

UNIVERSITE de NICE-SOPHIA-ANTIPOLIS-UFR SCIENCES

Ecole Doctorale : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

THESE

Présentée pour obtenir le titre de

Docteur en SCIENCES
de l'Université de Nice-Sophia-Antipolis

Spécialité : Biologie Moléculaire

par

Emmanuel GOTHIE

Etude de la voie de signalisation du « *Hypoxia Inducible Factor-1* » (HIF-1) menant à l'induction du « *Vascular Endothelial Growth Factor* » (VEGF) impliqué dans le phénomène de néovascularisation tumorale

Soutenue publiquement le 13 Juillet 2001 devant le Jury composé de :

Dr. Jacques Pouysségur

Pr. Carl Séguin

Dr. Denis Guédin

Dr. Gilles Pagès (Directeur de Thèse)

Dr. Jean-Michel Arrang

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

A 15 h au Centre de Biochimie, Parc Valrose, NICE

UNIVERSITE de NICE-SOPHIA-ANTIPOLIS-UFR SCIENCES

Ecole Doctorale : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

THESE

Présentée pour obtenir le titre de

**Docteur en SCIENCES
de l'Université de Nice-Sophia-Antipolis**

Spécialité : Biologie Moléculaire

par

Emmanuel GOTHIE

Etude de la voie de signalisation du « *Hypoxia Inducible Factor-1* » (HIF-1) menant à l'induction du « *Vascular Endothelial Growth Factor* » (VEGF) impliqué dans le phénomène de néovascularisation tumorale

Soutenue publiquement le 13 Juillet 2001 devant le Jury composé de :

Dr. Jacques Pouysségur

Pr. Carl Séguin

Dr. Denis Guédin

Dr. Gilles Pagès (Directeur de Thèse)

Dr. Jean-Michel Arrang

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

A 15 h au Centre de Biochimie, Parc Valrose, NICE



A Ma Femme Priscille

Remerciements

Merci **Jacques** de m'avoir accueilli au Laboratoire et d'avoir encadré avec Gilles ce projet de Thèse. Merci pour les conditions exceptionnelles de travail offertes, tes grandes qualités humaines ainsi que ta disponibilité et tes conseils avisés.

Merci **Gilles** pour ton encadrement de qualité qui m'a permis de me plonger dans la biologie moléculaire. Ta disponibilité, tes connaissances et tes qualités pédagogiques, mais aussi ta bonne humeur et tes blagues ont été autant d'atouts dans l'élaboration de ce cadre de travail idéal.

Merci à tous les autres membres de l'«équipe HIF», celle de la première heure : **Darren** (j'espère que tout ce passe bien là bas au pays des Caribous que tu as rejoint après ton Post Doc !), **Edurne** et **Danièle**. Merci pour tous vos conseils et bonne chance pour la suite...

Bonne chance aussi aux nouveaux membres ayant rejoint le groupe plus récemment. Merci en particulier à **Christiane** et **David** pour la relecture des derniers articles scientifiques ou de ce manuscrit et leurs suggestions.

Merci à tous les autres membres du Laboratoire qui, par leurs aides diverses, leurs conseils et leur bonne humeur, ont contribué à la bonne réalisation de ce travail. Un grand Merci en particulier à **Dominique** pour la myriade de cellules que tu nous as préparé tout au long de ces années et pour tes conseils sur la culture de cellules ! Merci aussi à **Martine**, **Agnès** et **Carole** pour vos contributions dans les diverses démarches administratives et les commandes variées...

Je remercie également les personnes du Centre de Biochimie avec lesquels j'ai eu des contacts privilégiés et en particulier **Yan** (merci pour les échanges en informatique que nous avons pu avoir), **Bernard** (merci pour les diapositives que tu nous as développé pour nos séminaires et congrès divers).

Enfin mes remerciements s'adressent à Messieurs **Carl Séguin**, **Denis Guédin** et **Jean-Michel Arrang** qui me font l'honneur d'accepter de juger ce travail.

Je remercie également le **CNRS** et **Roussel-Uclaf** ainsi que l'Association pour la Recherche contre le Cancer (**ARC**) pour les financements octroyés pour ce projet de Thèse.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	1
LISTE DES FIGURES.....	5
LISTE DES ABREVIATIONS.....	6
INTRODUCTION	9
I. LE DOMAINE PAS : UNE STRUCTURE CLEF DANS LA FONCTIONNALITÉ DES MEMBRES DE LA SUPERFAMILLE DES PROTÉINES A DOMAINE BHLH/PAS	11
A. LES DOMAINES PAS	11
1. Définition du domaine PAS.....	11
2. Structure du domaine PAS.....	13
3. Détection de différents stimuli par le domaine PAS.....	14
B. LA SUPERFAMILLE DES PROTEINES A DOMAINE BHLH/PAS	16
1. Introduction.....	16
2. AHR : Le récepteur des hydrocarbures aromatiques	17
2. 1. Historique.....	17
2. 2. Clonage du récepteur AHR	17
2. 3. SS : L'homologue de AHR chez la Drosophile contrôle le développement des antennes et des tarsi.....	19
2. 4. Structure du récepteur AHR	19
2. 5. Localisation tissulaire de AHR.....	20
2. 6. Modèle pour la signalisation	20
3. ARNT : Translocateur nucléaire du récepteur AHR	24
3. 1. Historique.....	24
3. 2. ARNT : gène et isoformes.....	24
3. 3. Structure des ARNTs	25
3. 4. Localisation tissulaire de ARNT	26
3. 5. Fonctions de ARNT	27
3. 6. TGO : L'homologue de ARNT chez la Drosophile.....	28
3. 7. Eléments de réponse reconnus par le dimère AHR/ARNT	28
4. SIM : Le régulateur de la neurogenèse	30
4. 1. dSIM	30
4. 2. Homologues de dSIM	30
5. TRH : Développement du système trachéal	32
5. 1. Le système trachéal	32
5. 2. Le gène thr et son produit THR.....	32
6. Les régulateur des rythmes circadiens (PER/TIM, JRK/CYC).....	33
6. 1. Le rythme circadien.....	33
6. 2. PER/TIM.....	35

6. 2. 1.	Premiers éléments découverts.....	35
6. 2. 2.	Homologues de per.....	35
6. 3.	JRK/CYC.....	36
6. 3. 1.	Le couple JRK/CYC.....	36
6. 3. 2.	Homologues de jrk et cyc.....	36
7.	<i>NPAS1 et NPAS2 : Protéines du Systeme Nerveux Central</i>	37
7. 1.	Structure.....	37
7. 2.	Expression tissulaire.....	38
7. 3.	Fonctions.....	38
II.	LE FACTEUR INDUIT PAR L'HYPOXIE - 1 (HIF-1).....	39
A.	HISTORIQUE.....	39
1.	<i>L' Erythropoïétine</i>	39
2.	<i>Determination de HRE</i>	40
3.	<i>Déterminations des Séquences codantes pour HIF-1</i>	41
4.	<i>Structure du HIF-1</i>	42
5.	<i>Isoformes de HIF-1α</i>	44
5. 1.	HIF-2 α	44
5. 2.	HIF-3 α	46
6.	<i>Localisation tissulaire de HIF-1α</i>	47
7.	<i>Rôles de HIF-1</i>	48
7. 1.	Implication de HIF-1 dans l'embryogenèse et la physiopathologie : les leçons des KO.....	48
7. 1. 1.	HIF-1 et angiogenèse.....	48
7. 1. 2.	HIF-1 et gènes induits par l'hypoxie.....	49
7. 1. 3.	HIF-1 et développement tumoral.....	50
7. 1. 4.	Autres liens entre HIF-1 et le développement tumoral.....	52
7. 1. 5.	HIF-1 et apoptose : un lien controversé.....	53
7. 2.	HIF-1, régulateur central de l'expression de gènes sous hypoxie.....	55
7. 3.	Autres cibles potentielles des isoformes HIF- α et ARNTs.....	57
B.	MECANISME D'ACTION DE HIF-1 (REGULATION DE HIF-1).....	57
1.	<i>Dégradation du HIF-1α par le protéasome : niveau principal de régulation</i>	59
1. 1.	pVHL.....	59
1. 2.	Autres éléments du complexe impliqués dans la dégradation.....	62
2.	<i>Autres niveaux de régulation</i>	64
2. 1.	Translocation nucléaire, fixation à l'ADN et transactivation.....	64
2. 2.	Cofacteurs.....	64
2. 2. 1.	HSP90.....	65
2. 2. 2.	p300/CBP.....	66
2. 2. 3.	SRC-1, TIF2 et REF-1.....	69
2. 2. 4.	p53.....	72
2. 3.	Modifications post-traductionnelles (phosphorylation) de HIF-1 α	73
2. 4.	Protéines apparentées et isoformes issues d'épissage alternatifs.....	75
3.	<i>Induction non hypoxique de HIF-1</i>	76

C.	LE DETECTEUR D'OXYGENE CELLULAIRE : HIF-PH	77
D.	AUTRES CANDIDATS DANS LA DETECTION DE L'OXYGENE ET MECANISMES MIS EN ŒUVRES	79
1.	<i>Détecteurs potentiels</i>	80
1. 1.	Le Complexe Cytochrome b558/NADPH oxydase	80
1. 2.	Oxydoréductases à Flavoprotéine	80
1. 3.	Les Cytochromes de la mitochondrie	81
1. 4.	Autres possibilités de détecteurs	82
2.	<i>Les ROS : Second messagers de l'hypoxie ?</i>	82
E.	PERSPECTIVES DANS LA VOIE DE DETECTION DE L'OXYGENE.....	84
III.	RESULTATS	86
A.	PUBLICATION 1 - IDENTIFICATION D'ISOFORMES RESULTANT D'EPISSAGES ALTERNATIFS DU HIF-1 α HUMAIN	86
1.	<i>Contexte</i>	86
2.	<i>Résumé de l'article</i>	86
B.	PUBLICATION 2 - CONSTRUCTION ET CARACTERISATION D'UN VECTEUR CYTOSTATIQUE DEPENDANT DE L'HYPOXIE DEVELOPPE POUR L'ETUDE DE LA VOIE DE SIGNALISATION DU HIF-1 α	90
1.	<i>Contexte</i>	90
2.	<i>Le Modèle</i>	90
3.	<i>Résumé de l'article</i>	92
3. 1.	Première et seconde génération de vecteurs	92
3. 1. 1.	Test des constructions par transfection transitoire	93
3. 1. 2.	Test des constructions par transfection stable.....	93
3. 2.	Troisième génération de vecteurs.....	95
3. 3.	Etude de l'activité biologique des différentes constructions.....	95
IV.	DISCUSSION FINALE ET PERSPECTIVES	98
A.	ISOFORMES DE LA FAMILLE BHLH/PAS	98
1.	<i>Epissages alternatifs : un système important dans l'élaboration de multiples effecteurs.</i>	99
2.	<i>Isoforme HIF-1α⁷³⁶ : un exemple d'isorme modifiée par perte d'un domaine fonctionnel</i>	100
B.	LA VOIE DE SIGNALISATION DE HIF-1	102
1.	<i>Etude Générale</i>	102
2.	<i>Recherche de l'hydroxylase à Proline</i>	106
3.	<i>Première approche - Enzymatique</i>	106
4.	<i>Deuxième approche - Biochimique</i>	107
5.	<i>Troisième approche – Génétique</i>	107
C.	DE L'IMPORTANCE DES OUTILS MOLECULAIRES DANS LA THERAPIE GENIQUE	108
1.	<i>La distribution ciblée</i>	109
2.	<i>L'expression ciblée</i>	109
2. 1.	Expression tissulaire ciblée	110
2. 2.	Expression ciblée pour une maladie	110
2. 3.	Expression ciblée conditionnelle.....	110

CONCLUSION GENERALE.....	112
ANNEXES.....	113
BASE DE DONNEES - Protéines à domaine bHLH/PAS	
PUBLICATION 3 - HIF-1 : régulateur central de l'hypoxie	
PUBLICATION 4 - HIF-1-dependent transcriptional activity is required for oxygen-mediated HIF-1α degradation	
PUBLICATION 5 - Signaling Angiogenesis via p42/p44 MAP Kinase and Hypoxia	
PUBLICATION 6 - p42/p44 Mitogen-activated Protein Kinases Phosphorylate Hypoxia-inducible Factor 1α (HIF-1α) and Enhance the Transcriptional Activity of HIF-1	
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	114
RESUMES.....	138

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Définition du domaine PAS	12
Figure 2 : Conformation tridimensionnelle proposée pour le domaine PAS d'après la structure de PYP .	13
Figure 3 : Le Domaine PAS dans le système Fixl/FixJ et dans le photorécepteur PYP	15
Figure 4 : Arbre phylogénique du récepteur AHR.....	18
Figure 5 : Localisation des signaux NLS et NES d'AHR	20
Figure 6 : Structure des protéines de la superfamille bHHL/PAS	21
Figure 7 : Modèle de signalisation de AHR/ARNT	23
Figure 8 : Localisation du NLS d'ARNT.....	25
Figure 9 : Classement des protéines à domaine bHLH	29
Figure 10 : Modèle général pour une horloge circadienne	34
Figure 11 : Structure de l'« <i>enhancer</i> » de l'Erythropoïétine répondant à l'hypoxie.	41
Figure 12 : Détails des structures des sous-unités humaine du HIF-1	44
Figure 13 : Régulation de l'activité de HIF-1.....	58
Figure 14 : Le complexe pVHL/élongine B et C/Cul-2	61
Figure 15 : Boucle de régulation de HIF-1	63
Figure 16 : Structure de CBP (p300) et sites de fixation de partenaires protéiques.....	70
Figure 17 : Modèle de mécanismes de détection de l'oxygène	79
Figure 18 : Clonage des isoformes du HIF-1 α Humain.	87
Figure 19 : Prédiction de structure des isoformes du HIF-1 α	88
Figure 20 : Schéma représentant la technique prévue pour l'isolation de mutants de la voie de signalisation de HIF-1 dans le cas du gène statique MKP3.....	91
Figure 21 : Schéma représentant les trois générations de constructions réalisées.....	92
Figure 22 : Cellules S19-R443.....	94
Figure 23 : les 38 016 possibilités de DSCAM	100
Figure 24 : Dernière approche développée au laboratoire pour l'isolement de mutants de la voie de réponse à l'hypoxie.	104
Figure 25 : Schéma d'une tumeur entourant un capillaire.....	111

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique
ADNc : ADN complémentaire
AHR : *Aryl Hydrocarbon Receptor* - Aussi appelé DR
AMPc : Adénosine Mono Phosphate cyclique
ARN : Acide ribonucléique
ARNm : ARN messenger
ARNpm : ARN pré-messenger
ARNT : *Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator*
ATP : Adénosine TriPhosphate
bHLH : *basic Helix-Loop-Helix*
BMAL1 : *Brain and Muscle Arnt-Like protein 1* - Aussi nommé ARNT3, MOP3, JAP3, CYC
CAD : Domaine de transactivation carboxy terminal - Aussi nommé C-TAD
CBP : *cAMP-Response Element-Binding protein (CREB)-Binding Protein*
C/H1 : domaine *Cysteine /Histidine-rich region* de p300/CBP
CREB : *cAMP-Response Element-Binding protein*
CLK : *Clock* - Aussi nommée JRK
CO : Monoxyde de Carbone
CYC : *Cycle* - Aussi nommé ARNT3, MOP3, JAP3, BMAL1
DFO : Desferrioxamine
DGK : Diacylglycérol Kinase
DPI : Diphenylène iodonium
DR : *Dioxin Receptor* - Aussi appelé AHR
DRE : *Dioxin Response Element* - Aussi appelé XRE ou AHRE (*Aryl Hydrocarbon Response Element*)
EGF : *Epidermal Growth factor*
EPAS1 : *Endothelial PAS domain protéin 1*- Aussi nommé HIF-2 α , MOP2, HRF, HLF
EPO : Erythropiétine
ES : *Embryonic Stem cells*
EST : *Expressed Sequence Tag*
FGF : *Fibroblast Growth Factor*
GMPc : Guanosine Mono Phosphate cyclique
GST : *Glutathione-S-Transferease*
HSP90 : *Heat Shock Protein 90*
HIF-1 : *Hypoxia Inducible Factor-1*
HIF-PH : *HIF- α Prolyl-Hydroxylase*.
HIF-2 α : *Hypoxia Inducible Factor-2 α* - Aussi nommé EPAS1, MOP2, HLF, HRF
HNF4 : *Hepatic Nuclear Factor 4*
HLF : *HIF-1 α Like Factor* - Aussi nommé HIF-2 α , EPAS1, MOP2, HRF

HPTF : *HIF-1 α proteasome targeting factor*

HRE : *Hypoxia Response Element*

HRF : *HIF-Related Factor* - Aussi nommé HIF-2 α , EPAS1, MOP2, HLF

HSV : *Herpes Simplex Virus*

JAP3 : Autre nom donné à ARNT3

JRK : Autre nom donné au facteur dCLK

KO : *Knock-Out*

MAPK : *Mitogen-Activated Protein Kinase*

MEK : *MAPK/ERK kinase (MAPK Kinase)*

MEKK : *MEK kinase (MAPK Kinase Kinase)*

MKP : *MAP Kinase Phosphatase*

MOP : *Member Of PAS superfamily*

MSG1 : *Melanocyte-Specific Gene 1*

MRG1 : *Melanocyte-Related Gene 1*

NAD : Domaine de transactivation amino terminal - Aussi nommé N-TAD

NES : *Nuclear Export Signal*

NLS : *Nuclear Localization Signal*

NO : Monoxyde d'Azote

NPAS1 : *Neuronal PAS domain protein 1*

NPAS2 : *Neuronal PAS domain protein 2*

ODD : *Oxygen-dependent Degradation Domain*

p35srj : *p35 serine-glycine rich junction*

PAS : Sigle issu des noms des protéines dans lesquelles des séquences répétées imparfaites ont été découvertes initialement : PER, ARNT et SIM

PCR : *Polymerase Chain Reaction*

PDGF : *Platelet-derived Growth Factor*

PER : *Period Clock*

PKC : *Protein Kinase C*

PI3K : *Phosphatidylinositol 3-Kinase*

PTEN : *Phosphatase and TENsin homolog deleted on chromosome TEN*

PYP : *Photoactive Yellow Protéine*

pVHL : Protéine du syndrome de Von Hippel-Lindau

Ref-1 : *Reducing factor-1*

ROS : *Reactive Oxygene Species*

RT-PCR : *Reverse Transcriptase-PCR*

SIM : *Single-minded*

SIMA : *Similar*

SNC : *Système Nerveux Central*

SRC-1 : *Steroid-Receptor Co-activator-1*

SS : *Spineless*

TAD : Domaine de transactivation

TGO : *Tango* - Aussi nommé dARNT

THR : *Trachealess*

TIF2 : *Transcription Intermediary Factor 2* -Aussi nommé GRIP1

TIM : *Timeless*

VEGF : *Vascular Endothelial Growth Factor*

VHL : Von Hippel-Lindau

V-src : Oncogène du virus du sarcome de Rous

XAP2 : *hepatitis B virus X-associated protein 2*

XRE : *Xenobiotic Response Element* - Aussi appelé DRE ou AHRE (*Aryl Hydrocarbon Response Element*)

INTRODUCTION

L'Homme, comme la plupart des espèces animales, présente une dépendance totale vis-à-vis de l'oxygène (dioxygène) pour sa survie. Sans un apport adéquat en oxygène, l'organisme est donc condamné à mourir extrêmement rapidement. Durant l'embryogenèse, les organismes supérieurs développent des systèmes respiratoire et circulatoire complexes pour assurer la disponibilité de l'oxygène à toutes les cellules de l'organisme. Une diminution en oxygène (hypoxie) va donc entraîner une réponse physiologique générale de l'organisme pour compenser ce manque. Ainsi, chez l'animal, une réponse rapide a lieu suite à la détection du taux d'oxygène sanguin au niveau de structures spécialisées situées dans la crosse aortique : les barorécepteurs. Un signal dopaminergique est envoyé au cerveau qui va à son tour émettre des signaux augmentant la respiration et le rythme cardiaque. Il en résulte une augmentation de la pression sanguine et de la saturation en oxygène nécessaire au métabolisme tissulaire. Dans le cas d'une période prolongée en condition d'hypoxie (exemple de personnes effectuant un séjour en altitude), des modifications telles qu'une augmentation du métabolisme anaérobie - ou glycolyse (avec pour conséquence la sécrétion d'acide lactique dans les muscles) - et du taux de globules rouges sanguins, permettent de compenser le manque d'oxygène et de fournir une énergie suffisante aux processus cellulaires (Goldberg and Schneider, 1994; Guillemin and Krasnow, 1997; Jiang *et al.*, 1996; Semenza, 1998).

Ces réponses de l'organisme sont bien connues sur le plan physiologique, mais aussi sur le plan moléculaire grâce aux efforts de nombreuses équipes de recherche notamment durant les deux dernières décennies. L'objectif des deux premières parties de ce manuscrit est de faire le point sur ce qui est connu sur le régulateur clef de cette réponse cellulaire à l'hypoxie, le Facteur Induit par l'Hypoxie - 1 (*HIF-1 pour Hypoxia Inducible Factor-1*). Un premier paragraphe consacré aux membres de la superfamille des protéines à domaines bHLH/PAS, dont les deux sous-unités de HIF-1 font partie, à pour but de replacer ce dernier parmi d'autres effecteurs clefs de nombreux processus biologiques. Le second paragraphe présente la totalité des informations connues sur le facteur HIF-1 ainsi que les perspectives de recherches futures pour décrypter la voie complexe de perception du taux d'oxygène intracellulaire.

Un troisième paragraphe est consacré aux résultats obtenus durant ce travail de thèse et matérialisés par deux articles scientifiques accompagnés d'un paragraphe resituant le contexte des études et d'un résumé détaillé.

Le dernier paragraphe est une discussion plus générale sur les questions soulevées lors de ce travail et les perspectives de recherches futures du laboratoire.

INTRODUCTION

I - LE DOMAINE PAS : UNE STRUCTURE CLEF DANS LA FONCTIONNALITÉ DES MEMBRES DE LA SUPERFAMILLE DES PROTÉINES A DOMAINE BHLH/PAS

II - LE FACTEUR INDUIT PAR L'HYPOXIE - 1 (HIF-1)

I. LE DOMAINE PAS : UNE STRUCTURE CLEF DANS LA FONCTIONNALITÉ DES MEMBRES DE LA SUPERFAMILLE DES PROTÉINES A DOMAINE BHLH/PAS

A. LES DOMAINES PAS

Les domaines PAS sont des modules protéiques clefs qui surveillent les modifications de luminosité, de potentiel redox, de teneur en oxygène, de ligand et d'énergie globale d'une cellule. Ils ont été identifiés dans les protéines des trois règnes vivants : Bactéries, Archæobactéries et Eucaryotes. Ces protéines peuvent être des kinases à histidine ou à sérine/thréonine, des chémorécepteurs et des photorécepteurs impliqués dans le tactisme et le tropisme, des protéines de cycle circadien, des canaux ioniques voltage-dépendants, des phosphodiesterases de nucléotides cycliques, ou encore des régulateurs de la réponse à l'hypoxie ou du développement du système nerveux central (Taylor and Zhulin, 1999). Les domaines PAS sont combinés avec une grande variété d'autres modules protéiques. Ainsi, de nombreuses réponses cellulaires aux changements environnementaux et intracellulaires sont contrôlées par des récepteurs, des transducteurs et des régulateurs contenant le domaine PAS.

1. DEFINITION DU DOMAINE PAS

Le sigle PAS est issu des noms des protéines dans lesquelles des séquences répétées imparfaites ont été découvertes initialement : la protéine de Drosophile *Period Clock* (PER), la protéine des Vertébrés *Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator* (ARNT) et la protéine de Drosophile *Single-minded* (SIM) (Nambu *et al.*, 1991). Chez les Eucaryotes, le domaine PAS a initialement été défini comme une région d'environ 270 acides aminés contenant deux domaines de 50 résidus conservés et répétés qui ont été nommés PAS-A et PAS-B (Crews *et al.*, 1988). Actuellement, le domaine PAS est défini par une région d'approximativement 100-120 acides aminés, les répétitions PAS-A et PAS-B correspondant aux parties amino terminales respectives des domaines PAS-1 et PAS-2 (Figure 1). Parmi les activateurs de la transcription de gènes eucaryotes, deux domaines PAS sont très souvent retrouvés, néanmoins des protéines microbiennes peuvent en contenir un seul, un double ou de multiple domaines PAS (jusqu'à six). La définition actuelle du domaine PAS est issue du

travail de nombreux laboratoires. Le premier motif identifié par Lararias *et al.* (Lagarias *et al.*, 1995), similaire à une répétition PAS était constitué de 40 résidus dont le repliement était similaire à l'extrémité amino terminale de la protéine PYP (*photoactive yellow protéine*) pour laquelle la structure cristallographique a été déterminée (Borgstahl *et al.*, 1995). Ce motif nommé Boite S1 est le bloc le plus conservé du domaine PAS. Le motif PAS a été étendu côté carboxy terminal par un domaine nommé boîte S2 (ou motif PAC). Plus de 200 protéines de différents organismes à travers l'arbre phylogénique contiennent ce domaine PAS complet. Un prototype de structure tridimensionnelle pour le domaine PAS a été proposé, basé sur trois domaines de protéines : les 125 résidus de PYP (Pellequer *et al.*, 1998), le domaine hémique de la kinase FixL (un détecteur d'oxygène régulateur de la fixation de l'azote) (Gong *et al.*, 1998) et le domaine amino terminal du canal potassique eucaryote HERG (pour *Human Ether-a-gogo Related Gene*) (Morais Cabral *et al.*, 1998).

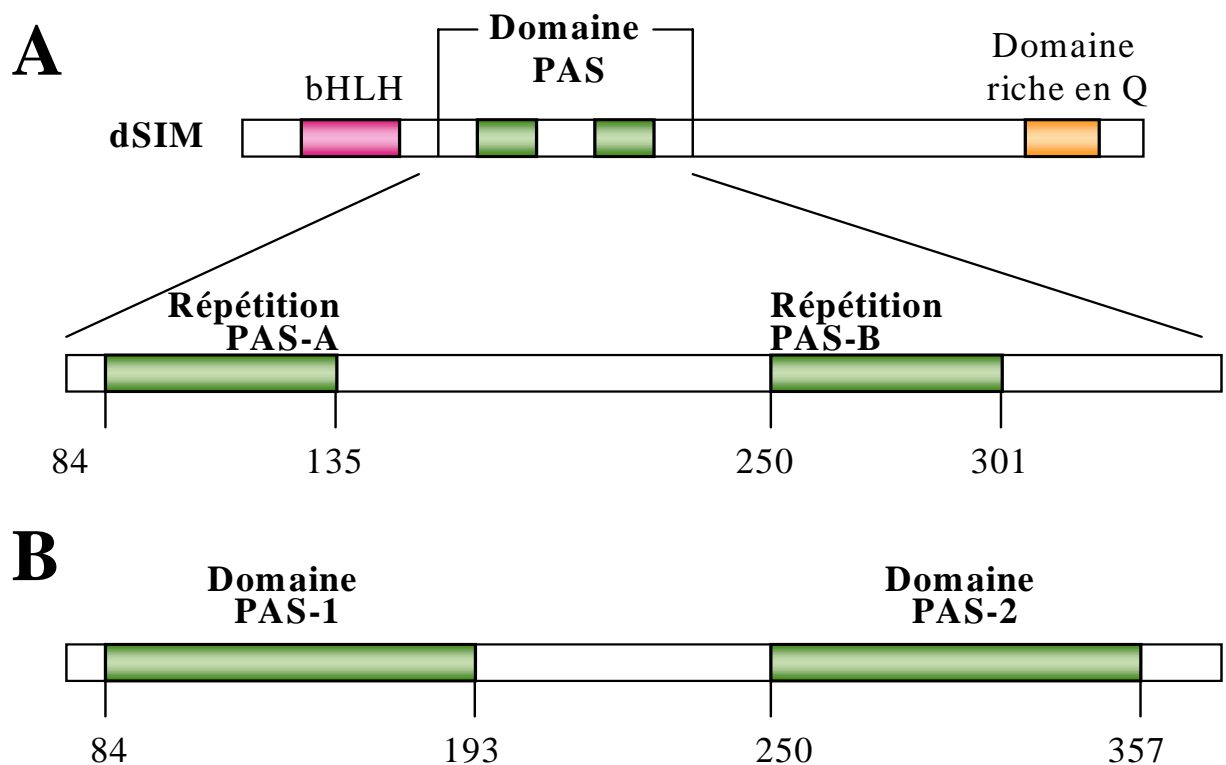


Figure 1 : Définition du domaine PAS

Comparaison des définitions initiale et actuelle des domaines PAS illustrée pour la protéine de *Drosophile* SIM.

A. Un domaine PAS contenant deux répétitions PAS décrit initialement.

B. Deux domaines PAS individuels identifiés dans la protéine SIM. Domaine riche en Q : Domaine d'activation riche en Glutamine. bHLH (*basic Helix-Loop-Helix*) : domaine basique hélice - boucle - hélice. D'après (Taylor and Zhulin, 1999).

2. STRUCTURE DU DOMAINE PAS

En démontrant qu'un domaine PAS typique issu de la protéine ARNT coïncide avec la structure cristallographique de PYP, Pellequer *et al.* (Pellequer *et al.*, 1998) ont donné le premier argument selon lequel PYP était le prototype pour le domaine PAS. La protéine PYP d'*Ectothiorhodospina halophina* est un récepteur bactérien de lumière bleue possédant une conformation non classique caractérisée par un feuillet β de six brins avec des brins β amino- et carboxy terminal (Borgstahl *et al.*, 1995) (Figure 2).

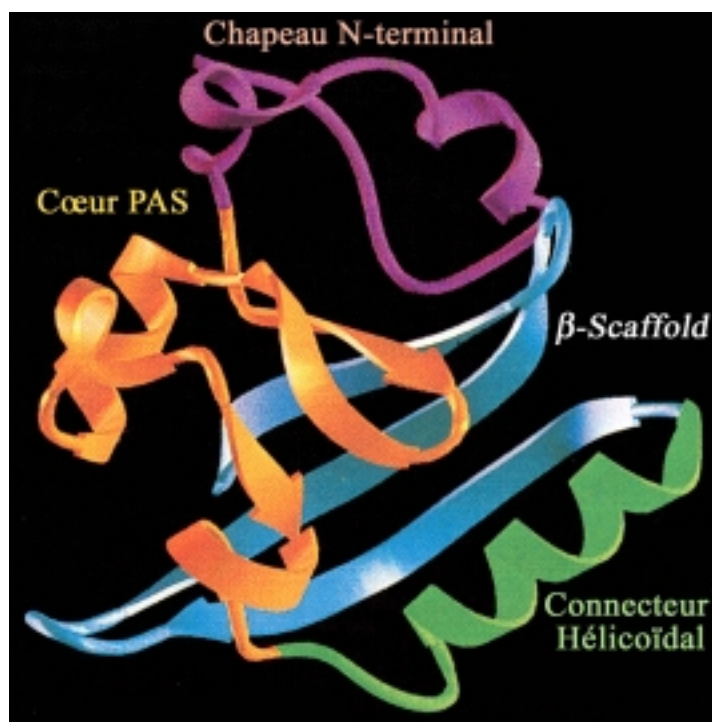


Figure 2 : Conformation tridimensionnelle proposée pour le domaine PAS d'après la structure de PYP

L'image présente le chapeau amino terminal (Violet - résidus 1 à 28), le cœur PAS (Orange - résidus 29 à 69), le connecteur hélicoïdal (Vert - résidus 70 à 89) et la structure « β -Scaffold » (voir texte - Bleu - résidus 88 à 125). D'après (Taylor and Zhulin, 1999).

Quatre segments ont été délimités dans le repliement global PAS de PYP : (1) le chapeau amino terminal ou « lasso » (résidus 1 à 28), incluant les hélices $\alpha 1$ et $\alpha 2$, (2) le cœur PAS avec les trois premiers brins β du feuillet β central (résidus 26 à 69) et les hélices $\alpha 3$ et $\alpha 4$, (3) le connecteur hélicoïdal (résidus 70-86) avec l'hélice $\alpha 5$ qui croise perpendiculairement le feuillet β et connecte deux bords des brins β , et (4) le « β -scaffold », composé de $\beta 4$, une boucle de connexion, et l'épingle à cheveux $\beta 5$ - $\beta 6$ qui forme la seconde moitié du feuillet β central. Dans la protéine PYP, il existe un cœur hydrophobe de chaque côté du feuillet β central. Le chapeau amino terminal contient un côté du feuillet β et forme la poche hydrophobe la plus petite. L'hélice restante et la boucle entourant l'autre côté du feuillet β central forment la poche hydrophobe la plus importante dans laquelle le chromophore 4-hydroxy-cinnamyl est enchâssé. Le cœur PAS correspond approximativement au motif PAS de 50 résidus initialement décrit (boîte S1). C'est le site actif photosensible de PYP. Le « β -scaffold » correspond approximativement au motif PAC (boîte S2). B.L.Taylor et I.B.Zhulin dans leur revue de juin 1999 (Taylor and Zhulin, 1999) ont réalisé un alignement de plus de 300 domaines PAS de plus de 200 protéines en respectant la similarité des domaines avec la structure tridimensionnelle prototype de PYP/FixL/HERG. Le chapeau amino terminal qui présente le plus de variabilité dans les segments de PAS n'a pas été conservé pour l'alignement. Une version continuellement mise à jour est maintenue sur la page web suivante : www.llu.edu/llu/medicine/micro/pas/. A part le chapeau amino-terminal, la partie la plus variable au sein de PAS est située entre le connecteur hélicoïdal et le début du β -scaffold. Cette zone apparaît comme étant une région régulatrice critique pour la famille des domaines PAS (Gong *et al.*, 1998).

3. DETECTION DE DIFFERENTS STIMULI PAR LE DOMAINE PAS

La capacité du domaine PAS à détecter différents stimuli (oxygène, lumière, ligand) se retrouve chez les Procaryotes les plus simples. Il est aussi postulé que différents domaines PAS dans une seule protéine doivent être capables de détecter différents stimuli. Le domaine PAS détermine aussi la spécificité de facteurs de transcription dans l'activation de gènes cibles (Zelzer *et al.*, 1997).

Un exemple dans lequel le domaine PAS est capable de détecter l'oxygène est la voie du système à 2 composants FixL/FixJ (Gilles-Gonzalez *et al.*, 1994; Monson *et al.*, 1995) où FixL est le détecteur d'oxygène. La dissociation de l'O₂ du domaine PAS de FixL modifie la

conformation de celui-ci, entraînant une augmentation de l'auto-phosphorylation du domaine transmetteur de FixL (Figure 3A). Il en résulte un transfert de phosphate entre les acides aminés His et Asp catalysé par FixL vers le module récepteur du régulateur FixJ. Ce dernier agit comme un activateur de la transcription de gènes impliqués dans la fixation de l'azote.

Un autre exemple de détection de stimuli est trouvé dans le cas la protéine PYP (Baca *et al.*, 1994). Il s'agit d'un domaine PAS isolé lié à un chromophore 4-hydroxy-cinnamyl (Figure 3B). La lumière bleue est directement capturée par le chromophore. Il s'en suit une rotation du groupe carbonyle, qui entraîne un réarrangement protéique. Le mouvement de l'Arg52 dans le cœur de PAS permet un accès du solvant au chromophore (Genick *et al.*, 1997; Genick *et al.*, 1998). Cette arginine a été proposée comme intervenant dans l'interaction de PYP avec une protéine transductrice en aval.

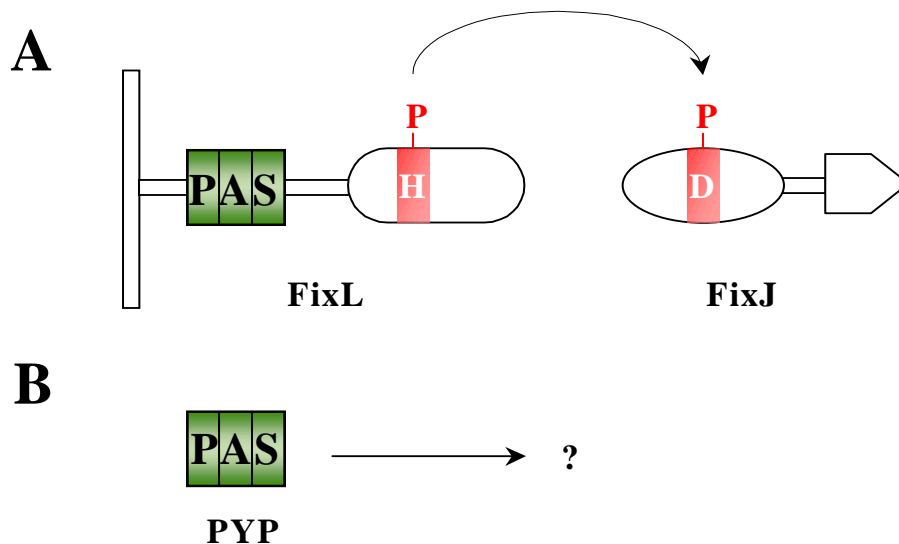


Figure 3 : Le Domaine PAS dans le système FixL/FixJ et dans le photorécepteur PYP

A. Modèle de signalisation FixL/FixJ.

B. PYP, un domaine PAS isolé. La protéine transductrice en aval est inconnue. D'après (Taylor and Zhulin, 1999).

L'interaction protéine-protéine transmet le signal par quelques protéines à domaine PAS, et ce dernier détermine la spécificité des interactions (Huang *et al.*, 1993). Bien qu'intervenant dans la formation d'homodimères (par exemple avec PER), PAS intervient surtout dans la formation d'hétérodimère (par exemple AHR/ARNT). Dans les protéines de la famille bHLH/PAS (cf. §I.B), le domaine bHLH (pour *basic Helix-Loop-Helix*) sert

d'interface pour l'hétérodimérisation, mais le domaine PAS augmente la stabilité et la spécificité de ces dimères (Pongratz *et al.*, 1998). De plus, la spécificité des « *enhancers* » de la transcription à domaine PAS dans la fixation des éléments de réponse est déterminée par la composition du dimère (Rowlands and Gustafsson, 1997).

La spécificité du domaine PAS dans la détection d'un signal est en partie déterminée par le cofacteur associé avec le domaine PAS. Les cofacteurs connus, le chromophore 4-hydroxy-cinnamyl vu précédemment, les hèmes incluant FAD (*Flavin Adenine Dinucleotide*), dans NifL (détecteur protéique impliqué dans la fixation de l'azote - *Nitrogen fixation factor L*) (Hill *et al.*, 1996) et Aer (pour *Aerotaxis*) (Bibikov *et al.*, 1997), et le centre proposé 2Fe-2S dans NifU (pour *Nitrogen fixation factor U*) (Fu *et al.*, 1994), sont localisés dans le domaine PAS. En fait, lorsque le site de fixation est connu, les cofacteurs se situent dans le cœur du domaine PAS, considéré comme le site actif de PAS. Avec très peu de modifications entre chaque protéine, les différents cofacteurs sont situés dans le cœur hydrophobe majeur du domaine PAS.

B. LA SUPERFAMILLE DES PROTEINES A DOMAINE bHLH/PAS

1. INTRODUCTION

La superfamille des protéines à domaine bHLH/PAS est définie par des protéines contenant en plus du domaine PAS détaillé précédemment, le domaine basique hélice-boucle-hélice rencontré dans de très nombreux facteurs de transcription intervenant dans une multitude de phénomènes biologiques tels que la myogenèse (MyoD/E47) (Neuhold and Wold, 1993), la neurogenèse (Achaete-scute/Daughterless) (Cabrera and Alonso, 1991), la régulation des gènes des immunoglobulines (TFEC/TFE3) (Zhao *et al.*, 1993), la prolifération cellulaire (Myc/Max) (Amati *et al.*, 1993). Des données biochimiques et cristallographiques ont suggéré que le domaine HLH agissait de concert avec une surface de dimérisation secondaire (par exemple les domaines « Leucine-Zipper », mais aussi les domaines PAS) favorisant le positionnement de la région basique sur la séquence d'ADN reconnue. Le domaine bHLH est constitué de 2 hélices α aux résidus conservés, séparées par une boucle dont la structure en acides aminées est plus variable (Littlewood and Evan, 1995). Cette structure est précédée d'un domaine riche en acides aminés basiques qui intervient dans la fixation et la spécificité de la liaison de la protéine à l'ADN (Murre *et al.*, 1989), tandis que le domaine HLH intervient dans la dimérisation des protéines. Comme il a été précisé

précédemment, le domaine PAS intervient aussi dans la formation des dimères en favorisant la stabilité de ces derniers, mais en jouant aussi sur la spécificité du complexe. Dans les facteurs présentés ci-dessous, il est situé à l'extrémité amino terminale, et fait directement suite au domaine bHLH. Les paragraphes qui suivent présentent de façon détaillée les facteurs les plus connus de cette famille chez les Eucaryotes, leurs structures, leurs rôles biologiques au sein de la cellule et leur régulation.

Notez que de par sa place importante dans cette étude, un paragraphe complet (§ II) est consacré au facteur de transcription impliqué dans la réponse à l'hypoxie HIF-1 α qui fait partie de cette superfamille.

2. AHR : LE RECEPTEUR DES HYDROCARBURES AROMATIQUES

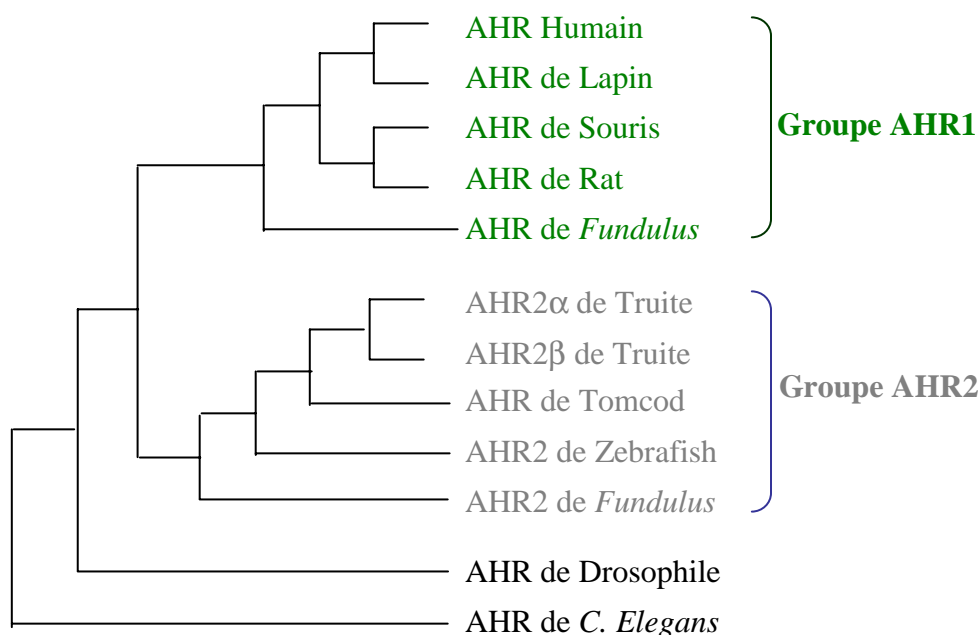
2. 1. Historique

La découverte de ce facteur est relativement ancienne. En effet, dès les années 1960, des observations montrent que certains carcinogènes tels que la dioxine (2,3,7,8 tétra-chloro-dibenzopara-dioxine ou TCDD) entraînent l'augmentation du métabolisme oxydatif de nombreux substrats, notamment via les cytochromes P450. Ces derniers sont des enzymes intervenant dans de nombreux métabolismes (acides gras, prostaglandines), mais participant aussi à la détoxification de molécules lipophiles telles que les hydrocarbures aromatiques. La dioxine, un hydrocarbure halogéné, est un contaminant de synthèse du 2,4,5 Trichlorophénol, un composant utilisé dans la fabrication des défoliants. Le métabolisme ainsi qu'une partie des effets toxiques des hydrocarbures aromatiques, passent par leur liaison au récepteur AHR (*Aryl Hydrocarbon Receptor*) aussi nommé DR (pour *Dioxin Receptor*). Ces molécules présentent différents effets toxiques tels qu'une perte de poids, l'atrophie du thymus, des lésions de la peau ainsi qu'une immunotoxicité et hépatotoxicité. Elles sont en outre carcinogènes et tératogènes (Poland and Knutson, 1982).

2. 2. Clonage du récepteur AHR

Le clonage de AHR a été rendu possible par une purification de la protéine à partir de foie de souris (Bradfield *et al.*, 1991), l'identification d'une courte séquence d'acides aminés côté amino-terminal, et le criblage d'une banque d'ADNc réalisée à partir d'ARNm de la lignée cellulaire d'hépatome de souris Hepal (Burbach *et al.*, 1992; Ema *et al.*, 1992). Les ADNc d'Homme (Dolwick *et al.*, 1993), de Rat (Carver *et al.*, 1994), de Lapin (Takahashi *et*

al., 1996), du poisson de l'atlantique Tomcod (Roy and Wirgin, 1997), de Nématode *Caenorhabditis elegans* (Powell-Coffman *et al.*, 1998), de Truite (Abnet *et al.*, 1999), de Drosophile (Emmons *et al.*, 1999) et de Zebrafish (Tanguay *et al.*, 1999) ont été caractérisés par la suite (cf. Annexe 1). Alors, qu'un seul type de AHR a été jusqu'à maintenant mis en évidence chez les Mammifères, S. I. Karchner *et al.* (Hahn *et al.*, 1997; Karchner *et al.*, 1999) ont cloné récemment deux ADNc nommés FhAHR1 et FhAHR2 à partir d'un poisson téléostéen de l'Atlantique : *Fundulus heteroclitus*. Il semblerait que ces deux formes soient



issues d'une duplication de gène. Karchner *et al.* (Karchner *et al.*, 1999) ont réalisé une analyse phylogénique des protéines AHR chez les Vertébrés et leurs homologues chez les invertébrés permettant de les classer en deux grands groupes (Figure 4).

Figure 4 : Arbre phylogénique du récepteur AHR

La figure présente l'arbre phylogénique du récepteur AHR donnant un classement en 2 grands groupes AHR1 et AHR2. D'Après (Karchner *et al.*, 1999)

Les ADNc de AHR présentent une grande homologie de séquences entre les espèces, notamment au niveau de la séquence codant pour le domaine amino terminal (le domaine carboxy terminal étant plus variable). La localisation chromosomique des gènes AHR a été déterminée chez certaines espèces (chromosome 7 chez l'Homme (Ema *et al.*, 1994), chromosome 12 chez la Souris) de même que la structure génique (le gène *ahr* de la souris est constitué de 11 exons s'étendant sur plus de 30 Kb (Schmidt *et al.*, 1993). Il code pour une

protéine de 805 acides aminés d'un poids moléculaire de 90 kDa environ. Il existe chez la Souris un polymorphisme du récepteur AHR, retrouvé aussi chez le Rat (Poland and Glover, 1990; Poland *et al.*, 1987; Poland *et al.*, 1994), qui donne lieu à différentes isoformes de AHR (variation de la longueur en acides aminés).

2. 3. *SS : L'homologue de AHR chez la Drosophile contrôle le développement des antennes et des tarses*

Le gène *spineless* (ss) de *Drosophila* code pour une protéine qui est l'homologue connu le plus proche de *ahr*. Capable de s'hétérodimériser avec l'homologue de ARNT chez la *Drosophila*, il peut se fixer sur des éléments de réponses XRE (*Xenobiotic Response Element*) et activer un gène rapporteur. Ceci montre la grande similitude existant entre ces deux homologues au niveau de la capacité de fixer l'ADN et d'activer la transcription. Néanmoins, SS/dARNT intervient au niveau de la spécification de l'identité des antennes distales, l'établissement des régions tarsales des pattes, et la croissance normale des soies. Il semblerait que SS soit nécessaire à la localisation nucléaire de dARNT dans les sites d'expression de SS (via son hétérodimérisation). Par ailleurs, SS/ARNT ne semble pas avoir de dépendance envers un signal supplémentaire comme c'est le cas avec les hydrocarbures aromatiques dans le dimère AHR/ARNT. Malgré ces différences (rôle biologique, dépendance du ligand), les mécanismes moléculaires par lesquels ces protéines fonctionnent semblent bien conservés entre les Insectes et les Mammifères (Emmons *et al.*, 1999).

2. 4. *Structure du récepteur AHR*

AHR présente un domaine bHLH impliqué dans la fixation à l'ADN et l'hétérodimérisation, mais aussi dans la fixation de HSP90 (*Heat Shock Protein 90*), suivi de deux domaines PAS dans l'extrémité amino terminale (impliquée dans la régulation de la dimérisation et la spécificité de la liaison à l'ADN (Pongratz *et al.*, 1998). Le domaine de liaison du ligand est situé au niveau de la région PAS-B (Whitelaw *et al.*, 1993). Ce domaine PAS-B contient en outre un site de fixation à HSP90 (Coumailleau *et al.*, 1995) qui chevauche le domaine de fixation du ligand (Fukunaga *et al.*, 1995). AHR présente aussi un domaine transactivateur dans sa partie carboxy terminale avec des domaines riches en glutamine, en résidus acides, ou encore en résidus proline, sérine et/ou thréonine (P/S/T) capable d'activer individuellement ou de façon synergique la transcription (Jain *et al.*, 1994; Whitelaw *et al.*, 1994) (Figure 6). AHR contient un signal d'import (NLS pour *Nuclear Localization Signal*)

localisé exactement au niveau du domaine de fixation à l'ADN (acide aminés 13 à 39 et Figure 5). Il contient également un signal d'export nucléaire (NES pour *Nuclear Export Signal*) localisé dans l'hélice 2 du domaine bHLH entre les acide aminés 63 à 71 chez la Souris (Ikuta *et al.*, 1998) qui intervient dans dégradation de AHR (Figure 5 et Figure 6).

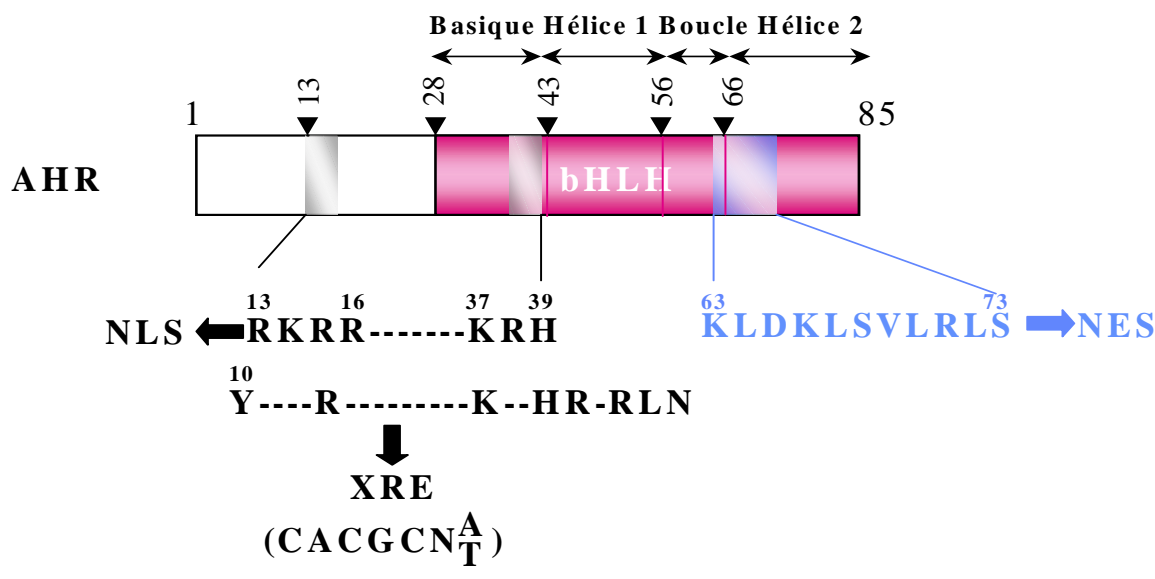


Figure 5 : Localisation des signaux NLS et NES d'AHR

Les acides aminés essentiels impliqués dans les domaines NES, NLS et de fixation aux XRE sont indiqués. D'après (Ikuta *et al.*, 1998).

2. 5. Localisation tissulaire de AHR

Les ARNm de AHR sont présents chez l'Homme et le Rat dans le placenta, le poumon, le foie et le rein, mais plus faiblement dans le cœur, la rate et les muscles squelettiques (Carver *et al.*, 1994; Dolwick *et al.*, 1993; Ema *et al.*, 1992). La protéine a été détectée dans le poumon, le foie, le rein, le thymus chez le Rat (Carlstedt-Duke, 1979).

2. 6. Modèle pour la signalisation

Le modèle pour la signalisation de la dioxine a subi de nombreuses modifications au fil des découvertes sur les cofacteurs intervenant dans cette voie. Il est actuellement proposé le modèle présenté sur la Figure 7 (description dans le le texte de la légende et un peu plus loin dans ce paragraphe) (Lees and Whitelaw, 1999).

