
Rue de Bruxelles, 50
B 5000 NAMUR (Belgium)
Tél. 091/72 44 18 - Fax 081/72 44 20