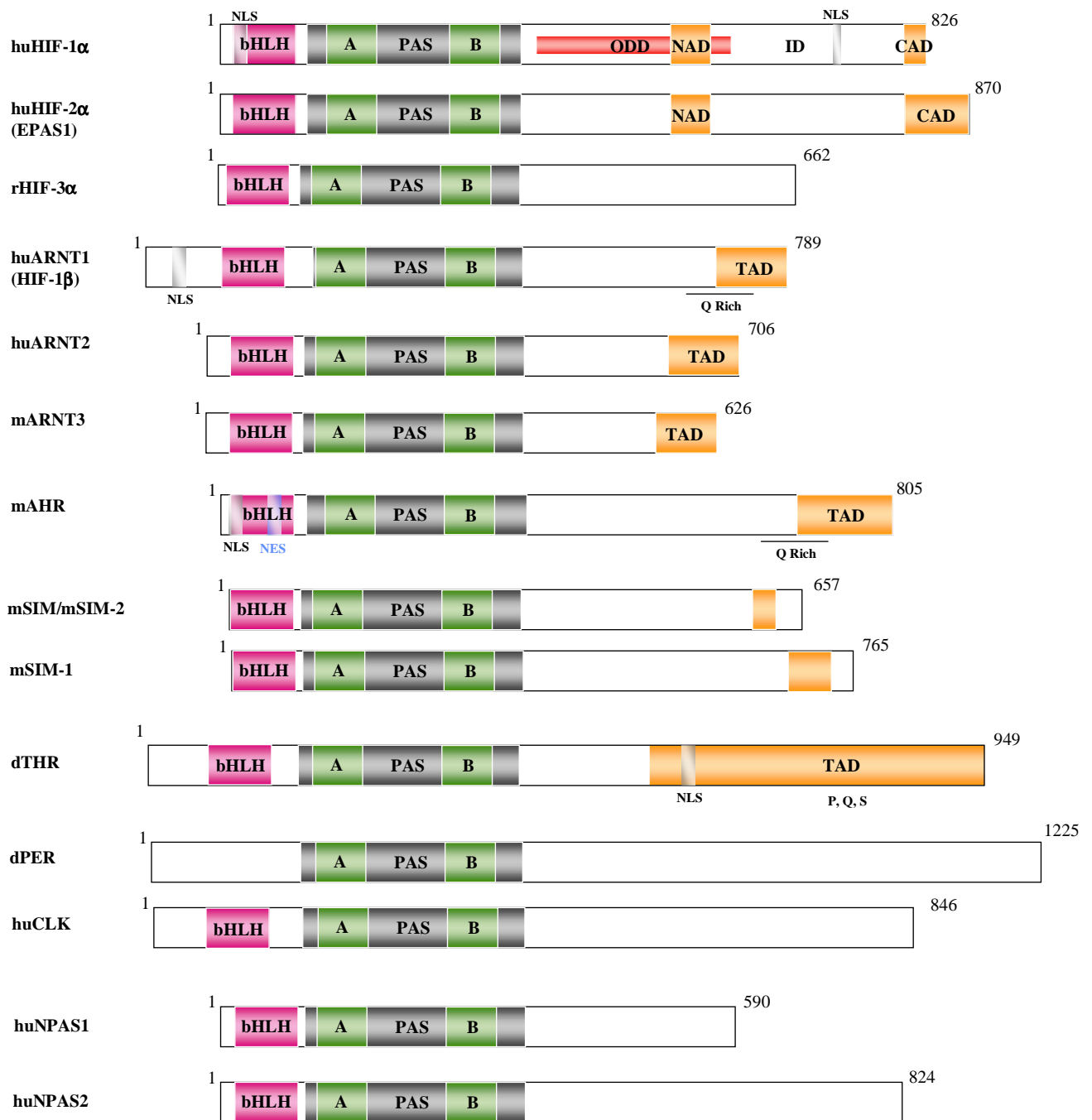


Figure 6 : Structure des protéines de la superfamille bHHL/PAS

AHR préexiste sous forme d'un complexe cytoplasmique contenant deux protéines chaperonnes : HSP90 et une protéine de 38 kDa (XAP2 pour *hepatitis B virus X-associated protein 2*) présentant des homologies avec les immunophilines FKBP12 et FKBP52 (Carver and Bradfield, 1997; Ma and Whitlock, 1997; Meyer and Perdew, 1999; Meyer *et al.*, 1998).

HSP 90 est essentielle pour que AHR puisse adopter une conformation permettant la fixation du ligand (Coumailleau *et al.*, 1995). XAP2 serait impliquée dans la régulation du « turnover » de AHR (Meyer and Perdew, 1999). HSP90 est aussi impliquée dans la rétention cytoplasmique de AHR en l'absence de ligand, en masquant la séquence NLS du récepteur (Ikuta *et al.*, 1998). Récemment, la molécule cochaperonne p23 a aussi été montrée comme faisant partie du complexe autour de AHR, en étant associée au domaine amino terminal fixant l'ATP de HSP90. Elle présenterait un rôle en modulant la réponse au ligand lors de l'activation du récepteur (Kazlauskas *et al.*, 1999).

La fixation de la dioxine sur le récepteur entraîne son activation qui se traduit par une modification conformationnelle du domaine bHLH lié étroitement à HSP90, une exposition du NLS et dès lors la translocation nucléaire de AHR. Ce récepteur peut alors se lier au domaine libre bHLH de ARNT, liaison qui initie la libération concomitante de HSP90 et la formation du complexe mature AHR/ARNT. Ce dernier événement est obligatoire pour la reconnaissance (interaction spécifique) des XRE aussi appelés DRE (*Dioxin Response Element*), dans le cas de la dioxine. Ces éléments de réponse sont présents dans des promoteurs de gènes tels que le cytochrome P4501A1 ou la Glutathione-S-Transférase (GST Ya) (pour revue : (Hankinson, 1995)). Il s'en suit une activation de ces gènes et donc une augmentation de la capacité de détoxification de la cellule.

Des phénomènes de phosphorylation sont impliqués au cours de la signalisation AHR/ARNT. Ainsi, Berghard *et al.* ont impliqué la Protéine Kinase C (PKC) dans cette voie de signalisation (Berghard *et al.*, 1993) au niveau du transport nucléaire et/ou de la fixation à l'ADN. La fixation de ligand n'affecte pas le profil de phosphorylation de AHR, et les régions phosphorylées sont localisées dans la partie carboxy terminale de la protéine (régions comprises entre les acides aminés 368-605 et 636-759) (Mahon and Gasiewicz, 1995). S. Park *et al.* ont décrits une régulation de la fixation à l'ADN dirigée par la phosphorylation au niveau du complexe AHR/ARNT sur des résidus tyrosines de AHR (Park *et al.*, 2000). En outre, des inhibiteurs de phosphatases à spécificité sérine/thréonine inhibent la capacité d'activation de la transcription du complexe AHR/ARNT à un niveau qui suit la fixation aux

XRE (Li and Dougherty, 1997). De plus le potentiel de transactivation d'ARNT dans un contexte de dimère est modulé par la stimulation de PKC ou PKA (*Protein Kinase A*) (Long *et al.*, 1999). L'ensemble de ces résultats laisse donc suggérer une régulation par phosphorylation de la voie de signalisation AHR/ARNT complexe.

Par ailleurs, la protéine AHR est rapidement dégradée *in vivo* et *in vitro* à la suite de la fixation du ligand (Giannone *et al.*, 1998). Il semblerait que cette dégradation de AHR par le protéasome soit liée avec l'export nucléaire de AHR dirigé par la séquence putative NES de AHR (Davarinos and Pollenz, 1999). R. S. Pollenz et E. R. Barbour (Pollenz and Barbour, 2000) ont mis l'accent sur l'export nucléaire de AHR et les relations complexes existant entre ce phénomène et la régulation des gènes dirigée par AHR. Il a aussi été suggéré qu'une kinase nucléaire était nécessaire pour déclencher la dégradation de AHR (Roberts and Whitelaw, 1999).

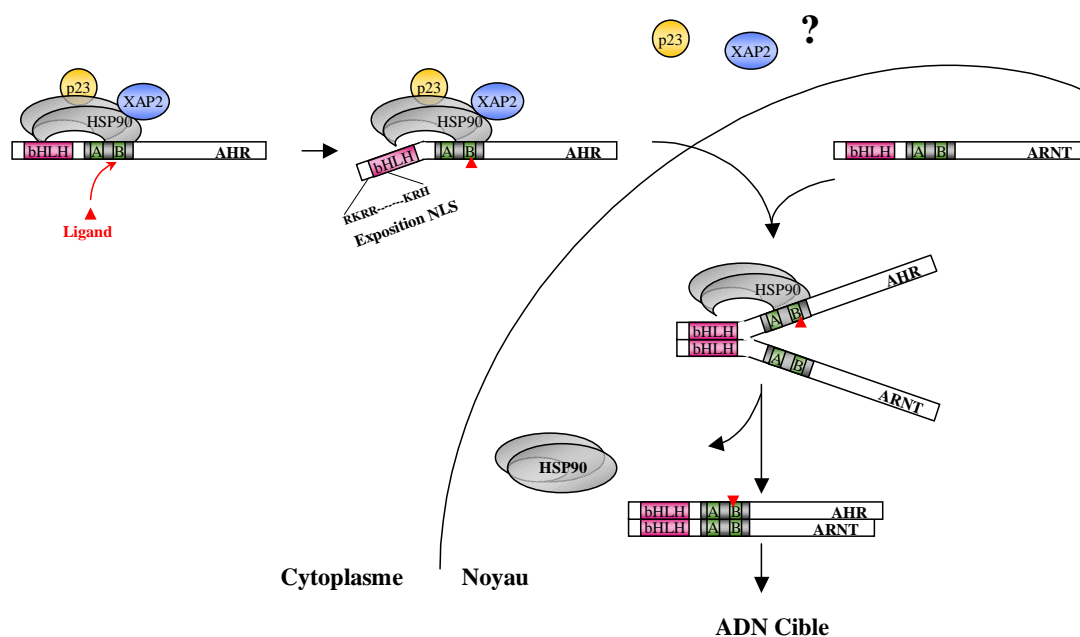


Figure 7 : Modèle de signalisation de AHR/ARNT

La fixation du ligand entraîne la libération du domaine amino terminal de AHR fixé à HSP90 et permet l'exposition du domaine NLS. AHR transloque au noyau et peut fixer ARNT qui est nucléaire. Cette liaison permet la libération de HSP90 et la formation de l'hétérodimère AHR/ARNT mature. Les protéines p38 (XAP2) et p23 sont associées au complexe cytoplasmique HSP 90/AHR. D'après (Lees and Whitelaw, 1999).

3. ARNT : TRANSLOCATEUR NUCLEAIRE DU RECEPTEUR AHR

3. 1. Historique

L'ARNT (*Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator*) a été identifié comme le facteur restaurant l'activité aryl hydroxylase en réponse aux xénobiotiques dans les cellules mutantes de la lignée Hepa-1c1c7 (Hoffman *et al.*, 1991). Comme la sous-unité AHR fixant le ligand était présent dans le cytoplasme de ces mutants, la notion selon laquelle ARNT était nécessaire à la translocation nucléaire dépendante du ligand de AHR a vu le jour (d'où son nom). L'analyse de la séquence humaine a révélé que ARNT était une protéine de 90 kDa présentant un domaine bHLH et un domaine PAS.

Les ADNc de Souris (Li *et al.*, 1994), de Rat (Carver *et al.*, 1994; Drutel *et al.*, 1996), de Lapin (Takahashi *et al.*, 1996), de Truite (Pollenz *et al.*, 1996), et de Drosophile (Ohshiro and Saigo, 1997) et paragraphe I.B.3. 6.) ont été caractérisés par la suite (cf. Annexe 1).

3. 2. ARNT : gène et isoformes

La localisation chromosomique du gène *arnt* a été déterminée dans certaines espèces (chromosome 1 chez l'Homme et chromosome 3 chez la Souris). Le gène humain code pour une protéine de 789 acides aminés et présente un exon alternatif dans sa région 5' codant pour 15 acides aminés juste avant le domaine bHLH (Hoffman *et al.*, 1991). Cet exon alternatif a été retrouvé chez le Rat (Drutel *et al.*, 1996), tandis qu'un autre épissage alternatif était décrit chez la Truite (Pollenz *et al.*, 1996).

Par la suite, deux isoformes de ARNT ont été décrites : il s'agit de ARNT2 décrit chez la Souris (Hirose *et al.*, 1996), le Rat (Drutel *et al.*, 1996), et le poisson téléostéen *Fundulus heteroclitus* (Powell *et al.*, 1999), et ARNT 3 (aussi nommé MOP3 pour *Member Of PAS superfamily*, BMAL1 pour *Brain and Muscle Arnt-Like protein 1*, et JAP3) décrite chez la Souris (Yu *et al.*, 1999), l'Homme (Takahata *et al.*, 1998), et la Drosophile (CYCLE - CYC - ou dBMAL1 - Voir aussi §I.B.6. 3.). Des formes résultantes d'épissages alternatifs ont aussi été décrites pour ARNT3 (Ikeda and Nomura, 1997; Yu *et al.*, 1999) (cf. Annexe 1).

Chez la Souris et le Rat, ARNT2 est composé de 712 acides aminés et présente des domaines bHLH/PAS dans sa région amino terminal avec une homologie très proche de ARNT1 murin (81% dans cette région, 57% au niveau de la séquence totale).

La forme humaine de ARNT3 code pour une protéine de 626 acides aminés contenant aussi dans la région amino terminale le domaine bHLH/PAS qui présente le plus d'homologie avec ARNT1 et ARNT2 (44% et 41% respectivement).

3. 3. Structure des ARNTs

ARNT1 présente donc tout comme AHR les domaines bHLH et PAS dans sa partie amino terminale (Figure 6). Il présente dans sa partie carboxy terminale riche en glutamine, un domaine de transactivation de 34 acides aminés (Whitelaw *et al.*, 1994). Une séquence d'import (NLS) est décrite pour ARNT1. Elle se situe au niveau des acides aminés 39-61 ((Ikuta *et al.*, 1998) et Figure 8). ARNT2 possède une structure proche de ARNT1 et présente aussi un domaine de transactivation dans sa partie carboxy terminale (Hirose *et al.*, 1996). ARNT3 présente également un domaine de transactivation situé dans les 45 derniers acides aminés de la protéine sans similarité avec le domaine de ARNT1, dont l'activité serait régulée négativement de façon intramoléculaire par une séquence située entre les domaines PAS-A et PAS-B (Takahata *et al.*, 1998).

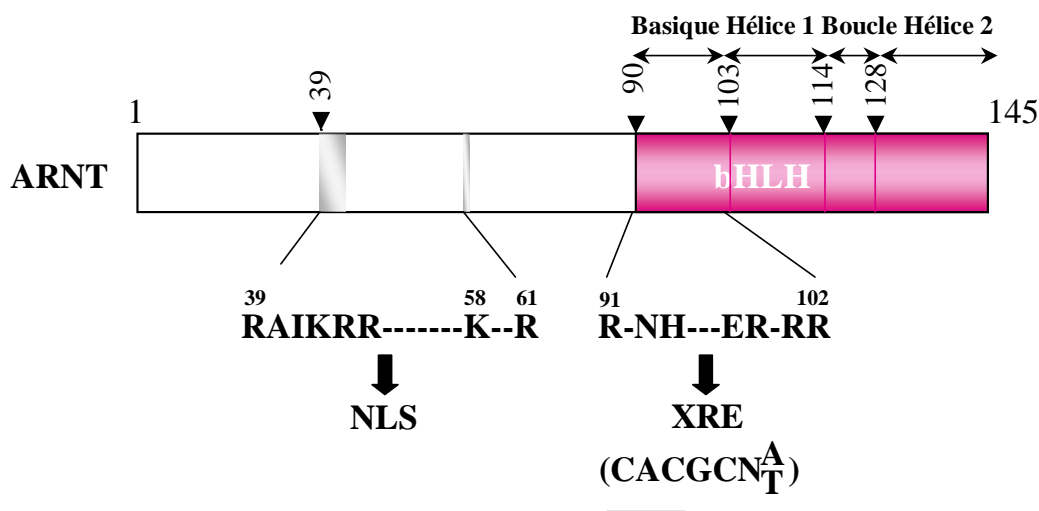


Figure 8 : Localisation du NLS d'ARNT

Les acides aminés essentiels impliqués dans le domaine NLS et celui de fixation aux XRE sont indiqués. D'après (Ikuta *et al.*, 1998).

3. 4. Localisation tissulaire de ARNT

L'expression du gène *arnt1* a été analysée chez le Rat et comparée à celle de son partenaire *ahr* (Carver *et al.*, 1994). Il existe une bonne corrélation entre la présence des différents transcrits, néanmoins dans le placenta (où l'expression du gène chez le Rat est beaucoup plus faible que chez l'Homme), les ARNm de *arnt* sont majoritaires suggérant un partenaire différent pour ARNT dans ce tissu.

Au cours du développement, l'expression des transcrits d'*ahr* et d'*arnt1*, a aussi été étudiée et une forte expression conjointe de ces transcrits a ainsi été détectée dans le neuro-épithélium, le cœur, le foie, les glandes surrénales à différents stades, suggérant un rôle pour le complexe AHR/ARNT dans le développement. Néanmoins, certaines régions présentent des différences d'expression de ces deux protéines suggérant d'autres partenaires et donc d'autres fonctions (Abbott *et al.*, 1995; Abbott and Probst, 1995).

L'étude de la distribution tissulaire de ARNT2 chez la Souris (Hirose *et al.*, 1996) a montré que les transcrits d'*arnt2* (7Kb) étaient détectables uniquement dans le cerveau, les reins et les embryons, alors que ceux de *arnt1* (4.8Kb) dans cette même étude étaient retrouvés dans tous les tissus testés (cerveau, cœur, poumon, thymus, estomac, foie reins, rate, intestins, testicules, muscles et embryons de 11.5 jours). La distribution des transcrits d'*arnt2* est aussi différente de celle des transcrits d'*ahr*. Au niveau de l'embryon, les ARNm d'*arnt2* sont localisés au niveau de la corde et des arcs branchiaux, tandis qu'*arnt1* est présent dans la plupart des tissus d'origines mésodermique et endodermique. L'ensemble de ces résultats suggère que ARNT2 a des fonctions spécifiques différentes de celles d'ARNT1. Chez le Rat, les distributions des transcrits d'*arnt2* (et d'*arnt1*) sont globalement similaires à ceux décrits pour la Souris (Drutel *et al.*, 1996), avec une détection des ARNm de *arnt1* au niveau de la rétine, des glandes salivaires, et surrénales. Chez le Rat nouveau né (4 jours après la naissance), les transcrits d'*arnt2* sont retrouvés dans le système nerveux central et périphérique alors que ceux d'*arnt1* ont une distribution ubiquiste (Drutel *et al.*, 1996).

Les ARNm de *arnt3* sont très présents chez la Souris au niveau du cerveau, des muscles squelettiques, plus faiblement dans l'estomac, et sont très faiblement détectables dans les autres tissus analysés (cœur, rein, poumon, foie). Les transcrits d'*arnt3* sont détectables dans des embryons de 13,5 jours.

3. 5. Fonctions de ARNT

Comme présenté dans le paragraphe précédent, ARNT1 est le partenaire de AHR et intervient dans les phénomènes de détoxification cellulaire, selon la signalisation décrite dans le paragraphe I.B.2. 6. Sa localisation est nucléaire bien que de nombreuses controverses sur sa localisation sub-cellulaire ont persisté. Les anciens modèles de signalisation présentaient ainsi une dimérisation cytoplasmique de AHR et ARNT1 et une translocation du complexe dans le noyau (Hoffman *et al.*, 1991; Probst *et al.*, 1993). Néanmoins la démonstration selon laquelle AHR est capable de transloquer au noyau après fixation du ligand dans des mutants de Hepa1c1c7 déficients en ARNT1 ainsi que les résultats d'immunocytochimie dans la lignée d'origine Hepa1c1c7 montrent que ARNT1 est nucléaire quelque soit l'état d'activation de AHR (Pollenz *et al.*, 1994). Ces résultats ont été confirmés par la suite par immunohistochimie dans d'autres lignées cellulaires (Holmes and Pollenz, 1997) et de manière plus générale chez la Souris et le Poulet au cours de différents stades du développement (Sojka *et al.*, 2000). La présence du signal d'import nucléaire NLS de ARNT1 explique la localisation nucléaire de ce facteur de transcription (Eguchi *et al.*, 1997).

ARNT1 peut s'homodimériser, se fixer sur des éléments de réponses spécifiques (Sogawa *et al.*, 1995) et activer la transcription des gènes correspondant. ARNT1 se fixe à d'autres membres de la famille bHLH/PAS. Il s'en suit d'autres fonctions dépendantes du partenaire lié. Ces fonctions seront présentées plus loin dans ce manuscrit.

ARNT2 est capable de se lier *in vitro* avec AHR d'une façon analogue à ARNT1. Le complexe peut se fixer sur les éléments de réponse XRE. Dans les cellules Hepa1 c4 déficientes en ARNT1, ARNT2 peut se substituer *in vivo* à celui-ci, cependant il est possible que l'affinité de ARNT2 pour AHR soit plus faible que ARNT1 (Hirose *et al.*, 1996) (voir aussi le paragraphe sur l'invalidation du gène *arnt*, §II.A.7. 1.). Par ailleurs, les différences d'expression de ces deux protéines dans certains tissus laissent penser que ARNT2 peut fonctionner en homodimère ou avec d'autres partenaires que AHR (Hirose *et al.*, 1996). ARNT2 se fixe à d'autres membres de la famille bHLH/PAS (Drutel *et al.*, 2000; Hirose *et al.*, 1996).

ARNT3 se lie à d'autres membres de la famille bHLH/PAS (HIF-1 α , HIF-2 α et CLOCK, mais pas ARNT1, AHR ou SIM2) et ne forme pas d'homodimères contrairement aux deux premiers ARNT (Takahata *et al.*, 1998). ARNT3 se lie aussi avec MOP4 (aussi appelé NPAS2) (Hogenesch *et al.*, 1998).

3. 6. *TGO : L'homologue de ARNT chez la Drosophile*

L'homologue de ARNT chez la Drosophile a été cloné et caractérisé. Il s'agit de TANGO (TGO ou dARNT) (Ohshiro and Saigo, 1997; Sonnenfeld *et al.*, 1997; Zelzer *et al.*, 1997). Il participe à de très nombreuses fonctions allant du développement du système nerveux (SIM), de la trachée (THR), des antennes et des tarsi (SS), de la régulation de l'expression de gènes sous hypoxie (SIMA) et du cycle circadien (PER). Ainsi chez la Drosophile, de très nombreux rôles ont été ainsi mis en évidence pour cette molécule clef. Les paragraphes qui suivent présenteront les différents partenaires de dARNT et leur rôle respectif chez la Drosophile.

Une seule isoforme de dARNT a été mise en évidence (Zelzer *et al.*, 1997 et cf. Annexe 1). Cette protéine de 631 acides aminés présente une homologie très forte (95%) avec huARNT dans le domaine HLH et 56% avec la région PAS. *darnt* est uniformément exprimé durant l'embryogenèse, une forte expression étant détectée dans les noyaux et plaques trachéales (Zelzer *et al.*, 1997). dARNT possède un domaine de transactivation (Sonnenfeld *et al.*, 1997), mais ne possède pas de séquence NLS (Eguchi *et al.*, 1997), ce qui pourrait expliquer la distribution sub-cellulaire variable de dARNT, alors que son homologue chez les Mammifères est nucléaire (Ward *et al.*, 1998).

Des mutants pour dARNT présentent des défauts de développement de la ligne médiane du SNC et de la trachée (Sonnenfeld *et al.*, 1997). En fait, dARNT est le partenaire des deux facteurs impliqués dans le développement de ces deux structures (SIM et THR respectivement) (voir paragraphes I.B.4. et I.B.5.).

3. 7. *Eléments de réponse reconnus par le dimère AHR/ARNT*

La formation du dimère AHR/ARNT est obligatoire pour la reconnaissance des éléments de réponse aux Xénobiotiques (XRE, DRE ou parfois AHRE pour *Aryl Hydrocarbon Response Element*), se situant en aval de plusieurs gènes cibles codant pour des enzymes impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques comme le cytochrome P4501A1, la glutathione S-transférase et l'oxydoreductase de Quinone (revues : (Poellinger, 1995; Schmidt and Bradfield, 1996)).

L'analyse par mutations réalisées sur des oligonucléotides contenant des séquences XRE a permis de caractériser la séquence consensus de fixation du complexe : 5'TNGCGTG-

3' (Yao and Denison, 1992). Les deux sous-unités du complexe reconnaissent des demi-sites d'ADN, 5'-TNGC-3' pour AHR et 5'-GTG-3' pour ARNT (Swanson *et al.*, 1995). Hollie I. Swanson *et al.* ont réalisé une comparaison des régions basiques des domaines bHLH de différentes protéines, éléments de superfamilles à domaines bHLH et bHLH/PAS ainsi que les régions d'ADN reconnus correspondantes (Swanson *et al.*, 1995). Trois classes ont été définies (Figure 9). Tout d'abord, les protéines de la classe A dont le consensus de la région basique est **|-RR---N-RER-R-|** reconnaissent le domaine 5'-CTG-3'. Celles de la classes B dont le consensus de la région basique est **|-BB--HN--ERRRR|**, avec une arginine terminant la région basique reconnaissent le domaine 5'-GTG-3'. Le dernier groupe (groupe C) est constitué de protéines reconnaissant des motifs asymétriques.

	Régions Basiques	Demi-sites ADN	
		5'	3'
Classe A			
AP4	RIRREIANSNERRRM		
MyoD	ADRRKAATMRERRRL		
E12	KERRVANNARERLRV	CAG	CTG
E47	RERRMANNARERVVRV		
Tal1	VVRRIFTNSRERWRQ		
Consensus	--RR---N-RER-R-		
Classe B			
c-Myc	NVKRRTHNVLERQRR		
USF	EKRRAQHNEVERRRR		
Max	ADKRAHHNALERRRR		
TFE3	RQKKDNHNLIERRRR	CAC	GTG
TFEB	RQKKDNHNLIERRRR		
ARNT	RLARENHSEIERRRR		
Consensus	--BB--HN--ERRRR		
Classe C			
AHR	AEGIKSNPSKRHRD	TC/TG	GCA/GA
SIM	MKEKSKNAARTRE	GTA/G	GC/TAC
Consensus	-----N--B--E-		

Figure 9 : Classement des protéines à domaine bHLH

Les acides aminés acides glutamiques et arginines conservés des classes A et B sont encadrés. Les arginines conservées qui distinguent la classe B sont signalées par un cadre en pointillé. La lettre B désigne un acide aminé basique et les tirets des positions hautement dégénérées. D'après (Swanson *et al.*, 1995).

4. SIM : LE REGULATEUR DE LA NEUROGENESE

4. 1. *dSIM*

Les ARNm du gène de *Drosophila* *d-Sim* sont retrouvés uniquement dans la ligne médiane où les précurseurs des cellules gliales du système nerveux sont générés. Par ailleurs, des mutants déficients pour le gène présentent une absence de développement cellulaire dans cette zone (Nambu *et al.*, 1991). La protéine dSIM est donc impliquée dans la régulation de la neurogenèse où elle occupe une place centrale.

La cascade proposée pour le développement du système nerveux est la suivante : *dSim* est activée dans le blastoderme par des protéines codées par des ARN maternels et zygotiques spécifiant les informations de positionnement le long de l'axe dorso-ventral. dSIM active la transcription de gènes spécifiques de la ligne médiane, déclenchant ainsi le programme de développement des cellules du SNC. Il contrôle sa propre expression qui est modulée par l'expression de nombreux gènes de la ligne médiane eux-mêmes dépendant directement ou indirectement de dSIM (Nambu *et al.*, 1990; Nambu *et al.*, 1991).

L'élément de réponse de dSIM a pu être déterminé et a été nommé CME pour CNS (*Central Nervous System*) *Midline enhancer Element* (Wharton *et al.*, 1994). Il présente le motif 5'-ACGTGC-3'. La protéine dSIM possède des domaines bHLH et PAS caractéristiques ainsi qu'une série de domaines de transactivation dans sa partie carboxy terminale (Franks and Crews, 1994). De plus, dSIM est fonctionnel sous la forme d'un complexe avec dARNT (Sonnenfeld *et al.*, 1997; Zelzer *et al.*, 1997). La localisation nucléaire de la protéine est prédominante dans les cellules de la ligne médiane au cours du développement (Crews *et al.*, 1988). HSP90 interagit avec dSIM et cette association nécessite les motifs de dimérisation bHLH et PAS de ARNT (McGuire *et al.*, 1995). HSP90 pourrait donc jouer un rôle important dans la régulation des fonctions de SIM.

4. 2. *Homologues de dSIM*

Des homologues de dSIM ont été décrits chez la Souris : mSIM (Ema *et al.*, 1996b; Moffett *et al.*, 1996; Yamaki *et al.*, 1996) aussi nommée mSIM-2 (Ema *et al.*, 1996a; Moffett *et al.*, 1997) et mSIM-1 (Ema *et al.*, 1996a; Fan *et al.*, 1996). Chez l'Homme deux homologues de dSIM ont aussi été décrits (hSIM-1 et hSIM-2) (Chrast *et al.*, 1997) (cf. Annexe 1).

mSIM/mSIM-2 est une protéine de 657 acides aminés qui présente des domaines bHLH et PAS ayant de grandes similarités de séquence avec dSIM. Cependant, la partie carboxy terminale avec une région riche en proline ne présente pas d'homologie de séquence avec dSIM (Yamaki *et al.*, 1996). Aucune étude n'a pu démontrer l'association de mSIM-2 à HSP90 (Moffett *et al.*, 1997). Alors que dSIM présente une activité transcriptionnelle positive avec ARNT, mSIM-2 présente une activité répressive (Moffett *et al.*, 1997). Deux domaines au moins sont impliqués dans cette activité (la région riche en proline/sérine 384-503 et la région riche en proline/alanine 504-657). Le domaine PAS module cette activité répressive en la diminuant (Moffett *et al.*, 1997). Un rôle de PAS dans la régulation de la transcription a aussi été décrit pour dSIM (Franks and Crews, 1994). Par ailleurs, mSIM-2 présenterait aussi une habilité pour bloquer la transactivation dirigée par ARNT, et pourrait faire compétition avec mSIM-1 pour ARNT (Moffett and Pelletier, 2000). Ainsi, mSIM-2 peut interférer avec les voies de signalisation AHR/ARNT et HIF-1 α /ARNT par compétition pour ARNT (Moffett *et al.*, 1997). mSIM-2 est présent dans plusieurs tissus comme les muscles, le rein et le poumon chez l'animal adulte. Au cours de l'embryogenèse, il est présent de façon prédominante dans le diencéphale et est aussi retrouvé dans les arcs branchiaux et les membres (Ema *et al.*, 1996a). L'homologue de dSIM pourrait donc jouer un rôle clef au cours du développement du SNC des Mammifères (Yamaki *et al.*, 1996). La localisation chromosomique de mSIM chez la souris est la bande C3.3-C4 du chromosome 16. D'après les similarités de séquence et la localisation chromosomique, il est considéré que *mSim-2* est l'orthologue de *hSim-2* (localisé sur le chromosome 21 humain) qui a été proposé comme le responsable possible des anomalies observées dans le syndrome de Down ou trisomie 21 due à la duplication de cette région (Chrast *et al.*, 1997; Ema *et al.*, 1996a; Ema *et al.*, 1996b; Yamaki *et al.*, 1996).

mSIM-1 est une protéine de 765 acides aminés, avec une région bHLH/PAS classique ayant une forte homologie de séquence avec mSIM/mSIM-2 (90%) dans ces régions. Cependant, la région carboxy terminale présente aucune similarité avec mSIM/mSIM-2 ou dSIM (Ema *et al.*, 1996a). mSIM-1, contrairement à mSIM-2, lie HSP90 (Probst *et al.*, 1997). Tout comme mSIM-2, il est capable d'interagir avec ARNT avec une affinité plus forte que AHR. Cependant, comme mSIM-2 et contrairement à dSIM, mSIM-1 présenterait une activité répressive dans le complexe hétérodimérique mSIM/ARNT. Néanmoins, d'autres études montrent une capacité d'activation de la transactivation de mSIM-1, via le domaine transactivateur de ARNT (Moffett and Pelletier, 2000).

L'étude de la distribution tissulaire déterminée par des hybridations *in-situ* a montré que les ARNm de mSIM-1 étaient retrouvés dans les somites, la corde néphrogénique et dans le mésencéphale (Ema *et al.*, 1996a) au cours du développement. Chez l'animal adulte, il est présent dans plusieurs tissus (muscles, reins et poumons) comme mSIM-2 (Probst *et al.*, 1997).

5. TRH : DEVELOPPEMENT DU SYSTEME TRACHEAL CHEZ LA DROSOPHILE

5. 1. Le système trachéal

Le système trachéal embryonnaire de *Drosophila* est un réseau de tubes qui est établi à partir de cellules précurseurs ectodermiques. Au stade 10 jour du développement embryonnaire, des regroupements de cellules latérales ectodermiques de chaque côté des 10 parasegments postérieurs parviennent au stade de placodes trachéales. Au stade 11, après une période de division cellulaire, chaque regroupement de cellules s'invagine donnant lieu aux noyaux trachéaux. La formation des arbres trachéaux qui suit se déroule sans d'autres divisions cellulaires. Les cellules suivent alors un modèle de migration stéréotypique : elles fusionnent avec d'autres cellules trachéales des segments adjacents pour former un réseau de tubes continu. Finalement, les cellules aux extrémités des tubes forment de longues extensions jusqu'aux cellules cibles qui sont connectées au réseau trachéal principal (pour revue (Manning and Krasnow, 1993)).

*5. 2. Le gène *thr* et son produit THR*

Le gène *tracheless* (*thr*), est exprimé spécifiquement dans les placodes trachéales et continu d'être exprimé durant le développement embryonnaire puis larvaire dans toutes les cellules trachéales. Les transcrits de *thr* sont aussi détectables dans les placodes salivaires (cellules ectodermiques ventrales du segment labial) ainsi que dans les regroupements de cellules qui donneront naissance aux orifices postérieurs. *thr* est nécessaire et suffisant pour induire le devenir trachéal dans les cellules où il est exprimé. Il est aussi capable de contrôler sa propre expression (Wilk *et al.*, 1996).

Cinq exons ont été décrits pour *thr*. Deux exons alternatifs (codant pour des fragments de 6 et 29 acides aminés) ont aussi été trouvés se situant entre les domaines PAS-A et PAS-B (Wilk *et al.*, 1996) (cf. Annexe 1).

La protéine THR possède 949 acides aminés et présente une grande homologie avec SIM (Nambu *et al.*, 1991) notamment dans sa région bHLH (79% d'identité) et dans les domaines PAS-A (67%) et PAS-B (43%) (Wilk *et al.*, 1996). THR présente un NLS (620-627) ainsi qu'un domaine de transactivation carboxy terminal riche en proline, glutamine et sérine. THR fonctionne en hétérodimère avec dARNT et se fixe aux mêmes séquences que dSIM (Sonnenfeld *et al.*, 1997; Zelzer *et al.*, 1997).

La protéine THR est détectée dans les cellules trachéales avec une localisation nucléaire ainsi que dans les conduits et les glandes salivaires. Son poids moléculaire apparent de 150 kDa est supérieur à celui attendu, un phénomène vu par ailleurs avec d'autres protéines à domaine bHLH/PAS (Wang *et al.*, 1995a).

Les lieux d'expression de THR et le phénotype présenté par des mutants déficients pour *thr* (Isaac and Andrew, 1996) impliquant deux autres tissus (les orifices postérieurs ainsi que les glandes et conduits salivaires) permettent d'envisager un rôle clef de Thr dans la formation des structures tubulaires en général (Wilk *et al.*, 1996).

6. LES REGULATEUR DES RYTHMES CIRCADIENS (PER/TIM, JRK/CYC)

6. 1. Le rythme circadien

Une très grande variété d'organismes, des Cyanobactéries à l'Homme manifestent des rythmes circadiens au niveau de phénomènes biologiques, physiologiques et comportementaux (Lee *et al.*, 1999).

Le rythme circadien des processus biologiques chez les Mammifères sont sous contrôle d'une horloge principale localisée dans le noyau supra-chiasmatique de l'hypothalamus et mue par le cycle jour/nuit (King *et al.*, 1997). Chez la Drosophile, des horloges ont été mises en évidence (Plautz *et al.*, 1997). Le fonctionnement d'une horloge circadienne au sein de cellules isolées a été découvert initialement chez les Procaryotes. Les horloges sont des facteurs de transcription qui inhibent leur propre transcription par boucle de rétrocontrôle négatif (« *feedback* » négatif). Les ARNm et protéines sont synthétisés et s'accumulent durant un cycle journalier, atteignent un niveau seuil qui entraîne une inhibition des gènes correspondants par rétrocontrôle négatif. Ces molécules doivent aussi pouvoir répondre rapidement aux signaux environnementaux (Kay, 1997).

L'isolement et la caractérisation des gènes-horloges dans plusieurs systèmes modèles (*Frequency* (FRQ) et WC-2 chez *Neurospora*, *Period* (PER), *Timeless* (TIM), *Clock* (CLK) et *Cycle* (CYC) chez la Drosophile et enfin BMAL1 (ARNT3) et *Clock* chez la Souris) a permis une avancée significative dans la compréhension de ces mécanismes complexes (pour revue : (Dunlap, 1999)).

Un modèle pour un oscillateur circadien a été proposé (Taylor and Zhulin, 1999) (Figure 10). Les gènes d'horloges positives sont exprimés cycliquement, augmentant le niveau d'ARNm et de protéines d'autres horloges négatives qui vont, à la suite de modifications (phosphorylation ?), inhiber l'activité des horloges positives qui avaient permis leur formation (Dunlap, 1998). Les molécules horloges peuvent éventuellement tomber en dessous d'un seuil et la formation de nouvelles protéines horloges permet de redémarrer un cycle. De plus, le système doit pouvoir répondre à un signal extérieur qui permettra d'avancer ou de retarder le cycle pour maintenir l'horloge en adéquation avec le cycle jour/nuit. Les composants de ce système ont été mis en évidence chez *Neurospora crassa*, la Drosophile et les Mammifères.

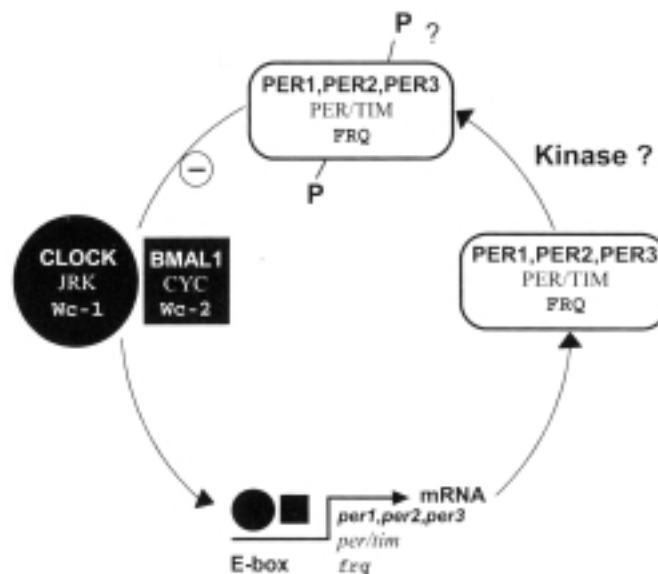


Figure 10 : Modèle général pour une horloge circadienne

Ce modèle présente le rôle de protéines à domaine PAS dans le rétrocontrôle négatif impliqué dans une horloge circadienne. Pour chacun des composants, les protéines spécifiques au Mammifères (en haut), à la Drosophile (milieu), et à *Neurospora* (en bas) sont indiquées. Toutes les protéines à l'exception de FRQ, TIM, et les kinases potentielles, contiennent un domaine PAS. Un point d'interrogation indique des éléments hypothétiques. JRK est aussi appelé dCLOCK (Taylor and Zhulin, 1999).

6. 2. *PER/TIM*

6. 2. 1. *Premiers éléments découverts*

Chez la *Drosophile*, les gènes *period* (*per*) et *timeless* (*tim*) sont des composants essentiels de l'horloge circadienne (pour revue (Hall, 1998; Rosbash *et al.*, 1996)). Les transcrits ainsi que les protéines PER et TIM subissent de nombreuses variations journalières (Ederly *et al.*, 1994; Hardin *et al.*, 1990; Myers *et al.*, 1996; Zeng *et al.*, 1996) en accord avec un rôle important dans une fonction d'horloge. Des mutations dans les régions codantes de *per* et *tim* ont montré des effets sur le cycle des transcrits de *per* et *tim* impliquant la participation codépendante des protéines PER et TIM dans une boucle de régulation par rétrocontrôle. Les fluctuations journalières des transcrits *per* et *tim* ont principalement lieu au niveau transcriptionnel (Allada *et al.*, 1998; Hardin *et al.*, 1992; Rutila *et al.*, 1998; So and Rosbash, 1997), pouvant suggérer que PER et TIM contrôlent leur propre transcription. Cependant, PER possède un domaine PAS pouvant être impliqué dans l'hétérodimérisation, mais ne présente pas de motif liant l'ADN connu. Huang *et al.* ont proposé que PER pouvait inhiber la transcription en formant un dimère non fonctionnel avec des facteurs de transcription contenant des domaines PAS (Huang *et al.*, 1993). Des études ultérieures ont montré que PER et TIM interagissaient avec le complexe JRK/CYC responsable de la régulation de la transcription des gènes *per* et *tim*, et modifiaient son activité transcriptionnelle en empêchant sa fixation au motif E-Box reconnu (Lee *et al.*, 1999).

Des modifications posttraductionnelles telles que la phosphorylation de PER ont été décrites et seraient impliquées dans la régulation du *turnover* des protéines d'horloge et le lien de ces dernières avec les cycles externes (Ederly *et al.*, 1994; Garceau *et al.*, 1997).

6. 2. 2. *Homologues de per*

Le gène *per* a été cloné chez la Souris (trois isoformes *mPer-1*, *mPer-2* et *mPer-3*) et l'Homme (Sun *et al.*, 1997; Tei *et al.*, 1997) (cf. Annexe 1). Une grande homologie avec dPER a été montrée, mais de façon intéressante chez les Mammifères, PER possède un domaine bHLH (Sun *et al.*, 1997). Chez la Souris, PER est présente dans les noyaux supra-chiasmatiques de l'hypothalamus, mais aussi dans d'autres régions (rétine, tyge hypophysaire et cervelet : (Sun *et al.*, 1997). *mPER-2* est un élément de l'horloge circadienne de Mammifère (Zheng *et al.*, 1999). Par ailleurs, l'expression du gène *mPer* oscille dans de nombreux tissus (Whitmore *et al.*, 1998).

Néanmoins, l'expression de nombreux facteurs membres de la famille bHLH dans le noyau supra-chiasmatique (ARNT1 et 2, CLOCK, EPAS-1, HIF-1 α et SRC-1 (*Steroid receptor coactivateur-1*), NPAS-1 (mais pas NPAS-2)), semble indiquer de nombreuses interactions potentielles, pouvant être impliquées dans cette horloge circadienne supra-chiasmatique (Shearman *et al.*, 1999).

6. 3. *JRK/CYC*

6. 3. 1. *Le couple JRK/CYC*

Chez la Drosophile, le couple dCLOCK (dCLK ou JRK) et CYCLE (CYC/dBMAL1) est requis pour l'expression de PER et TIM et la répression de dCLK. Durant le cycle journalier, dCLK interagit de façon stable avec CYC, le dimère peut alors se fixer sur des *E-Box* en amont des gènes *per* et *tim* et activer leur transcription (Hogenesch *et al.*, 1998; Rutila *et al.*, 1998). Ce dimère est fixé par PER et TIM durant la fin de la soirée et le début du matin suggérant la formation d'un complexe tétramérique qui empêche l'activité transcriptionnelle du premier dimère. Il semblerait que PER et TIM interagissent directement avec dCLK, bien que ce dernier soit moins abondant que CYC. dCLK serait alors le composant majeur régulant l'abondance journalière du complexe transcriptionnel actif dCLK/CYC (Bae *et al.*, 2000).

6. 3. 2. *Homologues de jrk et cyc*

Des homologues de *jrk* existent chez les Mammifères. En fait, dCLK (JRK) a été trouvée chez la Drosophile après la mise en évidence de son homologue Clock chez la Souris (Bae *et al.*, 1998). Les transcrits de *mCLK* sont présents de façon constitutive, une différence notable avec dCLK (Bae *et al.*, 1998).

Chez l'Homme le gène *clock* a aussi été découvert (Steeves *et al.*, 1999) (cf. Annexe 1). La protéine est constituée de 846 acides aminés et est identique à mCLK à 89%. Le gène est localisé sur le chromosome 4 (4q12), présente 20 exons avec une organisation exon/intron identique au gène homologue de Souris. Les deux transcrits majoritaires de 8 et 10 Kb ont une expression répandue, avec une expression importante dans le noyau supra-chiasmatique et le cervelet (Steeves *et al.*, 1999).

Comme vu précédemment (§ I.B.3. 2.), CYC possède un homologue chez l'Homme qui est MOP3 (Hogenesch *et al.*, 1998; Takahata *et al.*, 1998), et BMAL1 chez la Souris (Yu *et al.*, 1999). Récemment, un autre facteur (MOP9) présentant des homologies avec CYC et

MOP3/BMAL1 (Hogenesch *et al.*, 2000) a été mis en évidence (cf. Annexe 1). Le gène est localisé sur le chromosome humain 12 (12p11.22-11.23). Il est capable comme ses homologues de former un dimère actif avec CLK, MOP4/NPAS2 et HIF-1 α . MOP9 est présent comme ses partenaires potentiels dans le thalamus, l'hypothalamus et l'amygdale. MOP9 est aussi présent avec CLK dans le noyau supra-chiasmatique.

7. NPAS1 ET NPAS2 : PROTEINES DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL

De nouvelles protéines à domaine bHLH/PAS sont régulièrement identifiées et viennent agrandir cette superfamille, en amenant avec elles de nouvelles combinaisons possibles entre les différents facteurs et donc des fonctions biologiques potentielles. Les facteurs NPAS1/MOP5 et NPAS2/MOP4 ont été découverts à partir de séquences dont la structure était apparentée au domaine PAS issu des banques d'EST (*Expressed Sequence Tag*), avec les références respectives R67292 et R58054. Par cette approche, Y.D. Zhou *et al.* (Zhou *et al.*, 1997) recherchaient d'autres facteurs de cette superfamille, possédant des nouvelles fonctions, tandis que Hogenesch *et al.* (Hogenesch *et al.*, 1997) recherchaient de nouveaux partenaires aux facteurs AHR et ARNT.

7. 1. Structure

Les gènes résultant de cette étude ont été nommés par la première équipe *Neuronal PAS domain protein 1* (*npas1*) et 2 (*npas2*) d'après la localisation tissulaire retrouvée chez la souris adulte pour les transcrits correspondants. Le gène humain *npas1* est localisé sur le chromosome 19 (19q13.2q13.3), le gène murin sur le chromosome 7. Le gène humain *npas2* est lui localisé sur le chromosome 2 (2p11.2-2q13), tandis que le gène murin est sur le chromosome 1 (Zhou *et al.*, 1997) (cf. Annexe 1).

La séquence protéine humaine de NPAS1 contient 590 (62,7 kDa) acides aminés, celle de souris 594 (63,7 kDa) avec 86% d'identité, tandis que NPAS2 contient 824 (91,9 kDa) acides aminés pour 816 (90,9 KDa) chez la Souris. Le domaine bHLH de NPAS1 est très proche de celui d'autres protéines de cette superfamille (hAHR, hARNT, mSIM1 et 2 hHIF-1 α et 2 α et dTHR), tandis que NPAS2 semble présenter plus de divergence (Zhou *et al.*, 1997). Cette observation est vérifiée pour les domaines PAS-A et PAS-B. Cette étude montre que les deux éléments NPAS1 et 2 sont des nouveaux membres de cette superfamille.

7. 2. *Expression tissulaire*

Les ARNm de *npas1* et *npas2* sont détectés dans le cerveau et les tissus de la corde chez la Souris adulte. Au niveau embryonnaire, les transcrits de *npas1* sont détectés au jour 15, juste après l'organogenèse précoce du cerveau. Les transcrits de *npas2* sont détectés pendant le développement postnatal précoce du cerveau. Des hybridations *in situ* ont permis de montrer que les transcrits étaient présents dans les neurones du cerveau des souris (Zhou *et al.*, 1997).

7. 3. *Fonctions*

Très peu de données fonctionnelles sont actuellement connues sur NPAS1 et NPAS2. Néanmoins, Hogenesch *et al.* ont montré que MOP4/NPAS2 était incapable de se fixer avec AHR ni ARNT. MOP4/NPAS2 est capable d'interagir avec HSP90 (comme AHR, HIF-1 α /MOP1 et ARNT3/MOP3) alors que MOP5/NPAS1 ne présente pas d'interaction (Hogenesch *et al.*, 1997). MOP4 peut s'hétérodimériser avec ARNT3/MOP3 et activer la transcription d'un gène rapporteur sous dépendance de trois éléments de réponse contenant une E-Box avec un A en position +4 : 5'-CACGTGA-3' (Hogenesch *et al.*, 1998). MOP4 pourrait être impliqué dans la régulation des cycles circadiens dans un contexte de dimère MOP3/MOP4 en contrôlant l'expression de PER, l'élément de réponse E-Box de PER étant proche de celui testé précédemment. Néanmoins, MOP4 étant présent dans des zones où le gène de MOP3 est faiblement exprimé, d'autres partenaires sont à envisager (Hogenesch *et al.*, 1998).

II. LE FACTEUR INDUIT PAR L'HYPOXIE - 1 (HIF-1)

Ce chapitre présente de façon détaillée le facteur induit par l'hypoxie 1 : HIF-1. Découvert au milieu des années 90, il est l'élément clef impliqué dans les phénomènes d'adaptation cellulaire à l'hypoxie.

A. HISTORIQUE

1. L' ERYTHROPOÏÉTINE

Les premières observations mettant en lumière un rapport entre l'érythropoïèse et l'hypoxie datent de la fin du 19^{ème} siècle. En 1880, après une expédition dans les montagnes du Pérou, l'histologiste Viault nota une augmentation de la densité d'érythrocytes et attribua ces effets à la teneur faible en oxygène rencontrée en haute altitude. La base moléculaire de cette réponse devra attendre un siècle avant d'être découverte, avec la purification du facteur érythropoïétique EPO, la mise en évidence de sa fixation sur des récepteurs spécifiques localisés sur la surface des précurseurs des érythrocytes, et de sa capacité à stimuler leur prolifération et leur différenciation en globules rouges. Les premières études qui suivirent le clonage du gène *epo* en 1985 permirent de montrer que l'hypoxie régulait l'expression du gène *epo* principalement au niveau de sa transcription. (pour revue (Guillemin and Krasnow, 1997)). L'EPO est une hormone glycoprotéique synthétisée dans les cellules interstitielles péri-tubulaires de rein (Koury *et al.*, 1988; Koury *et al.*, 1989). Elle est acheminée jusqu'à la moelle osseuse pour y stimuler les précurseurs de globules rouges. Le rein est le site majeur de synthèse de l'EPO chez l'adulte, mais il existe des lignées cellulaires non dérivées de rein dans lesquelles l'expression d'EPO est aussi régulée par l'hypoxie (Goldberg *et al.*, 1987). Ainsi les cellules Hep3B ont été énormément utilisées pour étudier la régulation de la transcription d'*epo* en réponse à l'hypoxie (Wang and Semenza, 1993a). Ainsi la transcription du gène *epo* est augmentée d'au moins 10 fois dans ces cellules en réponse à une modification de 20% à 1% de la teneur en oxygène (Goldberg *et al.*, 1991). L'induction de *epo* par l'hypoxie nécessite la synthèse *de novo* de protéines. Par ailleurs, l'implication d'une protéine héminique (Goldberg *et al.*, 1988) et de phénomènes de phosphorylation semblent être impliqués (Jelkmann *et al.*, 1991).

2. DETERMINATION DE HRE

La découverte d'un élément de réponse responsable de l'induction de la transcription de *l'epo* en réponse à l'hypoxie a été menée par le groupe de G. Semenza (Semenza *et al.*, 1991). Localisé dans la région 3' flanquant le gène *epo* humain ou de souris, sa délétion élimine la transcription hypoxie dépendante (Pugh *et al.*, 1991). Constitué de 50 nucléotides (nt), l'*enhancer* est tripartite. Les sites 1 (nt 4-12) et 2 (nt 19-23) sont absolument nécessaires pour l'induction par l'hypoxie, tandis que le site 3 (nt 26-48), est un site de fixation putatif pour des éléments de la famille des récepteur aux hormones thyroïdiennes et stéroïdiennes et fonctionne par amplification du signal passant par les deux autres domaines (Semenza and Wang, 1992) (Figure 11). Une activité de fixation à l'ADN dépendant de l'hypoxie se liant au site 1 a été identifiée et fut nommée *Hypoxia-Inducible Factor-1* (HIF-1). L'induction de HIF-1 est dépendante de la synthèse *de novo* de protéine (Semenza and Wang, 1992) et suggérait une relation de cause à effet entre l'induction de HIF-1 et celle d'ARNm d'*epo*. HIF-1 fixe spécifiquement la séquence 5'-TACGTGCT-3' conservée entre l'Homme et la Souris (Pugh *et al.*, 1991). Le groupe de G. Semenza démontra par ailleurs que l'activité HIF-1 et la transcription de gène rapporteur dans des cellules non productrices d'EPO étaient induites par l'hypoxie (Wang and Semenza, 1993c). Cela suggérait à l'époque que HIF-1 pouvait activer la transcription de nombreux gènes en réponse à l'hypoxie. Or effectivement, de nombreux autres gènes étaient connus comme induit en réponse à l'hypoxie (tyrosine hydroxylase, endotheline, les enzymes glycolitiques, des facteurs de croissance comme le *Platelet-derived Growth Factor* (PDGF) ou le *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), sans que le mécanisme d'action soit connu (Wang and Semenza, 1995). La caractérisation du facteur HIF-1 pouvant s'avérer la molécule clef pour la réponse cellulaire à l'hypoxie devenait alors un challenge.

Par la suite HIF-1 α a été cloné dans de nombreuses espèces : Souris (Li *et al.*, 1996; Wenger *et al.*, 1997), Rat (Ladoux and Frelin, 1997), Drosophile (Bacon *et al.*, 1998).

Le gène *hif-1 α* est constitué de 15 exons chez l'Homme et la Souris. Il est localisé sur le chromosome 14 (14q21-q24) humain et sur le chromosome 12 murin (dispersés sur 45 kb) (Iyer *et al.*, 1998b; Semenza *et al.*, 1996) (cf. Annexe 1). R.H. Wenger et son équipe ont décrit l'existence de deux isoformes du HIF-1 α de souris issues de l'utilisation alternative d'un premier exon (exon I1) ou d'un autre premier exon (exon I2). L'expression de l'exon I1 est dirigée par un promoteur tissu-spécifique tandis que l'expression de l'exon I2 est dirigée par un promoteur de gènes de ménages (*housekeeping*) localisé dans un îlot CpG exempt de méthylation (*methylation-free*) (Wenger *et al.*, 1997; Wenger *et al.*, 1998b). Cet exon alternatif n'est retrouvé que chez la Souris et le Rat. L'ARNm contenant l'exon I1 code pour un polypeptide qui est plus petit de 12 acides aminés par rapport à l'isoforme dérivée de l'exon I2 et ne possède que 4 acides aminés précédant le domaine bHLH. Dans cette région, nous avons pu néanmoins mettre en évidence un phénomène d'épissage alternatif chez l'Homme qui donne lieu à deux isoformes différentes de HIF-1 α au niveau de deux acides aminés à la jonction exon1-exon2, provenant d'un double signal de fin d'intron 5'-**agtag**-3' ((Gothie *et al.*, 2000) et § III.A). G. Drutel *et al.* a montré récemment que ces isoformes étaient retrouvées chez le Rat et pouvaient être des partenaires de ARNT2 dans les neurones (Drutel *et al.*, 2000). Un autre épissage alternatif est rencontré chez l'Homme (mais apparemment pas chez les rongeurs) impliquant l'exon 14 et qui donne lieu à une protéine tronquée de son extrémité carboxy terminale ((Gothie *et al.*, 2000) et § III.A). Chez la Souris, une autre isoforme résultant d'un épissage alternatif à l'extrémité 5' de l'exon XI donne lieu à une délétion de 14 acides aminés dans le HIF-1 α (Luo *et al.*, 1997).

Ainsi, comme plusieurs facteurs de cette superfamille (AHR, ARNT etc...) HIF-1 α est présent sous plusieurs isoformes. La signification fonctionnelle de ces isoformes demande encore souvent à être déterminée.

4. STRUCTURE DU HIF-1

HIF-1 est donc un hétérodimère constitué de deux sous-unités HIF-1 α et ARNT1. HIF-1 α possède 826 acides aminés (taille théorique de 93 kDa) et contient des domaines bHLH et PAS à son extrémité amino terminale. Son domaine bHLH a une structure proche de

ceux de AHR et SIM (Wang *et al.*, 1995a), et son domaine PAS rapproche encore HIF-1 α de SIM.

HIF-1 α contient d'autres domaines fonctionnels importants pour sa fonction de régulateur de la transcription de gènes sous hypoxie. Il s'agit tout d'abord de ces deux domaines de transactivation situés dans la partie carboxy terminale. Étudiés par plusieurs équipes, leur structure et leur régulation fine sont bien connues (Jiang *et al.*, 1997b; Li *et al.*, 1996; O'Rourke *et al.*, 1999; Pugh *et al.*, 1997). Le premier domaine de transactivation (TAD-N ou NAD) est situé entre les acides aminés 531 et 575. Le second TAD (TAD-C ou CAD), en position carboxy terminale dans la protéine est situé entre les acides aminés 786 et 826. Les deux domaines transactivateurs sont séparés par un domaine inhibiteur de la transcription (Jiang *et al.*, 1997b). La région précédant le domaine TAD-N pourrait aussi présenter une activité d'inhibition (Pugh *et al.*, 1997).

Un domaine responsable de la dégradation (*Oxygen-dependent Degradation Domain* ou ODD) de HIF-1 α en normoxie par le protéasome (Salceda and Caro, 1997), situé entre les acides aminés 401-603, a été mis en évidence (Huang *et al.*, 1998). Une étude détaillée de ce domaine a montré que différentes sections (acides aminés 401-496, 497-529 et 530-603) étaient toutes capables de conférer des inductions par l'hypoxie à des degrés différents. Néanmoins, une analyse comparée des séquences des protéines de la famille HIF- α et des tests complémentaires du même type ont permis de réduire ce domaine à une séquence de 15 acides aminés (557-571) responsables de la stabilisation sous hypoxie des protéines HIF- α (Srinivas *et al.*, 1999). Ces derniers sont aussi retrouvés dans la protéine homologue Similar (Sima) de HIF-1 α chez la Drosophile.

Deux séquences PEST de 20 acides aminés (riches en proline, acide glutamique, sérine ou thréonine) ont été décrites pour le HIF-1 α mais ne semblent pas être impliquées de façon claire dans l'instabilité de la protéine (Huang *et al.*, 1998). Elles sont localisées au niveau des acides aminés 499-518 et 581-600 (Wang *et al.*, 1995a) à la fin du domaine ODD.

Enfin, deux séquences de localisation nucléaire ont été décrites (Kallio *et al.*, 1998). La première séquence possède une structure bipartite 17-RRKEKSRDAARSRRSKE-33. Elle est localisée dans le domaine bHLH et est réprimée par la conformation adoptée par le domaine PAS-B résultant en une rétention cytoplasmique. Ainsi, dans le contexte de la protéine native le NLS du côté amino terminal n'est pas fonctionnel. La seconde séquence 718-RKRRK-721 est apparentée au NLS retrouvé dans l'antigène Grand-T de SV40 (*Simian*

Virus 40). Cette séquence jouerait un rôle clef dans l'import nucléaire hypoxie-dépendant de HIF-1 α . (Kallio *et al.*, 1998).

Les domaines de fixation connus des autres cofacteurs p300/CBP, SRC-1, Ref-1, HSP90 et pVHL sont aussi indiqués sur la Figure 12 (cf. §II.B).

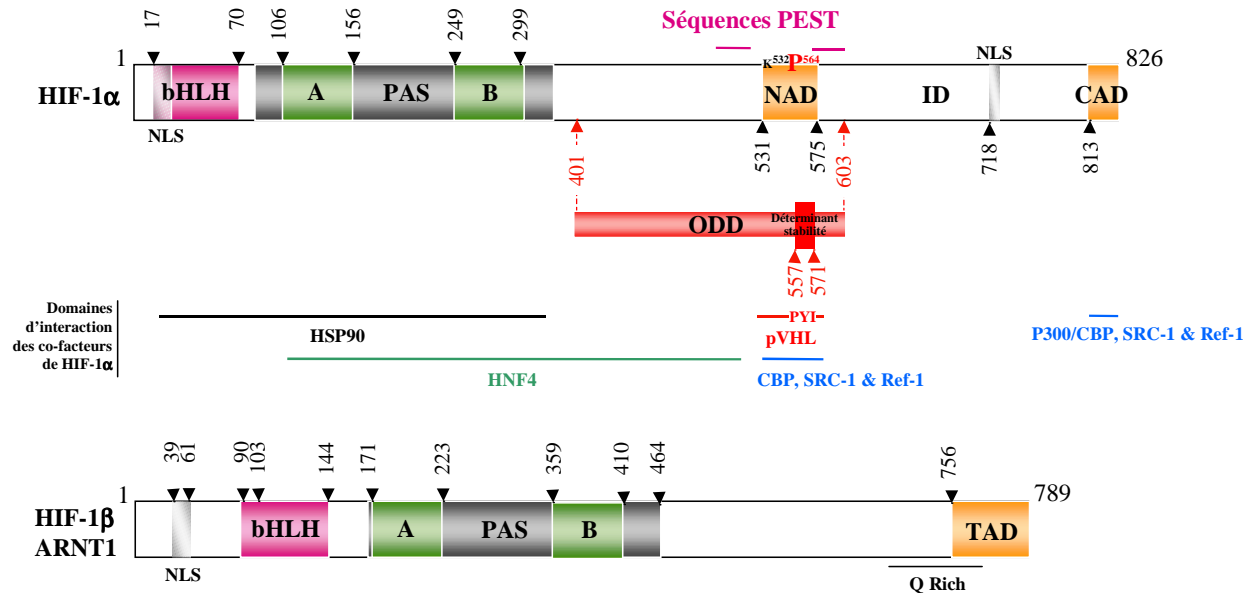


Figure 12 : Détails des structures des sous-unités humaine du HIF-1

La figure présente les domaines fonctionnels des deux sous-unités de HIF-1 et, lorsqu'ils sont connus, les domaines d'interaction des cofacteur de HIF-1 α (se reporter au texte pour les explications correspondantes).

5. ISOFORMES DE HIF-1 α

5. 1. HIF-2 α

H. Tian *et al.* ont été les premiers à caractériser une isoforme de HIF-1 α retrouvée chez la Souris et l'Homme, nommée EPAS1 pour *Endothelial PAS domain protein 1* compte tenu de sa localisation tissulaire (Tian *et al.*, 1997). Plusieurs autres équipes ont aussi cloné et étudié ce facteur dans la même période en lui donnant parfois d'autres noms : MOP2 ((Hogenesch *et al.*, 1997) isoforme humaine), HLF pour *HIF-1 α Like Factor* ((Ema *et al.*,

1997) isoforme de souris), HRF pour *HIF-Related Factor* (Flamme *et al.*, 1997) et HLF/EPAS (Ladoux and Frelin, 1997) (isoforme de rat) (cf. Annexe 1).

Le gène *hif-2α* est localisé sur le chromosome 2 (2p16-p21), une localisation différente de celle du gène *hif-1α* (chromosome 14). Il est constitué de 15 exons comme le gène *hif-1α* (dispersé sur plus de 120 kb d'ADN génomique (Tian *et al.*, 1997). Chez la Souris *hif-2α* est localisé sur le chromosome 17 alors que *hif-1α* est localisé sur le chromosome 12 (Ema *et al.*, 1997).

HIF-2α présente une masse moléculaire apparente de 96,5 kDa pour 870 acides aminés (874 (Ema *et al.*, 1997)/875 (Tian *et al.*, 1997) chez la Souris). Une identité d'acides aminés de 88% entre la forme de souris et celle humaine a été montrée. Tandis que HIF-2α présente 48% d'identité globale en acides aminés avec son isoforme HIF-1α avec une grande homologie dans l'extrémité amino terminale (bHLH : 85%, PAS-A : 68%, PAS-B : 73%). Dans la région carboxy terminale, une région localisée entre les acides aminés 824-874 est également bien conservée entre les deux espèces (63%) (Ema *et al.*, 1997; Tian *et al.*, 1997).

Deux domaines transactivateurs ont été caractérisés dans hHIF-2α (NAD 517-682 et CAD 819-870) capables de fonctionner indépendamment avec une inductibilité par l'hypoxie. Deux régions sont capables d'exercer un effet répresseur : la séquence en amont de l'acide aminé 495 et la région comprise entre les acides aminés 682-819 (O'Rourke *et al.*, 1999). Cette structure est donc très proche de celle de HIF-1α (Jiang *et al.*, 1997b; Pugh *et al.*, 1997). Néanmoins, le NAD de HIF-2α (codé par l'exon 11) semble différent de celui de HIF-1α (codé par l'exon 12), avec une séquence de 165 acides aminés nécessaire pour son activité contre 30-40 pour le NAD de HIF-1α. Par ailleurs, le NAD de HIF-2α présente un domaine riche en proline à la fin du domaine non retrouvé dans le NAD de HIF-1α (O'Rourke *et al.*, 1999).

Trois séquences dans HIF-2α peuvent indépendamment apporter une activité régulée par l'hypoxie. La séquence 517-534 semble ainsi importante pour l'activité inductible du domaine NAD et peut fonctionner dans un contexte différent du NAD de HIF-2α (O'Rourke *et al.*, 1999). De façon intéressante, elle correspond quasiment au déterminant de stabilité décrit par Srinivas *et al.* (Srinivas *et al.*, 1999). Les deux autres séquences sont comprises entre les deux TADs et présentent une régulation différente liée au contexte CAD de HIF-2α. Ceci a été vérifié pour HIF-1α. La présence de différentes séquences opératrices, régulant

l'inductibilité au sein du domaine de régulation interne de HIF-2 α , souligne encore la similarité entre les deux premiers HIF- α et confirme les résultats obtenus par Huang *et al.* dans leur étude sur le domaine ODD de HIF-1 α (Huang *et al.*, 1998).

En ce qui concerne le domaine CAD, une séquence de 9 acides aminés (819-828) est suffisante pour donner l'inductibilité par l'hypoxie à l'extrémité carboxy terminale présentant une activité transactivatrice constitutive (828-870). Cette observation est comparable à ce qui a pu être vu pour le HIF-1 α (comparaison des références (Jiang *et al.*, 1997b) et (Pugh *et al.*, 1997), (O'Rourke *et al.*, 1999)) ou le domaine 775-786 confère l'inductibilité par l'hypoxie à la région transactivatrice constitutive 786-826). Une mutation du résidu cystéine 800 en alanine diminue l'activité mais pas l'inductibilité par l'hypoxie. Par contre, la mutation de la séquence RLL conservée entre HIF-1 α et HIF-2 α entraîne une augmentation de l'activité transactivatrice du domaine en normoxie et recrée quasiment une activité constitutive (O'Rourke *et al.*, 1999). Les régions riches en Leucine sont connues comme étant importantes dans des interactions entre des coactivateurs comme p300 et des facteurs de transcriptions (Torchia *et al.*, 1997). p300 interagit avec ce domaine de HIF-1 α (résidus 723-826) et de HIF-2 α (Bhattacharya *et al.*, 1999; Kallio *et al.*, 1998; O'Rourke *et al.*, 1999) (voir aussi § II.B.2.2.2.).

5. 2. HIF-3 α

Une troisième isoforme a été récemment décrite (Gu *et al.*, 1998) (cf. Annexe 1). Clonée à partir des séquences EST de Souris, HIF-3 α est une protéine de 662 acides aminés avec une masse moléculaire apparente de 73 kDa. La région amino terminale présente une identité en acides aminés de 57% et 53% avec les séquences de HIF-1 α et HIF-2 α respectivement. L'extrémité carboxy terminale contient 36 acides aminés présentant 61% d'identité avec une séquence correspondante dans HIF-1 α . Ce domaine est capable de conférer une inductibilité par l'hypoxie à des domaines de transactivation hétérologues. La séquence réduite de 15 acides aminés (557-571) récemment décrite comme étant le domaine clef de la stabilité sous hypoxie des éléments HIF- α est aussi conservée dans cette isoforme (Srinivas *et al.*, 1999).

HIF-3 α est capable de s'hétérodimériser avec ARNT1, de reconnaître la séquence consensus HRE 5'-TACGTG-3' dans ce contexte d'hétérodimère, et son activité est régulable par l'hypoxie ou le cobalt (Gu *et al.*, 1998).

6. LOCALISATION TISSULAIRE DE HIF-1 α

Les transcrits de *hif-1 α* sont présents de façon constitutive dans la plupart des tissus (si ce n'est tous). Chez l'homme, les transcrits sont fortement présents dans tous les organes) (Tian *et al.*, 1997; Wiener *et al.*, 1996). Cette expression ubiquiste a été confirmée chez la Souris (Ema *et al.*, 1997; Luo *et al.*, 1997; Wenger *et al.*, 1996b).

Au cours du développement, les ARNm de *hif-1 α* sont présents aussi de façon ubiquiste, avec néanmoins une forte expression dans le neuroépithélium, le thymus, le cœur, le poumon, et les reins (Ladoux and Frelin, 1997).

Les transcrits de l'isoforme *hif-2 α* sont présents à des niveaux variables et de façon plus ou moins ubiquiste dans le cœur, le poumon, le foie, le cerveau, le rein, les testicules et les muscles squelettiques avec un niveau plus marqué dans les trois premiers tissus (Ema *et al.*, 1997). De façon intéressante, l'expression du VEGF étudiée en parallèle a révélé un profil d'expression similaire. Cela laisse supposer une relation entre l'expression de ce facteur de croissance et HIF-2 α (voir paragraphe II.A.7. 1. 1.). Une confirmation de cette observation a été réalisée durant le développement du poumon où de forts niveaux d'expression d'ARNm de *hif-2 α* sont induits au moment de la parturition sans modifications apparentes de ceux de *hif-1 α* . Au cours de l'embryogenèse précoce, les ARNm de *hif-2 α* sont présents abondamment dans le système vasculaire, au niveau des cellules endothéliales alors que les ARNm de *hif-1 α* sont quasiment indétectables (Ema *et al.*, 1997). Thian *et al.* ont réalisé aussi des localisations fines des ARNm de *hif-2 α* par des hybridations *in situ* et ont montré aussi des différences de distribution entre les deux transcrits avec une localisation quasi exclusive dans les cellules endothéliales (Tian *et al.*, 1997).

L'expression ubiquiste des ARNm de *hif-2 α* (autres tissus testés : pancréas, rate, thymus, prostate, ovaires, intestin, colon) et les forts taux rencontrés dans des tissus fortement vascularisés (cœur, poumon, placenta) ont été aussi montrés chez l'Homme. Il est à noter que les leucocytes sanguins ne présentent pas d'expression d'ARNm de *hif-2 α* à la différence de *hif-1 α* (Tian *et al.*, 1997).

Dans le cas de *hif-3 α* , les ARNm sont présents dans le thymus, le poumon, le cerveau, le cœur et les reins (Gu *et al.*, 1998).

7. ROLES DE HIF-1

7.1. Implication de HIF-1 dans l'embryogenèse et la physiopathologie : les leçons des KO

La démonstration de l'importance de HIF-1 dans l'homéostasie de l'oxygène a été clairement établie par l'invalidation des gènes ou KO (pour *Knock-Out*) codant pour les deux sous-unités du complexe. En premier lieu, le KO de *arnt1* (Maltepe *et al.*, 1997) a permis de montrer l'importance du complexe HIF-1. En effet, l'invalidation du gène entraîne un retard développemental, des défauts au niveau du tube neural, de la vésicule vitelline, du placenta, qui conduit à la mort embryonnaire au jour E 10.5 (E pour *Embryonic day*) de la gestation.

Néanmoins, l'unité clef du système de réponse à l'hypoxie étant la sous-unité HIF-1 α de HIF-1, il était intéressant de réaliser l'invalidation du gène correspondant. Plusieurs équipes indépendantes (Carmeliet *et al.*, 1998; Iyer *et al.*, 1998a; Ryan *et al.*, 1998) ont réalisé celle-ci et ont ainsi pu démontrer un rôle global de HIF-1 α au niveau du développement et de la physiologie vasculaire.

7.1.1. HIF-1 et angiogenèse

Les souris HIF-1 α ^{-/-} ne sont pas viables (mort embryonnaire au stade E10.5 de la gestation) et présentent une déficience au niveau de la vascularisation et des malformations cardiaques et neuronales (Iyer *et al.*, 1998a).

Des similitudes avec le phénotype d'embryon VEGF^{+/-}, comme la présence de structures vasculaires très larges dans les régions céphaliques (Carmeliet *et al.*, 1996; Ferrara *et al.*, 1996), montrent un lien clair entre l'expression du VEGF et celle de HIF-1 α , nécessaire pour un développement harmonieux de la structure vasculaire. Il existe néanmoins des différences entre les deux KO. Les embryons VEGF^{+/-} se distinguent notamment par un faible développement ou une absence de structures vasculaires (aorte dorsale) dès le stade E8.5 alors qu'il faut attendre le stade E9.25 pour visualiser une anomalie dans des embryons HIF-1 α ^{-/-}. D'autres voies de formation du VEGF sont donc présentes au cours du développement pour initier la vasculogenèse, mais resteraient insuffisantes pour assurer la production de VEGF nécessaire au développement complet. La production dépendante de HIF-1 est donc indispensable et pourrait intervenir au niveau de la maturation des vaisseaux et de l'organisation du réseau vasculaire (Iyer *et al.*, 1998a; Ryan *et al.*, 1998). L'existence de

micro-environnements hypoxiques déclenchant une réponse angiogénique locale pourrait apporter une explication plausible à ce phénomène (Ryan *et al.*, 1998).

Les différentes isoformes de HIF-1 α ou d'ARNT1 ne peuvent pas remplacer les sous-unités manquantes et compenser totalement leur fonction dans la réponse à l'hypoxie. HIF-1 α et ARNT1 ne sont donc pas des gènes redondants et l'hétérodimère HIF-1 exerce indiscutablement un rôle essentiel dans le développement embryonnaire. Néanmoins, l'existence d'isoformes d'ARNT pourrait expliquer certaines différences retrouvées entre les KO de *hif-1 α* , du *vegf* et celui de *arnt*. En effet, dans ce dernier la présence de larges structures vasculaires et l'absence de vascularisation céphalique normale dans les embryons VEGF^{+/+} et HIF-1 α ^{-/-} au stade E9.25 ne sont pas retrouvées. L'hétérodimérisation de HIF-1 α avec le facteur ARNT2, présent principalement dans le système nerveux (Drutel *et al.*, 1996; Hirose *et al.*, 1996), pourrait compenser localement l'invalidation du gène *arnt1*, ce qui implique dès lors des redondances fonctionnelles dans certains types cellulaires (Iyer *et al.*, 1998a; Ryan *et al.*, 1998). Dans les embryons HIF-1 α ^{-/-}, l'absence de dimères HIF1 α /ARNT1 ou HIF-1 α /ARNT2 aurait des effets plus marqués sur l'expression du VEGF expliquant le phénotype comparable à celui du KO du VEGF (Iyer *et al.*, 1998a).

Par ailleurs, les observations réalisées dans les études sur la distribution tissulaire de HIF-2 α , à défaut de pouvoir assurer l'intégralité des rôles de HIF-1 α dans les conditions hypoxiques, suggèrent qu'il pourrait contrôler la transcription du VEGF durant les processus de développement et dans les tissus adultes dans des conditions normoxiques (Ema *et al.*, 1997). ***HIF-1 et gènes induits par l'hypoxie***

Les études réalisées sur des cellules ES (pour *Embryonic Stem cells*) HIF-1 α ^{-/-} ont aussi pu démontrer le rôle central de ce facteur de transcription dans la régulation des gènes impliqués dans la cascade de signalisation de la glycolyse (Carmeliet *et al.*, 1996; Iyer *et al.*, 1998a).

En effet, le KO du gène *hif-1- α* entraîne une diminution de l'expression de plusieurs gènes (*vegf*^{*}, *pgk-1*^{*}, *ldha*^{*}, *glut-1*^{*}) dans des cellules ES HIF-1 α ^{-/-} sous hypoxie ou en hypoglycémie (Carmeliet *et al.*, 1996). En fait, une étude plus détaillée de l'effet de l'hypoxie sur près de 15 gènes différents survolant la voie complète de l'internalisation du glucose à la

* : Se reporter au Tableau 1 : Gènes régulés au niveau transcriptionnel par HIF-1, donnant toutes les significations des abréviations.

production de lactate (transporteurs de glucose et enzymes de la voie glycolytique), a montré que le KO de HIF-1 α entraînait (i) une perte de l'augmentation dépendante de l'hypoxie du taux d'ARNm et/ou une diminution de ce taux pour les ARNm *glut-1*[•], *glut-3*[•], *aldol*[•], *pgk1*[•] et *eno1*[•], (ii) une diminution du niveau d'ARNm sous hypoxie de *hkl*[•], *hk2*[•] et *pkm*[•] non affectés normalement par l'hypoxie dans les cellules ES sauvages et (iii) une diminution du niveau d'ARNm sous hypoxie et normoxie de *pfkl*[•], *aldol*[•], *tpi*[•], *gapdh* et *ldha*[•] qui sont aussi normalement non affectés par l'hypoxie dans les cellules ES sauvages. Ainsi, la déficience en HIF-1 α entraîne des effets variables sur l'expression de gènes de la voie glycolytique. Bien que HIF-1 α coordonne la régulation d'au moins 13 gènes impliqués dans la voie glycolytique, cette régulation est complexe (induction ou maintien de l'expression d'un gène sous hypoxie) (Iyer *et al.*, 1998a).

Il est à noter que des ARNm de certains gènes sensibles à l'hypoxie tels que l'*odc* (*Ornithine DeCarboxylase*) ne sont pas affectés par l'invalidation de HIF-1 α (Iyer *et al.*, 1998a). P. Carmeliet *et al.* confirme qu'il doit exister au moins deux voies de régulation des gènes induits par l'hypoxie de par l'existence de voies de régulation dépendantes de HIF-1 α (*pgk-1*[•], *p21*) ou non (*p27*, *gadd153*, *grp78* (pour *glucose-regulated proteins*)) (Carmeliet *et al.*, 1996).

7. 1. 3. **HIF-1 et développement tumoral**

L'adaptation des cellules cancéreuses à l'hypoxie est une étape critique pour la progression tumorale. Des tumeurs induites chez la souris « *nude* » par injection de cellules d'hépatome c4, déficientes en ARNT1, sont significativement moins abondantes que celles induites par les cellules sauvages Hepa1 et présentent une densité capillaire moindre, corrélée à une absence de transcrits du VEGF et de Glut-1 (Maxwell *et al.*, 1997).

En ce qui concerne HIF-1 α , les tumeurs induites chez la souris « *nude* » par injection de cellules ES HIF-1 α ^{-/-} sont faiblement vascularisées et moyennement hémorragiques (75% de tumeurs blanchâtres et très peu sanguinolentes, et 25% de tumeurs légèrement hémorragiques) contrairement à celles issues de cellules ES HIF-1 α ^{+/+} (82% de tumeurs abondamment ou sévèrement sanguinolentes, avec quelques tumeurs moyennement hémorragiques). Seuls des cordes endothéliales et des capillaires (mais pas de vaisseaux majeurs) sont présents dans les tumeurs HIF-1 α ^{-/-}. Ce phénotype pourrait être la conséquence de l'absence de régulation positive du VEGF dans les cellules hypoxiques des tumeurs HIF-

$1\alpha^{-/-}$. Le facteur de transcription HIF-1 a donc un rôle clef dans la vascularisation des tumeurs via son contrôle de l'expression du VEGF.

Il existe une controverse sur l'effet de l'inactivation de HIF-1 α sur la croissance des cellules ES. En effet, P. Carmeliet *et al.* ont rapporté que l'hypoxie supprimait la prolifération des cellules ES HIF-1 $\alpha^{+/+}$ (culture en mono-couche indifférenciée ou en corps embryonnaires qui constitue une structure tridimensionnelle différenciée). Par contre, l'hypoxie n'affecte pas la croissance des cellules ES HIF-1 $\alpha^{-/-}$ en mono-couche mais augmente significativement la croissance des cellules de corps embryonnaires. Une apoptose - mesurée par la quantification des oligonucleosomes et par la technique TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyUridine Nick End-Labeling*) - réduite dans les cellules HIF-1 $\alpha^{-/-}$ a été relevée et pourrait expliquer pour une part ces différences ((Carmeliet *et al.*, 1998), voir aussi § II.A.7. 1. 5.). Cependant, des études précédentes ont montré que la perte de HIF-1 α ou de ARNT1 n'altère pas significativement le développement cellulaire en hypoxie ou hypoglycémie (Iyer *et al.*, 1998a; Maltepe *et al.*, 1997; Maxwell *et al.*, 1997).

Par ailleurs des résultats inverses sont aussi décrits au niveau du développement des tumeurs. H.E. Ryan *et al.* présentent une diminution de la masse tumorale dans le cas de HIF-1 $\alpha^{-/-}$ sans modification de la survie cellulaire en hypoxie et proposent que cet effet soit dû à son action indirecte sur le VEGF et la régulation de l'angiogenèse (Ryan *et al.*, 1998). Les résultats présentés par P. Carmeliet *et al.* montrent pour leur part aucune différence dans la croissance des tumeurs durant les trois premières semaines mais la taille des tumeurs HIF-1 $\alpha^{-/-}$ augmentent ensuite. Les auteurs proposent que l'hypoxie pourrait stimuler directement la prolifération. La perte de HIF-1 α pourrait aussi avoir pu affecter la croissance de la tumeur par sélection de cellules hautement proliférantes, comme c'est le cas en l'absence de p53 (Graeber *et al.*, 1996). Enfin, l'apoptose (quantifiée par le nombre d'oligonucleosomes par mg de protéine) semble être réduite dans ces tumeurs (Carmeliet *et al.*, 1998).

Ces différences rendent difficile une définition du rôle de HIF-1 dans la prolifération des tumeurs autre que son rôle indirect sur l'angiogenèse dépendante du VEGF. Le rôle de HIF-1 α dans l'apoptose induite par l'hypoxie reste aussi à vérifier (voir aussi § II.A.7. 1. 5.).

7. 1. 4. Autres liens entre HIF-1 et le développement tumoral

Plusieurs autres liens entre HIF-1 et la progression tumorale ont été décrits notamment dans des cellules transformées par les oncogènes Ras (Chen *et al.*, 2000), Raf et V-src (oncogène du virus du sarcome de Rous) (Jiang *et al.*, 1997a) mais aussi pour des tumeurs pVHL^{-/-}, p53^{-/-} ou PTEN^{-/-} (Zundel *et al.*, 2000).

La capacité des cellules cancéreuses de surproduire de l'acide lactique en aérobie est connue depuis longtemps et l'augmentation du transport de glucose et de l'activité hexokinase dans les cellules cancéreuses (augmentation du flux de glucose cellulaire) est impliquée dans ce phénomène. (Dang *et al.*, 1997). Par ailleurs, il est montré que le facteur de transcription oncogénique c-Myc et HIF-1 sont capables de fixer l'élément de réponse ChoRE (*core carbohydrate response element* : CACGTG) présent sur le promoteur de la LDHA (*Lactate Dehydrogenase A*). Il a donc été supposé que les cellules neoplasiques pouvaient augmenter leur glycolyse par un effet des oncogènes sur le niveau d'expression de HIF-1 ou dans le cas de c-Myc, par une activation directe des éléments de réponse à l'hypoxie/glucose des enzymes glycolytiques (Dang *et al.*, 1997).

L'action directe d'un oncogène sur le niveau d'expression de HIF-1 a été démontrée dans le cas de H-Ras. C. Chen *et al.* ont montré que dans le cas de transformation de fibroblastes Rat1 avec H-Ras, ce dernier augmentait l'activité du promoteur du gène du transporteur de Glucose. Cet effet est dépendant, au moins pour une part, de l'augmentation du niveau de la protéine HIF-1 α entraînant une transactivation du promoteur via l'élément de réponse HRE (Chen *et al.*, 2000). Par ailleurs, l'induction du promoteur du VEGF dans des cellules NIH-3T3 transformées par H-Ras a été montrée dépendant de la PI3K (*Phosphatidylinositol 3-Kinase*) et d'un HRE intact (Mazure *et al.*, 1997). Le promoteur VEGF est aussi sensible à l'activation de la voie MAPK en plus de la voie PI3K (Milanini *et al.*, 1998; Rak *et al.*, 2000). Enfin, l'expression de l'oncogène Raf-1 (un effecteur de Ras) dans les cellules CCL39 (lignée cellulaire de fibroblastes de poumon de hamster chinois) entraîne une phosphorylation de HIF-1 α par les MAPK p42/p44 et une augmentation de l'activité transactivatrice de HIF-1 α (Richard *et al.*, 1999).

Dans le cas de cellules transformées par l'oncogène du virus du sarcome de Rous V-src, un autre lien entre HIF-1 et la progression tumorale a été aussi démontré. L'expression de HIF-1 α , l'activité de fixation à l'ADN HIF-1 et l'activation de gènes cibles tels que le *vegf* et

enol (*Enolase-1*) sont déclenchées dans ces cellules en condition hypoxique mais aussi non-hypoxique. L'expression constitutive de HIF-1 pourrait ainsi contribuer à la glycolyse aérobie liée à la transformation cellulaire induite par V-src (Jiang *et al.*, 1997a).

Les pertes de fonction des suppresseurs de tumeur pVHL (*von Hippel-Lindau*) et p53 retrouvées dans de nombreuses tumeurs entraînent une augmentation de HIF-1 α . Dans le cas de pVHL, la perte de fonction entraîne une accumulation de HIF-1 α par défaut d'ubiquitinylation et de signalisation au protéasome dans les conditions non-hypoxiques. Dans le cas de la perte de p53, qui a aussi été montré comme favorisant l'ubiquitinylation de HIF-1 α , c'est une augmentation de l'induction hypoxique de HIF-1 α et du VEGF qui est retrouvée (Ravi *et al.*, 2000).

La perte de fonction de la phosphatase PTEN (pour *Phosphatase and TENSin homolog deleted on chromosome TEN*, un suppresseur de tumeur agissant au niveau de la voie PI3K/AKT, AKT étant un effecteur de PI3K aussi nommé PKB (*Protein Kinase B*)) est corrélée avec l'angiogenèse et un degré de tumeur avancé dans le cancer de la prostate. La surexpression de PTEN dans des cellules de gliome réduit de façon drastique l'accumulation de HIF-1 α , suggérant que la voie PI3K/AKT est aussi impliquée dans la régulation de ce facteur de transcription par ubiquitinylation et dégradation par le protéasome (Zundel *et al.*, 2000).

Enfin, une étude de l'expression et de la distribution dans différents cancers et tumeurs de HIF-1 α et de HIF-2 α , a montré une expression de ces deux facteurs au niveau nucléaire dans la majorité des tumeurs examinées (carcinome de vessie, de cerveau, de sein, de colon, d'ovaire, de pancréas, de prostate et de rein) tandis que dans les tissus normaux, aucune des molécules n'a été détectée (Takahashi *et al.*, 2000). Ainsi, il est clair que le facteur HIF-1 est impliqué de façon importante dans les phénomènes de cancérisation. Comme nous le verrons dans le paragraphe II.A.7. 2. la connaissance des gènes cibles de HIF-1 permet d'entrevoir les mécanismes moléculaires par lesquels la surexpression de HIF-1 peut promouvoir des aspects clés de la progression tumorale.

7. 1. 5. HIF-1 et apoptose : un lien controversé

L'apoptose induite par l'hypoxie joue un rôle important dans la pathologie de nombreuses maladies incluant les ischémies cardiaque et cérébrale. La mort de cellules nerveuses à la suite d'ischémie globales ou localisées a démontré des signes d'apoptose (tels

que les « échelles » d'ADN et l'activation de caspases) 24-72 heures après l'hypoxie (Halterman and Federoff, 1999). De la même manière, des cardiomyocytes entrent en apoptose après une ischémie (Black *et al.*, 1998; Cheng *et al.*, 1996; Narula *et al.*, 1996; Tanaka *et al.*, 1994). Au niveau du cerveau, l'activité de HIF-1 α est induite en réponse à l'ischémie et serait nécessaire pour un sursis dans la mort des cellules neuronales (Halterman *et al.*, 1999). À côté de cet effet protecteur de HIF-1 initial, il est possible que ce facteur de transcription puisse aussi favoriser l'apoptose dans le cas d'expositions prolongées en conditions d'hypoxie (Bruick, 2000).

Un lien entre HIF-1 α et l'apoptose a en effet été proposé par une des équipes ayant réalisé l'inactivation de ce gène. Ils ont rapporté une apoptose comparable dans des cellules ES HIF-1 $\alpha^{+/+}$ ou HIF-1 $\alpha^{-/-}$ en normoxie/normoglycémie. Cependant, dans des cellules en normoglycémie/hypoxie, hypoglycémie/normoxie, ou hypoglycémie/hypoxie, l'apoptose est beaucoup plus marquée dans les cellules sauvages sans être modifiée dans les cellules HIF-1 $\alpha^{-/-}$. Les auteurs proposaient donc HIF-1 α comme un médiateur général plausible de l'apoptose induite par hypoxie/hypoglycémie (Carmeliet *et al.*, 1998). Ce rôle de HIF-1 α au niveau de l'arrêt de la croissance et de l'apoptose présente une similitude avec l'arrêt de la croissance/apoptose contrôlé par p53 en réponse à des génotoxiques (Cox, 1997; Liebermann *et al.*, 1995). Par ailleurs, P. Carmeliet *et al.* ont aussi montré que le niveau de p53 (aussi augmenté en hypoxie) et de p21 (effecteur de l'arrêt du cycle cellulaire et cible de p53) sont significativement augmentés, tandis qu'un inhibiteur de l'apoptose Bcl-2 est réduite dans des cellules HIF-1 $\alpha^{+/+}$ mais pas dans des cellules HIF-1 $\alpha^{-/-}$. Ces observations peuvent ainsi refléter une interaction entre ces voies de signalisation (Carmeliet *et al.*, 1998). En ce sens, il a été montré que l'hypoxie peut stabiliser p53 par l'intermédiaire de la fixation de HIF-1 α ((An *et al.*, 1998) et paragraphe II.B.2. 2. 4.).

Une étude récente renforce l'existence d'un lien direct entre HIF-1 α et l'apoptose. En effet, R. K. Bruick (Bruick, 2000) démontre que Nip3, un membre pro-apoptotique de la famille Bcl-2, est fortement induit en réponse à l'hypoxie. Cette induction est retrouvée aux niveaux des ARNm et des protéines Nip3 en réponse à l'hypoxie dans différentes lignées cellulaires. Il est à noter que NIP3 et la protéine apparentée Nix sont les seuls membres de la famille Bcl-2 qui sont induits à un niveau transcriptionnel par l'hypoxie dans les cellules CHO-K1. Le promoteur du gène *nip3* contient un HRE fonctionnel et est activé par l'hypoxie ou par une sur-expression de HIF-1 α .

Comme les autres membres de la famille Bcl-2, Nip-3 et Nix contiennent un domaine BH3 (*Bcl-2 Homology*) et un domaine hydrophobe à leur extrémité carboxy terminale qui permettent la localisation membranaire et sa dimérisation (Chen *et al.*, 1997a; Ray *et al.*, 2000; Yasuda *et al.*, 1998) Nip-3 est capable de former des hétérodimères avec les membres anti-apoptotique Bcl-2 et Bcl-XL (Boyd *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 1997a; Ray *et al.*, 2000; Yasuda *et al.*, 1998) et pourrait favoriser l'apoptose par séquestration de ces facteurs. Il semble donc bien exister un lien direct entre HIF-1 et NIP-3 et ce dernier pourrait avoir un rôle dédié dans l'apoptose sous hypoxie comme cela a été observé dans les ischémies cardiaques ou cérébrales (Bruick, 2000).

Néanmoins, il s'avérera nécessaire d'approfondir ces études pour confirmer l'effet de HIF-1 α au niveau de l'arrêt de la croissance et de l'apoptose, des résultats différents (comme précisé dans le § II.A.7. 1. 3.) ayant été rapportés. Ainsi Iyer *et al.* (Iyer *et al.*, 1998a), montrent que la mortalité cellulaire ne semble pas modifiée entre les cellules ES sauvages ou HIF- $\alpha^{-/-}$; Ryan *et al.* rapportent une augmentation de l'apoptose au sein de tumeurs HIF- $\alpha^{-/-}$ (Ryan *et al.*, 1998). Par ailleurs, un peptide empêchant l'interaction HIF-1 α /p300, et bloquant ainsi la transactivation de gène induit par l'hypoxie, entraîne une augmentation de la mortalité cellulaire en condition d'hypoxie et un effet anti-tumoral (Kung *et al.*, 2000) et § II.B.2. 2. 2.). Enfin, il est nécessaire de préciser que l'hypoxie peut aussi activer différents gènes par des processus indépendant de HIF-1, comme c'est le cas de la protéine anti-apoptotique IAP2 (pour *Inhibitor of Apoptosis-2*), induite en hypoxie, mais par un processus transcriptionnel indépendant de HIF-1 (Dong *et al.*, 2001).

7. 2. *HIF-1, régulateur central de l'expression de gènes sous hypoxie*

Décrit au départ comme le régulateur de l'expression du gène *epo* sous hypoxie, HIF-1 s'est révélé être en réalité le régulateur central de l'expression de nombreux gènes sous hypoxie. Comme vu précédemment, HIF-1 est présent dans plusieurs types cellulaires dont la plupart n'expriment pas le gène de l'érythropoïétine. Ainsi, HIF-1 ne semble pas restreint à cette seule activité. Cela a été confirmé par l'analyse de promoteurs de gènes connus pour être sensibles à l'hypoxie, notamment les enzymes de la voie glycolytique, qui pour la plupart présentent des HRE dont l'activité a pu être vérifiée (Semenza, 1998; Semenza *et al.*, 1994). Ces enzymes permettent un basculement sur le métabolisme anaérobie et la production d'énergie nécessaire aux cellules tout en diminuant le besoin en oxygène des tissus. Des sites

fonctionnels HRE ont aussi été trouvés dans de nombreux autres gènes (cf. Tableau 1) parmi lesquels le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire VEGF, qui entraîne une augmentation de l'angiogenèse rencontrée au cours du développement, de processus physiologiques ou physiopathologiques, la NO Synthase inductible (i-NOS) et l'Hème Oxygénase-1 (HO-1) qui donnent lieu à la synthèse des vasodilatateurs oxyde d'azote (NO) et monoxyde de carbone (CO) respectivement, la Tyrosine Hydroxylase (TH) qui est une enzyme clef dans la régulation de la respiration, et la transferrine qui comme l'EPO intervient dans l'érythropoïèse (Bianchi *et al.*, 1999; Guillemain and Krasnow, 1997). L'ensemble de ces gènes permet au niveau cellulaire, mais aussi à l'échelle de l'organisme, une réponse à l'hypoxie afin de retrouver le niveau d'oxygène nécessaire à la survie. HIF-1 est la clef de voûte de l'ensemble de ces réponses physiologiques (Guillemain and Krasnow, 1997).

G. L. Semenza a réalisé récemment un inventaire exhaustif des gènes connus comme étant des cibles directes de HIF-1 (Semenza, 2000; Semenza, 2001). Ils sont regroupés en trois catégories principales qui sont : (i) Métabolisme Glucose/énergétique et Viabilité/prolifération cellulaire, (ii) Erythropoïèse et métabolisme du fer et (iii) Développement/Remodelage Vasculaire et Tonus vasomoteur (cf. Tableau 1).

Tableau 1 : Gènes régulés au niveau transcriptionnel par HIF-1

<p><i>Métabolisme du Glucose & Prolifération Cellulaire / Viabilité</i></p> <p>Adenylate kinase 3, Aldolase A (ALDA), Aldolase C (ALDC), Enolase 1 (ENO1), Glucose transporter 1 (Glut-1), Glucose transporter 3 (Glut-3), Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, Hexokinase 1 (HK1), Hexokinase 2 (HK2), Insulin-like growth factor 2, IGF binding protein 1, IGF binding protein 2, IGF binding protein 3, Lactate dehydrogenase A (LDHA), NIP3, Phosphofructokinase L, Phosphoglycerate kinase 1 (PGK-1), Pyruvate Kinase M (PKM), p21, Transforming Growth Factor β3, Triosephosphate isomerase (TPI)</p>
<p><i>Métabolisme du fer & Erythropoïèse</i></p> <p>Ceruloplasmin, Erythropoietin, Transferrin, Transferrin receptor</p>
<p><i>Développement Vasculaire /Remodelage et tonus Vasomoteur</i></p> <p>α_{1B}-adrenergic receptor, Adrenomedullin, Endothelin-1, Heme Oxygenase-1 (HO-1), Nitric oxide synthase 2 (NOS-2), Plasminogen activator inhibitor 1, Vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF receptor FLT-1</p>
<p><i>Autres</i></p> <p>Carbonic anhydrase 9, p35srj, Prolyl-4-hydroxylase α(I), Tyrosine Hydroxylase (TH)</p>

7. 3. *Autres cibles potentielles des isoformes HIF- α et ARNTs*

Si les complexes contenant les isoformes apparentées au HIF-1 α (HIF-2 α , HIF-3 α) sont capables de reconnaître les éléments de réponse HRE et d'activer les gènes correspondants, il est connu qu'ils disposent vraisemblablement de cibles spécifiques non reconnues par le complexe HIF-1. En ce sens, il a été démontré une capacité propre au complexe HIF-2 α /ARNT1 d'activer le gène de la tyrosine kinase endothéliale Tie2 en hypoxie alors que HIF-1 en est incapable (Tian *et al.*, 1997).

B. MECANISME D'ACTION DE HIF-1 (REGULATION DE HIF-1)

Si la signalisation en aval du facteur HIF-1 est bien documentée (Figure 13), les éléments qui interviennent en amont sont encore disparates et demandent à être caractérisés. Cependant, une avancée majeure vient d'être réalisée cette année par deux équipes de recherche. En effet, M. Ivan *et al.* et P. Jakkola *et al.* viennent de publier des résultats comparables démontrant qu'une hydroxylase à proline sensible à l'oxygène et au fer est vraisemblablement le détecteur d'oxygène cellulaire (Jaakkola *et al.*, 2001) et (Ivan *et al.*, 2001). Cette enzyme doit encore être isolée et caractérisée.

Ces nouvelles données réconcilient de nombreuses observations réalisées telles que la capacité du cobalt ou d'un chélateur du fer (Desferrioxamine ou DFO) à mimer la réponse à l'hypoxie (Wang and Semenza, 1993b), qui laissaient supposer l'implication d'une protéine hémique (Goldberg *et al.*, 1988). Les paragraphes II.C et II.D présentent ces résultats et font le point sur ce qui est désormais connu sur la voie de détection de l'oxygène. L'implication vraisemblable d'autres intermédiaires encore inconnus dans l'activation du facteur HIF-1 (Guillemin and Krasnow, 1997), et les moyens pouvant être mis en œuvres pour les caractériser seront présentés dans le paragraphe II.E.

En ce qui concerne le HIF-1, les éléments clefs de sa régulation et de sa fonction sont désormais bien connus même si certaines zones d'ombre demandent encore à être éclaircies. Ainsi, les ARNm des deux sous-unités de HIF-1 sont présents de façon constitutive et stable dans la plupart des cellules (Gradin *et al.*, 1996). Au niveau protéique, ARNT1/HIF-1 β est aussi stable. Par contre, HIF1 α est dégradé extrêmement rapidement en condition de normoxie par le protéasome (cf. § II.B.1.). Plusieurs autres niveaux de régulation existent (cf. § II.B.2.), d'où un contrôle complexe de la molécule clef de la réponse à l'hypoxie. Enfin,

HIF-1 α peut aussi être induit dans des conditions de normoxie conférant à ce facteur de transcription de nouveaux rôles (cf. § II.B.3.).

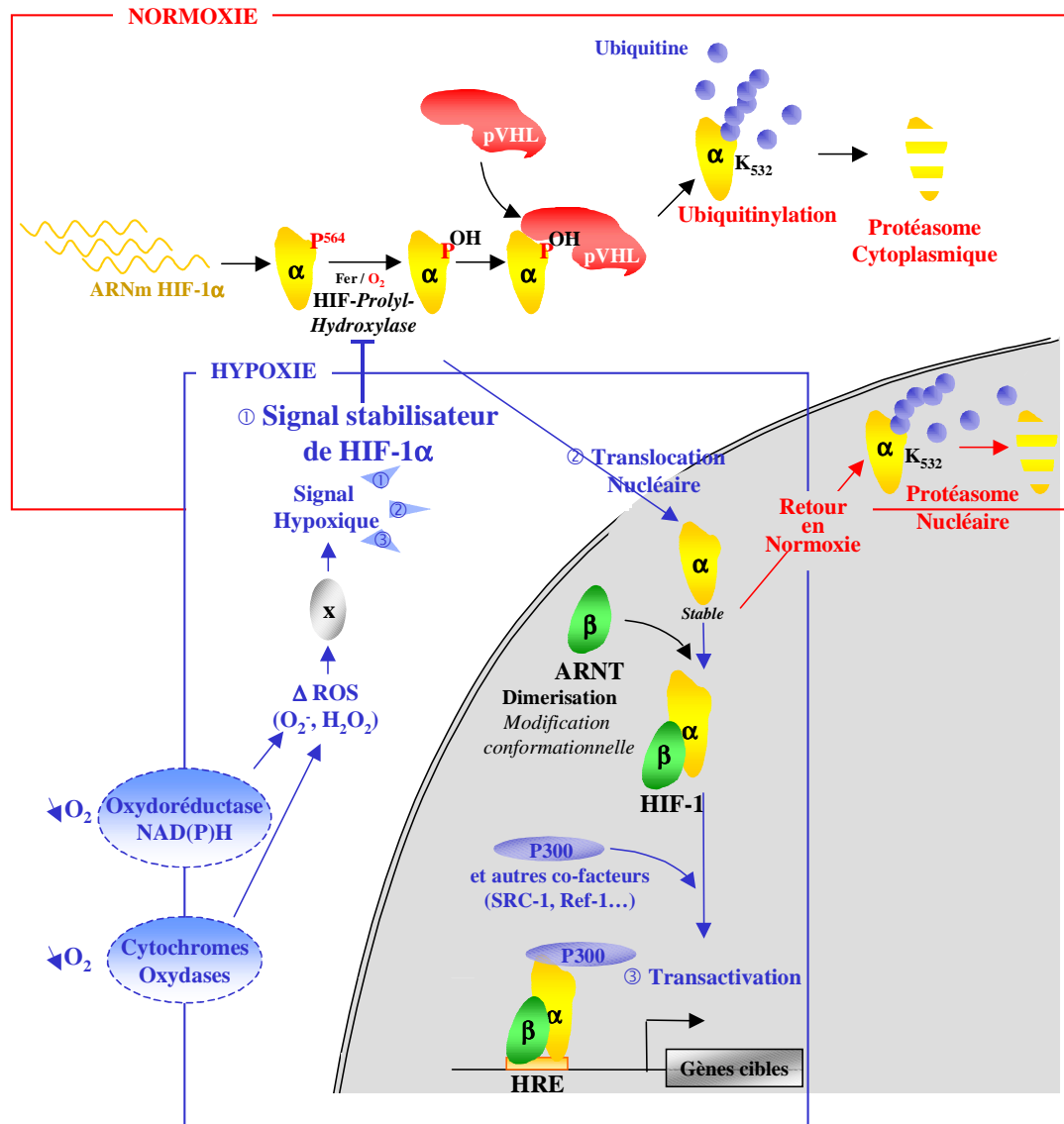


Figure 13 : Régulation de l'activité de HIF-1

La figure présente les principales étapes de la régulation du facteur HIF-1. En condition de normoxie, la protéine HIF-1 α est hautement instable. Elle fixe pVHL, après une hydroxylation sur la proline 564 dépendante de l'oxygène et du fer. La protéine pVHL fait partie d'un complexe, contenant aussi les élongines B et C et la protéine CUL-2, qui possède une activité *E3 ubiquitin ligase*. HIF-1 α est donc ubiquitinylé en normoxie puis dégradé par le protéasome. En condition d'hypoxie, HIF-1 α n'est plus hydroxylé et ne fixe plus pVHL. Le signal hypoxique va aussi déclencher la translocation nucléaire de HIF-1 α . Il peut dès lors se fixer avec son partenaire HIF-1 β /ARNT1 ainsi qu'à d'autres cofacteurs tels

que p300/CBP pour activer des gènes sous dépendances d'éléments de réponses à l'hypoxie (HRE). Enfin, l'hypoxie permet d'augmenter directement la capacité transcriptionnelle de HIF-1 via ses domaines transactivateurs. Il est possible que d'autres détecteurs (oxydoreductases, cytochromes) participent aussi à l'élaboration du signal hypoxique via les ROS (se reporter au texte pour les explications correspondantes). De retour en hypoxie, HIF-1 α est rapidement dégradé, une étape pouvant être assurée par le protéasome nucléaire (Berra *et al.*, 2001b).

1. DEGRADATION DU HIF-1 α PAR LE PROTEASOME : NIVEAU PRINCIPAL DE REGULATION

1. 1. pVHL

Les études initiales menées sur le HIF-1 α semblaient montrer une régulation des transcrits de ce gène sous un traitement par l'hypoxie (Wang *et al.*, 1995a). En réalité, des études sur plusieurs lignées cellulaires ont montré que l'hypoxie ne modifiait pas le niveau d'ARNm de HIF-1 α , suggérant une régulation au niveau de la traduction des ARNm ou au niveau de son degré de dégradation (Gradin *et al.*, 1996; Huang *et al.*, 1996; Salceda *et al.*, 1996). En fait, la sous-unité HIF-1 α est hautement instable en condition de normoxie (demi-vie de l'ordre de 5 mn (Wang *et al.*, 1995a) tandis que l'hypoxie prolonge significativement sa demi-vie, permettant ainsi son accumulation et la formation du complexe HIF-1 (Huang *et al.*, 1996). La machinerie de dégradation cellulaire des protéines Ubiquitine/Protéasome est responsable de cette dégradation (Huang *et al.*, 1998; Kallio *et al.*, 1999; Salceda and Caro, 1997; Sutter *et al.*, 2000) et des modifications de l'état redox de la cellule pourraient être aussi impliquées dans la stabilisation de HIF-1 α (Huang *et al.*, 1996; Salceda and Caro, 1997).

C'est le domaine ODD qui est responsable de la dégradation de HIF-1 α en condition de normoxie (Huang *et al.*, 1998). Une implication de ARNT1 dans la stabilisation de HIF-1 α a été proposée (Kallio *et al.*, 1997), cependant ce rôle serait indépendant de l'oxygène et limité par le fait que HIF-1 α diminue extrêmement rapidement lors d'un retour en condition de normoxie et malgré sa dimérisation avec ARNT1 (Huang *et al.*, 1998). Le facteur suppresseur de tumeur pVHL (*von Hippel-Lindau*), ainsi que HPTF (*HIF-1 α proteasome targeting factor*) (Berra *et al.*, 2001a), participent à la dégradation de HIF-1 α qui passe par une étape d'ubiquitylation avant l'entrée dans le protéasome (Kallio *et al.*, 1999; Salceda and Caro, 1997).

La maladie de von Hippel-Lindau (VHL) est un syndrome de cancer héréditaire caractérisé par le développement de carcinomes rénaux, de phéochromocytomes et de tumeurs vasculaires du SNC et de la rétine, causés par des mutations dans le gène suppresseur de tumeurs VHL au niveau des lignées de cellules germinales (Lonergan *et al.*, 1998) et références cités). L'implication de pVHL dans la régulation de HIF-1 a été initialement démontrée dans des cellules déficientes pour ce facteur qui présentent un niveau de HIF-1 α (et de HIF-2 α) important et une activation de HIF-1 (Maxwell *et al.*, 1999). La ré-expression de pVHL restaure l'instabilité dépendante de l'oxygène de HIF-1 α . pVHL et HIF-1 α sont associés, une interaction dépendante de fer (le chélateur du fer Desferrioxamine (DFO) ou des ions cobalt dissociant le complexe) est nécessaire pour la dégradation de la sous-unité HIF-1 α en condition de normoxie. Il était initialement suggéré que pVHL était présent dans le complexe fixant l'ADN HIF-1 et que la stabilité de HIF-1 α apportée par l'hypoxie était indépendante de la dissociation du complexe pVHL/HIF-1 α (contrairement aux agents DFO et cobalt) (Maxwell *et al.*, 1999). Cependant, nous verrons dans le paragraphe C que les résultats des études de Maxwell *et al.* sont artéfactuels et qu'en fait l'hypoxie se comporte comme la DFO et le cobalt en empêchant la liaison entre pVHL et HIF-1 α .

pVHL forme un complexe avec les élongines B et C (aussi noté VBC) et la cullin-2 (Cul-2). L'étude du complexe par cristallographie a montré que pVHL est lié directement avec l'élongine C (domaine CBD pour *elongin C-Binding Domain* localisé dans le domaine α , acides aminés 155-192)), tandis que l'élongine B est lié à l'élongine C (Stebbins *et al.*, 1999). Cul-2 est aussi fixé à cette dernière (Figure 14). Les élongines B et C et la cullin-2 présentent des homologies avec les composants du complexe multiprotéique SCF (*Skp1 - Cul-1 - F-box protein*), qui cible les protéines régulatrices du cycle cellulaire au système de dégradation par l'ubiquitine (Ciechanover, 1998; Ciechanover and Schwartz, 1998) laissant penser à des fonctions similaires des complexes. Allant dans ce sens, il a été récemment montré que pVHL présente une activité *E3 ubiquitin ligase* dans des extraits cellulaires (Iwai *et al.*, 1999; Lisztwan *et al.*, 1999).

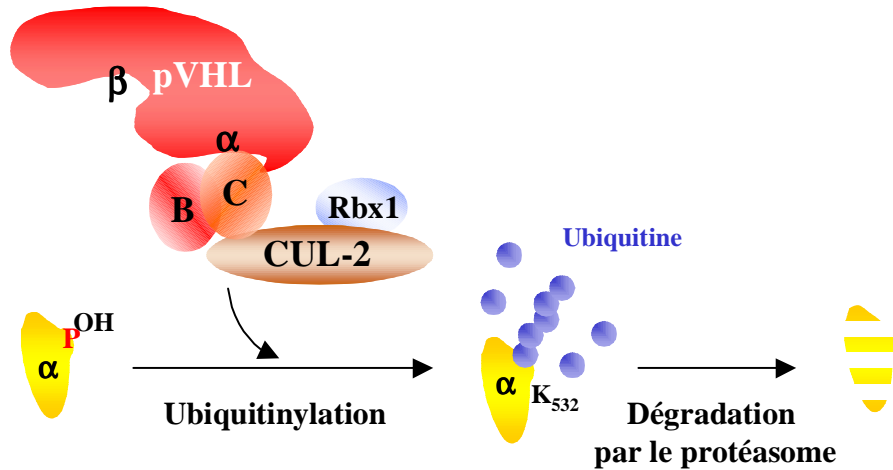


Figure 14 : Le complexe pVHL/élongine B et C/Cul-2

Le facteur pVHL fixe les élongines B et C, Cul-2 et Rbx1, il permet l'ubiquitylation des protéines HIF- α et leur dégradation par le protéasome. D'après (Kaelin, 1999).

Plusieurs études récentes ont permis de déterminer la régulation fine de l'interaction HIF-1 α /pVHL. Le facteur pVHL se fixe via une région comprise entre les acides aminés 91 à 113 de pVHL (domaine β voir Figure 14) au HIF-1 α via le domaine de transactivation N-TAD au cœur du domaine ODD (Tanimoto *et al.*, 2000). La région de fixation de HIF-1 α est incluse dans le domaine β de fixation de macromolécules de pVHL qui est constitué par un feuillet β de 7 brins (acides aminés 63-154) et d'une hélice α (acides aminés 193-204) (Stebbins *et al.*, 1999). Suivant les auteurs, plusieurs zones ont été décrites pour la région fixant pVHL dans HIF-1 α : 532-585 (Tanimoto *et al.*, 2000), 549-582 (Cockman *et al.*, 2000) et 530-652 (Ohh *et al.*, 2000). Par ailleurs, HIF-2 α est régulé de façon similaire et sa région fixant pVHL est localisée entre les acides aminés 517 et 552 (Cockman *et al.*, 2000). De façon intéressante, cette région correspond à la zone conservée entre les différents membres de la famille HIF- α au sein de l'ODD et du domaine de transactivation N-TAD et plus précisément la région de 15 acides aminés (557-571) responsable de la stabilisation sous hypoxie des protéines HIF- α (Srinivas *et al.*, 1999). Dans cette région, le motif PYI est extrêmement important pour l'interaction entre pVHL et le domaine N-TAD de HIF-1 α , une mutation de ce triplet abolissant totalement celle-ci ((Tanimoto *et al.*, 2000) et voir § II.C) . Enfin, la lysine

K532 (mais pas les 2 autres lysines du domaine N-TAD K538 et K547) est essentielle pour la dégradation de HIF-1 α (Tanimoto *et al.*, 2000).

pVHL dirige directement l'ubiquitinylation de HIF-1 α et la dégradation par le protéasome en normoxie qui s'en suit (Tanimoto *et al.*, 2000). L'hypoxie entraîne la stabilisation de cette sous-unité avec une diminution de l'ubiquitinylation de HIF-1 α (Kallio *et al.*, 1999) - un phénomène spécifique à HIF-1 α puisque l'hypoxie ne modifie pas l'ubiquitinylation de p53 (Ohh *et al.*, 2000) - et l'activation de la voie du HIF-1 consécutive.

Une autre protéine régulée par dégradation dépendante de l'oxygène via le système Ubiquitine/Protéasome, IRP-2 (*Iron Regulatory Protein-2*) (Iwai *et al.*, 1998), ne présente pas d'ubiquitinylation dépendante de pVHL, ce qui renforce encore la spécificité de pVHL pour la régulation des protéines HIF- α (Cockman *et al.*, 2000).

1. 2. Autres éléments du complexe impliqués dans la dégradation

Le domaine de fixation de l'élongine C (CBD) sur pVHL ainsi que l'interaction de pVHL avec l'élongine C sont nécessaires pour l'ubiquitinylation de HIF-1 α par pVHL (Ohh *et al.*, 2000; Tanimoto *et al.*, 2000), mais d'autres protéines pourraient être aussi nécessaires pour la régulation par le système d'ubiquitine/Protéasome (Ohh *et al.*, 2000).

Dans ce sens, p53 permettrait une ubiquitinylation dirigée par MDM2 et la dégradation par le protéasome consécutive de HIF-1 α (Ravi *et al.*, 2000). Par ailleurs, un autre facteur non encore identifié nommé HPTF (*HIF-1 α proteasome targeting factor*) est aussi impliqué dans la dégradation de HIF-1 α (et HIF-2 α). Il intervient dans un mécanisme de régulation par rétrocontrôle (*feedback*) de la dégradation de HIF-1 α ((Berra *et al.*, 2001a) et Figure 15) analogue à celui rencontré par le couple p53/MDM2 dans lequel p53 contrôle son propre niveau d'expression en induisant l'expression de son régulateur négatif MDM2. Le modèle de la boucle de régulation est présenté comme suit. Dans des conditions de normoxie, HIF-1 α est ciblé au protéasome par HPTF. Ce dernier, en accord avec le modèle est un gène induit en condition d'hypoxie et s'accumule d'autant plus que dure l'hypoxie et donc l'activité HIF-1. De retour en normoxie, HPTF peut se fixer au complexe HIF-1 α /pVHL et entraîner la dégradation de HIF-1 α . HIF-2 α serait aussi soumis à cette régulation par HPTF. Si, HPTF n'est pas encore caractérisé au niveau moléculaire, il ne correspond ni à pVHL, ni à

MDM2 (Berra *et al.*, 2001a). Il reste à caractériser les mécanismes régulant l'interaction de HPTF avec HIF-1 α /pVHL et déterminer si HPTF est directement lié ou non à HIF-1 α et si pVHL peut régir cette association. HPTF pourrait aussi s'avérer être l'hydroxylase à proline spécifique des protéines HIF- α (voir §IV.B.)

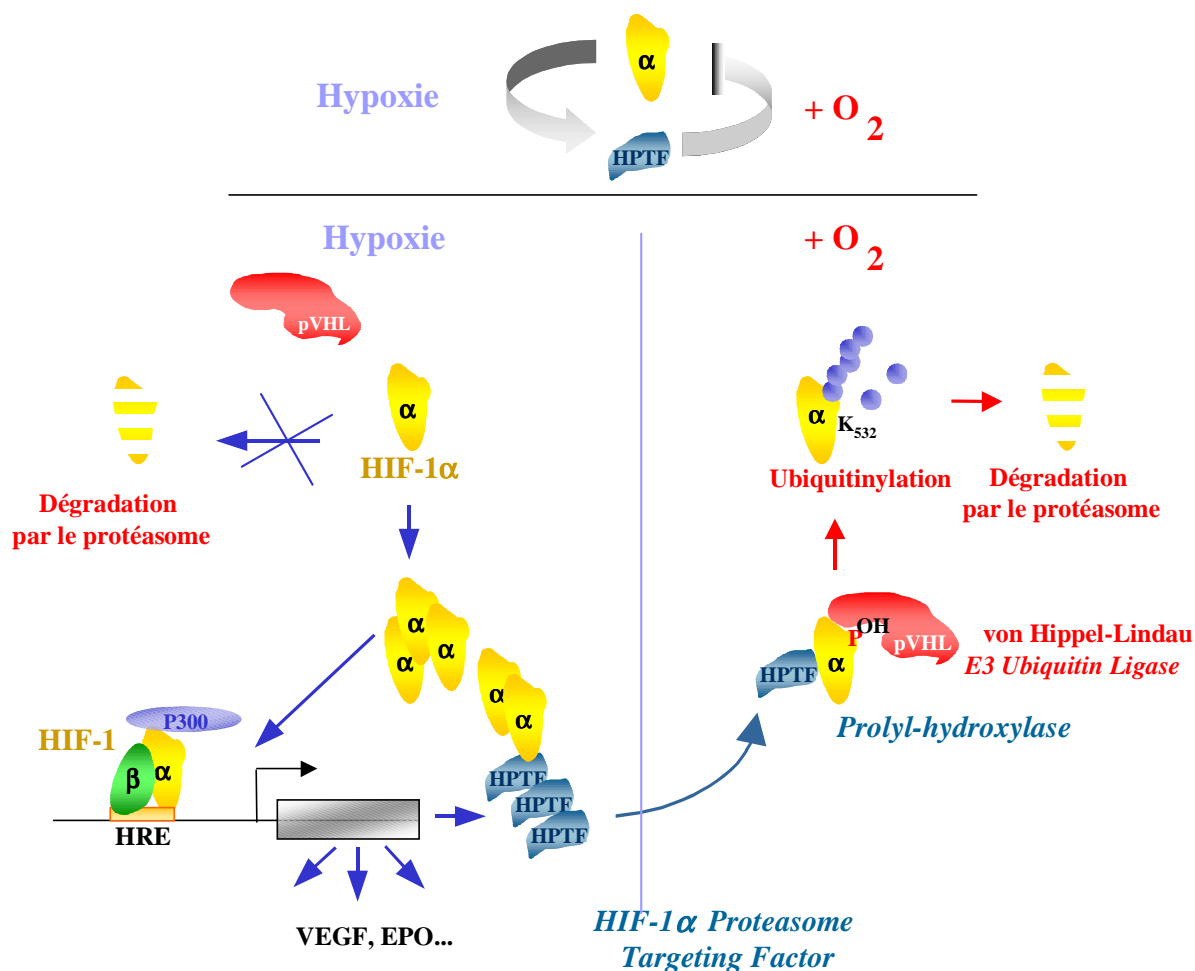


Figure 15 : Boucle de régulation de HIF-1

La figure présente la boucle de régulation du facteur HIF-1 par HPTF (HIF-1 α Proteasome Targeting Factor). En condition d'hypoxie, le HIF-1 α s'accumule et le complexe HIF-1 entraîne l'expression des gènes cibles spécifiques comme le gène du VEGF, de l'EPO, mais aussi HPTF. Ce facteur s'accumule en hypoxie et participe avec pVHL à la dégradation rapide du HIF-1 α lors du retour en normoxie (Berra *et al.*, 2001a).

2. AUTRES NIVEAUX DE REGULATION

2. 1. *Translocation nucléaire, fixation à l'ADN et transactivation*

Une fois stabilisé, HIF-1 α s'accumule dans le noyau. Cette étape est dépendante de son signal de localisation nucléaire sensible à l'hypoxie situé en position carboxy terminale. Il peut se dimériser dans ce compartiment avec ARNT1 qui est pour sa part exclusivement nucléaire (Eguchi *et al.*, 1997; Pollenz *et al.*, 1994).

La liaison avec ARNT1 entraîne un changement conformationnel de HIF-1 α nécessaire pour la fixation du dimère HIF-1 sur les éléments HRE des gènes sensibles à l'hypoxie et l'induction consécutive de la transactivation de ces derniers (Kallio *et al.*, 1997). La présence du site de fixation de HIF-1 est nécessaire mais pas suffisant pour diriger l'expression des gènes en réponse à l'hypoxie, indiquant que HIF-1 doit interagir avec d'autres facteurs de transcription liés sur des sites adjacents (Ebert and Bunn, 1998). C'est le cas du facteur nucléaire d'hépatocyte HNF4 qui se fixe sur un site adjacent du HRE du gène *epo*, mais aussi de CREB-1/ATF1 au niveau du promoteur du gène de la LDH-A, impliqués dans des complexes multiprotéiques avec HIF-1 α et p300/CBP ((Ebert and Bunn, 1998; Huang *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1999) et § II.B.2. 2. 2.). La transactivation est dirigée par les deux domaines de transactivation de HIF-1 α et celle-ci est soumise à une régulation par l'hypoxie.

L'hypoxie joue donc à plusieurs niveaux sur la sous-unité HIF-1 α : en la stabilisant, en favorisant sa translocation nucléaire et enfin en augmentant l'activité transactivatrice de ses deux domaines de transactivation.

2. 2. *Cofacteurs*

HIF-1 α interagit aussi avec de nombreux coactivateurs, l'association avec ces derniers étant dépendante des conditions d'oxygénation et de l'état redox de la cellule. La présence de partenaires cellulaires spécifiques éventuels peut par ailleurs donner lieu à une réponse à l'hypoxie tissu-spécifique. Ainsi, le récepteur nucléaire hépatique HNF4 peut participer avec HIF-1 au contrôle de l'expression de l'érythropoïétine (Galson *et al.*, 1995; Guillemain and Krasnow, 1997).

Le Tableau 2 et la Figure 12 donnent les facteurs se fixant à HIF-1 α et la localisation des domaines de fixation sur ce dernier (d'après (Semenza, 2001)). Les paragraphes qui suivent détaillent ces interactions.

Protéines	Résidus de HIF-1α
ARNT (HIF-1 β)	1-390
CBP	531-584, 786-826
HNF4	106-526
HSP90	Domaine HLH/PAS
P53	ND
P300	786-826
REF-1	531-584, 776-826
SRC-1	776-826
TIF2	ND
VHL	549-582

Tableau 2 : Cofacteurs de HIF-1 α

2. 2. 1. HSP90

HIF-1 α interagit ainsi avec la protéine chaperonne HSP90 (Gradin *et al.*, 1996), tandis que ARNT1 ne présente pas cette association (McGuire *et al.*, 1994). Le facteur HIF-2 α ne semble pas interagir avec HSP90 alors que ARNT3 en est capable soulignant encore là des différences de régulation entre les différentes isoformes des sous-unités de HIF-1 (Hogenesch *et al.*, 1997). HSP90 est nécessaire pour l'activation de HIF-1 en hypoxie. Il permet notamment, en se liant HIF-1 α en normoxie, que celui-ci adopte une conformation activable par l'hypoxie, un rôle en conformité avec son rôle de protéine chaperonne (Kallio *et al.*, 1997; Minet *et al.*, 1999). HSP-90 se fixe avec le domaine bHLH-PAS de HIF-1 α . L'interaction entre HSP90 et HIF-1 α semble bien plus faible en condition d'hypoxie, et il est possible que HSP90 se dissocie de HIF-1 α et ne cotransloque pas au noyau avec celui-ci en condition d'hypoxie (Minet *et al.*, 1999). Il est donc possible que HSP90 soit nécessaire dans les premières étapes d'activation de HIF-1 α en permettant une conformation adéquate. Il serait par la suite dissocié de HIF-1 α en condition d'hypoxie, un phénomène qui pourrait favoriser indirectement la translocation de ce dernier au noyau. Cependant, HSP90 est aussi présent au niveau nucléaire, et il est possible que ce dernier puisse être impliqué dans des étapes ultérieures de l'activation de HIF-1. C'est en effet le cas pour le récepteur AHR où HSP90 est impliqué dans la fixation de AHR à son ligand, sa dimérisation avec ARNT1 et la fixation à l'ADN (McGuire *et al.*, 1994). En ce sens, la modification de conformation de HIF-1 α par

ARNT1 dans le noyau n'a pas lieu dans le cas de l'absence d'une conformation de HIF-1 α dirigée par HSP90 (Kallio *et al.*, 1997). Il reste à déterminer si seule la conformation résultante de l'action de HSP90 au niveau du cytoplasme en est responsable ou si une nouvelle conformation dépendante de HSP90 nucléaire est nécessaire.

2. 2. 2. *p300/CBP*

La protéine nucléaire de 265 kDa CBP (*cAMP-Response Element-Binding protein (CREB)-Binding Protein*) est un coactivateur de la transactivation connu pour interagir avec un nombre important de facteurs de transcription fixant l'ADN de façon constitutive ou inductible tels que CREB, c-fos, c-jun, plusieurs récepteurs nucléaires (fixant les hormones stéroïdiennes, thyroïdiennes, les rétinoïdes et les vitamines) ou p53. CBP est très proche dans sa structure et ses caractéristiques avec la protéine cellulaire p300 initialement identifiée par sa capacité à co-immunoprécipiter avec l'oncoprotéine adénovirale E1A (Lundblad *et al.*, 1995). De ce fait, les études associent très souvent les deux facteurs en les notant p300/CBP lorsqu'elles présentent des propriétés communes (Yang *et al.*, 1996). Bien que les mécanismes qui permettent à p300/CBP de contrôler la transcription ne soient pas clairs, il est proposé que la régulation de la chromatine soit un aspect important de ce processus. En effet, p300/CBP ainsi que les facteurs P/CAF (*p300/CBP Associated Factor*) et ACTR (aussi nommé p/CIP) interagissant avec l'une ou l'autre des protéines, présentent une activité acétyltransférase sur les histones qui peuvent modifier la structure de la chromatine (Bannister and Kouzarides, 1996; Chen *et al.*, 1997b; Ogryzko *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1996). Ainsi, l'acétylation sélective des histones pourrait déstabiliser le nucléosome et faciliter l'accès de facteurs de régulation favorisant ainsi l'activation des promoteurs ciblés (Yang *et al.*, 1996).

Il est cependant possible que cette activité d'acétylation puisse intervenir à un autre niveau que les histones. Ainsi, p53, TFIIE- β (*Transcription Factor*) et la sous-unité RAP30/74 de TFIIF (*Transcription Factor*) peuvent être acétylés *in vitro* par CBP (Gu and Roeder, 1997; Imhof *et al.*, 1997). Cet effet est démontré *in vivo* dans le cas de p53, ce qui lui permet de se fixer sur des séquences d'ADN spécifiques (Gu and Roeder, 1997).

p300/CBP pourrait aussi exercer un contrôle sur la transcription à travers une interaction avec des membres de la famille des protéines d'assemblage du nucléosome (NAP pour *Nucleosome Assembly Proteins*) qui inclue NAP1, NAP2 et TAF1. Ces protéines NAP sont donc des composants importants du complexe coactivateur p300/CBP et pourraient servir

de point d'intégration entre les coactivateurs transcriptionnels et la chromatine (Shikama *et al.*, 2000).

p300/CBP interagit via un domaine situé entre les acides aminés 302-418 contenant la région C/H1 (*Cysteine /Histidine-rich region*) avec HIF-1 α et augmente la transactivation des gènes cibles ((Arany *et al.*, 1996; Kung *et al.*, 2000) et Figure 16).

Les leucines 344 et 345 et les cystéines 388 et 393 de p300 sont importantes pour l'interaction avec HIF-1 α (Gu *et al.*, 2000). Un résultat en accord avec les études signalant l'importance du motif LXXLL (L pour Leucine et X pour un acide aminé quelconque) des coactivateurs transcriptionnels (Heery *et al.*, 1997), mais aussi l'étude démontrant l'importance de ces deux cystéines dans l'interaction CBP/HIF-1 α (Newton *et al.*, 2000).

C'est au niveau du domaine de transactivation carboxy terminal (acides aminés 813-826) que p300/CBP se fixe sur HIF-1 α et cette association intervient en condition d'hypoxie (Kallio *et al.*, 1998). Cette interaction est essentielle pour l'activité de HIF-1 puisque le blocage spécifique de celle-ci par des peptides correspondants au domaine C/H1 de p300 ou au domaine C-TAD de HIF-1 α sont capables de diminuer l'expression de gènes induits par l'hypoxie et la croissance de tumeurs (Kung *et al.*, 2000).

L'interaction HIF-1 α /p300 est vraisemblablement dépendante d'une région hydrophobe riche en Leucine (L795, L818 et L822, conservées entre les espèces et HIF-2 α et essentielles pour la transactivation de HIF-1) régulée par la modification hydrophobe (-SH)/hydrophile (-S⁻) réversible de la cystéine C800 de HIF-1 α (Gu *et al.*, 2000). Cette hypothèse est en accord avec l'action du facteur réducteur Ref-1 (Carrero *et al.*, 2000; Ema *et al.*, 1999) et exclue la possibilité d'une formation de ponts disulfures entre la C800 et le domaine C/H1 de p300/CBP précédemment émise (Ema *et al.*, 1999). Les leucines décrites ci-dessus ne font pas partie du motif ⁷⁸¹RLL⁷⁸³ décrit comme crucial pour l'induction hypoxique de HIF-2 α (O'Rourke *et al.*, 1999) et §II.A.5.). Cette donnée est en accord avec la possibilité d'un mécanisme supplémentaire contribuant à l'interaction CAD/C/H1 ou à l'activité transcriptionnelle de CAD induite par l'hypoxie (Gu *et al.*, 2000).

Si CBP et p300 possèdent de nombreuses caractéristiques communes, CBP interagit aussi avec HIF-1 α au niveau des acides aminés 531-584 (au niveau du domaine de transactivation N-TAD) en plus de la région carboxy terminale ciblée par p300 (Carrero *et al.*, 2000).

p300/CBP est aussi capable de fixer l'extrémité carboxy terminale de ARNT1 via son domaine de fixation de CREB ((Kobayashi *et al.*, 1997) et Figure 16). Néanmoins, il semble que la dimérisation avec HIF-1 α supprime la capacité de ARNT1 à fixer CBP. Le mécanisme de cette régulation négative de HIF-1 α sur ARNT1 est encore inconnu ((Carrero *et al.*, 2000) et voir § II.B.2. 2. 3.).

Par ailleurs, plusieurs sites sont requis pour le recrutement de p300 au complexe hypoxique inductible dans le cas du promoteur du gène de la LDHA (Ebert and Bunn, 1998). En effet, l'intégralité de trois sites fonctionnels importants pour la régulation hypoxique est nécessaire pour une fixation de p300 de haute affinité. Cette observation a été étendue à « l'*enhancer* » de l'*epo* dont la structure est proche avec trois sites importants dont celui fixant HNF4 (Ebert and Bunn, 1998; Huang *et al.*, 1997). Dans le cas du gène de la tyrosine hydroxylase régulé par le facteur HIF-1, le site de fixation AP-1 à proximité jouait un rôle dans l'induction dépendante de l'hypoxie. Comme AP-1 est capable de fixer p300, il est vraisemblable qu'un complexe multiprotéique soit encore impliqué (Ebert and Bunn, 1998). De par les nombreux facteurs de transcription interagissant avec p300/CBP, la notion de complexe multiprotéique autour de HIF-1 doit être envisagé comme un phénomène général (Ebert and Bunn, 1998).

La nécessité d'interactions multiples pour le recrutement de p300/CBP et l'importance de ce dernier pour l'activation transcriptionnelle pourrait contribuer de façon significative dans la régulation précise et spécifique de l'expression des gènes sous hypoxie ou d'autres stimuli (Ebert and Bunn, 1998).

Une nouvelle protéine nucléaire instable, interagissant avec le domaine C/H1 de p300 et présent de façon ubiquiste, a été mise en évidence récemment et nommé p35srj (pour son domaine non classique *serine-glycine rich junction*). Il s'agit d'une forme épissée de façon alternative de MRG1 une protéine humaine aux fonctions inconnues. Cette dernière a été caractérisée initialement d'après sa similitude de séquence avec le produit d'un gène spécifique de mélanocyte MSG1 (pour *Melanocyte-Specific Gene*) (Shioda *et al.*, 1997) dont la fonction est également inconnue. MRG1 et MSG1 sont deux protéines nucléaires contenant un domaine de transactivation conservé, mais ne présentant pas de domaine de fixation à l'ADN. Récemment, il a été postulé que MRG1 et MSG1 pourraient fonctionner comme des coactivateurs pouvant se fixer à d'autres facteurs de transcription (Bhattacharya *et al.*, 1999; Glenn and Maurer, 1999; Shioda *et al.*, 1998). P35srj, MRG1 et MSG1 sont

capables de se fixer à p300. Cependant, alors que MRG1/p300 et MSG1/p300 sont impliqués dans l'activation de l'expression de gènes sous contrôle de certains facteurs de transcription (respectivement Lhx2 (Glenn and Maurer, 1999) et SMAD4 (de Caestecker *et al.*, 2000; Shioda *et al.*, 1998) p35srj est capable d'inhiber l'effet coactivateur de p300 sur HIF-1. Cela est dû à une compétition entre p35srj et le domaine C-TAD de HIF-1 α pour la fixation du domaine C/H1 de p300. Les domaines de fixation de ces deux facteurs, bien qu'étant des structures se chevauchant, sont néanmoins différents : HIF-1 α interagit avec les motifs de fixation de protéines « *zinc bundles* » de C/H1, alors que MRG1/p35srj ne nécessite pas cette région (Newton *et al.*, 2000).

De façon intéressante, p35srj est un gène régulé par HIF-1 suggérant dès lors un mécanisme de régulation par rétrocontrôle de l'activité de HIF-1 (Bhattacharya *et al.*, 1999). L'effet de p35srj affecte le domaine de transactivation C-TAD mais n'intervient pas au niveau du N-TAD (Bhattacharya *et al.*, 1999), ce qui impliquerait que l'interaction entre CBP et ce domaine de HIF-1 α possède des caractéristiques différentes qui rendent caduque l'action de p35srj.

p35srj étant lié de façon constitutive au domaine C/H1 de p300, il pourrait jouer un rôle de séquestration d'une fraction de ce coactivateur, empêchant sa liaison inappropriée à HIF-1 α , ou à d'autres facteurs fixant le domaine C/H1 (comme STAT2) (Bhattacharya *et al.*, 1999).

2. 2. 3. *SRC-1, TIF2 et REF-1*

La famille des protéines de 160 kDa, interagissant avec plusieurs membres de la famille des récepteurs nucléaires d'une manière dépendante des hormones et augmentant la transactivation, regroupe plusieurs facteurs dont TIF2 (*Transcription Intermediary Factor 2* aussi nommé GRIP1), SRC-1 (pour *Steroid-Receptor Co-activators*) et p/CIP (aussi nommé ACTR) ((Carrero *et al.*, 2000) et références cités). Deux membres de cette famille, SRC1 et TIF2, sont capables d'interagir avec HIF-1 α d'une manière dépendante de l'hypoxie et d'augmenter le potentiel de transactivation inductible sous hypoxie. SRC-1 peut produire cet effet en synergie avec CBP et la protéine de régulation redox Ref-1 est capable d'augmenter fortement cet effet, ce qui indique que ces trois protéines sont des composants importants de la voie de signalisation de l'hypoxie.

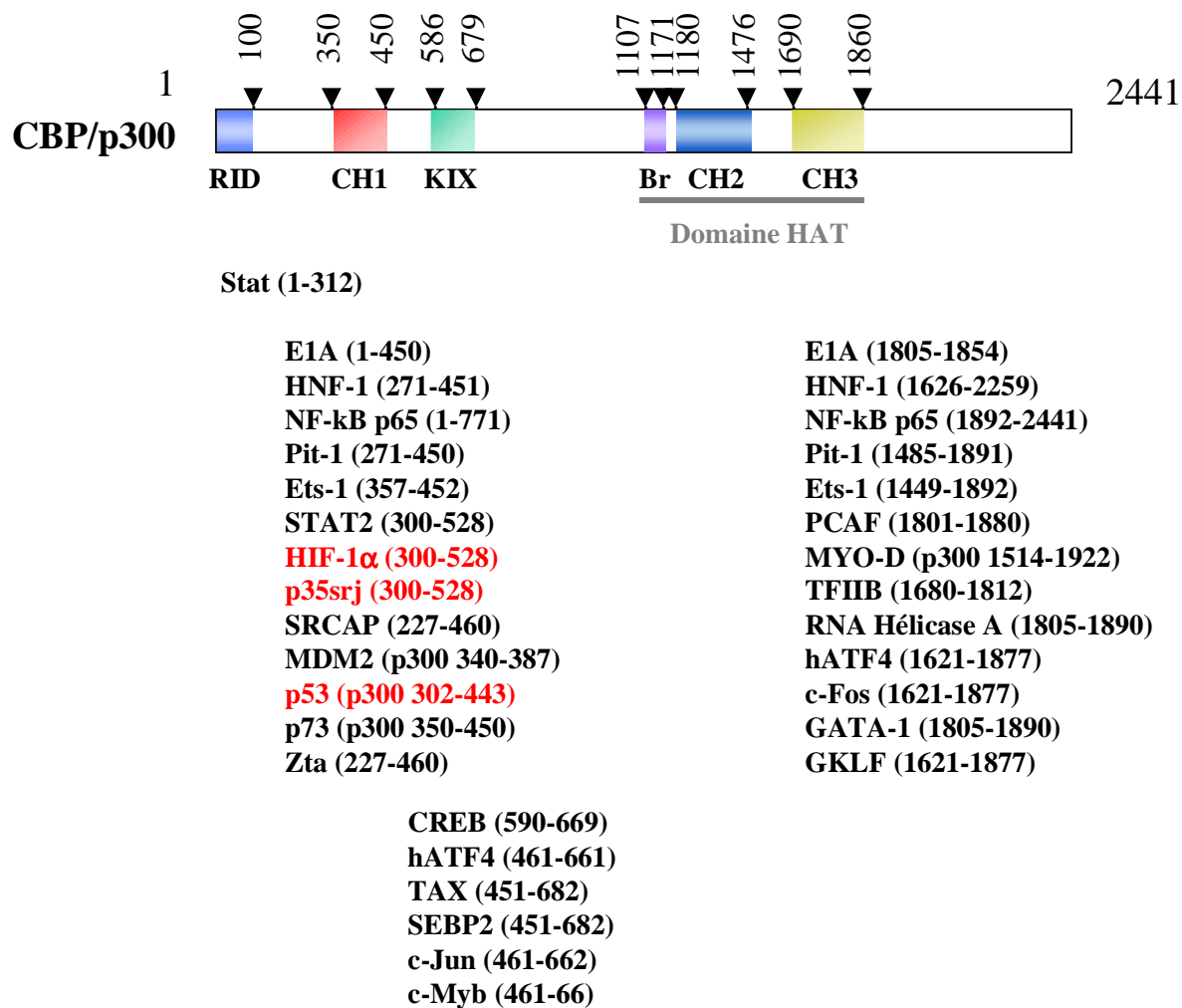


Figure 16 : Structure de CBP (p300) et sites de fixation de partenaires protéiques

Les domaines de p300/CBP, ainsi que les sites de fixations de partenaires protéiques sont identifiés. HAT : Histone AcetylTransferease). D'après (Newton *et al.*, 2000).

TIF2 est une protéine nucléaire principalement associée avec des corps nucléaires punctiformes (Voegel *et al.*, 1996) capable d'induire une relocalisation réversible de HIF-1α au sein du noyau en réponse à un signal hypoxique (Carrero *et al.*, 2000).

SRC1 et TIF2 sont des membres de la famille des protéines à domaines bHLH/PAS comme HIF-1α, cependant il est démontré que l'interaction entre HIF-1α et SRC-1 est indépendante du domaine bHLH/PAS amino terminal de ce dernier. Par ailleurs, le motif clef LXXLL important pour l'interaction de coactivateurs tels que SRC-1 et les récepteurs nucléaires (Heery *et al.*, 1997) n'intervient pas dans l'interaction entre SRC-1 et HIF-1α

(Carrero *et al.*, 2000) bien qu'il semble être impliqué dans l'interaction entre p300/CBP et HIF-1 α (voir § II.B.2. 2. 2.).

Les deux domaines de transactivation de HIF-1 α sont la cible de la régulation par SRC-1. De façon intéressante les deux régions d'acides aminés (531-584 et 786-826) sont aussi capables de fixer CBP et Ref-1. La région liant TIF-2 n'est pas encore déterminée.

La remarquable superposition des potentiels régulateurs de ces trois protéines semble indiquer un mécanisme d'action commun. SRC-1 et CBP sont capables de s'associer entre eux et de potentialiser la transactivation des récepteurs aux hormones stéroïdes (pour revue (Torchia *et al.*, 1998)). SRC-1, comme CBP, présente une activité HAT intrinsèque (*Histone Acetyl-Transferase*) (voir § II.B.2. 2. 2.). Il n'est pas possible de déterminer si l'un des membres du complexe CBP/SRC-1 en particulier est privilégié pour l'interaction avec les domaines de transactivation de HIF-1 α .

Ref-1 est capable d'augmenter l'effet de SRC-1 et de CBP au niveau de la potentialisation de la transactivation de HIF-1 α . Ref-1 est connu pour stimuler l'activité de fixation à l'ADN de nombreux facteurs de transcription incluant Fos, Jun et p53 par un mécanisme dépendant de l'état redox (Jayaraman *et al.*, 1997; Xanthoudakis *et al.*, 1992). Seul le domaine C-TAD de HIF-1 α contient des résidus cystéines, cibles éventuelles d'une réduction par Ref-1. Ref-1 augmente de façon significative l'activité de C-TAD, tandis qu'il produit qu'un très faible effet sur N-TAD en accord avec une régulation préférentielle du TAD contenant des résidus cystéines. Cependant en présence de CBP ou SRC-1, Ref-1 stimule l'activité dépendante de l'hypoxie des deux domaines de transactivation de manière spectaculaire démontrant que les deux domaines TAD sont régulés individuellement par Ref-1 (Carrero *et al.*, 2000).

Par ailleurs, ARNT1 est capable de fixer CBP (décrit précédemment) mais aussi SRC-1. La liaison ARNT1/CBP nécessite l'action d'un cofacteur dirigeant ou renforçant l'interaction entre les deux protéines qui pourrait être SRC-1 (Carrero *et al.*, 2000; Kobayashi *et al.*, 1997). Alors que l'interaction de CBP ou SRC-1 avec le dimère HIF-1 α /ARNT1 est dépendant de l'hypoxie, ces deux facteurs interagissent avec ARNT1 de façon constitutive. Néanmoins, comme discuté dans le paragraphe II.B.2. 2. 2. , il semble que la dimérisation avec HIF-1 α supprime la capacité de ARNT1 à fixer CBP ou SRC-1 par un mécanisme encore inconnu (Carrero *et al.*, 2000).

2. 2. 4. p53

Le facteur suppresseur de tumeur p53 est un facteur de transcription dont l'activité est modulée par des modifications de sa stabilité protéique et des modifications post-traductionnelles tels que les phosphorylations et l'acétylation. Le rôle critique de p53 dans la suppression de tumeur est souligné par le fait que le gène p53 est muté dans plus de 50% des cancers humains (Greenblatt *et al.*, 1994) et que des souris p53^{-/-} développent des tumeurs précocement (Donehower *et al.*, 1992). Les deux fonctions de p53 décrites intervenant dans ce rôle de suppresseur de tumeurs sont l'induction de l'arrêt du cycle cellulaire en réponse à un dommage au niveau de l'ADN, et l'induction de l'apoptose. L'hypoxie est aussi capable de moduler l'activité de p53. HIF-1 α interagit avec p53 et stabilise ce dernier (An *et al.*, 1998) mais des mécanismes autres que l'activation de HIF-1 α doivent aussi être envisagés pour l'induction de p53 dépendante de l'oxygène (Wenger *et al.*, 1998a). L'interaction HIF-1 α /p53 s'est révélée complexe avec plusieurs aspects de régulation se dégageant de cette association. Ainsi, si HIF-1 α ne présente pas d'effet sur l'activité transcriptionnelle de p53, ce dernier inhibe l'activité transcriptionnelle de HIF-1 par son interaction avec HIF-1 α . Cet effet nécessite le cofacteur p300 et un niveau d'expression de p53 plus élevé que nécessaire pour l'activité transcriptionnelle de p53 (Blagosklonny *et al.*, 1998). Cette dernière condition pourrait expliquer que cette liaison p53/p300 a lieu alors qu'elle est en désaccord avec le modèle de régulation de p53 par l'hypoxie proposé initialement par C. Koumenis *et al.* (Koumenis *et al.*, 2001). Ces derniers ont en effet proposé que l'absence de liaison entre p300 et p53 pouvait expliquer le défaut d'acétylation de ce dernier et l'absence d'induction transcriptionnelle observée, alors que la liaison de p53 avec des corepresseurs (tels que HDAC1 pour *histone deacetylase-1*) lui conférait une activité de repression de la transcription (Koumenis *et al.*, 2001).

HIF-1 α et p53 ne se fixent pas au même niveau sur p300 (voir Figure 16) laissant suggérer la formation d'un complexe tertiaire stœchiométrique entre ces trois protéines (Blagosklonny *et al.*, 1998). La fixation de p53 sur HIF-1 α entraîne par ailleurs l'ubiquitinylation de ce dernier via MDM-2 (facteur de régulation négatif de p53) et la dégradation consécutive par le protéasome ((Ravi *et al.*, 2000) et voir § II.B.1. 2.). Cet effet est en accord avec les niveaux élevés de HIF-1 α détectés dans des cellules tumorales ayant perdu p53. Cette amplification de la signalisation de HIF-1 via la perte de fonction de p53 contribue au basculement vers un phénotype angiogénique nécessaire pour la progression

tumorale. Ce phénomène est particulièrement important à la lumière du fait que p53 est muté dans plus de 50% des cancers humains comme précisé au début de ce paragraphe.

2. 3. *Modifications post-traductionnelles (phosphorylation) de HIF-1 α*

Des modifications par phosphorylation / déphosphorylation ont été proposées comme essentielles dans la voie menant à l'activation de HIF-1 (Salceda and Caro, 1997; Semenza, 1998). Wang *et al.* ont démontré que le traitement de cellules par les inhibiteurs de kinases à tyrosine (génistéine et herbimycine A), de kinases à sérine/thréonine (2-aminopurine) ou encore de phosphatases à sérine/thréonine (Fluorure de sodium) bloquait l'induction de HIF-1 α . Inversement, le traitement par l'orthovanadate de sodium, un inhibiteur de phosphatases à tyrosine, augmentait le niveau basal de HIF-1 α et son activité (Wang *et al.*, 1995b). Récemment, la Diacylglycérol Kinase (DGK) et la voie de la Phosphoinositol 3-Kinase (PI3K) ont aussi été impliquées dans l'induction de l'expression de HIF-1 α (Aragones *et al.*, 2001; Chandel *et al.*, 2000; Zhong *et al.*, 2000; Zundel *et al.*, 2000).

Cela suggère que différentes kinases et phosphatases sont impliquées dans la régulation de HIF-1 α mais cette action peut être directe ou indirecte pour maintenir l'activité de quelques composant du système.

Dans le sens d'une action indirecte, Aragones *et al.* ont montré que l'hypoxie entraîne une augmentation du second messenger lipidique diacylglycérol (DAG) dans la cellule, mais aussi d'acide phosphatidique (AP) principalement du à une augmentation de la DGK qui convertit par phosphorylation le DAG en AP. L'utilisation d'inhibiteur de l'activité de DGK, diminue la formation de AP en réponse à l'hypoxie et diminue l'accumulation de HIF-1 α , la formation consécutive du complexe fixant l'ADN HIF-1, mais aussi l'activité transcriptionnelle intrinsèque de HIF-1 α , via une inhibition de l'activité de ses deux domaines de transactivation. Ces résultats démontrent l'implication de cette kinase de lipide dans la signalisation intracellulaire amenant l'activation de HIF-1. Neuf DGKs sont connues à l'heure actuelle et classées en 5 familles différentes. La DGK impliquée dans ce phénomène n'est pas caractérisée, mais compte tenu de la spécificité de l'inhibiteur utilisé (R59949) fait vraisemblablement partie de la classe 1 des DGKs (Aragones *et al.*, 2001). Des études supplémentaires sont nécessaires pour définir la liaison entre la molécule AP et les modifications postraductionnelles de HIF-1 α nécessaires à son activation.

Notre laboratoire a récemment démontré que HIF-1 α était hautement phosphorylé *in vivo* (Richard *et al.*, 1999). Cette phosphorylation entraîne des modifications importantes dans le profil de migration de la protéine confirmant les hypothèses de modifications post-traductionnelles déjà émises (Wang *et al.*, 1995a). Les différentes bandes de migration de HIF-1 α sont donc dues à des niveaux variables de phosphorylation. Cependant, ces changements de masse moléculaire induits par phosphorylation sont indépendants de l'hypoxie puisque pouvant être observés en normoxie dans le cas de surexpression de la protéine (Jiang *et al.*, 1996; Richard *et al.*, 1999). Cela suggère donc que la phosphorylation de HIF-1 α a lieu dès que la protéine est produite dans la cellule, mais des phosphorylations additionnelles pourraient encore avoir lieu dans la réponse à l'hypoxie pour induire l'activation complète de HIF-1.

Les p42/p44 MAPKs sont capables de phosphoryler HIF-1 α , de reproduire ce profil électrophorétique et d'augmenter son activité transactivatrice, tandis que p38 MAPK et JNK ne présentent aucun de ces effets (Richard *et al.*, 1999). Néanmoins il semble que p38 puisse aussi phosphoryler HIF-1 α dans le cas d'un récepteur GPCR (pour *G protein-coupled receptor*) constitutif actif codé par le virus d'herpes associé au sarcome de Kaposi (KSHV pour *Kaposi's sarcoma-associated herpes virus*). Il en résulte une augmentation de l'activité transcriptionnelle de HIF-1 α , une augmentation de l'expression du VEGF consécutive et donc une stimulation de l'angiogenèse (Sodhi *et al.*, 2000). ARNT1 ne présente pas de modification du profil de migration sur gel en présence de p42 MAPK activée, ce qui suggère que le partenaire de HIF-1 α ne subit pas les mêmes modifications que ce dernier et renforce la spécificité de p42/p44 MAPKs sur la phosphorylation de HIF-1 α . Néanmoins, l'action des MAPKs ne modifie pas la stabilité de HIF-1 α , ni sa dimérisation avec ARNT1 ou encore la fixation du dimère sur l'ADN. Cependant, une modification de l'interaction de ce dernier avec la machinerie transcriptionnelle, ou avec d'autres cofacteurs liant le complexe pourrait expliquer l'effet de ces kinases sur l'activité transcriptionnelle. Des études supplémentaires sont nécessaires pour éclaircir cette action. Par ailleurs, à l'heure actuelle, les sites phosphorylés par ces kinases sur HIF-1 α ne sont pas encore déterminés (deux sites consensus PXSP en position 515 et 687 sur le HIF-1 α humain, n'étant pas impliqués, puisque la mutation ponctuelle de ces sites ne modifient pas le profil de migration) (Richard *et al.*, 1999).

Sutter *et al.* ont montré récemment que la sérine 551 et la thréonine 552, conservés chez l'Homme et la Souris au niveau des deux isoformes HIF-1 α et HIF-2 α , sont des résidus nécessaires pour la régulation de l'expression de HIF-1 α . Le mutant S551G/T552A présente en effet une ubiquitinylation moins marquée que la forme sauvage et une stabilisation consécutive en condition de normoxie. Cependant, les auteurs n'ont pu démontrer une (dé)phosphorylation régulée par l'hypoxie de ces deux sites (Sutter *et al.*, 2000).

Ainsi, s'il est clair que la phosphorylation de HIF-1 α est importante au niveau de la stabilité ou de l'activité de ce facteur, les mécanismes par lesquels ce type de modifications postraductionnelles a lieu, notamment le lien avec l'hypoxie, restent à caractériser.

2. 4. Protéines apparentées et isoformes issues d'épissage alternatifs

Les autres membres de la famille bHLH/PAS, pouvant fixer ARNT1 (AHR, SIM...), peuvent détourner cette protéine de sa fonction dans la réponse à l'hypoxie. Des phénomènes de compétition entre des protéines à domaine bHLH/PAS de différentes voies de signalisation peuvent ainsi avoir lieu et rendre plus complexe la signalisation cellulaire. Dans ce sens, Gradin *et al.* ont démontré une interférence entre la voie de l'hypoxie et celle de la dioxine impliquant respectivement les dimère HIF-1 α /ARNT1 et AHR/ARNT1 (Gradin *et al.*, 1996). Dans ce cas de figure cependant, la compétition est en faveur du complexe HIF-1 puisque HIF-1 α présente une meilleure affinité que AHR pour ARNT1 et est capable d'inhiber l'induction dépendante du ligand de l'activité de fixation à l'ADN de AHR ainsi que sa fonction sur des gènes rapporteurs. A l'inverse, l'activation de AHR n'empêche pas l'induction de gènes dépendante de HIF-1. Néanmoins, il est concevable de considérer que de par la présence de multiples partenaires de ARNT1 (pouvant présenter des affinité similaire ou meilleure que celle d'HIF-1 α) et suivant les conditions, des interférences ont lieu. Par ailleurs, la présence d'isoformes de HIF-1 α récemment découvertes (HIF-2 α , HIF-3 α) mais aussi d'autres partenaires potentiels pour HIF-1 α (ARNT2 et ARNT3) laisse envisager d'autres dimères fonctionnels pouvant également interférer avec la voie centrale de la réponse cellulaire à l'hypoxie.

Dans le cas de HIF-1, mais aussi plus généralement pour les membres de la famille des protéines à domaine bHLH/PAS, plusieurs cas d'épissages alternatifs sont décrits (se reporter aux § I.B et § II.A.3.). Les isoformes résultantes de ces épissages donnent lieu à des protéines

possédant une structure très proche de la molécule sauvage et qui peuvent interférer avec cette dernière pour moduler la signalisation (cf. publication 1 et §IV.A).

3. INDUCTION NON HYPOXIQUE DE HIF-1

Bien le l'hypoxie soit le facteur majoritaire d'induction de HIF-1 α au niveau des cellules, d'autres stimuli, tels que l'insuline, l'IGF 1 et 2 (*Insulin-like Growth Factor*), l'EGF (*Epidermal Growth Factor*) ou le FGF (*Fibroblast Growth Factor*), sont capables d'augmenter le niveau de ce facteur de transcription dans certains types cellulaires (Feldser *et al.*, 1999; Zelzer *et al.*, 1998; Zhong *et al.*, 2000). Une activation consécutive de gènes contrôlés par des HRE tels que le *vegf*^{*}, *glut 1 et 3*^{*}, *alda*^{*}, *pgk*^{*} (Zelzer *et al.*, 1998). Dans des cellules musculaires lisses vasculaires (VSMC), HIF-1 α est fortement augmenté en condition de normoxie par des agonistes de récepteurs membranaires (Angiotensine II, Thrombine, et PDGF (*Platelet Derived Growth Factor*)) est capable d'induire aussi la formation du VEGF (Brogi *et al.*, 1994; Richard *et al.*, 2000; Williams *et al.*, 1995).

Une voie indépendante de l'hypoxie est donc aussi capable d'induire la formation du complexe HIF-1 fonctionnel et ce par un mécanisme dépendant également de la stabilisation de HIF-1 α . La corrélation entre l'induction de gènes impliqués dans le transport du glucose ou de la glycolyse par l'hypoxie mais aussi par l'insuline via les mêmes éléments (HIF-1 α et ARNT1), laisse penser que ces derniers sont aussi essentiels pour l'activation de gènes nécessaires pour fournir à la cellule l'énergie requise dans des conditions de normoxie (Zelzer *et al.*, 1998). De façon intéressante, l'augmentation de HIF-1 α dans les VSMC est dépendante de la production de molécules oxygénées réactives (ROS pour *Reactive Oxygene Species*). Cette voie, pour l'instant spécifique de ces cellules, pourrait jouer un rôle clef dans la production du VEGF en normoxie et donc induire la perméabilité des vaisseaux en phase d'inflammation (Richard *et al.*, 2000).

Par ailleurs, l'oxyde nitrique (NO), qui joue un rôle important dans l'homéostasie de l'oxygène chez la Drosophile (Wingrove and O'Farrell, 1999), présente un rôle paradoxal d'induire le HIF-1 α dans des conditions de normoxie mais aussi d'inhiber l'expression du HIF-1 α induite par l'hypoxie (Kimura *et al.*, 2000; Palmer *et al.*, 2000) expliquant la

* : Se reporter au Tableau 1 : Gènes régulés au niveau transcriptionnel par HIF-1, donnant toutes les significations des abréviations.

suppression par le NO de la réponse cellulaire contrôlée par le HIF-1 déjà observé préalablement (Liu *et al.*, 1998; Sogawa *et al.*, 1998). L'action d'inhibition de l'expression du HIF-1 α par le NO, mais aussi par le monoxyde de Carbone (CO) passe par une déstabilisation de l'ODD. Ces deux molécules ont aussi une action d'inhibition du TAD en position carboxy terminale (Huang *et al.*, 1999).

C. LE DETECTEUR D'OXYGENE CELLULAIRE : HIF-PH

Comme présenté dans le chapitre B.1. 1. , certaines observations réalisées sur les propriétés d'association entre pVHL et HIF-1 α , semblaient démontrer que l'hypoxie ne modifiait pas cette association tandis que le cobalt et la DFO dissociaient le complexe (Maxwell *et al.*, 1999). Ce résultat suggérait dès lors une différence entre le mécanisme de régulation physiologique de HIF-1 et les effets pharmacologiques. Cependant, l'interaction pVHL/HIF-1 α détectée en condition d'hypoxie est en réalité artéfactuelle et due aux conditions de lyse utilisées (normoxie) permettant une réassociation rapide entre les deux protéines *in vitro*. L'équipe de P.J. Ratcliffe et celle de W.G. Kaelin Jr ont dès lors démontré que l'oxygène et la disponibilité du fer modifiaient de la même manière l'interaction pVHL/HIF-1 α . Ainsi, en condition d'hypoxie, en présence de cobalt ou de DFO, l'interaction est faible tandis qu'en condition de normoxie ou lors d'un traitement au fer, celle-ci devient très marquée.

pVHL reconnaît une forme modifiée de HIF-1 α et la modification ne peut être reproduite que par un facteur dépendant du fer, de l'oxygène et retrouvé dans des extraits cellulaires de vertébrés. La modification a lieu au sein de l'ODD dans la zone restreinte de 15 acides aminés (557-571) responsable de la stabilisation sous hypoxie des protéines HIF- α (Srinivas *et al.*, 1999). Il s'agit d'une hydroxylation sur la Proline 564. La mutation de cet acide aminé empêche totalement l'interaction entre pVHL et HIF-1 α . Les acides aminés Leu562 et Tyr565 sont aussi importants, mais seraient impliqués pour faciliter l'hydroxylation de P564 (Ivan *et al.*, 2001; Jaakkola *et al.*, 2001). Il est probable que la Ser551 et la Thr552 affectant le phénomène d'ubiquitinylation pourrait avoir un rôle similaire ((Sutter *et al.*, 2000) et § 2. 3.).

Ces résultats sont en accord avec les observations préliminaires ayant démontré le rôle important du triplet PYI pour la liaison pVHL/HIF-1 α (Tanimoto *et al.*, 2000) et § II.B.1.).

Ainsi l'activité enzymatique permettant l'interaction entre pVHL et HIF-1 α en condition de normoxie et en présence de fer est une hydroxylase à proline dénommée HIF-PH pour *HIF- α Prolyl-Hydroxylase*. Toutes les PHs (*Prolyl-4 Hydroxylase*) actuellement connues font partie de la superfamille des dioxygénases dépendante du 2-oxoglutarate ou apparentées et nécessitent impérativement du fer(II) comme cofacteur et le dioxygène comme cosubstrat. Les études structurales des dioxygénases ont permis de démontrer un centre ferrique non hémique coordonné par un motif HXD/E...H. Le fer(II) peut être facilement ôté par des agents chélateurs et l'activité enzymatique inhibée par la substitution du fer(II) par du Co(II) ou du Ni(II) ((Jaakkola *et al.*, 2001) et références cités). L'ascorbate est capable d'induire l'activité de HIF-PH tandis que des analogues du 2-oxoglutarate peuvent inhiber celle-ci, des résultats en accord avec l'effet de ces composants sur les PHs. Plusieurs éléments semblent montrer que HIF-PH est une nouvelle PH. En effet, le motif du HIF-1 ne ressemble pas aux motifs connus des cibles naturelles ou synthétiques des PHs. Par ailleurs la plupart de ces enzymes sont associées avec le réticulum endoplasmique tandis que le HIF-1 α est intracellulaire et les PHs de type I ou II qui modifient le collagène au niveau des séquences répétées (Pro-Pro-Gly) $_n$ n'affectent pas la Proline 564 de HIF-1 α (Jaakkola *et al.*, 2001). Des études supplémentaires sont donc nécessaires pour isoler et caractériser cette enzyme.

Le complexe multiprotéique VBC (*pVHL - Elongin B et C*) appartient à la classe SCF (*Skp1 - Cul-1 - F-box protein*), des ligases à ubiquitine avec pVHL agissant comme un composant de reconnaissance de substrat apparenté aux protéines F-Box. Ces dernières reconnaissent un motif phosphorylé. pVHL reconnaît lui un motif à proline hydroxylée. Il sera important de déterminer si pVHL possède d'autre cibles et si ces dernières contiennent aussi un tel motif.

Enfin, si HIF-PH est un bon candidat pour le détecteur cellulaire de l'hypoxie, il existe néanmoins de nombreuses observations impliquant dans la détection de l'oxygène les ROS, des phénomènes de phosphorylation, et éventuellement des nitrosylations. De façon concevable, ces changements pourraient modifier directement ou indirectement l'hydroxylation du HIF-1 α . Mais d'autres protéines pourraient aussi servir de détecteurs d'oxygène et être impliquées dans la détection de l'oxygène. Le chapitre suivant fait le point sur ce qui est connu à ce sujet.

D. AUTRES CANDIDATS DANS LA DETECTION DE L'OXYGENE ET MECANISMES MIS EN ŒUVRES

Initialement, quatre modèles de mécanisme de détection de l'oxygène existaient pour expliquer la réponse transcriptionnelle à l'hypoxie ((Semenza, 1999) et Figure 17). Deux des modèles impliquaient une unité contenant du fer sous forme d'un groupement hémique ou d'un cluster soufre/fer subissant une modification d'activité en hypoxie et déclenchant la réponse transcriptionnelle. Deux autres modèles impliquent la génération de ROS par une NAD(P)H oxydase ou par la mitochondrie. Enfin, d'autres études ont aussi suggéré que des canaux ioniques pourraient changer la conductance en fonction de la pression en oxygène, leur permettant de signaler l'hypoxie (pour revues (Chandel and Schumacker, 2000; Wenger, 2000)).

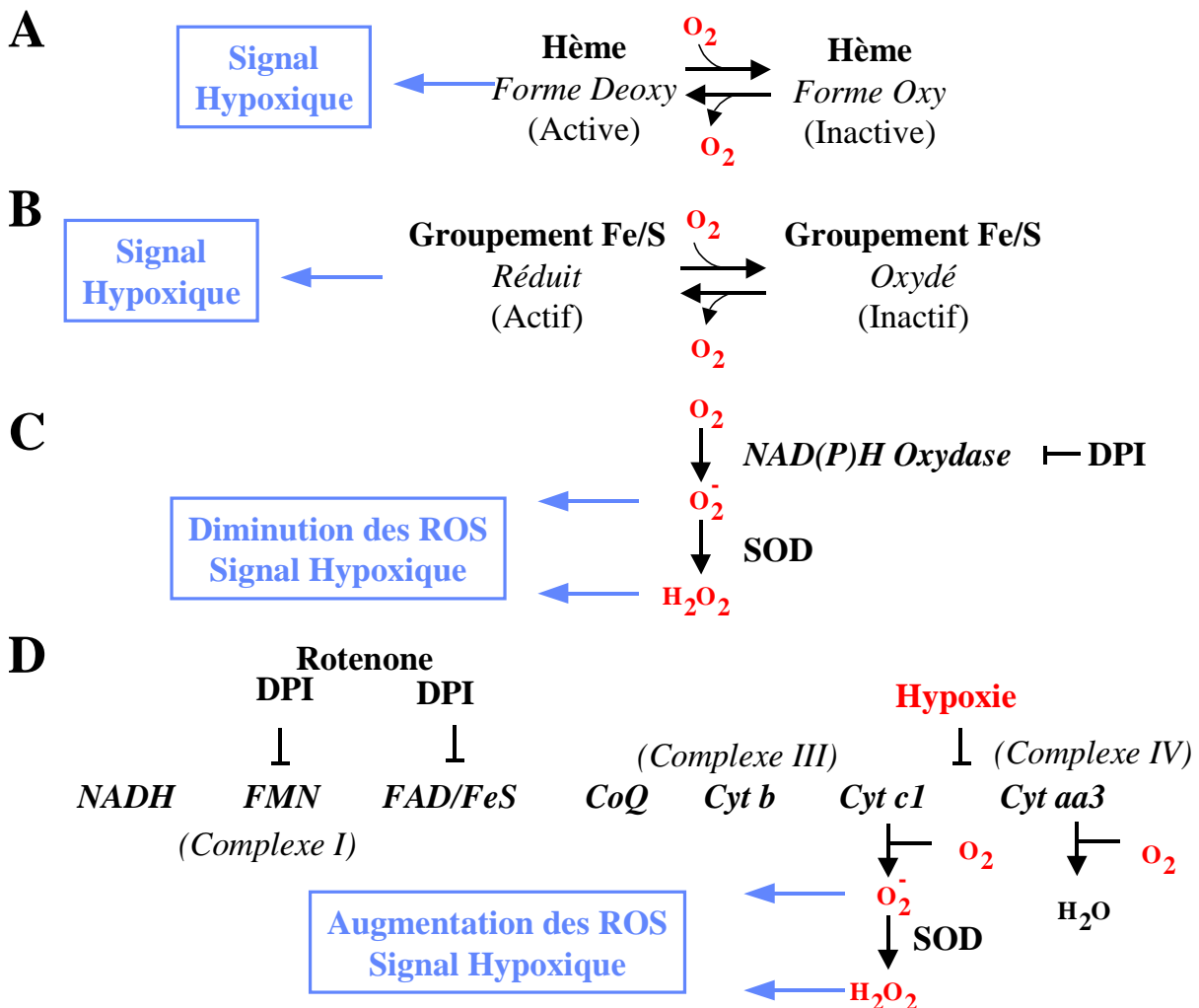


Figure 17 : Modèle de mécanismes de détection de l'oxygène

- A. L'activité du détecteur hémique est déterminée par l'absence ou la présence d'O₂ lié.
- B. L'activité du détecteur protéique contenant un groupement fer/soufre est déterminée par son état d'oxydation.
- C. Les ROS générés par des NAD(P)H oxydases sont directement liées à la concentration en O₂, et la diminution des ROS cytosoliques signale une hypoxie.
- D. L'hypoxie inhibe l'activité de la cytochrome oxydase Cyt aa3, entraînant l'augmentation de la formation de ROS mitochondriales. DPI (Diphenylène Iodonium) est un inhibiteur des flavoprotéines, incluant les NAD(P)H oxydases et le complexe I, alors que la Rotenone est un inhibiteur spécifique de ce dernier. D'après (Semenza, 1999).

1. DETECTEURS POTENTIELS

1. 1. *Le Complexe Cytochrome b558/NADPH oxydase*

Un des détecteurs possibles le plus cité est le complexe cytochrome b558/NADPH oxydase qui génère des superoxydes dans la membrane plasmique des phagocytes et des lymphocytes B. Les sous-unités de ce complexe sont aussi retrouvées dans de nombreuses cellules non immunocytaires (pour revue : (Wenger, 2000)). Ainsi, Acker *et al.* ont émis l'hypothèse selon laquelle ce complexe serait un détecteur d'oxygène (Acker, 1994). Néanmoins, des lignées cellulaires issues de patients souffrant de granulomatose chronique, une maladie héréditaire où l'une des sous-unité du complexe cytochrome b558/NADPH oxydase est défective, présentent une expression normale des gènes régulés par l'oxygène indiquant que ce complexe n'est probablement pas le détecteur universel (Wenger *et al.*, 1996a). Par ailleurs, bien que le Diphenylène Iodonium (DPI), un inhibiteur des NAD(P)H oxydases (et d'autres flavoprotéines) stimulent la dépolarisation des carotides et des corps neurophysio-épithéliaux comme attendu dans le modèle, il inhibe l'induction de HIF-1 et les gènes en aval en réponse à l'hypoxie (Gleadle *et al.*, 1995), un effet opposé à celui attendu (voir aussi le paragraphe II.D.2.). Ainsi, les données sont plus en accord avec un rôle de la NAD(P)H oxydase dans la dépolarisation induite par l'hypoxie des chémorécepteurs (Semenza, 1999).

1. 2. *Oxydoréductases à Flavoprotéine*

Le fait que les composés iodonium inhibent l'induction de l'*epo* et d'autres gènes par l'hypoxie, et compte tenu du fait que ces composants sont des inhibiteurs des flavoprotéines activées, il est possible que ces oxydoréductases soient impliquées dans la détection de

l'oxygène. De façon intéressante, ces composés ne bloquent pas l'induction par le cobalt et la DFO de ces gènes reflétant une différence dans le mécanisme de ces différents stimuli (Gleadle *et al.*, 1995). Cependant des contradictions existent dans la littérature sur l'action de ces composés (pour revue : (Wenger, 2000)). Comme les flavoprotéines sont souvent liées à des protéines hémiques des systèmes de transport d'électrons, il est possible que l'interaction de l'oxygène avec ce système puisse être la base d'un mécanisme de détection. Récemment, une cytochrome b5/b5 réductase (b5/b5R) cytosolique a été identifiée. La flavoprotéine b5/b5R humaine est une oxydoréductase à NAD(P)H, capable de produire des superoxydes en présence d'O₂ et de NAD(P)H et de réduire le cytochrome c *in vitro*. Ces propriétés en font un candidat plausible pour un détecteur d'oxygène (Zhu *et al.*, 1999).

1. 3. Les Cytochromes de la mitochondrie

Un autre candidat potentiel est le principal organe consommateur d'oxygène de la cellule : la mitochondrie. Cependant, de par le fait que le cyanure de potassium (un bloqueur de la chaîne du transport d'électrons respiratoire) ne puisse pas induire l'expression de l'*epo*, l'idée que la mitochondrie soit en tant que telle, le détecteur d'oxygène fut rapidement exclue (Goldberg *et al.*, 1988; Tan and Ratcliffe, 1991).

Cependant, les cytochromes c oxydase et a3 pourraient constituer des détecteurs d'oxygène (respectivement (Chandel *et al.*, 1997) et (Lahiri *et al.*, 1995; Wilson *et al.*, 1994)). De façon intéressante, la déplétion des cellules Hep3B de l'ADN mitochondrial (cellules p°, déficientes dans l'activité de transport d'électron) et le traitement avec plusieurs inhibiteurs bloquent l'induction de gènes régulés par l'oxygène et l'augmentation de ROS détectée en réponse à l'hypoxie. Les cellules p° conservent cependant la capacité d'augmenter les ROS et d'induction de ces gènes en réponse au cobalt. Enfin, des antioxydants bloquent l'activation transcriptionnelle de ces gènes durant l'hypoxie ou un traitement au cobalt des cellules sauvages et bloquent la réponse du cobalt dans les cellules p°. Ces résultats suggèrent que l'hypoxie active la transcription via une signalisation dépendante de la mitochondrie impliquant l'augmentation des ROS tandis que le cobalt active la transcription en stimulant la genèse de ROS en normoxie par un mécanisme indépendant de la mitochondrie. Le site de genèse des ROS en hypoxie serait le complexe III et les ROS seraient nécessaires et suffisantes pour activer la signalisation résultant dans la stabilisation de HIF-1α ((Chandel *et al.*, 1998; Chandel *et al.*, 2000) et § II.D.2.). Néanmoins, le fait que le cyanure de potassium n'interfère pas avec l'induction hypoxique de HIF-1α et la caractérisation nouvelle du

détecteur HIF-PH font que le rôle exact de la mitochondrie - et du complexe III en particulier - dans la détection de l'oxygène reste à éclaircir.

1. 4. Autres possibilités de détecteurs

La guanylate cyclase et le cytochrome P450, produisant respectivement du GMPc (Guanosine Mono Phosphate cyclique) et du 20-HETE (acide HydroxyEicosaTetraEnoïque) ont aussi été proposés comme détecteur d'oxygène (Harder *et al.*, 1996; Taylor *et al.*, 1998). Dans le premier cas, l'hypoxie et le cobalt sont capables d'inhiber la guanylate cyclase et la formation de GMPc au niveau de cellules épithéliales. La diminution pharmacologique (LY83583) de ce second messenger est capable d'inhiber une activité induite par l'hypoxie (la sécrétion de Cl^- stimulée par l'AMPc (Adénosine Mono Phosphate cyclique)), tandis qu'une élévation de GMPc (via le *8-bromo-cGMP* ou le *dibutyryl-cGMP*) restaure cette activité. Dans le cas du cytochrome P450, des antagonistes modulent l'expression de l'erythropoïétine (Fandrey *et al.*, 1990), mais l'implication du cytochrome P450 n'a pas pu être confirmée par spectrophotométrie (Ehleben *et al.*, 1998).

2. LES ROS : SECOND MESSAGERS DE L'HYPOXIE ?

Les ROS sont connues pour comme des transducteurs de signal dans plusieurs systèmes. Comme l'oxygène est le principal composant de ces molécules, il semble logique de considérer que leur concentration est dépendante de la concentration environnante en oxygène. Fandrey *et al.* ont décrit une relation étroite entre l'oxygène, le peroxyde d'hydrogène et le taux de production d'EPO dans des cellules d'hépatome (Fandrey *et al.*, 1994). La séquestration du peroxyde d'hydrogène est capable de mimer l'hypoxie (Canbolat *et al.*, 1998) et l'addition de peroxyde d'hydrogène inhibe l'induction hypoxique de l'EPO, ce dernier effet pouvant être bloqué par le cobalt ou la chélation du fer (Fandrey *et al.*, 1997; Fandrey *et al.*, 1994). Ce modèle est compatible avec le fait que certains antioxydants sont capables de mimer induction hypoxique de HIF-1 α dans des conditions de normoxie (pour revue (Wenger, 2000)).

Les enzymes générant des ROS comme le complexe cytochrome b558/NAD(P)H oxydase ou la cytochrome b5/b5R sont proposées comme sources de superoxydes qui sont rapidement converties en peroxyde par la SOD (*SuperOxyde Dismutase*). En condition d'hypoxie, la diminution en oxygène se traduirait par une diminution de superoxydes. Ehleben *et al.* ont montré que le cobalt et la DFO diminuaient aussi la concentration d' H_2O_2 ,

un effet passant vraisemblablement par une augmentation de l'activité de la glutathion peroxydase dans le cas du cobalt (Ehleben *et al.*, 1997). Par ailleurs, Acker *et al.* ont suggéré un site de réaction de Fenton (réduction non-enzymatique du peroxyde d'hydrogène en anion hydroxyl et en radical hydroxyl réactif par oxydation du fer ferreux) dans des granules cytosoliques périnucléaires contenant de forte concentration en fer (Kietzmann *et al.*, 1998; Porwol *et al.*, 1998). Ce modèle présente l'intérêt de séparer les sites d'action de l'oxygène et les effets du cobalt et des chélateurs de fer pouvant dès lors expliquer certaines différences observées entre ces agents. En accord avec cette hypothèse, les radicaux hydroxyls sont capables d'inhiber le HIF-1 α en normoxie, tandis que la diminution des radicaux en hypoxie n'affecte plus le facteur de transcription. La protéine régulatrice du fer IRP-2 (*Iron Regulatory Protein 2*) suit un tel mécanisme puisqu'elle est oxydée de façon dépendante de l'oxygène, ubiquitinylée et dégradée par le protéasome (Iwai *et al.*, 1998). Cependant, la dégradation de IRP2 est dépendante d'oxygène, de fer et est inhibée par les ions cobalt, cette protéine n'est pas un substrat de pVHL, démontrant ici une limite dans l'analogie entre ces deux facteurs (Cockman *et al.*, 2000).

D'un autre côté, l'hypoxie est capable d'augmenter la formation de ROS dans des cardiomyocytes. Des antioxydants bloquant cette augmentation et l'inhibition induite par l'hypoxie de la contraction des cardiomyocytes. La cytochrome oxydase c mitochondriale pourrait être le détecteur d'oxygène à la base de cette production de ROS en hypoxie dans les cardiomyocytes et les hépatocytes (respectivement (Budinger *et al.*, 1998; Chandel *et al.*, 1997)). Le site de genèse des ROS en hypoxie serait le complexe III comme vu précédemment. En effet, en condition d'hypoxie, la réduction de l'O₂ en H₂O par la cytochrome oxydase c du complexe IV est inhibée, ce qui entraîne une libération d'électron en aval au niveau du complexe III, et la genèse d'O₂⁻ et de H₂O₂ via la SOD (*SuperOxyde Dismutase*) (Semenza, 1999). Les ROS permettent l'activation hypoxique de HIF-1 en activant la signalisation résultant dans la stabilisation de HIF-1 α (Chandel *et al.*, 1998; Chandel *et al.*, 2000). En accord avec cela, le DPI inhibant le transport d'électron au niveau du complexe I à flavine mitochondrial (cf. Figure 17), bloque l'augmentation de ROS et l'activation sous jacente du HIF-1 α .

Dans tous les cas, s'il est clair que les ROS affectent la réponse à l'hypoxie, il n'en demeure pas moins qu'il n'existe pas de règle établie en ce qui concerne l'augmentation ou la diminution de ROS à la suite de l'hypoxie (les études réalisées avec différentes sondes fluorescentes mesurant les ROS ayant donné des résultats supportant les différents modèles

(Chandel *et al.*, 1998; Ehleben *et al.*, 1998)) Des expériences supplémentaires seront nécessaires pour clarifier le rôle des ROS.

E. PERSPECTIVES DANS LA VOIE DE DETECTION DE L'OXYGENE

Les mécanismes par lesquels les variations d'oxygène sont détectées au niveau cellulaire sont demeurés très longtemps inconnus. En fait, jusqu'aux articles très récents sur l'implication de la HIF-PH (Ivan *et al.*, 2001; Jaakkola *et al.*, 2001) seules des hypothèses étaient émises pour expliquer les différentes observations expérimentales. Si la découverte de l'implication d'une Proline Hydroxylase est une avancée majeure pour la compréhension de la voie de la réponse à l'hypoxie, il reste encore à isoler l'enzyme et à étudier ses propriétés, ce qui permettra notamment de savoir si seules les protéines HIF- α sont les cibles de l'enzyme ou si d'autres substrats suivent la même voie. HPTF, décrit précédemment, pourrait s'avérer être en réalité le détecteur HIF-PH, une hypothèse testée actuellement dans notre laboratoire (cf. Figure 15 et §IV.B).

Par ailleurs, si les effets du cobalt et de la DFO sont expliqués par leur action au niveau de la formation du complexe pVHL/HIF-1 α , plusieurs observations expérimentales concernant notamment les ROS restent à éclaircir. D'autres détecteurs à l'oxygène sont-ils aussi impliqués ou les ROS ont-elles une action de coopération sur la voie de l'hypoxie ? Les phénomènes de phosphorylation étant essentiels dans la signalisation de HIF-1, à quels niveaux interviennent-ils et quelles sont les kinases/phosphatases responsables de la régulation de l'activité de HIF-1. Existe-t-il aussi d'autres facteurs intermédiaires ?

L'approche empirique par analogie avec des systèmes déjà connus (cytochromes), et les limites pharmacologiques rencontrées (qui jusqu'à peu ne suffisaient pas pour trancher définitivement sur la nature du détecteur) font que seule une approche par la génétique semble adéquate pour identifier clairement les protagonistes et décortiquer entièrement la voie de signalisation de l'hypoxie.

Une première approche consistant à faire exprimer dans des cellules des marqueurs de surface en hypoxie à l'aide de constructions sous contrôle d'éléments de réponse à l'hypoxie, a permis d'isoler plusieurs mutants exprimant faiblement ou pas le marqueur de surface. Un seul s'est révélé positif et correspondait à une mutation pour HIF-1 α (Wood *et al.*, 1998). Dans l'étude menée, aucun autre élément de la voie de l'hypoxie n'a pu être découvert. Notre

laboratoire développe actuellement une approche similaire, mais basée cette fois sur une sélection négative. L'objectif est de faire exprimer dans des lignées cellulaires des constructions cytotatiques ou cytotoxiques sous dépendance de HRE. Des clones cellulaires résistants devront présenter des mutations au niveau de la voie de signalisation de HIF-1. Une étude de ces mutants devrait nous permettre de caractériser notamment la Proline hydroxylase spécifique de HIF- α et éventuellement d'autres intermédiaires de la voie de l'hypoxie (cf. Publication 2 - § III.B).

Par ailleurs, les cellules tumorales situées au sein des tumeurs solides étant très souvent extrêmement résistantes à la radiothérapie, l'efficacité de tels vecteurs portant des gènes cytotatiques ou cytolytiques capables d'être activés par l'hypoxie sont des outils thérapeutiques potentiels (cf. § IV.C). Une expérience similaire réalisée par Ruan *et al.* à notamment déjà permis de montrer que l'expression régulée par l'hypoxie d'une protéine toxique (protéine apoptotique bax sous dépendance de HRE) était possible dans des cellules tumorales de cerveau (U-87 MG et U-251 MG-NCI) et entraînait la mort par apoptose sous anoxie des cellules transfectées (Ruan *et al.*, 1999).

RESULTATS

III - RESULTATS

PUBLICATION 1 - IDENTIFICATION D'ISOFORMES RESULTANT D'EPISSAGES ALTERNATIFS DU HIF-1 α HUMAIN

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Vol. 275, No. 10, Issue of March 10, pp. 6922–6927, 2000

Emmanuel Gothié, Darren E. Richard, Edurne Berra , Gilles Pagès, and Jacques Pouyssegur

PUBLICATION 2 - CONSTRUCTION ET CARACTERISATION D'UN VECTEUR CYTOSTATIQUE DEPENDANT DE L'HYPOXIE DEVELOPPE POUR L'ETUDE DE LA VOIE DE SIGNALISATION DU HIF-1 α

Avant Soumission de l'Article

Emmanuel Gothié, Danielle Roux, David Busti, Edurne Berra, Gilles Pagès and Jacques Pouyssegur

III. RESULTATS

A. PUBLICATION 1 - IDENTIFICATION D'ISOFORMES RESULTANT D'EPISSAGES ALTERNATIFS DU HIF-1 α HUMAIN

Identification of Alternative Spliced Variants of Human Hypoxia-inducible Factor-1 α

Emmanuel Gothié, Darren E. Richard, Edurne Berra, Gilles Pagès et Jacques Pouyssegur

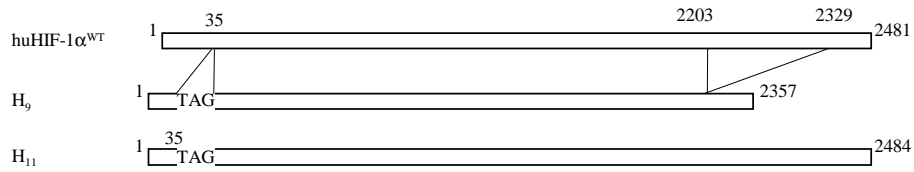
1. CONTEXTE

Pour débiter mon travail au laboratoire et étudier le facteur HIF-1 récemment caractérisé, il m'a fallu développer plusieurs outils. Les études rapides menées sur les ARNm de HIF-1 par Northern blot montrèrent l'absence de régulation sous hypoxie des transcrits des deux sous-unités, un résultat allant à l'encontre de ce qui était alors publié (Wang *et al.*, 1995a), mais confirmé rapidement par les articles sortant au même moment (Huang *et al.*, 1996). La régulation semblait donc plutôt se situer au niveau des protéines. Afin de pouvoir étudier la régulation post-traductionnelle du facteur de transcription HIF-1, il était nécessaire de disposer des ADNc des deux sous-unités clonés. J'ai donc réalisé le clonage par RT-PCR des ADNc de HIF-1 humain en utilisant des amorces déduites de la forme murine du HIF-1 α (seule disponible sur les bases de données à l'époque) et de la forme humaine du HIF-1 β (isoforme 789 AA). C'est lors de cette étape que j'ai isolé deux clones d'ADNc supplémentaires pour le HIF-1 α . J'ai alors débuté leur analyse afin de les caractériser.

2. RESUME DE L'ARTICLE

Les analyses par RT-PCR et séquençage des deux ADNc supplémentaires ont révélé que le premier clone présente trois paires de bases supplémentaires entre les exons 1 et 2. Le second clone présente en plus de cette modification l'absence de 127 pb correspondant à l'exon 14 du HIF-1 α sauvage (cf. Figure 18).

A



B

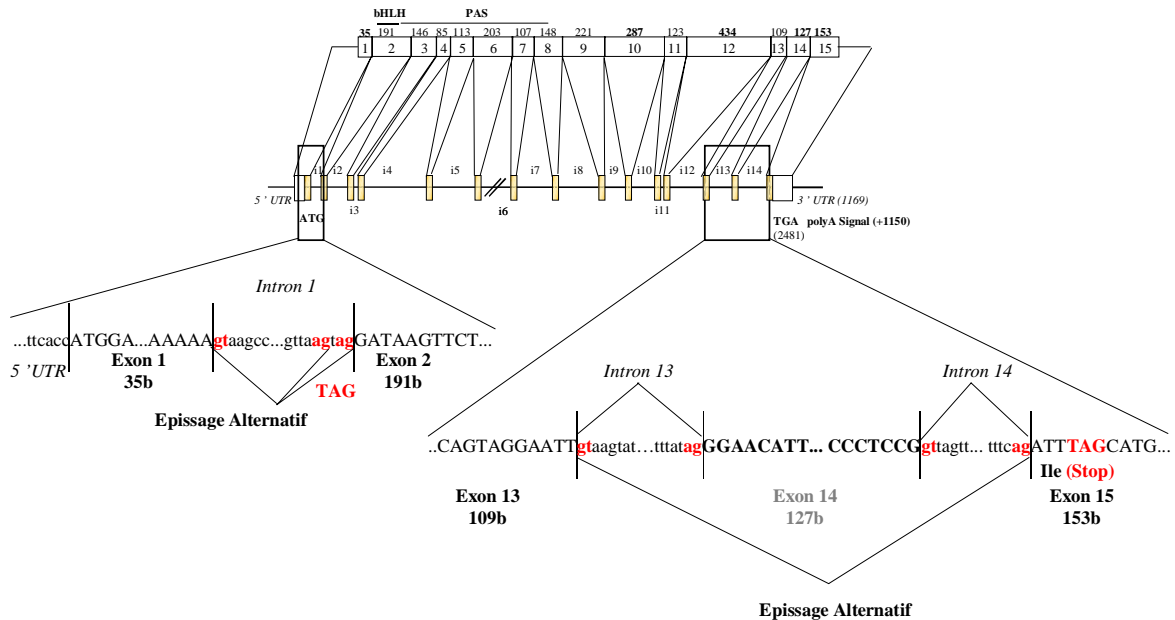


Figure 18 : Clonage des isoformes du HIF-1α Humain.

A. Représentation schématique des clones d'ADNc de HIF-1α isolés durant le clonage par RT-PCR des sous-unités du HIF-1 à partir des cellules HEK 293. Les différences de séquences avec le HIF-1α humain sont représentées : H11 est comparable au HIF-1α sauvage excepté l'addition de 3 paires de bases (TAG), 32 nucléotides en aval du codon ATG. H9 possède une différence supplémentaire dans son extrémité 3' (délétion de 127pb).

B. Représentation schématique du gène humain hif-1α (d'après (Iyer *et al.*, 1998a)). Les zones correspondant aux modifications observées sont indiquées. L'addition du TAG est juste située entre les exons 1 et 2, et la délétion de 127pb correspond à l'exon 14.

L'addition du TAG modifie deux acides aminés en amont du domaine bHLH (remplacement de la Lys12 en Asn12 et ajout d'une arg13). L'absence de l'exon 14 produit un déphasage du cadre de lecture et introduit un codon stop après une Ile735 générant ainsi une forme courte du HIF-1α. La totalité de la structure du HIF-1α est conservée si ce n'est le

domaine TAD carboxy terminal (CAD) et une partie du domaine ID qui disparaissent (cf. Figure 19).

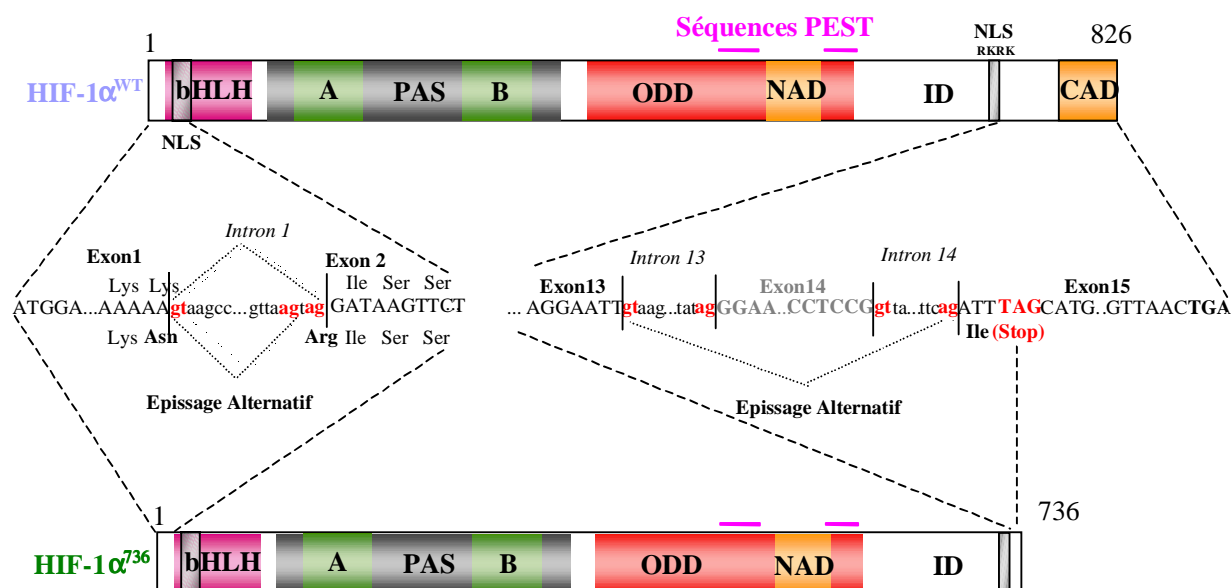


Figure 19 : Prédiction de structure des isoformes du HIF-1 α

L'addition des nucléotides TAG modifie la séquence codante en changeant la Lys12 en Asn12 et en ajoutant une Arg13. La disparition de l'exon 14 introduit un décalage du cadre de lecture et introduit un codon stop dans la séquence codante juste après l'Ile735. En tenant compte de ces deux modifications présentées par la construction dérivée du clone H₉, nous avons décidé de nommer cette isoforme HIF-1 α ⁷³⁶. La protéine attendue pour la construction dérivée du clone H₁₁, comportant uniquement l'addition des trois nucléotides TAG, a été nommée HIF-1 α ⁸²⁷ (non représentée).

Nous nous sommes principalement intéressés à cette dernière isoforme et nous avons entrepris des expériences pour la caractériser.

Nous avons ainsi démontré que l'ARNm de cette forme courte est présent dans plusieurs lignées cellulaires (293, HeLa, HepG2), dans des fibroblastes de peau humaine, mais apparemment pas chez les Rongeurs.

En transfection transitoire dans les HEK 293, la protéine correspondante de 736 acides aminés (HIF-1 α ⁷³⁶) est régulée par l'hypoxie d'une manière similaire à la forme longue de HIF-1 α (HIF-1 α ^{FL}). Les deux protéines recombinantes HIF-1 α ⁷³⁶ et HIF-1 α ^{FL} dimérisent avec HIF-1 β /ARNT et activent le promoteur du VEGF sous hypoxie. Cependant, l'isoforme courte est trois fois moins active que HIF-1 α ^{FL}, un résultat en accord avec l'absence du

domaine de transactivation carboxy terminal CAD. De façon prévisible, l'isoforme HIF-1 α ⁷³⁶ fait compétition pour la réponse à l'hypoxie avec la forme endogène ou transfectée de HIF-1 α ^{FL}.

L'ensemble de ces résultats, suggèrent que l'isoforme HIF-1 α ⁷³⁶ module l'expression de gènes sous hypoxie.

Identification of Alternative Spliced Variants of Human Hypoxia-inducible Factor-1 α *

(Received for publication, October 12, 1999)

Emmanuel Gothié[‡], Darren E. Richard[§], Edurne Berra[¶], Gilles Pagès, and Jacques Pouyssegur

From the Institute of Signaling, Developmental Biology and Cancer Research, CNRS UMR 6543, Centre Antoine Lacassagne, 33 Avenue Valombrose, 06189 Nice, France

Mammalian cells are able to sense oxygen and regulate a number of genes in response to hypoxia. The transcription factor Hypoxia Inducible Factor-1 (HIF-1) was identified as an important key component of the hypoxia signaling pathway. HIF-1 is a heterodimer composed of two members of the basic helix-loop-helix transcription factor superfamily containing a PAS (PER-ARNT-SIM) domain: HIF-1 α and HIF-1 β /ARNT. During the cloning by reverse transcriptase-polymerase chain reaction of the human HIF-1 α subunit, we isolated two cDNA clones which corresponded to alternative splicing of the *HIF-1 α* gene. Polymerase chain reaction analysis and sequencing revealed that both clones possessed three additional base pairs between exons 1 and 2. Also, one of them lacked 127 base pairs corresponding to exon 14. We demonstrate that the mRNA of this truncated form is expressed in several human cells lines and human skin but apparently not in rodents. When transfected in HEK 293 cells, the corresponding 736 amino acid protein (HIF-1 α ⁷³⁶) is regulated by hypoxia in a similar manner as the full-length HIF-1 α (HIF-1 α ^{FL}). In luciferase transfection assays, both recombinant proteins HIF-1 α ⁷³⁶ and HIF-1 α ^{FL} dimerize with HIF-1 β /ARNT and activate the VEGF promoter upon hypoxia. However, the shorter HIF-1 α isoform is 3-fold less active than HIF-1 α ^{FL}, a result consistent with the lack of the C-terminal transactivation domain. As expected, this small isoform can compete with the endogenous and transfected full-length HIF-1 α . Altogether, these results suggest that the HIF-1 α ⁷³⁶ isoform modulates gene expression upon hypoxia.

Hypoxia Inducible Factor-1 (HIF-1)¹ is a transcriptional complex identified as an important key component of the signaling pathway. HIF-1 is a heterodimer composed of two proteins, HIF-1 α and HIF-1 β /ARNT (1). These proteins are members of the basic helix-loop-helix transcription factor

superfamily containing a PAS (PER-ARNT-SIM) domain (2). Recently, an increasing number of closely related proteins were found, HIF-2 α (also termed EPAS1 (3), MOP2 (4), HLF (5), HRF (6)) and HIF-3 α /MOP7 (7), for the α subunit; ARNT2 (8) and ARNT3 (9) (also termed MOP3 (10), BMAL1 (11)), in the case of HIF-1 β /ARNT1.

Several putative dimers could be implicated in multiple physiological responses according to the responsive element targeted. Thus, Hogenesh *et al.* (10) suggest that HIF-1 α /ARNT3 complexes may have a distinct subset of hypoxia response elements because ARNT3 binds a GTGA half-site compared with the GTGG sequence in the consensus hypoxia response elements. Moreover, it was shown that EPAS1/HIF-2 α is able to specifically activate *Tie-2* reporter gene, whereas HIF-1 α does not (3).

In addition, the presence of alternative spliced forms previously reported for ARNT1 (12, 13) and HIF-1 α (14–16) increases the possibility of combination between the different partners and the putative different biological activities. In the case of HIF-1 α , splicing events were only described in mouse with alternative translation initiation (17) and alternative splicing within exon 10 (15), which are unlikely to occur in humans according to the analysis undertaken by Iyer *et al.* (18).

Here, we identified for the first time two new isoforms of human HIF-1 α that result from alternative splicing. The first difference with the previously cloned HIF-1 α is present in the two clones at the exon 1–2 junction where three nucleotides, TAG, are added involving a difference of two amino acids upstream of the bHLH domain. The second difference concerning one clone is the lack of exon 14, which gives a shorter form of HIF-1 α . In this report, we analyzed the properties of this last isoform compared with HIF-1 α .

MATERIALS AND METHODS

Cell Culture—HeLa, HepG2, and HEK 293 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 7.5% (except HeLa, 5%) inactivated fetal calf serum, penicillin (50 units/ml), and streptomycin (50 μ g/ml) (Life Technologies, Inc.) in a CO₂ incubator (5% CO₂) at 37 °C. The established Chinese hamster lung fibroblast cell line CCL39 was cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium containing 7.5% fetal calf serum. Hypoxic conditions were attained by incubation of the cells in a sealed "Bug-Box" anaerobic workstation (Ruskin Technologies, Leeds, UK/Jouan, Saint Herblain, France). The oxygen in this workstation was maintained at 1–2% with the residual gas mixture being 93–94% nitrogen, 5% carbon dioxide.

Human HIF-1 Subunits Cloning and Plasmids Constructions—The hemagglutinin (HA)-tagged HIF-1 α and HIF-1 β were cloned by RT-PCR. Briefly, mRNA was extracted from hypoxic HEK 293 cells with the use of the mRNA Isolation Kit (Roche Molecular Biochemicals) and reverse transcribed using the Expand Reverse Transcriptase System (Roche Molecular Biochemicals). HIF-1 α and HIF-1 β were amplified with the Expand High Fidelity PCR System (Roche Molecular Biochemicals) using the following primers: sense, 5'-ATGGAGGGCGCCG-GCGGCGAG-3', and antisense, 5'-GTTAACTTGATCCAAAGCTCTGA-G-3' for HIF-1 α ; and sense, 5'-ATGGCGGCGACTACTGCCAACCC-3', and antisense, 5'-TTCTGAAAAGGGGGGAAAC-3' for HIF-1 β .

* This work was supported by grants from the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Le Ministère de la Recherche (ACC-SV9), La Ligue Nationale Contre le Cancer, l'Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC), and the European Community (contract B104-CT97-2071). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

[‡] Recipient of a scholarship from CNRS and Roussel Uclaf and to whom correspondence should be addressed. Tel.: 33-4 92 03 12 38; Fax: 33-4 92 03 12 25; E-mail: gothie@unice.fr.

[§] Supported by a fellowship from ELF-Aquitaine.

[¶] Recipient of a fellowship from the Human Frontier Science Program.

¹ The abbreviations used are: HIF-1, hypoxia-inducible factor-1 α ; HA, hemagglutinin; RT-PCR, reverse transcriptase-polymerase chain reaction; bp, base pair(s); TAD, transactivation domain; ID, inhibitory domain.

Conditions for PCR amplification were: 35 cycles with 30 s at 95 °C, 1 min at 55 °C, 2.5 min at 72 °C, and a last cycle of elongation at 72 °C for 10 min. Blunt-ended fragments were 3' A-tailed with *Taq* DNA polymerase, purified, and ligated into the PCR fragment cloning vector pTag (Ingenuis-R&D Systems).

To construct the HA-tagged form of HIF-1 α and HIF-1 β , a new PCR reaction was performed using the pTag constructions as templates and the same sense (initiation codons ATG were mutated to GAG) and antisense primers (containing a *Sma*I and a *Xba*I restriction site, respectively) previously utilized. The PCR products were digested with *Sma*I and *Xba*I and subcloned into the pECE/HA expression vector (19). Finally, the two tagged forms were subcloned into the pcDNA3 expression vector (Invitrogen). The complete sequence was verified by Eurogentec (Liège, Belgium).

The luciferase reporter plasmid used in these experiments was kindly provided by Dr. Werner Risau (20) and consists in the original VEGF promoter (+54/-1176) coupled to the luciferase gene reporter (21).

RT-PCR—mRNA was extracted from different cell lines (rabbit kidney cells and Huvec cells were kindly provided by Drs. L. Counillon and V. Vouret (University of Nice), respectively) or tissues with the mRNA Isolation Kit (Roche Molecular Biochemicals) and reverse transcribed using the Expand Reverse Transcriptase System (Roche Molecular Biochemicals). 3'-end of HIF-1 α was amplified with the Expand High Fidelity PCR System (Roche Molecular Biochemicals) using the primers: sense, 5'-GTCGGACAGCCTCACCAACAGAGC-3', and antisense, 5'-GTTAACTTGATCCAAAGCTCTGAG-3'. Total RNA of human skin fibroblasts was kindly provided by Dr. M. P. Simon (University of Nice). PCR fragments were analyzed on 1% agarose gel stained with ethidium bromide.

The relative expression of the HIF-1 α isoforms containing the additional TAG base pairs was determined by RT-PCR on several mRNA using the following primers: sense, 5'-¹³GGCGGCGGACGACAAG-AAA³³-3', and antisense, 5'-¹³⁴GGCAACTGATGAGCAAGCTCATA-A¹¹¹-3'. PCR products were run on a 7.5% polyacrylamide gel, stained with ethidium bromide, and revealed under UV light.

Immunoprecipitation—Subconfluent HEK 293 cells on 100-mm culture dishes were transfected with 10 μ g of either pcDNA3, HIF-1 α ⁷³⁶, or HIF-1 α ⁸²⁷ by the calcium phosphate method. 48 h post-transfection, cells were incubated under normoxia (20% O₂) or hypoxia (1% O₂) for 4 h and then lysed in lysis buffer (0.1% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM sodium fluoride, 40 mM β -glycerophosphate, 200 μ M sodium orthovanadate, 5 μ g/ml aprotinin, 0.7 μ g/ml pepstatin, 0.5 μ g/ml leupeptin, and 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride). Protein concentration was determined with the BCA assay (Pierce). 800 μ g of protein was immunoprecipitated with mouse monoclonal anti-HA antibody (from BabCO, Richmond, CA) for 1 h at 4 °C and used for Western blot analysis.

Nuclear Extracts Purification—Crude nuclear purification was performed as follows. After washing, cells were scrapped in cold phosphate-buffered saline with protease inhibitors (5 μ g/ml aprotinin, 5 μ g/ml pepstatin, 5 μ g/ml leupeptin, and 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride) and then lysed with HNB buffer (0.5 M sucrose, 15 mM Tris-HCl (pH 7.5), 60 mM KCl, 0.25 mM EDTA, 0.125 mM EGTA, 0.5 mM Spermidin, 1 mM dithiothreitol, protease inhibitors, and 0.4% Nonidet P-40). Nuclei were washed twice with the same buffer without Nonidet P-40, and Laemmli buffer was added prior to electrophoresis.

Immunoblot Analysis—Total cellular extracts (50 μ g), nuclear extracts (50 μ g), or immunoprecipitated proteins were resolved in SDS-polyacrylamide (7.5%) gels, transferred onto a polyvinylidene difluoride membrane (Immobilon-P; Millipore) and incubated with the specific antibodies: mouse anti-HIF-1 α NB100-105 antibody against amino acids 432-528 of HIF-1 α (Novus Biologicals, Inc., Littleton, CO) or rabbit anti-HIF-1 α antiserum 2087 (22) against the last 20 amino acids of the C-terminal end of human HIF-1 α . Horseradish peroxidase-coupled anti-mouse and anti-rabbit antibody were from Promega. The bands were visualized with the ECL system (Amersham Pharmacia Biotech).

Luciferase Assays—HEK 293 cells in 12-well plates (2 \times 10⁵ cells/well) were transiently transfected by CaPO₄ precipitation. Generally, 200 ng/well of reporter plasmid were used along with the indicated concentrations of expression vector, 100 ng/well cytomegalovirus β -galactosidase as a control for transfection efficiency and the empty vector, pcDNA3, to normalize the total DNA amount (2 μ g/well). Cells were stimulated for 20 h and washed twice with cold phosphate-buffered saline, and luciferase assays were performed as described previously (22). Results were quantified with a MicroBeta TRILUX luminescence counter (Wallac) and expressed as the -fold induction over control cells.

Control cells were only transfected with the cytomegalovirus β -galactosidase and the reporter plasmid. Each condition was performed in triplicate and data represent mean \pm S.E. values. Fig. 4, A and B, are representative of at least two experiments. For the experiment with quantification of HIF-1 α expression, 6-well plates (5 \times 10⁵ cells/well) were used, and 1 well served for the Western blot analysis. Lysis and immunoblot analysis were performed as described above except that 35 μ g of total cellular extracts was used.

RESULTS

Human HIF-1 α Isoforms Cloning—During the cloning of HIF-1 α from HEK 293 cells by RT-PCR, we isolated two cDNA clones (named H₉ and H₁₁, Fig. 1A). Restriction analysis and sequencing revealed that H₁₁ was similar to the previously cloned HIF-1 α (2) except the addition of three base pairs (TAG) 32 nucleotides downstream the initiation ATG codon. Clone H₉ contained the additional TAG but also lacked 127 bp at the 3'-end as compared with the wild type HIF-1 α . The analysis of the human HIF-1 α gene structure (Fig. 1B, from Iyer *et al.* (18)) showed that the three base pairs, TAG, are located at the exon 1 and 2 junction, and the 127-bp lacking fragment corresponded to exon 14. It was therefore highly possible that these differences corresponded to alternative splicing.

Expression of HIF-1 α Isoforms mRNA—The relative expression of the different isoforms of HIF-1 α was analyzed by RT-PCR in different cell lines using primers flanking the spliced regions. Two PCR fragments corresponding to the expected length of the isoforms with (125 bp) or without (122 bp) TAG adjunction were obtained. Results shown in Fig. 2A demonstrated that there are some differences in the level of expression of the two isoforms depending on the cell lines. In HEK 293, HepG2, and human skin fibroblasts, the major HIF-1 α isoform does not contain the additional TAG. However in CCL39 cells, the major HIF-1 α form appears to contain the TAG addition. In HeLa cells, both isoforms are present at similar levels.

Expression of HIF-1 α isoform lacking the exon 14 was also analyzed by RT-PCR using the appropriate primers (see "Materials and Methods" and Fig. 2B). Two PCR products corresponding to the expected length with the exon (487 bp) and without (350 bp) were obtained in several human cell lines (HEK 293, Huvec, HeLa, HepG2), in human skin fibroblasts but not in Chinese Hamster lung fibroblast (CCL39), primary cultures of rabbit kidney cells, or different mouse tissues, where only the full-length isoform was detected. The specificity of the amplified fragments was verified by Southern blot analysis (data not shown) with a full-length HIF-1 α as a probe. The two fragments which corresponded to the short and the long HIF-1 α isoforms in HEK 293 sample were then cloned into the pTag vector and partially sequenced. We thus corroborated that the 127-bp lacking fragment corresponds to exon 14.

The approximate ratio between the two isoforms was estimated by successive dilution of the RT-PCR product (Fig. 2C). In HEK 293 cells, the shortest form of HIF-1 α (lacking the exon 14) was expressed 10-fold less than the full-length HIF-1 α .

Structure Prediction and Expression of HIF-1 α Isoforms—The addition of TAG nucleotides changes the coding sequence and modifies the Lys¹² by Asn¹² and adds an Arg¹³ (Fig. 3A). The expected protein contains 827 amino acids compared with the 826 amino acids for the previously cloned form. The construct derived from H₁₁ clone containing the TAG modification was thus named HIF-1 α ⁸²⁷. It is clear that in cells expressing the two forms of HIF-1 α , with or without TAG, analysis by Western blot does not allow discrimination of the two isoforms, and the signal would thus correspond to a mixture of both. We thus decided to gather these isoforms under the term of HIF-1 α full-length (HIF-1 α ^{FL}).

The lack of exon 14 produces a frameshift and introduces a

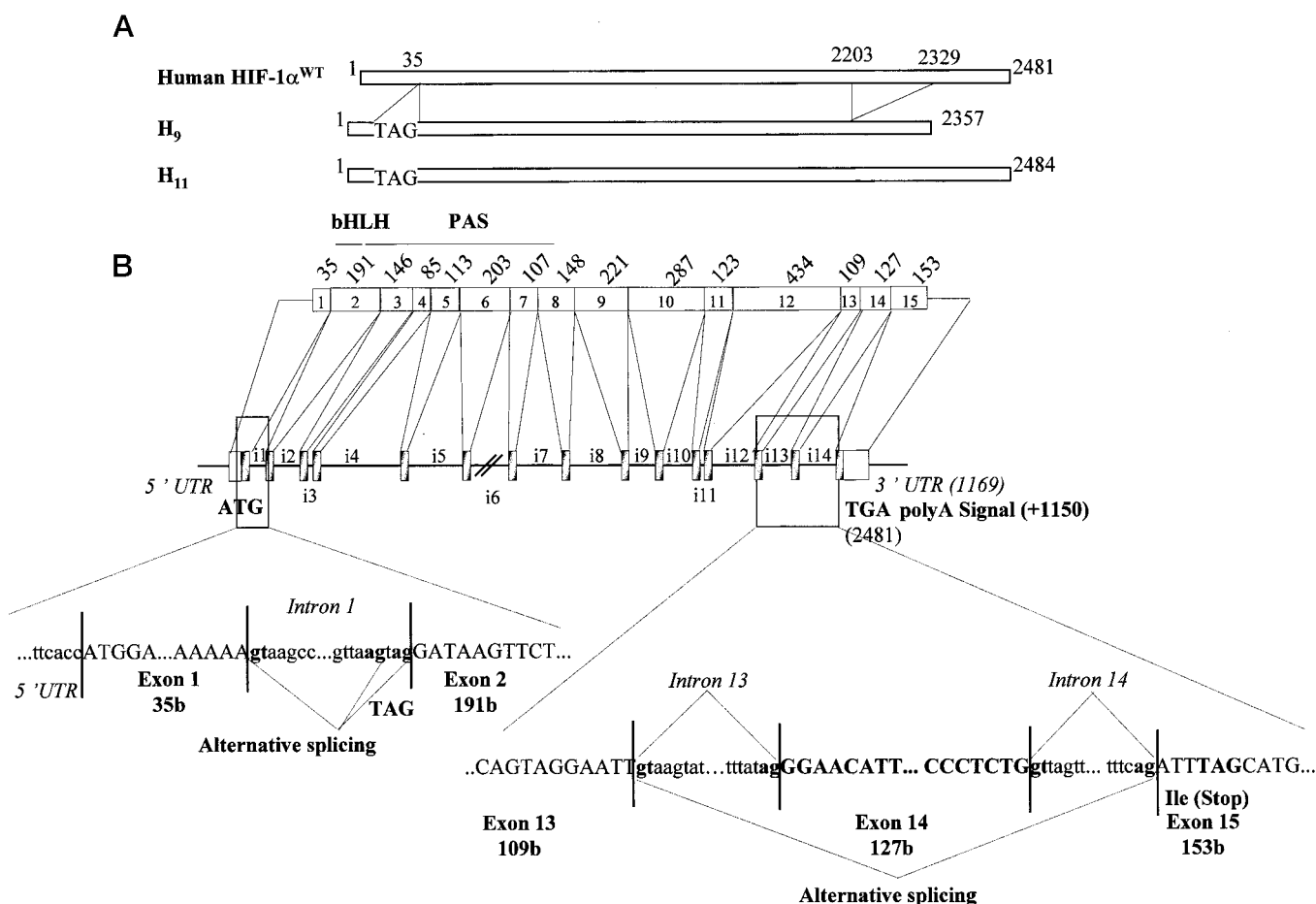


FIG. 1. Cloning of human HIF-1 α isoforms. A, schematic representation of cDNA clones isolated during RT-PCR cloning of the human HIF-1 α subunit from HEK 293 cells. Differences with the previously cloned human HIF-1 α are represented: H₁₁ was similar to the wild type HIF-1 α except for an additional three base pairs (TAG), 32 nucleotides downstream of the ATG codon. H₉ has an additional difference in the 3'-end, lacking 127 bp as compared with wild type HIF-1 α . B, schematic representation of the human HIF-1 α gene structure (from Iyer *et al.* (18)). Areas corresponding to the modifications observed are indicated. The addition of TAG was just between exon 1 and 2, and the 127-bp lacking fragment corresponded to exon 14.

stop codon in the coding sequence after an Ile⁷³⁵ (Fig. 3A). The expected protein contains 735 amino acids compared with the 826 amino acids for the wild-type form. The construct derived from H₉ clone, referred to here as HIF-1 α ⁷³⁶ (according to the two modifications presented), conserves all the structure except the removal of the C terminus Transactivation Domain (TAD) and a part of the Inhibitory Domain (ID).

To study the migration pattern of the two isoforms, we first compared the *in vitro* translated proteins (Fig. 3B). As expected, HIF-1 α ⁷³⁶ migrates at a lower molecular weight than HIF-1 α ⁸²⁷. When both isoforms were transfected in HEK 293 cells, immunoprecipitated with anti-HA antibody, and resolved on SDS-PAGE gel (Fig. 3C, lanes 8, 9, 18, and 19), they both migrated as a doublet. Recently, results from our laboratory have clearly demonstrated that this doublet is due at least in part to phosphorylation by p42/p44 MAPK (22). HIF-1 α ⁸²⁷ shows a molecular mass of around 104–116 kDa, similar to the expression profile of wild type HIF-1 α , while HIF-1 α ⁷³⁶ migrates at 94–103 kDa.

Finally, we wanted to evaluate the expression of the endogenous exon 14 spliced variant protein in human cells. Thus, nuclear extracts from HeLa and HEK 293 were immunoblotted with two different antibodies: NB100–105 (Fig. 3C, lanes 11–19) and HIF-1 α 2087 (Fig. 3C, lanes 1–9), directed against the central region and the C-terminal end of HIF-1 α , respectively. Immunoprecipitated proteins from transfected HEK 293 cells were used as positive control. In contrast, nuclear extracts from

CCL39 cells in which the truncated form has not been detected by RT-PCR were used as negative control. Results from Fig. 3C show that NB100–105 antibody specifically recognizes a band in extracts from HeLa cells upon hypoxia at the expected size (see Fig. 3C, lanes 4 and 14).

Transcriptional Activity of HIF-1 α ⁷³⁶ on the VEGF Gene Promoter—The existence of another form of HIF-1 α raises the question of the functionality of these proteins. We first investigated the effect of the isoform resulting from exon 14 splicing (HIF-1 α ⁷³⁶) on the transcription of VEGF gene. To be sure that the effects observed were because of the truncation of the C-terminal extremity and not to the modifications resulting from the addition of the TAG to the exon 1–2 junction, we transfected the HIF-1 α ⁸²⁷ form as a full-length HIF-1 α isoform. Studies concerning the specific modification because of TAG addition are currently under investigation.

HEK 293 cells were co-transfected with the VEGF promoter coupled to the luciferase reporter gene (20, 21) and expression plasmids for HIF-1 β , and HIF-1 α ⁷³⁶, or HIF-1 α ⁸²⁷. As shown in Fig. 4A, both recombinant proteins, HIF-1 α ⁷³⁶ and HIF-1 α ⁸²⁷, dimerize with HIF-1 β , induce the VEGF promoter in a dose-dependant manner, and are activated by hypoxia. However, the level of their response differs and the shorter HIF-1 α isoform is 3-fold less potent than HIF-1 α^{FL} . The specific activities of both isoforms were assessed by monitoring the protein expression level using two antibodies (NB 100–105 and HIF-1 α 2087) which, respectively, recognize either the two forms of HIF-1 α or

only the full-length HIF-1 α (Fig. 4B). Upon hypoxia, the expression level of the two proteins is similar but in normoxia HIF-1 α^{736} is more strongly expressed. As both isoforms are expressed to a similar level upon hypoxia, we can conclude that HIF-1 α^{736} is 3- to 4-fold less active than HIF-1 α^{827} , a result consistent with the truncation of the C-terminal transactivation domain.

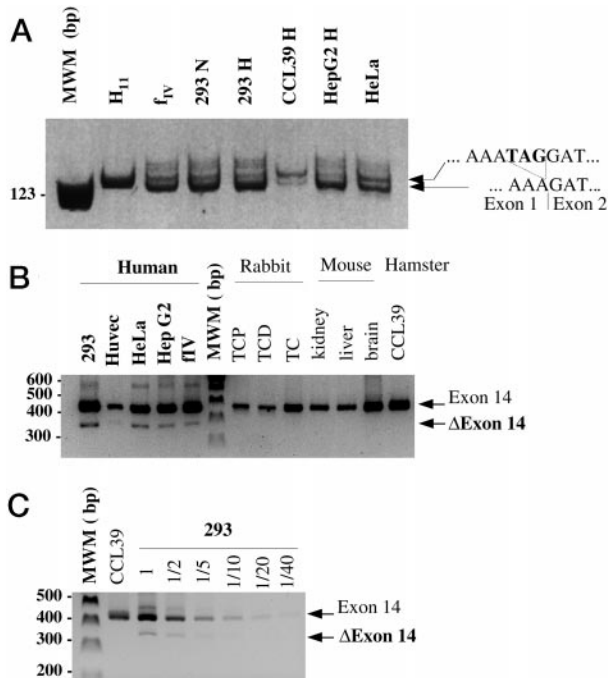


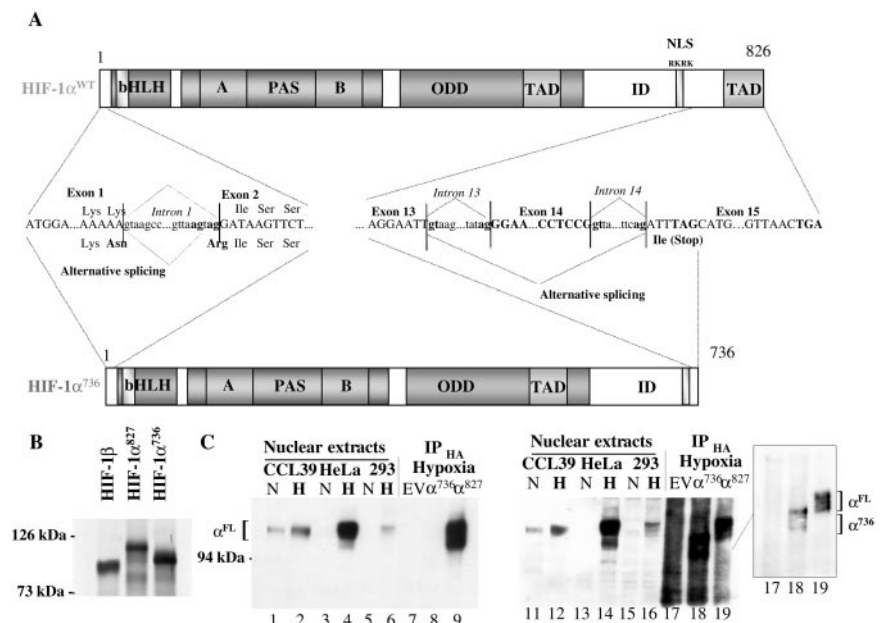
FIG. 2. Expression of human HIF-1 α mRNA isoforms. A, the relative expression of HIF-1 α isoforms with the additional TAG was analyzed in different cell lines by RT-PCR (see "Materials and Methods") and compared with a RT-PCR control performed on HA-HIF-1 α construction derived from H₁₁ cDNA clone. Two PCR fragments corresponding to the expected length of the isoforms with (125 bp) or without (122 bp) TAG addition were obtained. f_{IV}, human skin fibroblasts; N, normoxia; H, hypoxia. B, expression of the HIF-1 α isoform lacking exon 14 was analyzed by RT-PCR (see "Materials and Methods"). Two PCR products corresponding to the expected length with (487 bp: exon 14) and without (350 bp: Δ exon 14) the exon were obtained in positive cell lines. C, the approximate ratio between the two isoforms was estimated by successive dilution of the RT-PCR product.

According to experiments in which only empty vector was transfected, hypoxia is able to stimulate endogenous HIF-1 complex and induce the VEGF promoter activity. In the absence of transfected HIF-1 β , recombinant HIF-1 α^{827} increases this endogenous response upon hypoxia in HEK 293 cells, whereas HIF-1 α^{736} decreases it (Fig. 5A). These results suggested that the spliced variant of HIF-1 α (HIF-1 α^{736}) can compete with the endogenous HIF-1 α for HIF-1 β on the VEGF promoter. To confirm these results, we tested the competition by HIF-1 α^{736} on HIF-1 α^{827} -dependent transactivation in cells co-transfected with HIF-1 β and the two isoforms of HIF-1 α (Fig. 5B). We used 100 ng of HIF-1 α^{827} to be consistent with the results presented on Fig. 4A. Indeed, at this concentration, inducibility (ratio hypoxia/normoxia) begins to decrease, a sign of a saturation of the system. The hypoxic response obtained with these amounts of HIF-1 α^{827} is arbitrarily fixed to 100%. The maximal response obtained with the short form transfected alone and expressed as a percentage of this response is 49.6% (Fig. 5B). The co-transfection of HIF-1 α^{736} and HIF-1 α^{827} inhibits the response of HIF-1 α^{827} alone. Taken together these results demonstrate that HIF-1 α^{736} can compete *in vivo* with the full-length HIF-1 α for the induction of the VEGF promoter.

DISCUSSION

In this report, we have cloned two new isoforms of HIF-1 α that result from alternative splicing. To our knowledge, this is the first report describing an alternative spliced variant of human HIF-1 α . Two differences with the previously cloned HIF-1 α were described: 1) an additional 3 bp at the exon 1–2 junction involving a difference of two amino acids upstream of the bHLH domain (HIF-1 α^{827}), and 2) the lack of exon 14 introducing a frameshift resulting in a shorter form of HIF-1 α (HIF-1 α^{736}). The level of expression of this newly identified isoform is smaller compared with the full-length HIF-1 α . The isoform presenting an additional TAG between exon 1 and 2 has already been described by Drutel (23). He detected this splice variant in several regions of the rat brain and in PC12 cells. Here, we show that these isoforms are expressed in several human cell lines, in human skin fibroblasts, and in the CCL39 Chinese hamster lung fibroblast cell line. Our results demonstrate that they are present in several species and are expressed with different ratios depending on the origin of the cell line. The exact implication of this HIF-1 α splice variant in

FIG. 3. Structure prediction and expression of HIF-1 α isoforms. A, schematic representation of the newly cloned HIF-1 α^{736} compared with the previously cloned HIF-1 α . Addition of TAG nucleotides changes the coding sequence and modifies the Lys¹² by Asn¹² and adds an Arg¹³. The lack of exon 14 produces a frameshift and introduces a stop codon in the coding sequence after an Ile⁷³⁵. B, *in vitro* translated proteins. C, Western blot analysis of endogenous HIF-1 α isoforms. Nuclear extracts (50 μ g of protein) from normoxic (N) or hypoxic (H) HEK 293, HeLa, and CCL39 cells (lanes 1–6 and 11–16) or immunoprecipitated proteins from transfected HEK 293 cells (lanes 7–9 and 17–19) were analyzed by Western blotting using rabbit anti-HIF-1 α anti-serum 2087 (lanes 1–9) or NB100–105 antibody (lanes 11–19).



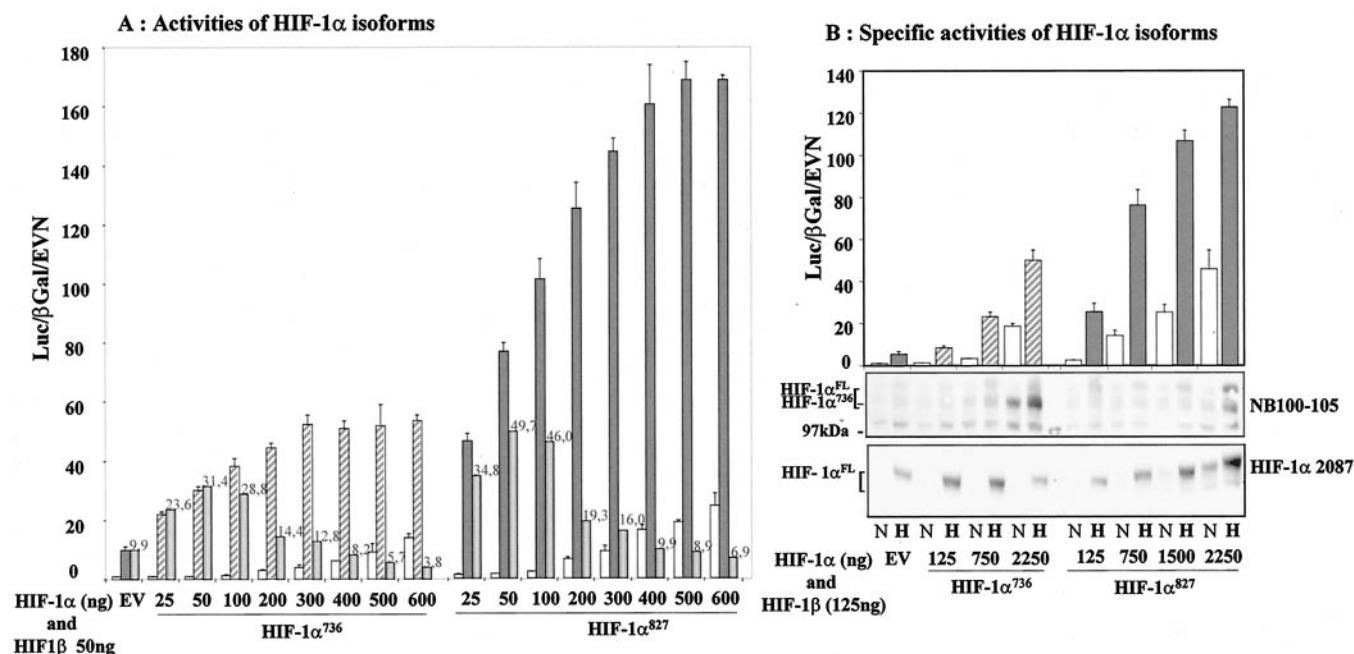


FIG. 4. **Transcriptional activities of HIF-1 α^{736} isoform on the VEGF gene promoter.** A, HEK 293 cells in 12-well plates were transfected with 25 to 600 ng of HIF-1 α isoforms and 50 ng of HIF-1 β , and then exposed to 20% (open bars) or 1% O₂ (hatched or gray bars for HIF-1 α^{736} and HIF-1 α^{827} , respectively) for 20 h. Luc/ β Gal activity was normalized to values obtained from cells transfected with pCDNA3 and cultured at 20% O₂. The third bar corresponds to the ratio of hypoxia/normoxia. B, HEK 293 cells in 6-well plates were transfected with 125–2250 ng of HIF-1 α isoforms and 125 ng of HIF-1 β and then exposed to 20% (open bars) or 1% O₂ (hatched or gray bars for HIF-1 α^{736} and HIF-1 α^{827} , respectively) for 20 h. The protein expression level of the two HIF-1 α isoforms was monitored by Western blotting using NB 100–105 and HIF-1 α 2087 antibodies.

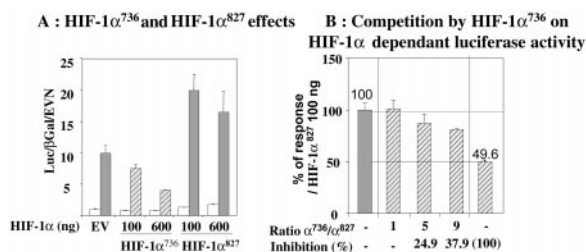


FIG. 5. **Competition by HIF-1 α^{736} on HIF-1 α -dependent luciferase activity.** A, HEK 293 cells were transfected with empty vector or 100 and 600 ng of HIF-1 α isoforms and then exposed to 20% (open bars) or 1% O₂ (hatched or gray bars for HIF-1 α^{736} and HIF-1 α^{827} , respectively) for 20 h. B, HEK 293 cells were transfected with 100 ng of HIF-1 α^{827} alone or with different amounts of HIF-1 α^{736} in the presence of 50 ng of HIF-1 β . The hypoxic response obtained with this amount of HIF-1 α^{827} is arbitrarily fixed to 100%, and the maximal response obtained with HIF-1 α^{827} is expressed as a percentage of this response. Percentage of inhibition corresponds to the response obtained with the δ value between reference responses of HIF-1 α^{827} and HIF-1 α^{736} transfected alone.

hypoxia signaling remains to be determined.

In contrast, the isoform lacking exon 14 (HIF-1 α^{736}) appears to be present only in human cells. We estimate that HIF-1 α^{736} is expressed 10-fold less than the full-length at the mRNA levels.

We suggest also that the protein ratio HIF-1 α^{FL} /HIF-1 α^{736} is similar and reflects the relative mRNA levels. In this context, it is important to note that the presence of overlapping bands between the two HIF-1 α isoforms, as a consequence of the different phosphorylation states, hinders us in demonstrating the presence of endogenous HIF-1 α^{736} protein by Western blot analysis. The design of an antibody which only recognizes the short form should be the ideal. However, this is virtually impossible because the only difference between the two forms resides in the presence of one isoleucine at the C-terminal end of HIF-1 α^{736} .

TADs are present within the C-terminal portion of HIF-1 α (24, 25). Each TAD could act independently and could be regulated during hypoxia by different mechanisms. Indeed, Jiang *et al.* (24) reported that the N-terminal TAD (N-TAD), when fused to a GAL4 DNA binding domain, is still inducible upon hypoxia, whereas the inducible response of the C-terminal TAD (C-TAD) is because of repression of its constitutive transcriptional activity under normoxic conditions by the inhibitory domain. Henceforth, it is accepted that the inducible activity of N-TAD is mainly a consequence of HIF-1 α induction because this domain is co-localized with the Oxygen-dependent Degradation Domain (ODD) which is responsible for HIF-1 α instability. The HIF-1 α^{736} isoform highlighted in this article is interesting because it only possesses the N-terminal transactivation domain and can support *in vivo* the results with fusion proteins, on the activity of N-TAD independently of C-TAD. It is important to note that the NLS responsible for hypoxia-inducible import RKRK (27) is also present on the shorter form and allowed us to anticipate that this isoform was functional. Indeed, our results show that the HIF-1 α^{736} isoform is also regulated during hypoxia and is able to transactivate the VEGF promoter with HIF-1 β , even if it lacks the C terminus TAD. We thus demonstrate by this experiment that N-TAD is active without C-TAD *in vivo*. As expected, our experiments also show that in this context the specific activity of the short form is less important than full-length HIF-1 α . However, the short form could have some different properties on other promoters. The results of Tian, H. *et al.* (3) showing that EPAS-1/HIF-2 α , is able to specifically activate *Tie-2* reporter gene whereas HIF-1 α does not are in favor of a putative specific role of HIF-1 α^{736} . Moreover, two other ARNT isoforms have been described, ARNT2 and ARNT3. Consequently, the short form in association with one of these partners could regulate specific target promoters.

The expression profiles of recombinant isoforms suggest that, in normoxia, HIF-1 α^{736} is expressed at levels higher than those of HIF-1 α^{FL} (see Fig. 4B). The putative presence of HIF-

1 α ⁷³⁶ in normoxia could be important under certain physiological conditions or tissues where the wild type protein is totally absent because of protein degradation (26, 28). More experiments are required to verify this hypothesis. It will be interesting also to determine upon which physiological conditions exon 14 is alternatively spliced in order to study whether the short form could modulate the HIF-1 α -dependent responses.

CBP/P300, which was found to mediate transcriptional activation by HIF-1 α (29) and HIF-2 α (30), interacts with the two TADs and enhances the hypoxia-inducible transactivation. However, Ema *et al.* (30), demonstrate that CBP/P300 directly interacts with C-TAD in a yeast two-hybrid system and is the potential cofactor responsible for the inducible response of the C-TAD, whereas interaction with N-TAD is indirect. We are currently evaluating the effect of p300 on the two isoforms of HIF-1 α and determine whether p300 has a differential action on them. This would enable us to validate the *in vivo* action of p300 on the two TADs.

In summary, we have described for the first time alternative splicing for the human HIF-1 α gene. The resulting isoforms are inducible upon hypoxia and transactivate VEGF promoter. The HIF-1 α ⁷³⁶ also competes with full-length HIF-1 α for recruitment of HIF-1 β . One of the crucial questions now is to determine the conditions which regulates this alternative splicing to evaluate the exact role of these proteins during hypoxic stress.

Acknowledgments—We thank Dr. W. Risau and J. Milanini for the VEGF promoter constructs and D. Grall and Y. Fantei for their excellent technical assistance.

REFERENCES

- Wang, G. L., and Semenza, G. L. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 1230–1237
- Wang, G. L., Jiang, B. H., Rue, E. A., and Semenza, G. L. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 5510–5514
- Tian, H., McKnight, S. L., and Russell, D. W. (1997) *Genes Dev.* **11**, 72–82
- Hogenesch, J. B., Chan, W. K., Jackiw, V. H., Brown, R. C., Gu, Y. Z., Pray-Grant, M., Perdew, G. H., and Bradfield, C. A. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 8581–8593
- Ema, M., Taya, S., Yokotani, N., Sogawa, K., Matsuda, Y., and Fujii-Kuriyama, Y. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 4273–4278
- Flamme, I., Frohlich, T., von Reutern, M., Kappel, A., Damert, A., and Risau, W. (1997) *Mech. Dev.* **63**, 51–60
- Gu, Y. Z., Moran, S. M., Hogenesch, J. B., Wartman, L., and Bradfield, C. A. (1998) *Gene Expr.* **7**, 205–213
- Hirose, K., Morita, M., Ema, M., Mimura, J., Hamada, H., Fujii, H., Saijo, Y., Gotoh, O., Sogawa, K., and Fujii-Kuriyama, Y. (1996) *Mol. Cell. Biol.* **16**, 1706–1713
- Takahata, S., Sogawa, K., Kobayashi, A., Ema, M., Mimura, J., Ozaki, N., and Fujii-Kuriyama, Y. (1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **248**, 789–794
- Hogenesch, J. B., Gu, Y. Z., Jain, S., and Bradfield, C. A. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 5474–5479
- Ikeda, M., and Nomura, M. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **233**, 258–264
- Hoffman, E. C., Reyes, H., Chu, F. F., Sander, F., Conley, L. H., Brooks, B. A., and Hankinson, O. (1991) *Science* **252**, 954–958
- Pollenz, R. S., Sullivan, H. R., Holmes, J., Necela, B., and Peterson, R. E. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 30886–30896
- Li, H., Ko, H. P., and Whitlock, J. P., Jr. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 21262–21267
- Luo, G., Gu, Y. Z., Jain, S., Chan, W. K., Carr, K. M., Hogenesch, J. B., and Bradfield, C. A. (1997) *Gene Expr.* **6**, 287–299
- Wenger, R. H., Rolfs, A., Marti, H. H., Guenet, J. L., and Gassmann, M. (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **223**, 54–59
- Wenger, R. H., Rolfs, A., Kvietikova, I., Spielmann, P., Zimmermann, D. R., and Gassmann, M. (1997) *Eur. J. Biochem.* **246**, 155–165
- Iyer, N. V., Leung, S. W., and Semenza, G. L. (1998) *Genomics* **52**, 159–165
- Ellis, L., Morgan, D. O., Clauser, E., Ederly, M., Jong, S. M., Wang, L. H., Roth, R. A., and Rutter, W. J. (1986) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **2**, 773–784
- Ikeda, E., Achen, M. G., Breier, G., and Risau, W. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 19761–19766
- Milanini, J., Vinals, F., Pouyssegur, J., and Pagès, G. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 18165–18172
- Richard, D. E., Berra, E., Gothiè, E., Roux, D., and Pouyssegur, J. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 32631–32637
- Drutel, G. (1998) *Discovery, Localization, and Functions of ARNT2, a New 6HLH/PAS Transcription Factor*. Ph.D. thesis, Université Paris 6
- Jiang, B. H., Zheng, J. Z., Leung, S. W., Roe, R., and Semenza, G. L. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 19253–19260
- Pugh, C. W., O'Rourke, J. F., Nagao, M., Gleadle, J. M., and Ratcliffe, P. J. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 11205–11214
- Huang, L. E., Gu, J., Schau, M., and Bunn, H. F. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 7987–7992
- Kallio, P. J., Okamoto, K., O'Brien, S., Carrero, P., Makino, Y., Tanaka, H., and Poellinger, L. (1998) *EMBO J.* **17**, 6573–6586
- Salceda, S., and Caro, J. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 22642–22647
- Arany, Z., Huang, L. E., Eckner, R., Bhattacharya, S., Jiang, C., Goldberg, M. A., Bunn, H. F., and Livingston, D. M. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 12969–12973
- Ema, M., Hirota, K., Mimura, J., Abe, H., Yodoi, J., Sogawa, K., Poellinger, L., and Fujii-Kuriyama, Y. (1999) *EMBO J.* **18**, 1905–1914

B. PUBLICATION 2 - CONSTRUCTION ET CARACTERISATION D'UN VECTEUR CYTOSTATIQUE DEPENDANT DE L'HYPOXIE DEVELOPPE POUR L'ETUDE DE LA VOIE DE SIGNALISATION DU HIF-1 α

Construction and characterization of a hypoxia dependant cytostatic vector developed for the characterization of the Hypoxia-Inducible Factor-1 alpha pathway.

Emmanuel Gothié, Danielle Roux, David Busti, Gilles Pagès et Jacques Pouysségur

1. CONTEXTE

Si plusieurs éléments avaient été découverts avant le début de ce travail, notamment sur le facteur HIF-1 lui-même (structure, fonctionnalité, régulation), de très nombreux points restaient à éclaircir (voir § **II.B**). Ainsi la nature du détecteur d'oxygène qui avait été avancé comme intermédiaire dans l'activation du HIF-1, restait à définir. De même l'existence d'autres éléments intervenant dans cette cascade restait aussi à vérifier. C'est dans ce contexte que nous avons décidé de développer un système fiable permettant l'étude approfondie de cette étape d'activation du HIF-1.

2. LE MODELE

Pour cela, nous nous sommes basés sur la propriété du HIF-1 d'activer spécifiquement sous hypoxie la transcription d'un gène sous dépendance d'éléments de réponse à l'hypoxie (HRE). Ainsi, nous développons différentes constructions artificielles constituées de gènes toxiques ou statiques pour la cellule (respectivement Caspase 8 et MKP-3) sous dépendance d'un promoteur minimum possédant des « *enhancers* » HRE. Ce promoteur est en outre doté d'un autre système inductible (système tétracycline) de manière à pouvoir ajuster l'expression du gène d'intérêt.

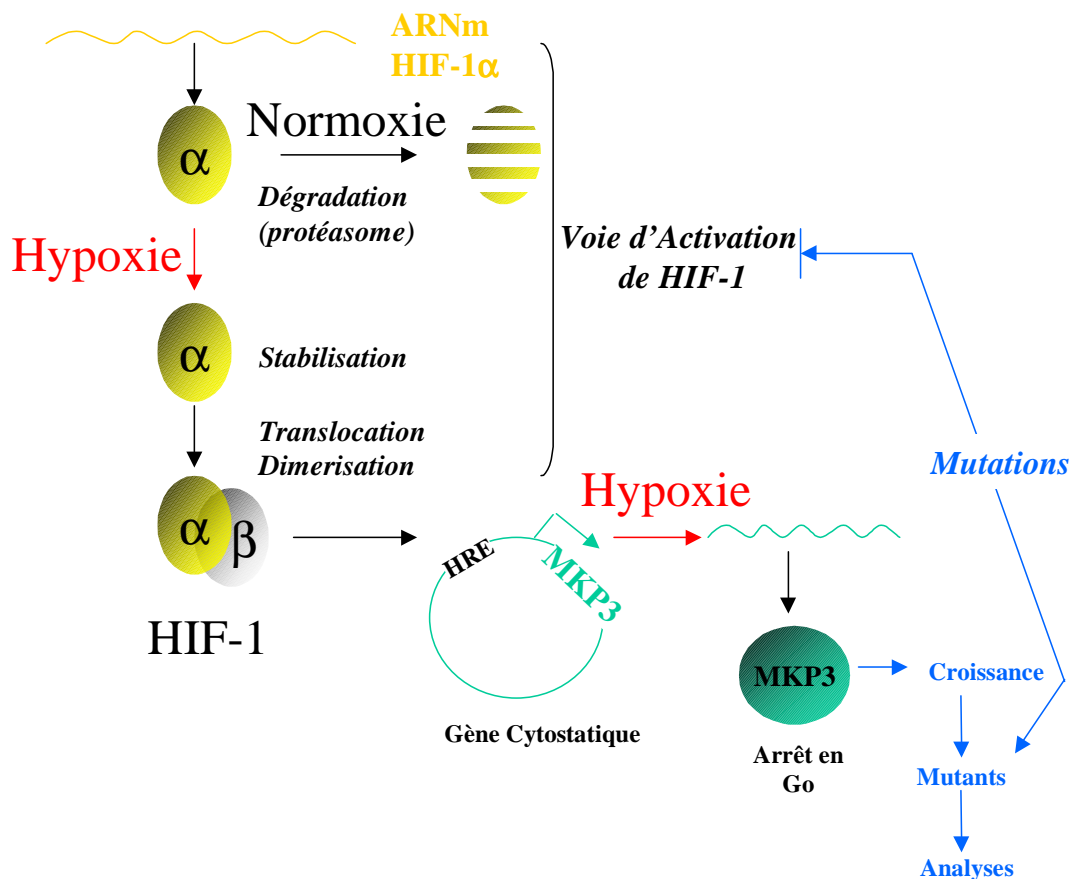


Figure 20 : Schéma représentant la technique prévue pour l'isolation de mutants de la voie de signalisation de HIF-1 dans le cas du gène statique MKP3

Les objectifs de ce projet sont d'une part l'obtention de clones stables exprimant les différentes constructions, et d'autre part la réalisation d'un test de sélection par activation sous hypoxie des gènes toxiques pour entraîner une mortalité cellulaire sauf pour des mutants ayant acquis une résistance par mutation d'un des éléments de la voie d'activation du HIF-1 (cf. Figure 20).

L'étude de ces mutants par différentes techniques - utilisation de marqueurs génétiques (Polymorphisme de Taille de Fragments de Restriction : RFLP), hybridation soustractive et complémentation - devrait permettre de les caractériser et ainsi de progresser dans la compréhension de la voie d'activation du facteur HIF-1.

Enfin, ce type d'outils moléculaires pourrait être aussi la base de molécules d'intérêt thérapeutique dans la mesure où elles pourraient s'avérer efficaces au sein des zones très

hypoxiques de tumeurs qui sont connues comme étant extrêmement résistantes aux traitements par radiations (voir §IV.C).

3. RESUME DE L'ARTICLE

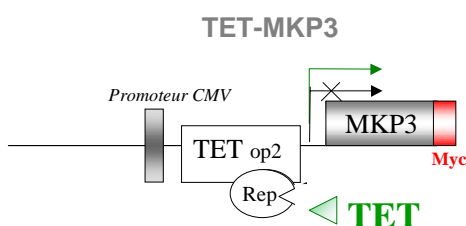
3. 1. Première et seconde génération de vecteurs

Pour mener à bien ce projet, nous avons choisi dans un premier temps le gène MKP3 (MAP Kinases Phosphatase-3). MKP3 intervient directement au niveau du cycle cellulaire en inactivant par déphosphorylation les MAP Kinases p42/p44, lesquelles contrôlent la progression dans le cycle. Les constructions basées sur MKP3 devraient donc présenter une activité cytostatique.

La première étape a consisté à cloner le gène MKP3 dans le vecteur TREx d'Invitrogen (pcDNA/TO) de manière à produire un vecteur inducible par le système tétracycline (cf. Figure 21). Ce vecteur présente un promoteur CytoMegalovirus (CMV) couplé à un opérateur TetO₂ sur lequel peut se fixer un répresseur (TetR) bloquant la transcription du gène placé en aval. L'ajout de tétracycline permet de déverrouiller le système par fixation sur le répresseur entraînant une modification conformationnelle de ce dernier et empêchant sa fixation sur TetO₂. Le vecteur obtenu a été nommé TET-MKP3.

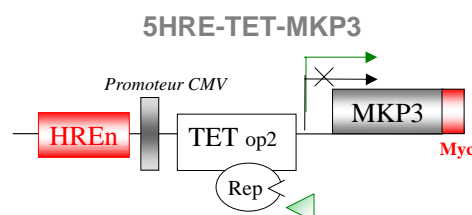
A : Première Génération

Clonage de MKP3 dans Vecteur TREx de Invitrogen



B : Deuxième Génération

Multimérisation du HRE de huVEGF
Insertion de (HRE)_n dans vecteurs MKP3



C : Troisième Génération

Clonage de HIF-1α dans les vecteurs de deuxième génération

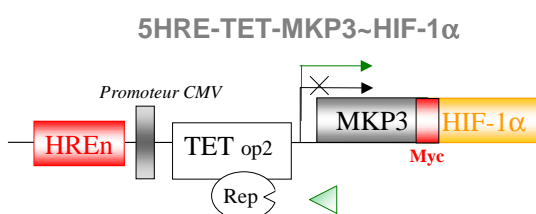


Figure 21 : Schéma représentant les trois générations de constructions réalisées.

Cette première étape réalisée, nous avons généré des éléments de réponse à l'hypoxie (HRE) par multimérisation d'amorces correspondant à la séquence du HRE du VEGF humain. Les différents multimères obtenus ont été clonés en amont du promoteur de la construction TET-MKP3, et une construction comportant au moins 5HRE (nommée 5HRE-TET-MKP3) a été retenue pour les tests ultérieurs.

3. 1. 1. *Test des constructions par transfection transitoire*

Dans un premier temps, les constructions TET-MKP3 et 5HRE-TET-MKP3 ont été transfectées dans des cellules HeLa en vue de réaliser des études par western blot ou par immunofluorescence.

En western blot, nous avons été capables de détecter un signal correspondant à la construction 5HRE-TET-MKP3 en condition d'hypoxie. L'absence de signal MKP3 pour la construction TET-MKP3 étant sans doute dû ici à une expression trop faible de la protéine (inférieur au seuil de détection de l'anticorps).

Dans le cas des immunofluorescences, les cellules cotransfectées par les deux sous-unités du HIF-1 et par les deux types de construction présentent une fluorescence correspondant à l'expression de MKP3. Il semble cependant que le nombre de cellules transfectées par 5HRE -TET-MKP3 exprimant MKP3 soit plus important que TET-MKP3, suggérant une expression plus forte dans le cas d'une activation par HIF-1.

Ces résultats ne permettant pas une analyse satisfaisante des constructions, nous avons entrepris de transfecter de façon stable les constructions.

3. 1. 2. *Test des constructions par transfection stable*

L'établissement préliminaire d'une lignée exprimant de façon stable le répresseur du système TREx s'est avéré nécessaire, d'une part du fait que les cellules fournies par Invitrogen (dérivées de cellules HeLa) ont présenté des problèmes au niveau de leur culture et d'autre part parce que nous souhaitons nous placer dans un environnement favorable aux études génétiques finales. Dans cette optique, nous avons transfecté les cellules S19 (exprimant de façon stable DeltaRaf-1:ER, une forme Raf-1 régulée par l'oestradiol (Lenormand *et al.*, 1996)), dérivées des CCL39 (fibroblastes de poumon de hamster chinois) qui présentent une bonne stabilité génétique. Nous avons ainsi isolé un clone nommé S19R443 exprimant de façon stable le répresseur TetR.

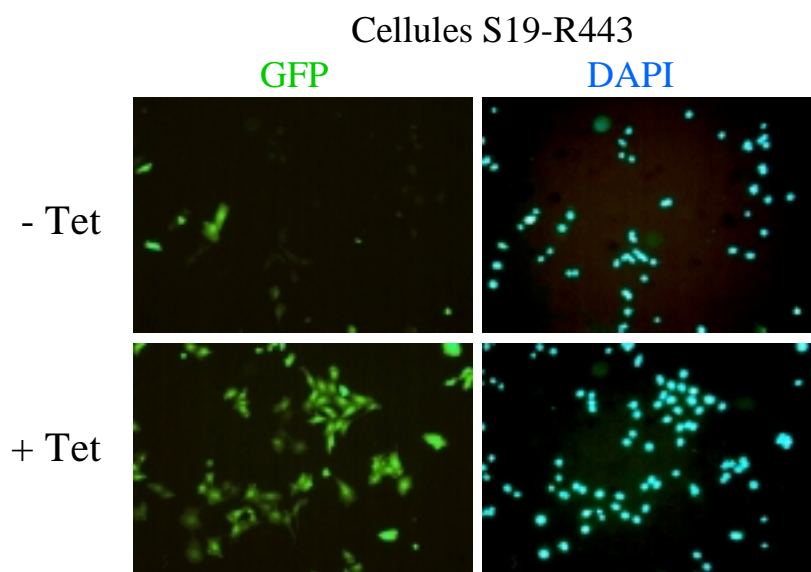


Figure 22 : Cellules S19-R443

Des expériences menées sur la population totale de cellules S19 transfectées par la construction 5HRE-TET-MK3 n'étant pas suffisantes, nous avons poursuivi jusqu'à l'isolement de clones.

Ainsi, différents clones isolés à partir de cellules transfectées par la construction 5HRE-TET-MKP3 ont été analysés par western blot. Plusieurs clones se sont révélés positifs présentant une forte expression de MKP3 sous tétracycline et une inhibition marquée de l'activation des MAPKs (visualisée à l'aide d'anticorps dirigés contre les formes phosphorylées de p42 et p44 MAPK). Deux d'entre eux ont été utilisés pour les tests de validation des constructions. Les cellules ont ainsi été traitées ou non par la tétracycline en condition de normoxie ou d'hypoxie.

Les résultats obtenus ont montré qu'un des 2 clones testé (clone 9) présentait une bonne expression de MKP3 sous tétracycline, que cette expression était augmentée dans le cas d'un traitement à l'hypoxie, mais que l'hypoxie seule ne permettait pas d'exprimer MKP3. Nous retrouvons par ailleurs l'inhibition de la phosphorylation des p42 et p44 MAPKs validant la fonctionnalité de MKP3.

Un deuxième sous-clonage a été réalisé sur le clone 9 afin de s'assurer de sa pureté. Différents sous-clones ont été analysés par des expériences de western blot similaires aux précédentes et nous avons sélectionné le clone 9-11 présentant une bonne induction sous hypoxie de la phosphatase. (cf. Figure 1B de l'article).

3. 2. *Troisième génération de vecteurs*

Parallèlement à la construction 5HRE-TET-MKP3, nous avons développé une construction chimère MKP3~HIF-1 α dans l'optique d'augmenter la *sensibilité* du système (cf. Figure 21). En effet, à l'action transcriptionnelle due à l'enhancer 5HRE, nous ajoutons un effet de régulation traductionnelle apporté par le domaine ODD de la protéine HIF-1 α . Dans des conditions de normoxie, la chimère MKP3~HIF1 α éventuellement produite devrait être ainsi dégradée par le protéasome, tandis que l'hypoxie stabilisant la partie HIF-1 α de la chimère devrait permettre l'expression marquée de cette dernière.

Une étude par Western blot sur la population totale obtenue en transfectant de façon stable la construction 5HRE-TET-MKP3-HIF-1 α dans les cellules S19 nous a permis d'observer une expression de la chimère en réponse à l'hypoxie seule (contrairement à la construction 9-11), une réponse à la tétracycline et une réponse magnifiée par la double stimulation tétracycline et hypoxie. Cependant, dans ce contexte de population totale, nous n'avons pas pu observer un effet de la chimère sur la phosphorylation des MAPKs. Nous avons donc poursuivi jusqu'à l'isolement de clones cellulaires (deux étapes de clonage). Nous avons ainsi isolé le clone 14-7 présentant le profil attendu (cf. Figure 2B de l'article).

3. 3. *Etude de l'activité biologique des différentes constructions*

Nous avons entrepris en parallèle une série de tests en vue de mesurer l'activité biologique réelle des constructions MKP3 et MKP3-HIF-1 α . Pour cela, des expériences de réinitiation de la synthèse d'ADN ont été réalisées pour lesquelles l'incorporation de thymidine tritiée au terme de 24 h de stimulation pour différentes concentrations de Sérum de Veau Fœtal (SVF), a permis d'avoir une représentation graphique témoin de la croissance cellulaire.

Dans le cas des cellules contrôle R443, l'ajout de tétracycline n'entraîne aucune modification des courbes de croissance, il n'y a donc pas d'effet non spécifique. Il est cependant noté un effet d'inhibition de la croissance par l'hypoxie de l'ordre de 30 % sur ces cellules (cf. Figure 1D de l'article). Cet effet est à priori clonal, car non retrouvé sur les cellules initiales CCL39 ayant servi à développer les cellules S19 puis S19-R443, mais retrouvé pour ces deux dernières

Dans le cas de la chimère MKP3~HIF-1 α (Cl14-7) de très bons résultats ont pu être observés avec, sous tétracycline (1 μ g/ml) et pour 10% de SVF, une inhibition de la croissance cellulaire atteignant 49,2% en normoxie et 84% pour 24h d'hypoxie (cf. Figure 2D de l'article). Pour tester si seul HIF-1 α était capable d'expliquer cet effet sur les cellules, nous avons testé l'effet de l'hypoxie sur des cellules exprimant l'échangeur Na⁺/H⁺ SN1 ou la chimère SN1-HIF-1 α (cf. Figure 2E de l'article). La présence de HIF-1 α avec l'échangeur n'amène pas de différences dans la réinitiation dans ces cellules.

La construction 9-11 présente cependant moins d'effet : 17% d'inhibition comparés aux 84% d'inhibition pour la chimère MKP3-HIF-1 α en Hypoxie+Tet (cf. Figure 1C de l'article). Parallèlement à cela, nous avons réalisé une étude par western blot pour comparer l'expression relative de MKP3 et de la chimère MKP3~HIF-1 α . Deux anticorps ont été utilisés pour renforcer l'interprétation : un anticorps dirigé contre l'épitope Myc placé au centre de la chimère ainsi qu'un anticorps dirigé contre l'extrémité carboxy terminale de MKP3. Les deux anticorps donnent un même résultat montrant une expression plus importante de MKP3 par rapport à la chimère MKP3~HIF-1 α (cf. Figure 3 de l'article).

Bien que dans les conditions de transfert utilisées lors de cette étude, n'étaient pas suffisantes pour assurer un transfert complet des protéines (notamment celles de haut poids moléculaire), nous nous sommes assurés de l'existence d'un différentiel d'expression entre les deux protéines par une expérience complémentaire contrôle. Dans cette expérience, un mélange 50/50 de MKP3 et MKP3~HIF-1 α provenant d'extraits cellulaires des clones 9-11 et 14-7 traités dans les mêmes conditions (Hypoxie/Tétracycline/LLnL) a été déposé sur gel. Après électrophorèse, les protéines ont été transférées complètement. Dans ces conditions, le différentiel est de l'ordre de 3-5 fois. Ce résultat va dans le sens d'une meilleure activité spécifique de MKP3~HIF-1 α par rapport à MKP3 expliquant dès lors les différences observées.

Il est connu que l'activité de MKP3 est fortement augmentée suite à un changement conformationnel régit par sa liaison avec l'extrémité amino terminale de son substrat, les MAPK p42/p44 (Fjeld *et al.*, 2000). Il est donc possible de penser que l'ajout du HIF-1 α derrière MKP3 a modifié la conformation de la phosphatase, rendant celle-ci constitutivement plus active.

Dans cette étude, nous avons décrit le développement d'une lignée cellulaire stable (MKP3-HIF-1 α) dans laquelle il est possible d'inactiver le niveau de P-MAPK cellulaire et donc la croissance cellulaire en hypoxie. Ce type d'outil est une étape pour la sélection de mutants dans la voie de HIF-1 α . Nous sommes actuellement en train de développer d'autres outils basés sur les effecteurs toxiques Caspase 8 ou Thymidine Kinase (dans ce dernier cas, la propriété toxique est indirecte via l'activation de l'agent antiviral Gancyclovir (GCV) en un dérivé toxique) et dont l'expression est dépendante de l'hypoxie (voir aussi § IV.B.5.). La caractérisation de ces mutants et leur étude devrait permettre de trouver les éléments clefs de l'activation du HIF-1 dont l'hydroxylase à proline détecteur d'oxygène récemment mis en évidence.

Construction and characterization of a hypoxia dependent cytostatic vector developed for the characterization of the Hypoxia-Inducible Factor-1 alpha pathway.

**Emmanuel Gothié#, Danielle Roux#, David Busti, Edurne Berra, Gilles Pagès
and Jacques Pouyssegur***

Institute of Signaling, Developmental Biology and Cancer Research
UMR CNRS 6543, Centre Antoine Lacassagne, 33 Avenue Valombrose,
06189 Nice, France

These authors contributed equally to this study.

*To whom correspondence should be addressed:

Phone: (33) 4 92 03 12 22

Fax: (33) 4 92 03 12 25

E-mail: pouysseg@unice.fr

Running title: hypoxia-dependent cytostatic vector

ABSTRACT

Downstream signaling of Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1) is well documented but the upstream mechanisms by which variations in oxygen are detected at the cellular level are poorly understood. In this study, we developed a cell model with the aim of genetically dissecting hypoxia signal transduction pathways. We present the development of a stable cell line expressing a hypoxia-dependent chimera containing the Mitogen-activated protein Kinase Phosphatase-3 (a specific phosphatase of Phosphorylated p42/p44 MAPK (P-MAPK), which is a key component of the cell cycle) and the α subunit of HIF-1 (MKP3-HIF-1 α). Expression of this chimera was under the control of the hypoxia-responsive element that binds HIF-1. Moreover, hypoxia exerts control, at the post-translational level, on the chimera due to the presence of the Oxygen-dependant Degradation Domain of HIF-1 α , which is involved in the stability of HIF-1 α . In this cell line, we were able to shut down significantly the P-MAPK level and to consequently inhibit cell growth in hypoxia. This cell line should prove useful for the further study of the HIF-1 α pathway as a preliminary tool in selecting mutant cells of this pathway. In addition, constructs with potential to shut down cell growth in hypoxia may prove useful for gene therapy.

INTRODUCTION

Mammalian cells are able to sense the presence of oxygen and regulate a number of genes in response to low oxygen concentrations (hypoxia). The transcription factor Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1) is a key component of the hypoxia signaling pathway. HIF-1 is a heterodimer composed of two members of the basic helix-loop-helix transcription factor superfamily containing a PAS (PER-ARNT-SIM) domain: HIF-1 α and HIF-1 β /ARNT (for review (1,2)). Downstream signaling of HIF-1 is well documented but the upstream mechanisms by which variations in oxygen are detected at the cellular level have remained a mystery until recently. Under hypoxic conditions HIF-1 α is stabilized and translocates to the nucleus where it forms a heterodimer with HIF-1 β /ARNT1, which then binds the Hypoxia-Responsive Element (HRE) on target genes and induces transactivation. Recently, two groups recently published data that sheds light on the mechanism of oxygen sensing involved in HIF-1 regulation by proteasomal degradation (3,4). These groups reported that HIF-1 α which is rapidly degraded in normoxic conditions is hydroxylated by an enzyme, probably a prolyl 4-hydroxylase that requires oxygen, Fe⁺⁺ and 2-oxoglutarate for activity. Hydroxylation renders HIF-1 α susceptible to binding to the E3 ligase von Hippel-Lindau tumor suppressor which targets HIF-1 α for degradation by the ubiquitin-proteasome system. However, other enzymes involved in the formation of reactive oxygen species (for review (2)) or other as yet unidentified intermediates may also be involved in HIF-1 regulation (5).

In this study, we developed a cell model with the aim of genetically dissecting hypoxia signal transduction pathways. To this aim, we exploited the property of HIF-1 in activating specifically in hypoxia the transcription of a gene containing multiple HRE. We developed plasmid constructs of the cytostatic gene Mitogen-activated protein Kinase Phosphatase-3 (MKP3) under the control of a promoter with HRE enhancers (Fig.1A and Fig.2A). This promoter moreover contains an inducible system (tetracycline) to select for the expression of the gene of interest.

MKP3 is a member of the dual specificity phosphatases (DSPs) family which regulates Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPK) (6). These kinases play a central role in intracellular mitogen signaling and cell growth. MKP3 is able to dephosphorylate both threonine and tyrosine residues in the TEY motif and to consequently inactivate these kinases leading to cell growth arrest. The final objective of this study was to develop a hypoxia-dependent system that blocks cell growth so as to select resistant clones, resulting from mutations in the HIF-1 pathway, to analyze them and to determine intermediates in the HIF-1 signaling pathway.

In this report, we present a functional tool developed around MKP3, which shuts down dramatically cell growth under hypoxia by inactivation of p42/p44 MAPK.

MATERIALS AND METHODS

Cell Culture.

HeLa cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 5% inactivated fetal calf serum (FCS), penicillin (50 U/ml), and streptomycin (50 µg/ml) (GIBCO-BRL). Cells were maintained at 37°C in a 5% CO₂ - 95% air. The established Chinese hamster lung fibroblast cell line CCL39, derived cell lines S19 and S19-R443 and stable clones expressing the different MKP3 constructs were cultured in DMEM containing 7.5 % fetal calf serum (FCS). Hypoxic conditions were attained by incubation of the cells in a sealed "Bug-Box" anaerobic workstation (Ruskin Technologies, Leeds, UK/Jouan, Saint Herblain France). The oxygen in this workstation was maintained at 1-2% and the residual gas mixture was 93-94% nitrogen and 5% carbon dioxide.

Plasmid constructions.

MKP3 in the pSG5 vector (Stratagene), kindly provided by Dr Stephen Keyse, was digested with EcoRI and XhoI and subcloned into the pcDNA4/TO/myc-His A T-REx expression vector (Invitrogen) and the construct was named TET-MKP3. Multimeres of the Hypoxia-Response Element (HRE) of human VEGF with a MfeI site were then generated by auto-ligation and subcloned into the TET-MKP3 vector digested with MfeI upstream of the pCMV promoter. A construction containing 5 HRE sense sequences was obtained and retained for subsequent tests (5HRE-TET-MKP3). Finally, HIF-1α was subcloned into 5HRE-TET-MKP3 (by PCR using sense, CCCGGGGGAGACCGGTGCCGGCGGCC and antisense primers, GGAATGAAATTAAGTTTAACTCAGTTAACTTG - containing an Age I and a Pme I restriction sites, respectively, digestion of the PCR products with the same enzymes and subcloning into 5HRE-TET-MKP3) to generate the chimera MKP3-Myc-HIF-1α.

The pcDNA4/TO-GFPw/o Zeo vector was obtained as follows: EGFP-N1, obtained from pEGFP-N1 (Clontech) containing Hind III and Not I restriction sites, was subcloned into pcDNA4/TO/myc-His B (Invitrogen). Resistance to zeocin was then removed from this construct by cutting and religation with Eco72I.

Cell clones

S19-R443 cells were obtained by stable transfection of S19E cells (a CCL39 derived cell line that stably expresses DeltaRaf-1:ER, an estradiol-regulated form of oncogenic Raf-1 (7)) with pcDNA6/TR (Invitrogen) and after selection with blasticidine. Clones were tested for expression of β-galactosidase (β-Gal) in the presence of tetracycline. Selected clones were cloned an additional time by dilution and tested again for β-Gal induction. The clone presenting the highest β-Gal induction was transfected with pcDNA4/TO-GFPw/o Zeo and pECE/Super NHE1 and selected by proton suicide + 100µM HOE (8). The highest GFP expressing clone obtained after tetracycline treatment was cloned twice by dilution and the final clone termed S19-R443.

This clone was transfected with 5HRE-TET-MKP3 and 5HRE-TET-MKP3-HIF-1α, selected with G418. The resulting clones were tested by immunofluorescence and Western blotting and the clones **9** (MKP3) and **14** (MKP3-HIF-1α) were selected, after a second cloning by dilution, the clones were named **9-11** and **14-7**.

The Na⁺/H⁺ exchanger SN1 and chimeric SN1-HIF-1α clones were described previously ((9)).

Immunoblot Analysis.

Subconfluent cells on 6- or 12-well plates (3 or 1.5×10^5 cells/well) were incubated in normoxia (20% O₂) or hypoxia (1% O₂) overnight, treated or not with tetracycline (if not specified 1 µg/ml overnight), LLnL (if not specified 50 µM overnight) and then lysed in lysis buffer (0.1% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM sodium fluoride, 40 mM β-glycerophosphate, 200 µM sodium orthovanadate, 5 µg/ml aprotinin, 0.7 µg/ml pepstatin, 0.5 µg/ml leupeptin, and 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride). The protein concentration was determined using the BCA assay kit (Pierce).

Total cell extracts (50 µg), were resolved in SDS-polyacrylamide (7.5%) gels, transferred onto a PVDF membrane (Immobilon-P; Millipore) and incubated with specific antibodies: mouse anti-Myc antibody (1/000) (Roche), mouse anti diphosphorylated p42/p44MAPK antibodies (1/000) (Sigma) and rabbit anti-HIF-1α antiserum 2087 (1/000) (11). Horseradish peroxidase (HRP)-coupled anti-mouse and anti-rabbit antibodies were from Promega. The bands were visualized with the ECL system (Amersham Pharmacia Biotech).

Immunofluorescence Analysis.

Cells were plated on glass slides in 6-well plates at a density of 1.3×10^5 cells/well (2.5×10^5 cells/well if transient transfections were performed). Cells were transfected using the calcium phosphate technique. Two days later, quiescent cells were obtained (for Phospho-MAPK (P-MAPK) detection) or not by incubation in serum-free medium for 6 h after two washes with the same medium, and treated with various agents (+/- tetracycline, +/- LLnL) before incubation or not in hypoxia during 6 h. For P-MAPK detection only, cells were stimulated with 10% FCS before fixation. They were then fixed for 30 min in 3.3% paraformaldehyde (10% for P-MAPK) at room temperature, washed three times with phosphate-buffered saline (PBS), incubated in 0.2% Triton-PBS for 5 min. Coverslips were washed with PBS and the non-specific sites were blocked by incubation with PBS + 0.2% gelatin + 2% Bovine Serum Albumin (BSA) for 15 to 30 min. Coverslips were incubated with the first antibody diluted in PBS/gelatin/BSA (anti-Myc 1/1000, anti-HIF-1α 1/3000, anti-P-MAPK 1/1000) for 2 h at room temperature, then washed five times with PBS. Cells were incubated with the second antibody (goat anti-mouse Alexa 594-conjugated, 1/500; Molecular probes), diluted in PBS/gelatin/BSA for 1 h at room temperature. In the case of HIF-1α, a goat biotinylated anti-rabbit, 1/500, was used, before incubation with Texas Red labeled Streptavidine (Molecular probes), 1/500 for 15 min at room temperature. DAPI (4',6 diamine dihydrochloride; Boehringer Mannheim) was added for the last 15 min at a final concentration of 0.2 mg/ml. After extensive washes in PBS, coverslips were mounted in Citifluor (Citifluor Ltd, London N1 6LD) and examined under epifluorescence illumination.

Analysis of the reinitiation of DNA synthesis

Cells were plated on 24-well plates at a density of 1.5×10^5 cells/well. Two or three days later, cells were rendered quiescent after two washes in serum-free medium and incubation in the same medium for 24 h. The medium was removed and cells were incubated with [³H] thymidine (1 µCi/ml), treated or not with tetracycline, stimulated with 1, 3 or 10 % FCS, and incubated or not in hypoxia for 24 h. Cells were washed twice with cold TCA (5%) and once

in water before addition of 0.1N NaOH. The radioactivity was quantified with a MicroBeta Trilux luminescence counter (Wallac).

RESULTS

Establishment of the S19-R443 cell line

To establish a stable cell line expressing the repressor of the T-REx system, we transfected with pcDNA6/TR S19 genetically stable cells derived from CCL39 cells. These cell were also transfected with a GFP reporter gene under the control of the Tet repressor (pcDNA4/TO-GFPw/oZeo). We thus isolated a clone named S19-R443 possessing stable expression of the repressor TetR. These cells were tested in immunofluorescence studies where expression of GFP was visualized only after treatment with tetracycline which changes the conformation of repressor fixed to TetO₂ and activates expression of the gene (data not shown).

Expression of MKP3, dephosphorylation of P-MAPK and the effect on cell growth in cells stably transfected with the 5HRE-TET-MKP3 vector (clone 9-11)

To obtain cells possessing stable expression of MKP3 under hypoxia, we transfected S19-R443 cells with the construction 5HRE-TET-MKP3 (Fig. 1A). Several isolated clones were analyzed by Western blotting (data not shown) and clone 9 was selected based on the level of expression of MKP3 and its effect on P-MAPK. A second subcloning was carried out on this clone to ensure its purity. Various subclones were analyzed and we selected clone 9-11 which showed high expression of MKP3 after treatment with tetracycline (Fig. 1B). This expression was increased in hypoxia (compare lanes 6 and 8), but no expression of MKP3 in hypoxia alone was detected. Expression of MKP3 was detectable after 1 h and maximal after 3 h in the absence of the proteasome inhibitor LLnL (data not shown). In the presence of this inhibitor (which stabilizes MKP3), the maximum level of MKP3 expression was observed after 9 h of induction with tetracycline. No further modification at 12 h was observed (data not shown). We also analyzed the effect of MKP3 expression in hypoxia with and without tetracycline in the presence of LLnL (Fig. 1C Left) on the activation of MAPKs. The MKP3 expression results in a partial inhibition of the activation of MAPKs visualised with an antibody against the di-phosphorylated forms of p42 and p44 MAPKs. To test the effect of MKP3 on cell growth of the 9-11 clone, the reinitiating of DNA synthesis was analysed. Figure 1C (Right) shows that under hypoxia and tetracycline treatment only a 17% inhibition resulted. In control S19-R443 cells, tetracycline had no effect and a non-specific effect of hypoxia alone on reinitiation of DNA synthesis resulted (Fig. 1D).

Expression of MKP3~HIF-1 α , dephosphorylation of P-MAPK and the effect on cell growth in cells stably transfected with the 5HRE-TET-MKP3~HIF-1 α vector (clone 14-7)

With the aim of producing a more sensitive response to hypoxia (with additional post-translational regulation of the level of MKP3, see discussion), we transfected S19-R443 cells with the construction 5HRE-TET-MKP3-HIF1 α (Fig. 2A). Several isolated clones were analyzed by Western blotting (data not shown) and clone 14 selected according to the level of expression of the chimera and its effect on P-MAPK. A second subcloning was carried out as above. Several subclones were analyzed and the clone 14-7 showing high expression of the chimera MKP3-HIF-1 α in hypoxia and with tetracycline treatment (Fig. 2B) was selected. The expression of the chimera increased 5-fold in hypoxia (Fig. 2B - Low exposure, lines 6 et 8). Hypoxia alone resulted in expression of the chimera contrary to

clone 9-11 (Fig. 2B – line 7). Expression of the chimera leads to inhibition of the activation of MAPKs as observed previously. The effect of the chimera on P-MAPK was estimated by successive dilution of one sample and the level of inhibition estimated to be approximately 60-70%.

This clone was examined by immunofluorescent analysis (Fig. 2C). Hypoxia and tetracycline induced expression of the chimera as visualized with a HIF-1 α antibody (the exposure time chosen detected the strong expression of the chimera while the endogenous HIF-1 α expression was weak - Fig 2C, first line, third panel). The expression resulted in an inhibition of the P-MAPK level in cells (in these experiments, cells were rendered quiescent after two washes in serum-free medium and were restimulated with FCS to maximize the P-MAPK signal). When incubated with LLnL, which stabilizes the chimera, all cells express the chimera and the P-MAPK signal is significantly reduced. Controls were also performed to verify that FCS+LLnL treatment does not extinguish the P-MAPK signal in hypoxia as in the presence of Tet and we concluded that the effect is specific (data not shown).

To test the effect of the chimera MKP3-HIF-1 α on cell growth, the reinitiating of DNA synthesis was analysed. Figure 2D shows that in hypoxia and with tetracycline treatment an inhibition of 84% was reached. To test if the presence of HIF-1 α alone was able to explain the effect on cells we examined the effect of hypoxia on cells expressing the Na⁺/H⁺ exchanger SN1 or a chimera SN1-HIF-1 α (Fig. 2E). The presence of HIF-1 α together with the exchanger did not make any difference to reinitiation of DNA synthesis in these cells. Thus HIF-1 α alone does not lead to inhibition of cell growth.

Comparison of the 9-11 and 14-7 clones

To compare the efficacy of the two constructions for MKP3 expression, analysis by Western blot were performed. Figure 3 shows that in hypoxia and with tetracycline treatment the expression of MKP3 is higher with the MKP3 vector than with the chimera MKP3-HIF-1 α - which was revealed with an anti-Myc antibody that detects expression of both vectors - but with a similar effect on P-MAPK dephosphorylation. This result was confirmed with a more N-terminal antibody (anti-MKP3) since the large HIF-1 α domain after the c-Myc epitope could modify the detection of MKP3-Myc-HIF-1 α compared with MKP3-Myc (Fig. 3 - Right). The HIF-1 α chimera appears to be more efficient than the MKP3 on dephosphorylation of P-MAPK. We have verified that this result is not an artifact due to difference in the efficacy of transfer to the blot as a result of the differences in size of the two proteins. In conditions where transfer is 100%, the HIF-1 α chimera is 3-5 less expressed than MKP3 (data not shown). This result explains the results of the reinitiation of DNA synthesis (Fig. 1C - Right and Fig.2D) where the effect of MKP3 was only 17% in hypoxia and after tetracycline treatment whereas inhibition was 84% with MKP3-HIF-1 α .

DISCUSSION

In this report, we described a functional tool which is able to shut down dramatically cell growth under hypoxia by inactivation of p42/p44 MAPK. The study was carried out on two constructs which were developed around the phosphatase MKP3, under the control of tetracycline and hypoxia. The inducibility with tetracycline was used to avoid escape of the system and non-specific expression of the cytostatic protein.

The preliminary establishment of a stable cell line expressing the repressor of the T-REx system proved to be necessary, because we wish to place ourselves in a favourable environment to the final genetic studies. The first construct we developed (MKP3) allowed us to determine the functional parameters of the promoter pCMV/TetO under the control of the enhancer 5HRE and verify the functionality of the latter. We then carried out a series of tests to determine the parameters for use of the construction. Exogenous MKP3 is detectable on a Western blot after 1 h of treatment with tetracycline and maximum of expression is reached after 3 h (data not shown). The addition of a proteasome inhibitor (LLnL) results in very high levels of expression of MKP3 (Fig 1C) but without abolishing completely the P-MAPK signal, which corresponds to the active state of these kinases.

To obtain a more hypoxia-specific tool, we developed a MKP3-HIF-1 α chimera. The HIF-1 component was used to obtain post-translational regulation of the chimera using the instability of HIF-1 α in normoxia and its stability in hypoxia (12-15). This construction was also under the control of the promoter pCMV/TetO, which allowed us to extend the studies performed with the construction MKP3. We verified that this chimera is functional by Western blot analysis and observed substantial inactivation of the P-MAPK signal after treatment with tetracycline and in hypoxia which resulted in a high expression of the chimera.

We then compared the dephosphorylation activity of P-MAPK of the two MKP3 constructions by Western blot analysis. The MKP3~HIF-1 α chimera was more effective than the MKP3 alone in inactivation of the P-MAPK signal despite a lower level of MKP3.

Immunofluorescence analysis also allowed us to confirm the dephosphorylation activity of the MAPK by the MKP3-HIF-1 α chimera (Fig. 2C) with significant extinction of the P-MAPK signal with tetracycline/hypoxia and LLnL.

We finally tested the effect of these constructs on the reinitiation of DNA synthesis which allowed us to measure the impact of the expression of these constructions on cell growth.

The MKP3-HIF-1 α chimera strongly inhibits (84% in Figure 2D) cell growth and this effect is due to the phosphatase activity of the chimera and was not the result of non-specific expression of HIF-1 α in cells (cf. HIF-1 α control fused to the SN1 membrane exchanger). The MKP3 gave only a low level of inhibition (17%) of cell growth and confirmed that the MKP3-HIF-1 α chimera is more efficient for inhibition of cell growth.

Clark C. Fjeld *et al.* have shown (16) that the activity of MKP3 was greatly increased by binding to the NH₂-extremity of p42/p44 MAPK after conformational modification. It is thus possible that HIF-1 α modifies the conformation of MKP3 in the chimera and thus does not need to be activated by MAPK, and therefore possesses a stronger activity than wild type MKP3. This may explain the differences in activities observed between the two constructs.

In this study, we have described the development of a stable cell line expressing the chimera MKP3-HIF-1 α in which we are able to reduce the P-MAPK level and consequently inhibit cell growth in hypoxia. This cell line should also prove useful for the further study of the HIF-1 α pathway as a preliminary tool for selecting mutant cells of this pathway. In addition, we are currently developing tools based on toxic genes (caspase 8 or thymidine kinase, the latter using the pro-drug Ganciclovir) which are hypoxia-dependent. Further characterization of these mutant cells and their study should allow a better understanding of the signaling of the activation of HIF-1.

Such constructions could also be important tools for gene therapy in cancer. Indeed, the oxygen status of a tumor is an important prognostic factor since cells in hypoxic tumors are often chemo- and radioresistant and thus more difficult to cure (for reviews (17,18)). This is because cells in hypoxia divide less than those in normoxia and the majority of anticancer drugs are effective on highly proliferating cells. Moreover, drugs reach the tumors by the blood vessels and hypoxic cells are less vascularized. In addition, resistance to ionizing radiation in hypoxia results from the fact that free-radical damage caused by radiations of cellular DNA leading to cell death is amplified by oxygen molecules. The construction of hypoxia-dependent vectors expressing cytostatic or cytolytic genes could result in the production of excellent tools for cancer therapy.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank D. Grall and Y. Fantei for their excellent technical assistance and Dr M.C. Brahimi-Horn for critical reading of the manuscript. This work was supported by grants from the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Le Ministère de la Recherche (ACC-SV9), La Ligue Nationale Contre le Cancer, l'Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC) and the European Community (contract n° B104-CT97-2071). E.G. is a recipient of a scholarship from ARC. E.B is a recipient of a fellowship from the Human Frontier Science Program.

REFERENCES

1. Semenza, G. L. (2001) Trends Mol. Med. **In press**
2. Wenger, R. H. (2000) J Exp Biol **203 Pt 8**, 1253-63.
3. Jaakkola, P., Mole, D. R., Tian, Y., Wilson, M. I., Gielbert, J., Gaskell, S. J., Kriegsheim, A., Hebestreit, H. F., Mukherji, M., Schofield, C. J., Maxwell, P. H., Pugh, C. W., and Ratcliffe, P. J. (2001) Published online/www.sciencexpress.org /, 5 April 2001;10.1126/science.1059796
4. Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., Kim, W., Valiando, J., Ohh, M., Salic, A., Asara, J. M., Lane, W. S., and Kaelin Jr., W. G. (2001) Published online/www.sciencexpress.org /, 5 April 2001;10.1126/science.1059817
5. Guillemin, K., and Krasnow, M. A. (1997) Cell **89** (1), 9-12.
6. Keyse, S. M. (1998) Semin Cell Dev Biol **9** (2), 143-52.
7. Lenormand, P., McMahon, M., and Pouyssegur, J. (1996) J Biol Chem **271** (26), 15762-8.
8. Pouyssegur, J., Sardet, C., Franchi, A., L'Allemain, G., and Paris, S. (1984) Proc Natl Acad Sci U S A **81** (15), 4833-7.
9. Berra, E., Roux, D., Richard, D. E., and Pouyssegur, J. (2001) EMBO **In press**
10. Brondello, J. M., Brunet, A., Pouyssegur, J., and McKenzie, F. R. (1997) J Biol Chem **272** (2), 1368-76.
11. Richard, D. E., Berra, E., Gothie, E., Roux, D., and Pouyssegur, J. (1999) J Biol Chem **274** (46), 32631-7.
12. Salceda, S., and Caro, J. (1997) J Biol Chem **272** (36), 22642-7.
13. Huang, L. E., Gu, J., Schau, M., and Bunn, H. F. (1998) Proc Natl Acad Sci U S A **95** (14), 7987-92.
14. Kallio, P. J., Wilson, W. J., O'Brien, S., Makino, Y., and Poellinger, L. (1999) J Biol Chem **274** (10), 6519-25.
15. Sutter, C. H., Laughner, E., and Semenza, G. L. (2000) Proc Natl Acad Sci U S A **97** (9), 4748-53.
16. Fjeld, C. C., Rice, A. E., Kim, Y., Gee, K. R., and Denu, J. M. (2000) J Biol Chem **275** (10), 6749-57.
17. Dachs, G. U., Dougherty, G. J., Stratford, I. J., and Chaplin, D. J. (1997) Oncol Res **9** (6-7), 313-25.
18. Brown, J. M. (2000) Mol Med Today **6** (4), 157-62.

FIGURE LEGENDS

Fig.1.

Clone 9-11 analysis. A, Schematic representation of the 5HRE-TET-MKP3 vector. B, Western blot analysis of control S19-R443 cells and clone 9-11 : total cell extracts (45 µg) from normoxic (N) or hypoxic (H) cells treated or not with tetracycline (Tet) (1 µg/ml overnight) where analyzed by Western blotting using rabbit anti-HIF-1α antiserum 2087, and a mouse anti-Myc antibody (MKP3-Myc). C - Left, Western blot analysis: Total cell extracts (45 µg) from hypoxic cells (clone 9-11 and control S19-R443) treated with LLnL (50 µM during 6 h) and treated or not with tetracycline (1µg/ml during 6 h) where analyzed by Western blotting using mouse anti-Myc and mouse anti di-phospho p42/p44MAPK antibodies. Reinitiation of DNA synthesis in clone 9-11 (C right), was performed in hypoxia with or without tetracycline (1 µg/ml). Growth (measured by [³H] thymidine incorporation) in 10% FCS is shown. D, Reinitiation of DNA synthesis was performed in control S19-R443 cells in normoxic or hypoxic cells treated (normoxia : ●, hypoxia : ○ and dotted lines) or not (normoxia : ■, hypoxia : □ and full lines) with tetracycline (1 µg/ml). [³H] thymidine incorporation is presented versus the percentage of FCS.

Fig.2.

Clone 14-7 analysis. A, Schematic representation of the 5HRE-TET-MKP3-HIF-1α vector. B, Western blot analysis of the expression of HIF-1α and P-MAPK : quiescent cells obtained by incubation in serum-free medium for 24 h after two washes with the same medium, were then stimulated with 10% FCS during 5 h before lysis. Total cell extracts (45 µg) from normoxic (N) or hypoxic (H) cells (Control S19-R443 or clone 14-7 cells) treated or not with tetracycline (1µg/ml overnight) where analyzed by Western blotting using rabbit anti-HIF-1α antiserum 2087 or a mouse anti di-phospho p42/p44MAPK antibody. Successive dilutions of an extract from clone 14-7 (N -Tet) were performed on the same gel to determine the effect of MKP3~HIF-1α on P-MAPK. C, Immunofluorescence analysis for HIF-1α and P-MAPK of clone 14-7: normoxic (N) or hypoxic (H) cells were starved and restimulated or not with 10% FCS. In some conditions, tetracycline (1µg/ml) and LLnL (50 µM) were used. Immunofluorescence analysis was performed with anti-HIF-1α or anti-P-MAPK antibodies.

D, Reinitiation of DNA synthesis for clone 14-7, was performed in normoxic or hypoxic cells, treated (normoxia : ●, hypoxia : ○ and dotted lines) or not (normoxia : ■, hypoxia : □) with tetracycline (1µg/ml). The Percentage of inhibition of growth (measured by [³H] thymidine incorporation) is represented versus the percentage of FCS. Right, growth (measured by [³H] thymidine incorporation) in 10% FCS is also represented on a graph with bars. E, Controls was performed on S19/SN1 cells under normoxia (■) or hypoxia (▣) and S19/SN1HIF cl8-1 under normoxia (▤) or hypoxia (▥). Growth (measured by [³H] thymidine incorporation) in 10% FCS is shown.

Fig.3.

Comparison of clones 9-11 and 14-7. A, Western blot analysis : Total cell extracts (45 µg) from hypoxic cells (clones 9-11, 14-7 and control S19-R443,) treated with LLnL (50 µM during 6 h) and treated or not with tetracycline (1 µg/ml during 6 h) where analyzed by Western blotting using mouse anti-Myc or anti MKP3 and mouse anti di-phospho p42/p44MAPK antibodies.

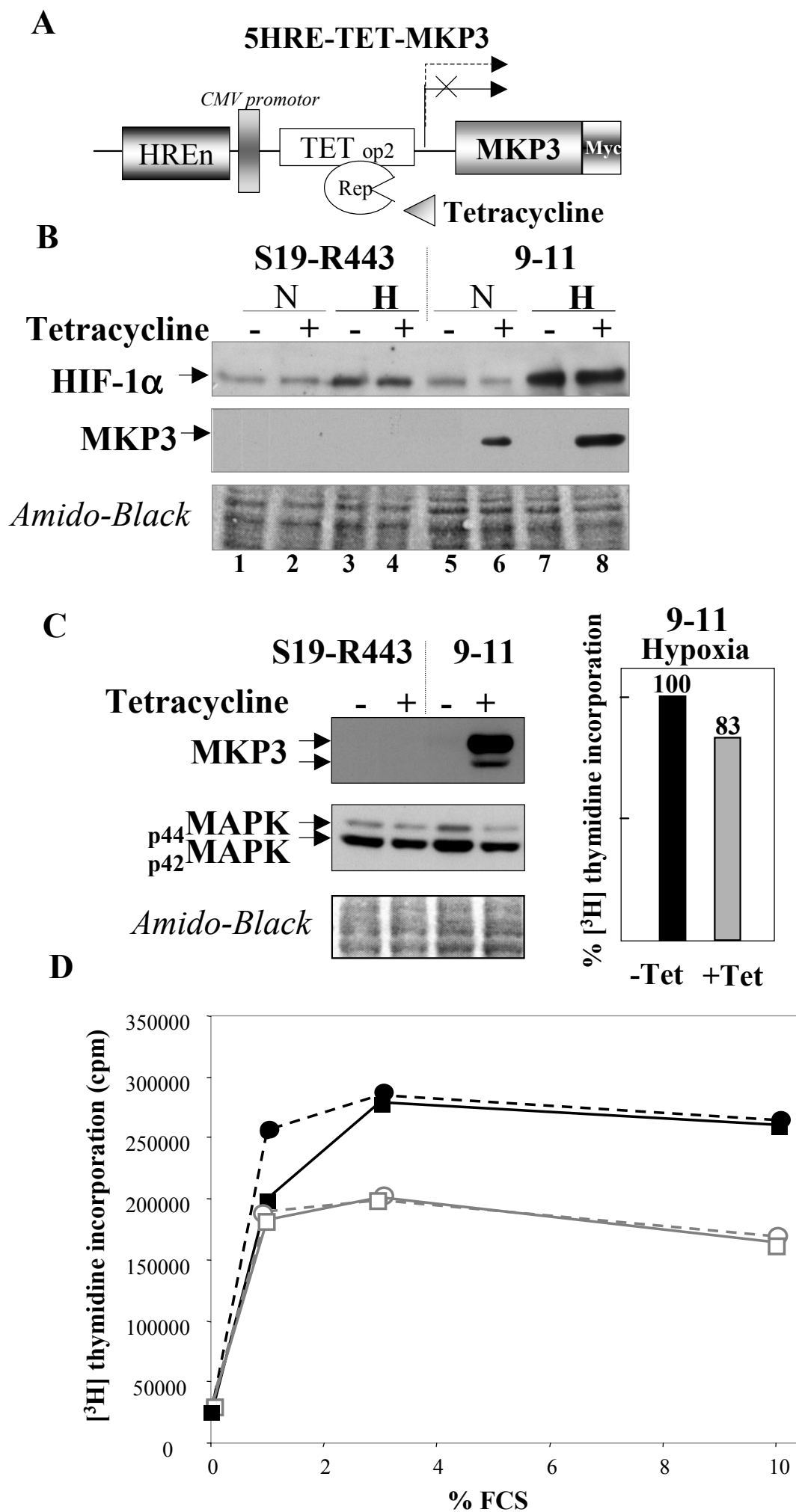
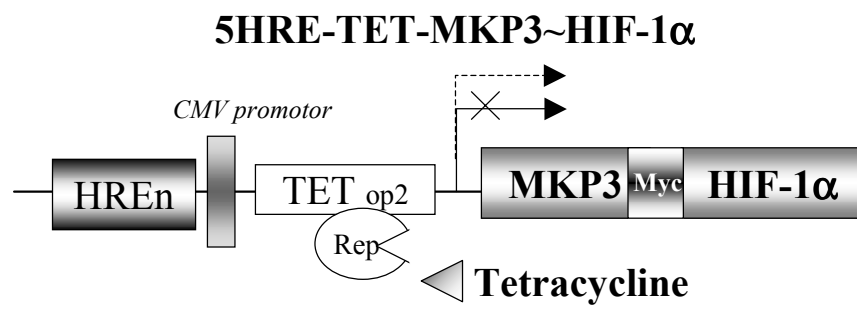


Fig. 1 - Gothié E. *et al.* - 2001

A



B

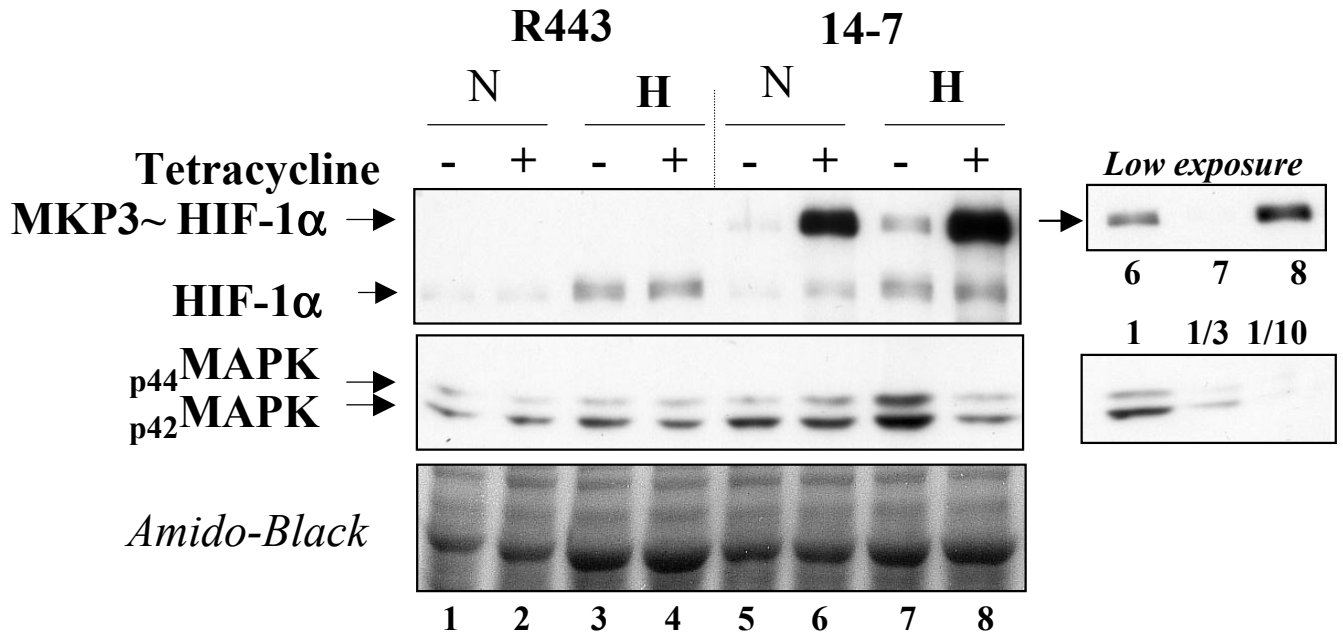


Fig. 2 - Gothié E. *et al.* - 2001

C

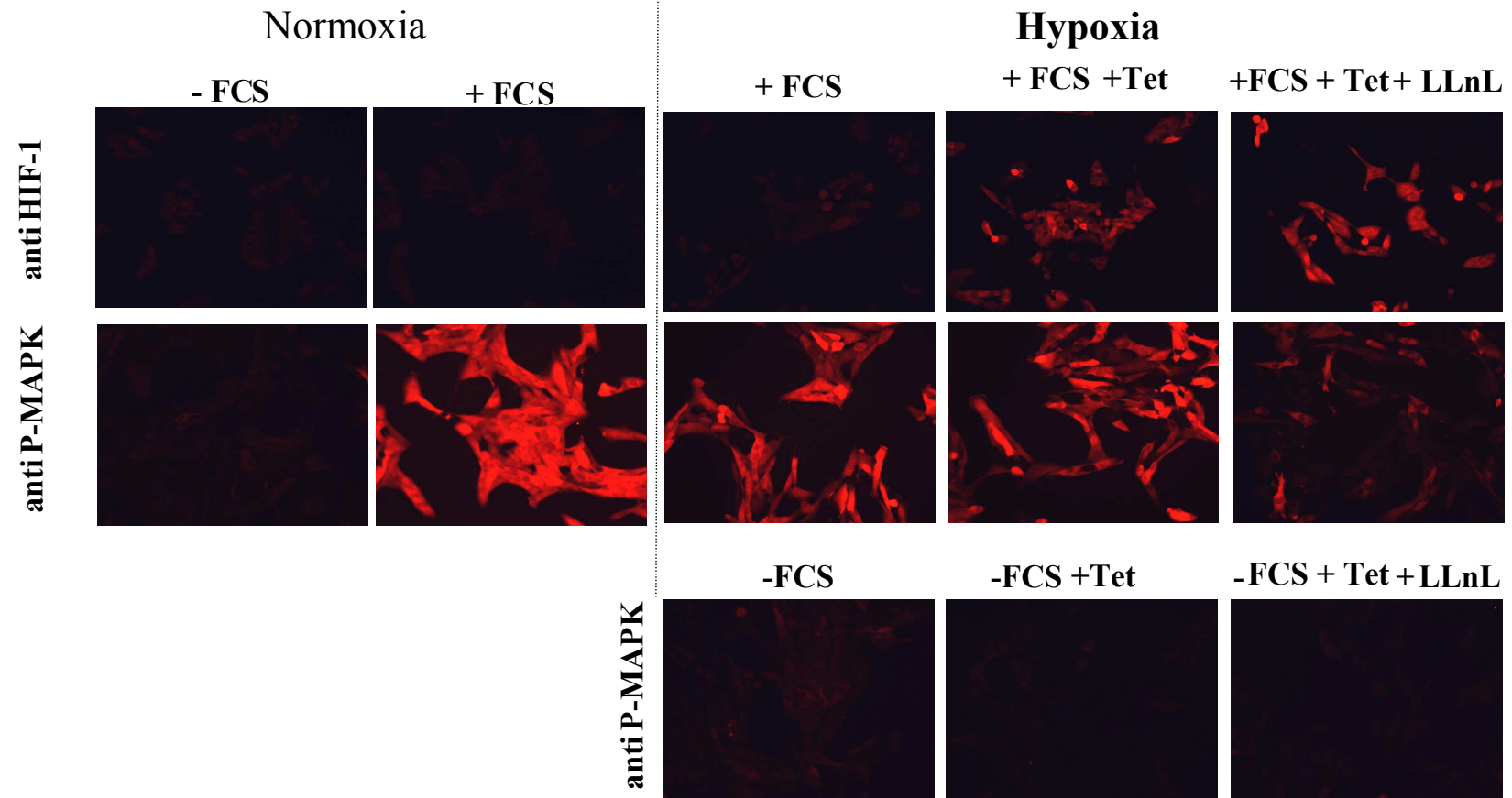
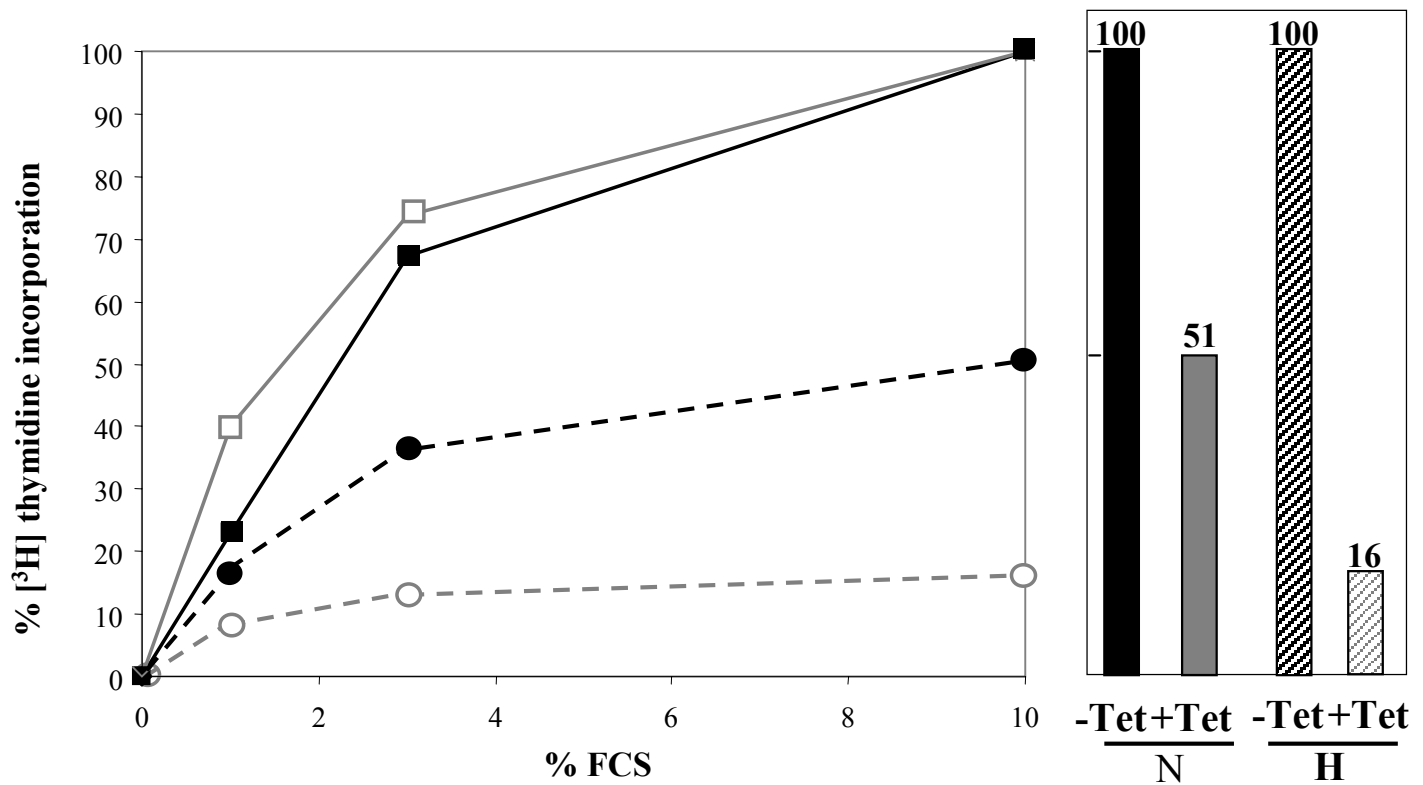


Fig. 2 - Gothié E. *et al.* - 2001

D Reinitiation of DNA synthesis for MKP3-HIF-1 α (Cl 14-7) in normoxia or hypoxia



E Reinitiation of DNA synthesis for S19E/SN1 and S19E/SN1HIF (Cl 8-1) in normoxia or hypoxia

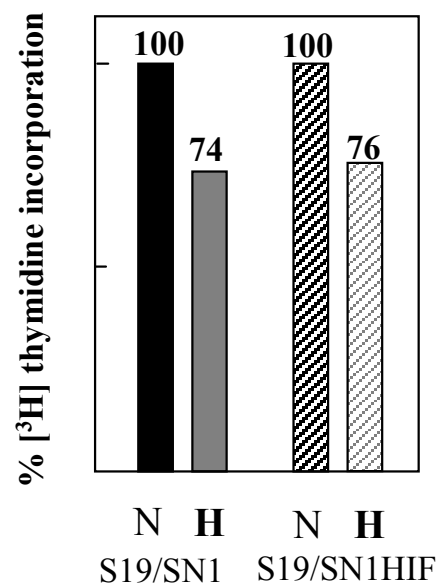


Fig. 2 - Gothié E. *et al.* - 2001

A Western blot analysis of the expression of MKP3 (Cl 9-11) and MKP3-HIF-1 α (Cl 14-7) in hypoxia with or without tetracycline

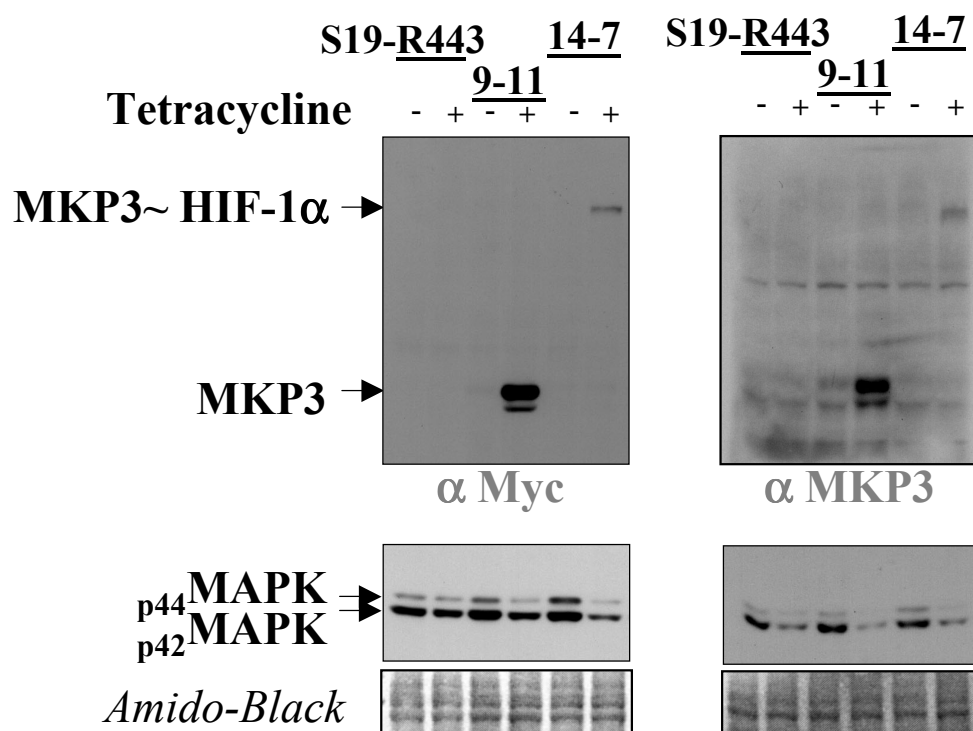


Fig. 3 - Gothié E. *et al.* - 2001

DISCUSSION

IV - DISCUSSION FINALE ET PERSPECTIVES

A - ISOFORMES DE LA FAMILLE BHLH/PAS

B - LA VOIE DE SIGNALISATION DE HIF-1

C - DE L'IMPORTANCE DES OUTILS MOLECULAIRES DANS LA THERAPIE GENIQUE

IV. DISCUSSION FINALE ET PERSPECTIVES

Dans cette dernière partie, nous discuterons certains aspects soulevés lors de ce travail comme l'importance de l'existence d'isoformes de facteurs protéiques et du phénomène d'épissage alternatif dans l'élaboration de nombres d'entres-elles, les perspectives de recherche menées au laboratoire à la suite des travaux de cette thèse et des nouvelles données bibliographiques concernant la caractérisation de la voie de réponse à l'hypoxie et enfin l'intérêt de développer des outils moléculaires répondant à l'hypoxie comme approches possibles de thérapies géniques anticancéreuses.

A. ISOFORMES DE LA FAMILLE bHLH/PAS

Comme rapporté dans le paragraphe II.B.2. 4. , plusieurs isoformes existent dans la superfamille des facteurs bHLH/PAS. Qu'elles soient issues de gènes différents ou d'un même gène, elles comportent des domaines structuraux similaires ou identiques leur permettant d'assurer, selon cette structure, des rôles communs ou différents dans les voies de signalisation de leurs homologues. Même si parfois des localisations tissulaires différentes peuvent compartimenter leurs actions (par exemple HIF-2 α localisé quasi-exclusivement dans les cellules endothéliales), les isoformes s'exprimant de façon concomitante pourraient interférer les unes sur les autres et moduler les voies de signalisation attitrées à l'instar des protéines apparentées (voie de réponse de l'hypoxie et de la détoxification par exemple dans le cas de HIF-1 α et de AHR). Par exemple, HIF-2 α est capable d'induire l'expression du gène de la tyrosine kinase endothéliale *tie2*, ce dont HIF-1 α est incapable. Une modification quantitative de l'expression d'une isoforme par rapport à l'autre, peut donc privilégier l'activation d'une batterie de gènes plutôt qu'une autre. Dans ce cas, une partie constante du système (partenaire commun ARNT1 ou encore d'autres cofacteurs) est conservée, ce qui se traduit par une économie d'énergie au niveau cellulaire. Un autre moyen cellulaire très économe en énergie pour l'élaboration de multiples effecteurs, est l'épissage alternatif qui dans ce cas ne nécessite qu'un seul gène pour donner lieu à de multiples produits. Le paragraphe suivant présente ce phénomène.

1. EPISSAGES ALTERNATIFS : UN SYSTEME IMPORTANT DANS L'ELABORATION DE MULTIPLES EFFECTEURS.

L'épissage alternatif est présent dès le stade métazoaire et constitue un moyen de produire divers polypeptides à partir d'un seul gène (Lopez, 1998). Il est très répandu chez les Vertébrés et l'alignement des séquences EST ainsi que la cartographie des familles d'ARNm résultant du génome humain permettent d'estimer que 35 % des gènes présentent des produits variables issus d'épissages alternatifs ((Croft *et al.*, 2000) et références citées). Cependant, il est vraisemblable que ce pourcentage soit sous-estimé. Dans le génome humain, les gènes « riches en protéines » sont nombreux et incluent par exemple les neurexines, les n-Cadhérines, les canaux potassiques activés par le calcium. Ainsi, les 35000 à 80000 gènes du génome humain doivent sans aucun doute produire facilement plusieurs centaines de milliers de protéines différentes (pour revue (Black, 2000)).

Les modifications de la structure des ARNm peuvent prendre de nombreuses formes. Les exons peuvent ainsi être épissés ou évités et les positions d'épissage en 5' ou 3' peuvent bouger pour donner naissance à des exons plus longs ou plus courts. En plus de cela, des altérations au niveau du site d'initiation de la transcription ou de polyadénylation permettent de produire de multiples ARNm à partir d'un seul gène. Ces multiples ARNm produisent différentes modifications au niveau des protéines résultantes. Dans certains transcrits, des domaines fonctionnels peuvent être ôtés ou ajoutés. L'introduction d'un codon stop précoce peut donner naissance à des protéines tronquées. Le phénomène d'épissage alternatif est utilisé couramment pour ajouter de petites séquences peptidiques dans une protéine (de un à plusieurs centaines de d'acides aminés) qui permettent un gain de fonction pour la protéine cible comme par exemple une modification de la capacité de fixation d'un ligand de récepteur de facteur de croissance ou de molécules d'adhésion, ou encore l'altération de domaines transactivateurs de facteurs de transcription. Il arrive aussi que l'épissage alternatif contrôle la localisation subcellulaire, la phosphorylation de la protéine par des kinases, ou la fixation d'un effecteur allostérique sur une enzyme (pour revue (Black, 2000)).

Un exemple remarquable d'épissage alternatif est trouvé chez la *Drosophile* où la protéine DSCAM, un récepteur superviseur du développement des axones dirigeant la croissance des cônes vers leur cible spécifique au sein du nerf de Bolwig's de la mouche (Schmucker *et al.*, 2000). Ainsi, les exons 4, 6, 9 et 17 sont codés chacun par un large éventail d'exons (cf. Figure 23 : 12, 48, 33 et 2 exons respectivement) qui sont utilisés de manière

exclusive. Si toutes les combinaisons étaient utilisées, le seul gène DSCAM pourrait produire 38016 protéines différentes. Si ces protéines ont des structures similaires, il est vraisemblable que leurs activités soient modifiées.

Ce gène démontre clairement le formidable potentiel de l'épissage alternatif, et en corollaire que le nombre de gènes n'est pas une estimation de la complexité protéique d'un organisme. En ce sens, l'étude et la compréhension de ce phénomène et des mécanismes impliqués est un véritable challenge pour la bioinformatique et la biologie post-génomique.

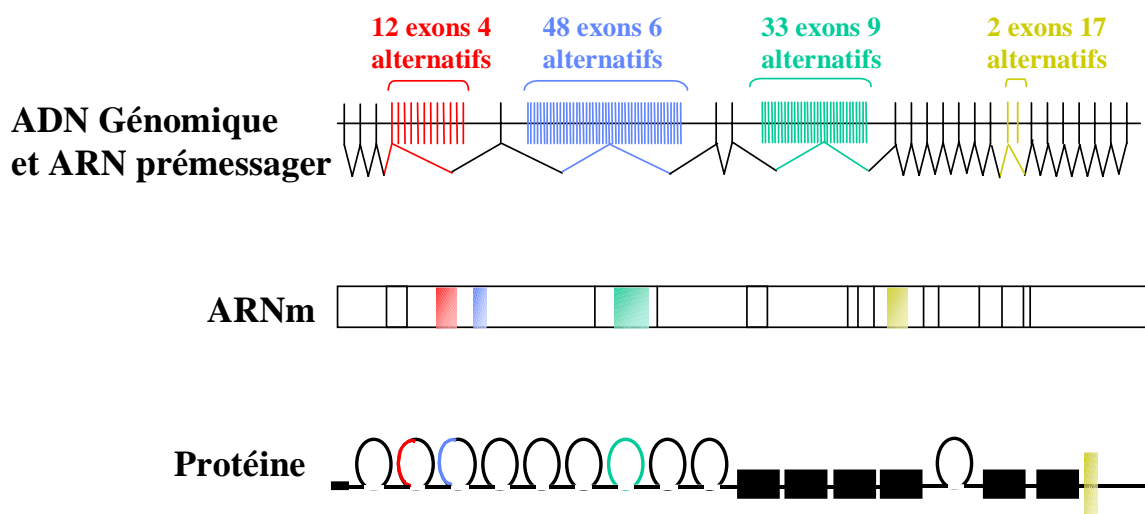


Figure 23 : les 38 016 possibilités de DSCAM

Le gène *dscam* de 61 Kb produit après transcription et épissage un ARNm de 7,8 Kb de 24 exons. Les exons 4, 6, 9 et 17 sont codés par une série d'exons alternatifs mutuellement exclusifs. Chaque ARNm contiendra une des 12 possibilités d'exon 4 (en rouge), une des 48 possibilités d'exon 6 (en bleu), une des 39 possibilités d'exon 9 (en vert), et une des 2 possibilités d'exon 17 (en jaune). Dans la protéine résultante, l'exon 4 code pour la partie amino-terminale du domaine Ig 2, l'exon 6 code pour la même portion du domaine Ig 3, l'exon 9 code pour la totalité du domaine Ig 7, tandis que l'exon 17 code pour le domaine transmembranaire. Si toutes les possibilités sont utilisées, le gène *dscam* peut produire 38016 ARNm et protéines différentes. D'après (Black, 2000).

2. ISOFORME HIF-1 α ⁷³⁶ : UN EXEMPLE D'ISORME MODIFIEE PAR PERTE D'UN DOMAINE FONCTIONNEL

Comme discuté dans le premier article (cf. § III.A), l'isoforme humaine HIF-1 α ⁷³⁶ présente une activité différente de la forme sauvage par perte d'un des domaines de

transactivation. Dans les différentes expériences menées, elle semble avoir une activité plus faible tout en conservant la capacité d'induction sous hypoxie ce qui démontre d'ailleurs que le domaine NAD est bien capable de fonctionner de façon indépendante du domaine CAD. Nous n'avons pas été en mesure de montrer par les expériences réalisées, des avantages pour l'isoforme courte si ce n'est peut être son expression plus marquée en normoxie permettant d'envisager un rôle du complexe HIF-1 dans des tissus nécessitant une vascularisation importante. Néanmoins, à côté de son rôle de transactivation, la partie carboxy terminale de HIF-1 α intervient aussi comme cible de la fixation de cofacteurs. Le cofacteur p300, par exemple, est montré comme capable de fixer ce seul domaine terminal alors que CBP, très proche dans sa structure, peut fixer les deux domaines de transactivation. Comme ce type de cofacteur est impliqué dans la liaison de différents effecteurs protéiques pour l'élaboration de complexes fonctionnels au niveau de l'ADN, et si les propriétés de liaison avec HIF-1 α ⁷³⁶ sont modifiées par rapport à celles de la forme sauvage, il est probable que ces deux isoformes possèdent des propriétés différentes au niveau transcriptionnel.

Par ailleurs, la perte de la régulation positive de p300 sur la forme HIF-1 α ⁷³⁶ pourrait *a contrario* s'avérer avantageuse dans certains cas. En effet, cette forme est dans ce cas aussi insensible à la régulation d'autres cofacteurs ciblant cette interaction p300/HIF-1 α comme c'est le cas avec p35srj mais aussi p53 qui inhibe l'activité transcriptionnelle de HIF-1 par son interaction avec HIF-1 α dépendante de p300.

Par ailleurs, le fait que l'isoforme courte ait été souvent détectée dans des cultures cellulaires humaines d'origine tumorale (HEK293, HepG2 Hela) rend possible une existence conditionnelle de cette isoforme liée au statut des cellules. On sait notamment que dans nombre de tumeurs (carcinome de vessie, de cerveau, de sein, de colon, d'ovaire, de pancréas, de prostate et de rein), le niveau de HIF-1 α est fortement augmenté (Talks *et al.*, 2000) et § II.A.7. 1. 4.). Qu'en est-il de l'isoforme HIF-1 α ⁷³⁶ ? Les propriétés intrinsèques de cette isoforme pourraient lui conférer un rôle important au niveau du développement tumoral. Ou, en tamponnant la réponse hypoxique par son effet dominant négatif partiel, cette isoforme pourrait à l'inverse avoir un effet anti-tumoral. Il serait nécessaire de réaliser une étude sur différentes tumeurs pour vérifier la présence de cette isoforme dans celles-ci et estimer le rapport entre les deux formes.

Par ailleurs, le facteur de transcription Sp1 coimmunoprécipite avec HIF-1 α (G.Pagès/E. Berra, communication personnelle). Or, ce facteur ubiquiste possède un rôle clef

au niveau transcriptionnel dans de très nombreux gènes (gènes de « ménage » importants dans la synthèse d'ADN, gènes tissu-spécifiques ou inductibles). C'est un activateur de la transcription qui fait le lien entre des séquences d'ADN activatrices et la machinerie transcriptionnelle, ou avec d'autres facteurs de transcription. Sp1 interagit notamment avec p300/CBP qui permet d'augmenter la liaison à l'ADN de Sp1 (Suzuki *et al.*, 2000). Le facteur Sp1 interagit-il avec HIF-1 α ⁷³⁶? Des études supplémentaires, avec utilisation de protéines étiquetées pour permettre la détection des différentes isoformes, sont nécessaires pour découvrir si cette isoforme peut lier Sp1 (directement ou indirectement via la protéine CBP) et clarifier le rôle de cette liaison avec Sp1.

Ainsi, bien que souvent moins étudié que les formes principales, les isoformes résultant d'épissages alternatifs retrouvées pour de nombreux éléments de la famille bHLH/PAS ont sans aucun doute des rôles physiologiques au niveau cellulaire. Cependant, certaines isoformes sont retrouvées que chez certaines espèces, si bien que leur rôle exact et leur importance restent à déterminer.

B. LA VOIE DE SIGNALISATION DE HIF-1

1. ETUDE GENERALE

L'ensemble du travail décrit dans le cadre de la seconde publication (§III.B), basé sur la première famille de vecteurs construits autour de MKP3, a permis de développer un outil cytotatique fonctionnel. Ce dernier nous a également permis de valider l'action de l'« *enhancer* » HRE dans le contexte de promoteur du vecteur pcDNA/TO d'Invitrogen et de réaliser toute une série de tests pour déterminer les conditions optimales de fonctionnement. Nous avons transposé ces résultats à une seconde famille de vecteurs basée sur un effecteur toxique pour la cellule (Caspase 8). Ce gène nous semblait prometteur pour développer des constructions présentant une activité cytolytique. En effet, l'expression de Caspase 8, une molécule impliquée dans l'apoptose, doit entraîner en effet un phénomène irréversible conduisant à la mort de la cellule. Nous avons obtenu par le Dr Ph. Pognonec (Université de Nice) une construction chimère CD8~Caspase8 (fusion de la protéine membranaire CD8 au domaine catalytique de Caspase 8 générant une protéine chimère membranaire active) nous permettant de développer les différentes constructions.

Néanmoins les premiers résultats obtenus ne semblent pas permettre d'envisager l'utilisation de ce gène dans ce type de construction.

En effet, la construction 5HRE-TET-CD8~Caspase8 possède bien une activité toxique, aussi bien en normoxie qu'en hypoxie, pour les cellules qui expriment CD8~Caspase8 (visualisée par immunofluorescence en présence de l'inhibiteur de caspase ZVAD). La construction 5HRE-TET-CD8~Caspase8~HIF-1 α développée pour augmenter la sensibilité à l'hypoxie, n'a pas permis d'obtenir un outil toxique, puisque même en absence de ZVAD, certaines cellules expriment la chimère sans pour autant mourir. Cela implique vraisemblablement que la présence de HIF-1 α derrière CD8~Caspase8 détruit l'activité caspase de l'enzyme.

L'expression de CD8~Caspase8 aussi bien en normoxie qu'en hypoxie de la construction 5HRE-TET-CD8~Caspase8 est sans doute dû à la trop forte activité du promoteur CMV, raison pour laquelle, le gène a été placé ensuite dans un contexte de promoteur plus faible (TK pour *Thymidine Kinase*) précédé de 3HRE.

Dans le cas de la construction 3HRE-pTK-CD8~Caspase8, une induction en hypoxie est bien détectée, mais l'expression des protéines chimères est sans doute inférieure au seuil toxique et ne permet pas d'obtenir la mort cellulaire. La construction CD8~Caspase8~HIF-1 α , présente sensiblement les mêmes résultats de même qu'une construction CD8~Caspase8~ODD développée pour réduire le gène stérique vraisemblablement responsable de la faible activité de ce type de construction.

Devant les difficultés rencontrées, une nouvelle approche est en cours de développement au laboratoire basée sur l'utilisation du gène de la *thymidine kinase* de HSV (*Herpes Simplex Virus*). Comme décrit précédemment, cette enzyme est en effet capable de métaboliser le Gancyclovir (GCV) en produit toxique. Par ailleurs l'utilisation du GCV donne aussi la possibilité de moduler le taux de cette drogue pour éliminer les cellules.

Par ailleurs, l'objectif d'isolement de mutants de la voie de réponse à l'hypoxie nécessite de disposer d'un test de stringence extrêmement fiable. C'est la raison pour laquelle, il a été décidé de développer un outil possédant un double système de verrouillage. A côté de l'utilisation de la thymidine kinase, un deuxième gène de contre-sélection (puromycine, échangeur Na⁺/H⁺) va donc être placé en aval du premier dans un vecteur à structure bicistronique, grâce à une séquence IRES (*Intra Ribosomal Entry Site*) dans le contexte du promoteur 3HRE-TK (cf. Figure 24A).

Ce type de vecteur, générant un ARNm contenant les deux séquences codantes - la première traduite de façon CAP-dépendant et la seconde par un procédé CAP-indépendant, dû

à la séquence IRES - permet de s'assurer de l'expression des deux gènes de façon concomitante.

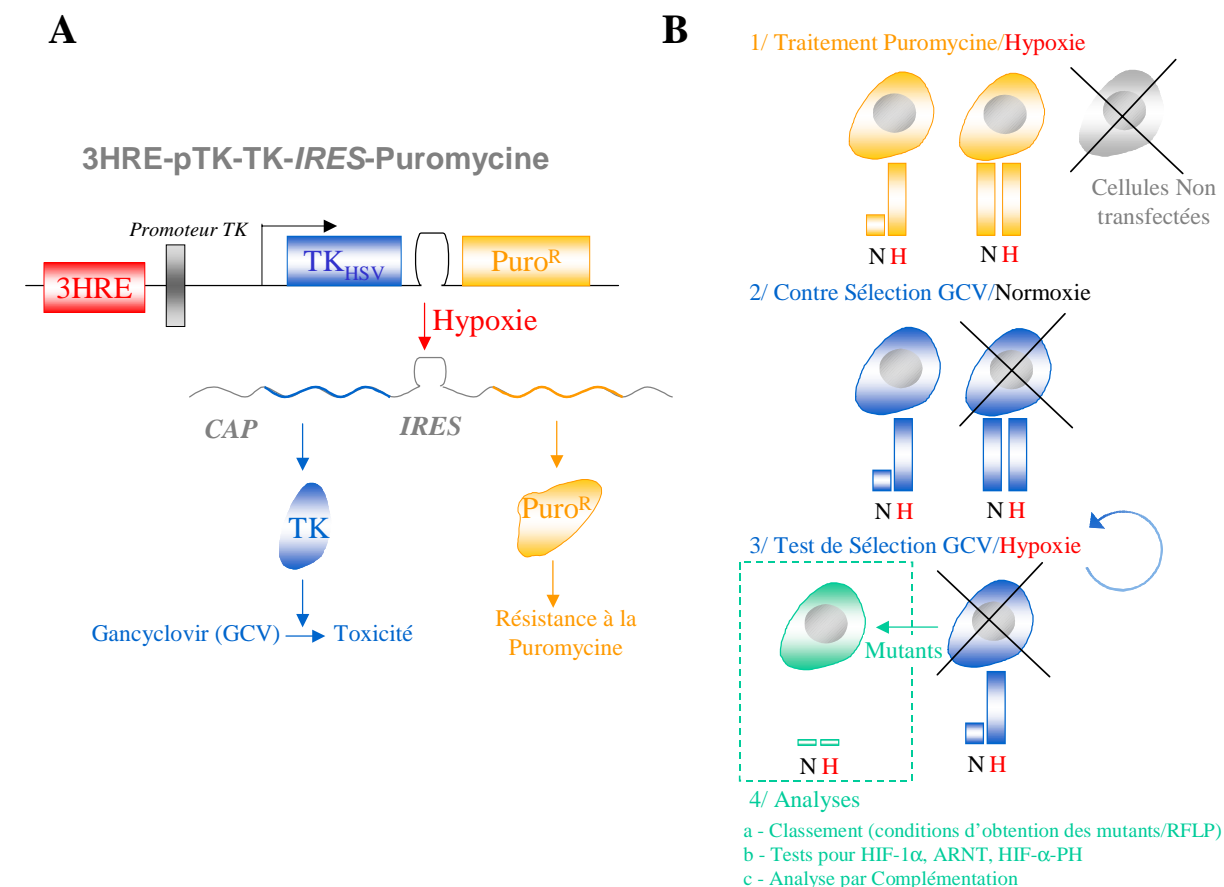


Figure 24 : Dernière approche développée au laboratoire pour l'isolement de mutants de la voie de réponse à l'hypoxie.

A. Schéma de la construction 3HRE-pTK- TK - IRES - Puromycine.

TK_{HSV} pour *Thymidine Kinase* de *Herpes Simplex Virus*. IRES pour *Intra Ribosomal Entry Site*, Puro^R pour gène de résistance à la Puromycine.

B. Etapes de sélection. Se reporter au texte pour les explications. N pour Normoxie, H pour Hypoxie, GCV pour Gancyclovir

Un traitement à la puromycine (ou proton suicide dans le cas de l'utilisation de l'échangeur Na⁺/H⁺) en condition d'hypoxie va permettre la sélection de clones stables exprimant à des niveaux suffisants le gène de résistance. Une étape de contre sélection en normoxie et traitement au GCV va permettre d'éliminer les clones ayant une expression du gène toxique en normoxie non souhaitée. Cette méthode possède ainsi l'avantage d'une contre

sélection en normoxie et GCV évitant de nombreux faux positifs. Enfin, il restera à réaliser le test de sélection pour isoler des mutants par un traitement combinant Hypoxie et GCV. En effet, dans ces conditions tous les clones inductibles doivent mourir, sauf des mutants de la voie d'activation du HIF-1. Plusieurs cycles de sélection seront réalisés pour s'assurer de la bonne réponse des clones (cf. Figure 24B).

Une fois les clones obtenus, il faudra dans un premier temps les classer. Un premier type de classement pourra être réalisé suivant les conditions d'obtention de ces clones. En effet, certains éléments de la voie de signalisation de l'hypoxie entre en jeu rapidement tels que la sous-unité HIF-1 α (expression dès 30 mn, maximum dès 3 h d'hypoxie) et les éléments impliqués directement dans cette stabilisation (hydroxylase à proline, kinases, phosphatases etc...). D'autres éléments tels que HPTF peuvent être impliqués lors d'hypoxie prolongée (8h). Ainsi en ce plaçant à différents temps de traitement à l'hypoxie, les cibles des mutations peuvent être différentes.

Il est aussi possible d'envisager un classement des mutants en utilisant la technique de marqueurs RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), l'analyse des profils des clones permettant de les classer en différentes familles.

Une série de test rapides seront ensuite réalisés afin de savoir si les mutants obtenus touchent des éléments connus de la voie de l'hypoxie, à savoir HIF-1 α et ARNT ou l'hydroxylase à proline. Dans les deux premiers cas, une transfection par l'une ou l'autre des sous-unités et l'observation d'une complémentation ou non permettra de trancher. Dans le second cas, un test d'activité d'hydroxylation sur proline, réalisé en mettant en présence des lysats cellulaires des différents mutants et un peptide correspondant au déterminant de stabilité du HIF-1 α (contenant le triplet PYI cible de la PH - § II.B.1. et § II.C) fixé sur colonne d'affinité (cf §IV.B.3.) permettra de savoir si la mutation porte sur la PH ou sur un élément nécessaire à son fonctionnement.

L'analyse des clones mutants pour HIF-1 α , HIF-1 β - dans le cas de mutations ponctuelles ou de petites délétions - permettra de déterminer des domaines essentiels pour le fonctionnement de ces deux cofacteurs (domaine de fixation de la PH, sites de phosphorylation etc...).

A la suite de cela, les clones non-caractérisés devront être analysés par complémentation. Cette méthode consiste à transfecter les mutants par une banque d'ADNc représentatifs des ARNm d'une cellule. Pour déterminer le nombre de cellules à transfecter, il

sera nécessaire de tenir compte de divers paramètres comme le nombre d'ADNc estimé de la banque (pouvant être multiplié par un facteur 10 par sécurité) et l'efficacité de transfections des cellules cibles. Une fois déterminé, il suffira de transfecter le nombre de cellules adéquat, de faire une sélection par le gène de résistance porté par le vecteur contenant les ADNc pour éliminer les clones non transfectés. Les clones résistant obtenus seront de nouveau testés pour leur capacité de réponse à l'hypoxie. Dans le cas d'une restauration de la signalisation de l'hypoxie, il restera à déterminer par PCR, l'ADNc ayant permis cette complémentation de fonction, et donc étant un élément clef de la voie de l'hypoxie.

2. RECHERCHE DE L'HYDROXYLASE A PROLINE

La compréhension du mécanisme de la voie de signalisation de HIF-1 est restée longtemps un véritable challenge. Les deux publications récentes, concernant l'hydroxylase à proline (PH), ont cependant créé une véritable avancée en la matière (Ivan *et al.*, 2001; Jaakkola *et al.*, 2001). Plusieurs possibilités d'études ont dès lors été envisagées au sein du laboratoire pour caractériser exactement l'enzyme.

3. PREMIERE APPROCHE - ENZYMATIQUE

Dans un premier temps, des études rapides vont être entreprises pour déterminer si HPTF mis en évidence au laboratoire, ne serait pas en réalité l'hydroxylase à proline. Pour cela, des mesures de l'activité hydroxylase vont être réalisées dans différentes conditions d'oxygénation et comparées à la caractéristique de HPTF d'être induit en condition d'hypoxie (Berra *et al.*, 2001a). Pour ce faire deux techniques sont envisagées.

La première consiste à fixer sur colonne d'affinité (phase avidine) un peptide biotinylé correspondant au déterminant de stabilité de HIF-1 α contenant le signal PYI ciblé par l'hydroxylase à proline. En faisant passer divers extraits sur cette colonne, puis en éluant le peptide, l'activité hydroxylase des extraits sera estimée par le rapport entre les deux formes hydroxylé ou non du peptide (quantités relatives déterminées par FPLC - *Fast Performance Liquid Chromatography*). Si l'activité hydroxylase des différents essais mesurée dans différentes conditions d'oxygénation suit les propriétés de HPTF, ce dernier facteur pourrait bien s'avérer être la HIF- α -PH.

La deuxième technique consiste à se placer dans des cellules déficientes en pVHL dans lesquelles HIF-1 α est stable. En condition de normoxie ou de traitement à la DFO, la

HIF- α -PH est active ou non. En passant des extraits sur une colonne d'affinité ayant le peptide déterminant de stabilité de HIF-1 α fixé, la PH va hydroxyler ou non ce peptide. Cette activité sera mesurée en utilisant la capacité de ce peptide hydroxylé de fixer pVHL. En effet, en faisant synthétiser ce facteur en réticulocyte en présence de méthionine ^{35}S (avec un traitement avec la DFO pour éviter une activité non spécifique de PH dans les extraits de réticulocytes) et en faisant passer les extraits obtenus sur colonnes, il sera possible de mesurer directement la radioactivité retenue sur colonne.

4. DEUXIEME APPROCHE - BIOCHIMIQUE

Si le domaine contenant le signal PYI est extrêmement important pour le signal de dégradation de HIF-1 α , il n'est pas sûr que ce soit le domaine de fixation de l'enzyme. Pour s'assurer de pouvoir purifier l'enzyme, une série de constructions GST contenant différentes fractions du domaine ODD (avec ou sans le déterminant de stabilité), ont été réalisées en vue de réaliser des expériences de *GST-Pull Down*. A la suite de ces derniers, il sera possible de tester l'activité des fractions retenues, par élution de ces dernières et passage sur les colonnes de dosage développées précédemment. Cela permettra de déterminer si une activité hydroxylase à proline peut être retenue sur billes GST-ODD. Parallèlement à ces mesures, des analyses par SDS PAGE permettront de mettre en évidence des bandes protéiques qu'il faudra analyser par des techniques de spectrométrie de masse ou de séquençage amino terminal afin de parvenir à la séquence de la PH puis au clonage de celle-ci.

Parallèlement à la technique de *GST-Pull Down*, des colonnes d'affinité au métal (Nickel, Fer ou Cobalt) sont aussi développées pour isoler la PH selon ces propriétés de fixation du Fer comme cosubstrat. Cette technique peut être évidemment couplée à la précédente pour augmenter la spécificité du système de purification.

S'il s'avère que la PH suit la propriété de HPTF d'être fortement synthétisé après un traitement prolongé à l'hypoxie, l'analyse des bandes protéiques obtenues en SDS PAGE se fera sur celle présentant une induction sous hypoxie.

5. TROISIEME APPROCHE – GENETIQUE

La dernière approche génétique développée au laboratoire pour isoler la PH est une tentative de clonage par PCR de l'enzyme en utilisant des oligonucléotides dégénérés. Pour déterminer ces derniers, les séquences connues des hydroxylases à proline de collagène ont

été comparées et ont permis de cibler deux régions fortement conservées (domaines de fixation du fer et domaine de fixation du 2-oxoglutarate). Là encore, si la PH est inductible par l'hypoxie, les PCR seront réalisées après un traitement à l'hypoxie pour enrichir les extraits en PH.

Toutes les techniques présentées précédemment constituent des approches complémentaires dans l'isolement d'éléments clefs de la voie de réponse à l'hypoxie, étape essentielle pour la compréhension de cette voie impliquée au cours du développement, dans la physiologie ou au niveau pathologique.

C. DE L'IMPORTANCE DES OUTILS MOLECULAIRES DANS LA THERAPIE GENIQUE

L'objectif original de la thérapie génique était de corriger un désordre génétique en remplaçant le gène déficient par un gène fonctionnel. Plus récemment, le concept d'utilisation de la thérapie génique dans le traitement de maladies autre que les désordres génétiques héréditaires a émergé. Ainsi, des centaines d'essais cliniques pour la thérapie génique du cancer ont déjà commencé (Dachs *et al.*, 1997).

Afin d'être capable de cibler les cellules malignes tout en évitant les tissus sains, ce type d'approche nécessite de combiner une distribution de gènes extrêmement sélective avec une expression génique (et une activité des produits de ces gènes) spécifique, en plus d'une possible activation indirecte par des drogues. Des progrès récents ont permis d'avancer dans la recherche de distribution efficace des ADNs au niveau des tumeurs via l'utilisation de méthodes virales (rétrovirus, adénovirus) ou non (liposomes, injection) bien que le système sanguin faible et désordonné, ainsi que la pression du fluide interstitiel, au niveau tumoral rendent difficile cette distribution. Un niveau de contrôle supplémentaire peut être ajouté en ciblant l'expression génique via des promoteurs tissus-spécifiques ou activés uniquement dans des conditions tumorales.

En fait, trois approches existent dans le registre des outils thérapeutiques contre le cancer : la thérapie chimique moléculaire (utilisée pour délivrer un gène toxique – aussi appelé gène suicide – aux cellules tumorales), l'immunopotentialisation génétique (réalisée afin d'aider le système immunitaire à rejeter la tumeur) et enfin la compensation de mutation (qui bloque les oncogènes ou stimule l'expression des gènes suppresseurs de tumeurs).

Au niveau de la première stratégie, deux aspects sont importants à considérer : la distribution ciblée et l'expression ciblée (Dachs *et al.*, 1997).

1. LA DISTRIBUTION CIBLEE

Le ciblage plutôt qu'une distribution hautement efficace est en effet nécessaire pour une thérapie génique sélective du cancer. Les récepteurs extracellulaires et les molécules de surface spécifiques de tumeurs déjà caractérisées ou encore à mettre en évidence peuvent être utilisées pour cibler les gènes thérapeutiques. Les deux techniques de transport (virale ou non virale) ont été développées pour cet objectif (rétrovirus, adénovirus, liposomes, les constructions polylysine, les cellules T).

La méthode initiale développée était basée sur la transduction rétrovirale du fait de sa caractéristique à infecter les seules cellules se divisant. Cette méthode présente donc potentiellement un ciblage spécifique des cellules cancéreuses hautement prolifératives. Les vecteurs rétroviraux ont ensuite été modifiés dans l'optique d'augmenter les infections sélective.

Le vecteur HSV (*Herpes Simplex Virus*) déficient pour le gène de la ribonucléotide réductase est un bon exemple pour ce type d'ingénierie (Carroll *et al.*, 1996). Ce gène étant essentiel pour la réplication virale et n'étant exprimé que dans les cellules hautement prolifératives, l'existence d'un lien étroit avec les cellules hôtes pour la génération de deoxyribonucléotides nécessaire à sa synthèse d'ADN est forcément nécessaire pour le vecteur recombinant.

Sinon, la modification des protéines de l'enveloppe virale des rétrovirus, permet aussi de cibler spécifiquement ces virus dans des cellules. En effet, le transfert de gènes par ces virus est entièrement dépendant de l'interaction entre les protéines de l'enveloppe virale et de récepteurs adaptés sur la surface des cellules cibles. En remplaçant un domaine de protéine d'enveloppe (exemple le polypeptide SU du virus Mo-MuLV (*Moloney Murine Leukemia Virus*) par une chaîne d'anticorps, il est possible de rendre l'interaction spécifique d'un type d'antigène cellulaire (Chu *et al.*, 1994; Kasahara *et al.*, 1994; Russell *et al.*, 1993). Il reste à déterminer les molécules de surface spécifiques exprimées de façon différentielle et qui pourraient fonctionner en tant que récepteurs pour ce type de virus modifiés.

2. L'EXPRESSION CIBLEE

Pour augmenter la sélectivité de la thérapie génique du cancer, il est possible de placer des séquences de régulation permettant d'éviter l'expression des vecteurs dans des tissus normaux qui auraient été ciblés de façon non spécifique. Les études portant sur les promoteurs tissu-spécifiques ou spécifiques de tumeurs ont ainsi permis de déterminer des séquences de

régulation pouvant être utilisée pour contrôler les promoteurs utilisés dans les constructions pour la thérapie génique.

2. 1. *Expression tissulaire ciblée*

Dans le cas du promoteur du facteur *von Willebrand Factor* (vWf), une région du gène a ainsi pu être isolée présentant une spécificité d'expression au niveau des cellules endothéliales. Une suppression *in vitro* de la croissance cellulaire a ainsi pu être observée avec l'utilisation du promoteur *vWf* dirigeant l'expression du gène de la thymidine kinase dans le cadre d'un vecteur HSV et suite à un traitement par l'agent antiviral Gancyclovir (GCV) (Ozaki *et al.*, 1996). En effet, la thymidine kinase est capable de transformer le GCV en un dérivé toxique permettant de tuer les cellules ciblées.

2. 2. *Expression ciblée pour une maladie*

Certaines cellules tumorales telles que des cellules de carcinomes de colon surexpriment le proto-oncogène *c-myc*. En développant une construction HSVtk sous dépendance d'éléments de réponse de l'hétérodimère Myc/Max, il a été possible *in vitro* d'augmenter la sensibilité au GCV de cellules tumorales transfectées ou encore d'induire *in vivo* la régression tumorale après un traitement de GCV de tumeurs établies ciblées par une distribution par liposomes. (Kumagai *et al.*, 1996; Sugaya *et al.*, 1996).

2. 3. *Expression ciblée conditionnelle*

Un remarquable exemple d'expression ciblée prometteur au niveau du traitement du cancer concerne l'expression de gènes régulés par l'hypoxie. En effet, les tumeurs agressives sont souvent insuffisamment irriguées, en partie à cause de la croissance extrêmement rapide des cellules tumorales comparée à celle des cellules endothéliales nécessaires à une néovascularisation, et aussi du fait que les nouveaux vaisseaux sanguins forment souvent un système d'irrigation désorganisé. Cela résulte en des régions déprivées en nutriments et en oxygène. Les cellules dans ce type d'environnement restent cependant viables et présentent souvent une résistance à la chimiothérapie ou la radiothérapie (Dachs *et al.*, 1997). En fait, cela s'explique par le fait que la majorité des médicaments anticancéreux sont souvent actifs contre des cellules à prolifération extrêmement rapide. Or, les cellules éloignées d'un système d'irrigation approprié se divisent moins bien que les cellules correctement irriguées. Par ailleurs, les médicaments nécessitent souvent d'atteindre la tumeur par le système sanguin (cf. Figure 25).

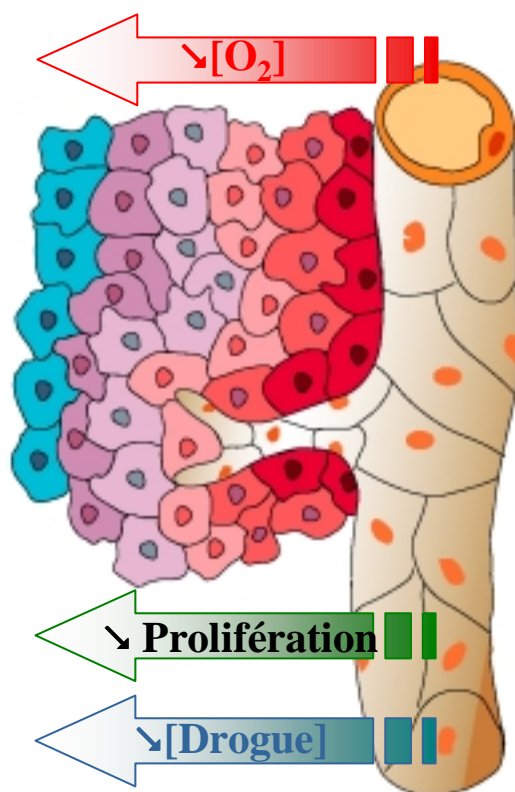


Figure 25 : Schéma d'une tumeur entourant un capillaire

Comme l'oxygène décroît en fonction de la distance entre les cellules tumorales et le capillaire, la croissance cellulaire ainsi que la distribution de drogues diminuent. D'après (Brown, 2000; Carmeliet and Jain, 2000).

En ce qui concerne la résistance aux traitements ionisants, l'oxygène renforce les dégâts causés sous formes de radicaux libres sur l'ADN par ces derniers, ce qui amène un déclenchement irréversible de la mort cellulaire. L'efficacité des traitements ionisants est donc moindre sur des cellules en hypoxie (Brown, 2000).

L'hypoxie est donc souvent considérée comme un obstacle majeur dans la thérapie et constitue un pronostic important devant d'autres facteurs tels que l'âge des patients, l'état de ménopause, ou la taille et l'histologie de tumeurs (Brown, 2000).

Les outils développés dans le cadre de l'article 2, sont donc des outils répondant à ces critères et qui pourraient s'avérer prometteurs dans la thérapie génique contre le cancer.

CONCLUSION GENERALE

Les connaissances disponibles sur l'hypoxie et sur son facteur clefs HIF-1 sont impressionnantes et ne cessent de croître. En fait, le rôle essentiel du facteur HIF-1 au cours du développement, dans la physiologie ou au niveau pathologique fait de la découverte des mécanismes clefs de son activation (un domaine encore faiblement connu) un véritable challenge. Les découvertes à venir sur cette voie de signalisation permettront sans aucun doute de nouvelles approches pour le traitement de maladies sévères telles que le cancer (via l'utilisation de la thérapie génique par exemple) ou les ischémies cérébrales ou cardiaques. Allant dans ce sens, il a été récemment montré que le peptide apparenté à la cathéline PR39 (*Prolin and Arginine-rich peptide*) est capable d'induire fortement l'angiogenèse en inhibant la dégradation de HIF-1 α par le système Ubiquitine/Protéasome. Ce peptide et des analogues de celui-ci pourraient donc s'avérer être des agents efficaces pour l'induction de l'angiogenèse thérapeutique (Li *et al.*, 2000).

ANNEXES

BASE DE DONNEES : PROTEINES A DOMAINE bHLH/PAS

PUBLICATION 3 - HIF-1 : REGULATEUR CENTRAL DE L'HYPOXIE

Emmanuel Gothié et Jacques Pouyssegur
Médecine Science - Mini-Revue – Soumis

PUBLICATION 4 - HIF-1-DEPENDENT TRANSCRIPTIONAL ACTIVITY IS REQUIRED FOR OXYGEN-MEDIATED HIF-1 α DEGRADATION

Eduarne Berra, Darren E. Richard, **Emmanuel Gothié**, Jacques Pouyssegur
FEBS 24608 FEBS Letters 491 (2001) 85-90

PUBLICATION 5 - SIGNALING ANGIOGENESIS VIA P42/P44 MAP KINASE AND HYPOXIA

Eduarne Berra, Julie Milanini, Darren E. Richard, Maude Le Gall, Francesc Vinals, **Emmanuel Gothié**, Danièle Roux, Gilles Pagès and Jacques Pouyssegur
Biochemical Pharmacology, Vol. 60, pp. 1171-1178, 2000

PUBLICATION 6 - P42/P44 MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASES PHOSPHORYLATE HYPOXIA-INDUCIBLE FACTOR 1 α (HIF-1 α) AND ENHANCE THE TRANSCRIPTIONAL ACTIVITY OF HIF-1

Darren E. Richard, Eduarne Berra, **Emmanuel Gothié**, Danièle Roux, and Jacques Pouyssegur
THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Vol. 274, No. 46, Issue of November 12, pp. 32631–32637, 1999

BASE DE DONNEES SUR LES FACTEURS A DOMAINES bHLH/PAS

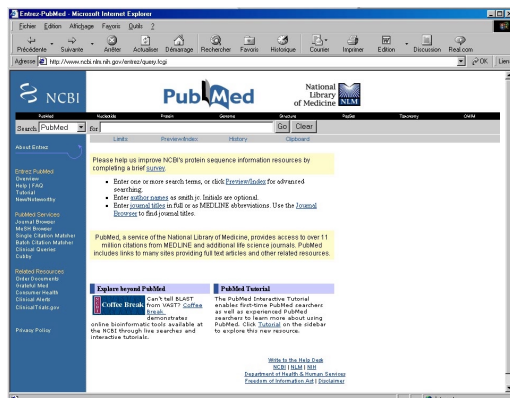
Préambule

Cette base de donnée est une compilation des séquences relatives aux facteurs éléments de la superfamille des protéines à domaine bHLH/PAS. Elle a été établie à partir du site NCBI :

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>

Elle donne comme informations le **numéro d'accension** (*Accession Number*, la version et le PID), l'**organisme**, l'**espèce** et la **localisation chromosomique** lorsque celle-ci est connue. Le **nombre de bases** et **d'acides aminés** correspondant ainsi que les **références bibliographiques** sont également indiqués.

Parmi les informations complémentaires, le **nom** initial de la séquence, le statut « **séquence complète/incomplète** » ou de **variant** issus d'épissage alternatif etc... sont fournis selon les informations disponibles. La mention **REFSEQ** (*The NCBI Reference Sequence project*) fait référence à ce projet d'annotation fonctionnelle du génome humain. Plusieurs normes établies fournissent un point de référence stable pour l'analyse des mutations, les études d'expression de gènes, et la découverte de polymorphisme.



La mise à jour des séquences en est plus rapide et permet de refléter les connaissances actuelles, mais aussi d'éviter la redondance souvent rencontrée dans les archives de base de données de GenBank.

Plus de renseignements : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink/refseq.html>

REFSEQ Provisoire : Cette indication signale que la séquence publiée n'est pas encore soumise au contrôle final de NCBI.

Isoformes HIF-α

HIF-1α = MOP1

Organisme	Espèce	Accession Number	Version et PID	Chromosome et Localisation	Bases CDS	Acides Aminés	Informations supplémentaires	Auteurs
Humain	Homo sapiens	AH006957	AH006957.1 GI:3790534	14 Loc=14q21-q24			Joindre les séquences suivantes : AF050115.1:1..1066/AF050116.1:1..441 AF050117.1:1..538/AF050118.1:1..423 AF050119.1:1..352/AF050120.1:1..251 AF050121.1:1..422/AF050122.1:1..576 AF050123.1:1..527/AF050124.1:1..996 AF050125.1:1..551/AF050126.1:1..392 AF050127.1:1..1558	Iyer <i>et al.</i>
		NM_001530	NM_001530.1 GI:4504384	14 Loc=14q21-q24	2481	826	REFSEQ Provisoire	Hogenesch <i>et al.</i> Semenza <i>et al.</i> Wang <i>et al.</i>
		U22431	U22431.1 GI:881345		2481	826		Wang <i>et al.</i>
		U29165	U29165.1 GI:1144012	14 Loc=14q22.23	2481	826	MOP1	Hogenesch <i>et al.</i>
Souris	Mus musculus	AH006789	AH006789.1 GI:2197149				Caractérisation moléculaire du locus murin Hif-1 alpha Joindre les séquences suivantes : AF004141.1:1..292/AF004142.1:1..191 AF004143.1:1..146/AF004144.1:1..85 AF004145.1:1..113/AF004146.1:1..203 AF004147.1:1..107/AF004148.1:1..147 AF004149.1:1..222/AF004150.1:1..284 AF004151.1:1..165/AF004152.1:1..425 AF004153.1:1..109/AF004154.1:1..127 AF004155.1:1..1321	Luo <i>et al.</i>
		NM_010431	NM_010431.1 GI:7363432	12	2511	836	REFSEQ	Luo <i>et al.</i>
		X95580	X95580.1 GI:1430864	12	2430	810		Wenger <i>et al.</i>
		U59496	U59496.1 GI:1389890		2469	822		Li <i>et al.</i>
Vache	Bos taurus	AB018398	AB018398.1 GI:5019611		2472	823		Hara <i>et al.</i>
Truite (Rainbow trout)	Oncorhynchus mykiss	AF304864	AF304864.1 GI:13561505		2301	766		Soitamo <i>et al.</i>
Caenorhabditis elegans	Caenorhabditis elegans	AF370361	AF370361.1 GI:14028830		1911	636		Jiang <i>et al.</i>
African clawed frog	Xenopus laevis	AJ277829	AJ277829.1 GI:8953674		2418	805		Kietzmann <i>et al.</i>
Rat (Norway rat)	Rattus norvegicus	Y09507	Y09507.1 GI:2924301		2478	825		Kietzmann <i>et al.</i>

HIF-2 α = EPAS1 = MOP2

Organisme	Espèce	Accession Number	Version et PID	Chromosome et Localisation	Bases CDS	Acides Aminés	Informations supplémentaires	Auteurs
Humain	Homo sapiens	NM_001430	NM_001430.1 GI:4503576	2 Loc=2p21-p16	2613	870	REFSEQ Provisoire EPAS1	Tian <i>et al.</i> Hogenesch <i>et al.</i>
Rat (Norway rat)	Rattus norvegicus	NM_023090	NM_023090.1 GI:12831204		2625	874	REFSEQ	Kietzmann,T <i>et al.</i>
Souris (House mouse)	Mus musculus	NM_010137	NM_010137.1 GI:6753755		2625	874	REFSEQ HRF	Flamme <i>et al.</i>
		U81983	U81983.1 GI:1805269		2628	875		Tian <i>et al.</i>
Poulet	Gallus gallus	AAD38358	AAD38358.1 GI:5051910		2604	867		Favier <i>et al.</i>
Caille (Common quail).	Coturnix coturnix	AF212989	AF212989.1 GI:6644407		2613	870		Elvert <i>et al.</i>
Vache	Bos taurus	AB018399	AB018399.1 GI:5019613		2613	870		Hara <i>et al.</i>

HIF-3 α

Organisme	Espèce	Accession Number	Version et PID	Chromosome et Localisation	Bases CDS	Acides Aminés	Informations supplémentaires	Auteurs
Rat (Norway rat)	Rattus norvegicus	AJ277827	AJ277827.1 GI:8953574		1989	662		Kietzmann <i>et al.</i>
Souris (House mouse)	Mus musculus	NM_016868	NM_016868.1 GI:8393527		1989	662		Gu <i>et al.</i>

SIMILAR SIMA

Organisme	Espèce	Accession Number	Version et PID	Chromosome et Localisation	Bases CDS	Acides Aminés	Informations supplémentaires	Auteurs
Mouche (fruit fly)	Drosophila melanogaster	U43090	U43090.1 GI:1174073	III Loc=3; 99D6-9	613..5130		Séquence complète	Nambu <i>et al.</i>

Isoformes ARNTs

ARNT : aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator = AHA-1 = TGO

Organisme	Espèce	Accession Number	Version et PID	Chromosome et Localisation	Bases CDS	Acides Aminés	Informations supplémentaires	Auteurs
Humain	Homo sapiens	Y18859	Y18859.1 GI:12232594	1 Loc=1q21			Structure du gène ARNT humain Joindre les séquences : Y18859.1 :2849..2873/AJ404853.1:937..1048 AJ404852.1:480..524/AJ404851.1:597..641 AJ404854.1:799..843/AJ404854.1:3615..3828 AJ404854.1:6776..6989/AJ404854.1:8626..8728 AJ404854.1:10866..10931/AJ404854.1:11362..11447 AJ404854.1:13281..13357/AJ404854.1:14034..14168 AJ404854.1:16642..16716/AJ251863.1:210..361 AJ251863.1:5522..5632/AJ251863.1:6120..6192 AJ251863.1:6351..6471/AJ251863.1:6663..6765 AJ251863.1:7147..7294/AJ251863.1:9314..9476 AJ251863.1:10215..10381/AJ251863.1:11443..11532 Note : 5 ARNs possibles décrits.	Scheel,J <i>et al.</i>
		NM_001668	NM_001668.1 GI:4502230		2370	789		Hoffman <i>et al.</i>
		AF001307	AF001307.1 GI:2702318	1 Loc=1p36-q12	987	328	Variant ARNT issu d'un épissage alternatif	Wilson <i>et al.</i>
Vache	Bos taurus	AB053954	AB053954.1 GI:13537426		2373	790		Hara,S.
Rat (Norway rat)	Rattus norvegicus	NM_012780	NM_012780.1 GI:7549743		2403	800		Drutel <i>et al.</i>
		U61405	U61405.1 GI:1408267		2139	712		
Souris (House mouse)	Mus musculus	NM_009709	NM_009709.1 GI:6806900		2316	771	REFSEQ	Li <i>et al.</i>
		U10325	U10325.1 GI:555687		2376	791		Reisz-Porszasz <i>et al.</i>
Caenorhabd	Caenorhabditis	AF039569	AF039569.1	I	1356	451	AHA-1 : <i>aryl hydrocarbon receptor nuclear</i>	Powell-

itis elegans.	elegans		GI:2828111				<i>translocator ortholog</i>	Coffman <i>et al.</i>
Stenotomus chrysops	Stenotomus chrysops	AF155146	AF155146.1 GI:5163455		1037	346	Evolution des protéines de la voie de signalisation des aryl hydrocarbones : Diversité des isoformes d'ARNT isoforms parmi les espèces de poissons Séquence incomplète	Powell, W.H. and Hahn, M.E
Mouche (<i>fruit fly</i>)	Drosophila melanogaster	AF154417	AF154417.1 GI:5051999	III Loc=3R; 86D1-86D8	1935	644		Ma, E. and Haddad, G.G
		AF020426	AF020426.1 GI:2688931	III Loc=85C	1935	644	TGO	Sonnenfeld <i>et al.</i>
		AF016053	AF016053.1 GI:2367596		1896	631		Zelzer <i>et al.</i>
		AB002556	AB002556.1 GI:2547045		1929	642	dARNT	Ohshiro and Saigo
Truite (Rainbow trout)	Oncorhynchus mykiss	U73840	U73840.1 GI:1695920		1911	636	ARNTa	Pollenz <i>et al.</i>
		AAC60052	AAC60052.1 GI:1695923		2172	723	ARNTb	Pollenz <i>et al.</i>
Zebrafish	Danio rerio	Y08434	Y08434.1 GI:2462131		711	237	Séquence incomplète	Wang, W.D. <i>et al.</i>
Lapin	Oryctolagus cuniculus	BAA19931	BAA19931.1 GI:2094758		2373	790	Séquence complète	Takahashi <i>et al.</i>
Poulet	Gallus gallus	AF348088	AF348088.1 GI:13430372		2418	805		Catron <i>et al.</i>

ARNT2 : aryl-hydrocarbon receptor nuclear translocator 2

Organisme	Espèce	Accession Number	Version et PID	Chromosome et Localisation	Bases CDS	Acides Aminés	Informations supplémentaires	Auteurs
Humain	Homo sapiens	AH009831	AH009831.1 GI:10242086	15 Loc=15q24			Structure et localisation du gène ARNT2 : Joindre les séquences : AF185592.1:1..62/AF185593.1:1..115 AF185594.1:1..48/AF185595.1:1..214 AF185596.1:1..214/AF185597.1:1..103 AF185598.1:1..66/AF185599.1:1..86 AF185600.1:1..77/AF185601.1:1..135 AF185602.1:1..75/AF185603.1:1..152 AF185604.1:1..73/AF185605.1:1..124 AF185606.1:1..100/AF185607.1:1..139 AF185608.1:1..166/AF185609.1:1..137 AF185610.1:1..397	Barrow, L.L. <i>et al.</i>
Humain	Homo sapiens	NM_014862	NM_014862.1 GI:7662049	15 Loc=15q24	2121	706		Nagase <i>et al.</i> Wines <i>et al.</i>
Souris (<i>House mouse</i>)	Mus musculus	NM_007488	NM_007488.1 GI:6671574	7 Loc=7 42.5 cM	2139	712	REFSEQ	Hirose <i>et al.</i>
Rat (Norway rat)	Rattus norvegicus	U61157	U61157.1 GI:1470079		2250	749	Séquence incomplète	Drutel, G <i>et al.</i>
killifish	Fundulus heteroclitus	AF079311	AF079311.1 GI:4191334		2148	715		Powell <i>et al.</i>
zebrafish	Danio rerio	AF155066	AF155066.1 GI:8132410		1278	425	Séquence complète	Wang <i>et al.</i>
		AY007992	AY007992.1 GI:13569830		1179	392	ARNT2B Séquence complète	Hsu <i>et al.</i>
		AF219987	AF219987.1 GI:10998381		1278	425	ARNT2a; variant issu d'un épissage alternatif de ARNT2	Tanguay <i>et al.</i>
		AF219988	AF219988.1 GI:10998383		2214	737	ARNT2b; variant issu d'un épissage alternatif de ARNT2	
		AF219989	AF219989.1 GI:10998385		2169	722	ARNT2c; variant issu d'un épissage alternatif de ARNT2	

ARNT3 = MOP3 = CYC = Jap 3 = TIC = ARNTL = BMAL1 (brain and muscle ARNT-like 1)

Organisme	Espèce	Accession Number	Version et PID	Chromosome et Localisation	Bases CDS	Acides Aminés	Informations supplémentaires	Auteurs
Humain	Homo sapiens	D89722	D89722.1 GI:2104215		1752	583	BMAL1a Séquence complète	Ikeda and Nomura
		AB000812	AB000812.1 GI:2094734		1881	626	BMAL1b	
		AB000813	AB000813.1 GI:2094736		546	181	BMAL1c	
		AB000816	AB000816.1 GI:2094742		814	271	BMAL1d Séquence incomplète	
		AB000815	AB000815.1 GI:2094740		777	258	BMAL1e Séquence complète	
		AB000814	AB000814.1 GI:2094738		342	113	BMAL1f Séquence incomplète	
		U60415	U60415.1 GI:1698575	11 Loc=11p15.1	1881	626	JAP3	Tian,H, <i>et al.</i>
		NM_001178	NM_001178.1 GI:4502232	11 Loc=11p15	1752	583	ARNTL : <i>aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like</i>	Hogenesch <i>et al.</i> Ikeda and Nomura
		AF044288	AF044288.1 GI:3170266		1881	626	MOP3	Hogenesch <i>et al.</i>
		XM_005989	XM_005989.3 GI:13631313	11	1620	539	Variation : 825 : allele=A ou allele=C Variation : 1884 : allele=T ou allele=C	NCBI
Souris (House mouse)	Mus musculus	NM_007489	NM_007489.1 GI:6680731	7 Loc=7 52.0 cM	1881	626	REFSEQ ARNT3	Takahata <i>et al.</i>
		AB012601	AB012601.1 GI:4586557		1899	632	BMAL1b' Séquence complète	Yu <i>et al.</i>
		AB012602	AB012602.1 GI:4586559		669	222	BMAL1g' Séquence complète	
		AB015203	AB015203.1 GI:5360227		1878	625	BMAL1b Séquence complète	
Zebrafish	Danio rerio	AF144689 & AF144690	AF144689.1 GI:7595267 & AF144690.1 GI:7595269		1881	626	Clones 40-1 et 40-6 BMAL1 Séquence complète	Cermakian <i>et al.</i>
Hamster (Golden hamster)	Mesocricetus auratus	AF070917	AF070917.1 GI:3228688		1881	626	BMAL1	Gekakis <i>et al.</i>
Rat (Norway rat)	Rattus norvegicus	AF317669	AF317669.1 GI:11321491		246	81	BMAL1g' Séquence incomplète	Jac,M. & Sauman,I. <i>et al.</i>
		AF015953	AF015953.1 GI:3211719		1773	590	TIC	Wolting and McGlade
		AB012600	AB012600.1 GI:3668182		1881	626	BMAL1b Séquence complète	Honma <i>et al.</i>
Mouche (fruit fly)	Drosophila melanogaster	AF069998	AF069998.1 GI:3219727		1242	413	MOP3 Séquence complète	Bae,K. <i>et al.</i>
		AF067206	AF067206.1 GI:3192864	III Loc=76C	1242	413	BMAL1 Séquence complète	Darlington <i>et al.</i>
		AF065473	AF065473.1 GI:3283365	III Loc=76C-D	1242	413	Cycle	Rutila <i>et al.</i>
Poulet	Gallus gallus	AF205219	AF205219.1 GI:9651531		1902	633	BMAL1 Similaire à mBMAL1b'	Chong <i>et al.</i>

BMAL2 = MOP9 = CLIF (cycle-like factor)= ARNTL2

Organisme	Espèce	Accession Number	Version et PID	Chromosome et Localisation	Bases	Acides Aminés	Informations supplémentaires	Auteurs
Zebrafish	Danio rerio	AF144691	AF144691.1 GI:7595271		1728	575	clone=40-2	Cermakian <i>et al.</i>
Humain	Homo sapiens	AF231338	AF231338.1 GI:7963663	12 Loc=12p11.23-p11.22	1758	585	MOP9 Forme Longue résultant d'épissage alternatif	Hogenesch <i>et al.</i>
		AF231339	AF231339.1 GI:7963666		1719	572	MOP9 Forme Courte résultant d'épissage alternatif	
		NM_020183	NM_020183.1 GI:9910367		1656	552	REFSEQ Provisoire	Ikeda <i>et al.</i>
		AF256215	AF256215.1 GI:11345222		1809	602		Maemura <i>et al.</i>

Facteur THR

THR : trachealess

Organisme	Espèce	Accession Number	Version et PID	Chromosome et Localisation	Bases CDS	Acides Aminés	Informations supplémentaires	Auteurs
Mouche (<i>fruit fly</i>)	Drosophila melanogaster	U33427	U33427.1 GI:1173580	3 Loc=61 B3/C1	2850	949		Wilk <i>et al.</i>
		U42699	U42699.1 GI:1155055	3 Loc=3; 61C1,2	2775	924		Isaac and Andrew
Bombyx mori	Bombyx mori	AB007832	AB007832.1 GI:2564052		2550	849	Bm trachealess	Matsunami <i>et al.</i>

Facteur FRQ

FRQ : frequency clock protein

Organisme	Espèce	Accession Number	Version et PID	Chromosome et Localisation	Bases CDS	Acides Aminés	Informations supplémentaires	Auteurs
Neurospora crassa	Neurospora crassa	U17073 L14465	U17073.1 GI:595951	VII R	2970	989		Aronson <i>et al.</i>
Sordaria fimicola	Sordaria fimicola	L14467	L14467.1 GI:310366		2994	997		Merrow and Dunlap
Creopus spinulosus	Hypocrea spinulosa	U25850	U25850.1 GI:852501		3048	1015	Séquence complète	Lewis <i>et al.</i>
Leptosphaeria australiensis	Leptosphaeria australiensis	U25851	U25851.1 GI:852503		2979	992	Séquence complète	Lewis <i>et al.</i>

Facteur AHR

AHR

Organisme	Espèce	Accession Number	Version et PID	Chromosome et Localisation	Bases CDS	Acides Aminés	Informations supplémentaires	Auteurs
Humain	Homo sapiens	AH003424	AH003424.1 GI:1040872	7 Loc=7p21-p15			Joindre les séquences : U27656.1:1..275/U27657.1:1..530 U28060.1:1..478/U28061.1:1..398 U28062.1:1..554/U28063.1:1..522 U28064.1:1..394/U28065.1:1..265 U28066.1:1..402	Bennett <i>et al.</i>
		NM_001621	NM_001621.2 GI:5016091	7 Loc=7p15	2547	848	REFSEQ: Cette séquence a été corrigée par le NCBI Variation : 2304 : allele=G/allele=A Variation : 3609 : allele=C/allele=T Variation : 5302 : allele=C/allele=T Variation : 5374 : allele=C/allele=T	Dolwick <i>et al.</i> Eguchi <i>et al.</i> Ema <i>et al.</i> Hahn Hayashi <i>et al.</i> Itoh and Kamataki Le Beau <i>et al.</i> Micka <i>et al.</i>
Souris (<i>House mouse</i>)	Mus musculus	AH003146	AH003146.1 GI:349507				Joindre les séquences : L19757.1:1..1044/L19749.1:1..263 L19750.1:1..371/L19751.1:1..331 L19752.1:1..442/L19758.1:1..338 L19753.1:1..311/L19759.1:1..329 L19754.1:1..408/L19755.1:1..1602 L19756.1:1..3030	-
		AF325111	AF325111.1 GI:13160984	12	2547	848	Région génomique du AHR murin	Hadd,A.G <i>et al.</i>
		D38416	D38416.1 GI:575584		2446	816	Séquence incomplète	Ema <i>et al.</i>
		NM_013464	NM_013464.1 GI:7304872	12 Loc=12 18.0 cM	2418	805		Ema <i>et al.</i> , 1992
		M94623	M94623.1 GI:405813		2418	805		Burbach <i>et al.</i> Schmidt <i>et al.</i>
killifish	Fundulus heteroclitus	AF024591	AF024591.2 GI:5931360		2829	942	<i>aryl hydrocarbon receptor 1 alpha</i>	Hahn <i>et al.</i>
		AF190654	AF190654.1 GI:6013458		2139	712	<i>aryl hydrocarbon receptor 1 beta</i>	
		U29679	U29679.2 GI:5931362		2718	905	AHR2	Karchner <i>et al.</i> Hahn and Karchner
Lapin	Oryctolagus cuniculus	D38226	D38226.1 GI:2094755		2544	847		Takahashi <i>et al.</i>
Rat (Norway)	Rattus norvegicus	U09000	U09000.1 GI:510268		2562	853		Carver <i>et al.</i>

rat)								
		AF082124	AF082124.1 GI:3561051		2433	810	Epissage 3 : variant issu d'un épissage alternatif	Pohjanvirta <i>et al.</i>
		AF082125	AF082125.1 GI:3561053		2448	815	Epissage 2 : variant issu d'un épissage alternatif	
		AF082126	AF082126.1 GI:3561055		2448	815	Epissage 1 : variant issu d'un épissage alternatif	
		NM_013149	NM_013149.1 GI:6978474	6 Loc=6	2562	853	REFSEQ Provisoire	Elferink,C.J. and Whitlock,J.P
Cobaye et hamster	Mesocricetus auratus	AB033505	AB033505.1 GI:9188538		2763	920		Ohe,N. and Kaneko,H.
little skate	Raja erinacea	AF024594	AF024594.1 GI:2674114		648	216	Séquence incomplète	Hahn <i>et al.</i>
Sea lamprey	Petromyzon marinus	AF024595	AF024595.1 GI:2674116		654	218	Séquence incomplète	Hahn <i>et al.</i>
Caenorhabditis elegans	Caenorhabditis elegans	AF039570	AF039570.1 GI:2828113	1	1809	602	<i>aryl hydrocarbon receptor ortholog AHR-I</i>	Powell-Coffman <i>et al.</i>
Atlantic tomcod	Microgadus tomcod	AF050489	AF050489.2 GI:5733848		2472	823		Roy and Wirgin
Mouche (fruit fly)	Drosophila melanogaster	AF050630	AF050630.1 GI:3132523	3 Loc=89C1,2	2655	884	<i>Drosophila melanogaster Ahr homolog spineless (SS)</i>	Duncan <i>et al.</i>
Necturus maculosus	Necturus maculosus	AF192500	AF192500.1 GI:6524993		909	303	Séquence incomplète	Karchner <i>et al.</i>
Sterna hirundo	Sterna hirundo	AF192503	AF192503.1 GI:6524999		912	304	Séquence incomplète	
Anas platyrhynchos	Anas platyrhynchos	AF192501	AF192501.1 GI:6524995		912	304	Séquence incomplète	
Poulet	Gallus gallus	AF260832	AF260832.1 GI:7839651		2577	858		Walker <i>et al.</i>
pig	Sus scrofa	AF233432	AF233432.1 GI:7243740		223	301	Séquence incomplète	Bartol <i>et al.</i>
Mya arenaria	Mya arenaria	AF261769	AF261769.1 GI:7839661		2559	852		Kelley,M.L. <i>et al.</i>

Isoformes PERs

PER = PER1 = RIGUI

Organisme	Espèce	Accession Number	Version et PID	Chromosome et Localisation	Bases	Acides Aminés	Informations supplémentaires	Auteurs
Humain	Homo sapiens	AF102137	AF102137.1 GI:6537133	17 Loc=17p12			Joindre les séquences : 3559..3833/3948..4046/4140..4294/4389..4510/4602..4803/4955..5006/5472..5614/5999..6077/6155..6261/6432..6585/6681..6789/6878..7009/7299..7404/7536..7707/7799..7929/8165..8344/9312..9554/10432..11042/11473..11659/11850..12039/12352..12502/12997..13269	Taruscio <i>et al.</i>
		NM_002616	NM_002616.1 GI:4505712	17 Loc=17p13.1-17p12	3873	1290	Variation : 4571/allele=C/allele=T REFSEQ: Cette séquence a été corrigée par le NCBI Rq : il existe des variants issus d'épissages alternatifs.	Hida <i>et al.</i> Sun <i>et al.</i> Taruscio <i>et al.</i> Tei <i>et al.</i>
		XM_008568	XM_008568.2 GI:13653370		3291	1097	Variation : 4570/allele=C/allele=T	NCBI
Souris (House mouse)	Mus musculus	M12039	M12039.1 GI:200288		2019	672		Shin <i>et al.</i>
		AF022992	AF022992.1 GI:2435508	11	3876	1292		Sun <i>et al.</i>
Apis cerana	Apis cerana	AB048825	AB048825.1 GI:14133254		3375	1124	<i>Period alpha</i> Séquence complète	Shimizu <i>et al.</i>
		AB048826	AB048826.1 GI:14133256		3348	1115	<i>Period beta</i> variant issu d'épissage alternatif.	
Apis mellifera	Apis mellifera	AB050744	AB050744.1 GI:11138048		714	237	<i>Period protein</i> Séquence incomplète	
Chinese oak silkmoth	Antheraea pernyi	AF182284	AF182284.1 GI:6007525	W	1254	417	<i>Female-specific period clock protein homolog PERW</i> Séquence complète	Gotter,A.L. <i>et al.</i>
		AF182285	AF182285.1 GI:6007527	W	1321	-	<i>Female-specific endogenous period clock protein homolog antisense RNA</i>	
Mouche (fruit fly)	Drosophila melanogaster	M30114	M30114.1 GI:158056	Loc=X, 4B6-C1			Séquence complète ARNpm : 179..7365 Gène=perA (biological clock protein A)	Citri <i>et al.</i>

							joindre(2837..2931,2992..4031,4096..4452,4515..6229,6300..6536,6601..6741,6800..6871) Gène=perB <i>(biological clock protein B)</i> joindre(2837..2931,2992..4031,4096..4452,4515..5609,5898..6229,6300..6536,6601..6741,6800..6871) Gène=perC <i>(biological clock protein C)</i> joindre(2837..2931,2992..4031,4096..4452,4515..6553)	
		AF033029	AF033029.1 GI:2645718		3675	1225		Baylies <i>et al.</i>
house fly	Musca domestica	AF142664	AF142664.1 GI:5070466		3147	1048	Joindre les séquences : AF142662.1:1..175/AF142663.1:112..355 AF142664.1:1221..1304/AF142664.1:1377..1537 AF142664.1:1601..1797/AF142664.1:1861..2281 AF142664.1:2338..2694/AF142664.1:2758..4124 AF142664.1:4193..4351/AF142664.1:4423..4521 AF142664.1:4583..4723/AF142664.1:4784..5441	Piccin <i>et al.</i>
Lucilia cuprina	Lucilia cuprina	Y19108	Y19108.1 GI:5262947		3114	1037		Warman <i>et al.</i>
Truite (Rainbow trout)	Oncorhynchus mykiss	AF228695	AF228695.1 GI:6960209		411	136	PER1 (RIGUI) Séquence incomplète	Brierley,I. and Williams,L.M.
Sheep	Ovis aries	AF044911	AF044911.1 GI:2895644		404	134	RIGUI (mPER1)	Morgan,P.J. <i>et al.</i>

PER2 = RIGUI2 = period homolog 2 (Drosophila)

Organisme	Espèce	Accession Number	Version et PID	Chromosome et Localisation	Bases	Acides Aminés	Informations supplémentaires	Auteurs
Rattus norvegicus	Rattus norvegicus	NM_031678	NM_031678.1 GI:13928941		3774	1257	REFSEQ Provisoire rPER2	Sakamoto <i>et al.</i>
Souris (House mouse)	Mus musculus	AF035830	AF035830.1 GI:3258604		3774	1257		Shearman <i>et al.</i>
		AF036893	AF036893.1 GI:2687662		3774	1257		Albrecht <i>et al.</i>
Coturnix coturnix japonica	Coturnix japonica	AB029890	AB029890.1 GI:9581834		3918	1305	qPER2	Yoshimura <i>et al.</i>

PER3 = period homolog 3 (Drosophila)

Organisme	Espèce	Accession Number	Version et PID	Chromosome et Localisation	Bases	Acides Aminés	Informations supplémentaires	Auteurs
Souris (House mouse)	Mus musculus	NM_011067	NM_011067.1 GI:6755029		3342	1113	REFSEQ Provisoire	Zylka <i>et al.</i>
Coturnix coturnix japonica	Coturnix japonica	AB029891	AB029891.1 GI:9581836		3297	1098	qPER3	Yoshimura <i>et al.</i>
Zebrafish	Danio rerio	AF254792	AF254792.1 GI:9502116		3846	1281		Delaunay <i>et al.</i>

Facteur CLK

CLK : Clock = circadian locomoter output cycles kaput

Organisme	Espèce	Accession Number	Version et PID	Chromosome et Localisation	Bases	Acides Aminés	Informations supplémentaires	Auteurs
Humain	Homo sapiens	AF097458	AF097458.1 GI:6478190	4			Séquence incomplète - Joindre : AF097442.1:113..159 (ex.2)/AF097443.1:81..140 AF097444.1:143..291/AF097445.1:63..154 AF097446.1:63..152/AF097447.1:56..176 AF097448.1:77..190/AF097448.1:328..446 AF097449.1:111..193/AF097449.1:407..513 AF097450.1:83..230/AF097450.1:778..853 AF097451.1:64..205/AF097452.1:130..230 AF097453.1:65..154/AF097454.1:28..180 AF097455.1:89..298/AF097456.1:71..273 AF097457.1:71..326/AF097458.1:82..>257	Steeves <i>et al.</i>
		AB005535	AB005535.1 GI:2326258		1047	349	Séquence incomplète	Ikeda,M. <i>et al.</i>
		NM_004898	NM_004898.1 GI:4758009	4 Loc=4q12	2541	846	REFSEQ Provisoire	Steeves <i>et al.</i> Nagase <i>et al.</i>

Souris (House mouse)	Mus musculus	AF000998	AF000998.1 GI:2114487	5	2568	855	Séquence complète	Antoch <i>et al.</i> King <i>et al.</i>
		NM_007715	NM_007715.2 GI:7949021	5 Loc=5 43.0 cM	2568	855	Locus <i>Clock</i> murin	Wilsbacher,L.D. <i>et al.</i>
Mouche (fruit fly)	Drosophila melanogaster	AF065133	AF065133.1 GI:3213257	3 Loc=66A	3048	1015		Allada <i>et al.</i>
		AF067207	AF067207.1 GI:3192866	3 Loc=66A	3072	1023	Séquence complète	Darlington <i>et al.</i>
		AF069997	AF069997.1 GI:3219725		3084	1027		Bae <i>et al.</i>
house fly	Musca domestica	AH007818	AH007818.1 GI:5070467				Joindre les séquences : AF142662.1:1..175/AF142663.1:1..757 AF142664.1:1..5441	Piccin <i>et al.</i>
Rattus norvegicus	Rattus norvegicus	NM_021856	NM_021856.1 GI:11177897		2589	862	REFSEQ Provisoire	Abe <i>et al.</i>
honeybee	Apis mellifera	AF159569	AF159569.1 GI:7958613		3375	1124		Toma <i>et al.</i>
Chinese oak silkmoth	Antheraea pernyi	U12769	U12769.2 GI:5819090		2550	849		Reppert <i>et al.</i>
cecropia moth	Hyalophora cecropia	U12771	U12771.1 GI:533718		1074	358	Séquence incomplète	
American cockroach	Periplaneta americana	U12772	U12772.2 GI:4544339		2682	893	Séquence incomplète	
tobacco hornworm	Manduca sexta	U12773	U12773.1 GI:533722		1062	354	Séquence incomplète	
Coturnix coturnix japonica	Coturnix japonica	AB029889	AB029889.1 GI:9581832		2565	854	qClock	Yoshimura <i>et al.</i>
Truite (Rainbow trout)	Oncorhynchus mykiss	AF266745	AF266745.1 GI:8489852		898	299	Séquence incomplète	Mazurais,D. <i>et al.</i>
Poulet	Gallus gallus	AF132531	AF132531.1 GI:5442152		2628	875	Séquence complète	Larkin <i>et al.</i>
		AF144425	AF144425.1 GI:4903293		2562	853		Chong <i>et al.</i>
		AF201076	AF201076.1 GI:6715305		2559	852	Séquence complète	Noakes,M.A. <i>et al.</i>
African clawed frog	Xenopus laevis	AF203107	AF203107.1 GI:6466209		2337	778	<i>xClock</i>	Kim,J.S. and Drysdale,T.A.
		AF227985	AF227985.1 GI:6984143		2478	825		Zhu <i>et al.</i>
zebrafish	Danio rerio	AF133306	AF133306.1 GI:4680718		2682	893		Whitmore <i>et al.</i>

Isoformes NPAS

NPAS2 = MOP4

Organisme	Espèce	Accession Number	Version et PID	Chromosome et Localisation	Bases	Acides Aminés	Informations supplémentaires	Auteurs
Humain	Homo sapiens	NM_002518	NM_002518.1 GI:4505428	2 Loc=2p11.2-q13	2475	824	NPAS2 REFSEQ Provisoire	Hogenesch <i>et al.</i> Zhou <i>et al.</i>
		XM_002406	XM_002406.2 GI:13636897	2	2373	790	NPAS2	NCBI
Souris (House mouse)	Mus musculus	NM_008719	NM_008719.1 GI:6679101	1 Loc=1 20.0 cM	2451	816	REFSEQ Provisoire	Zhou <i>et al.</i>
Poulet	Gallus gallus	AF193071	AF193071.1 GI:10945815		333	111	MOP4 Séquence incomplète	Chong <i>et al.</i>

NPAS1 = MOP5

Organisme	Espèce	Accession Number	Version et PID	Chromosome et Localisation	Bases	Acides Aminés	Informations supplémentaires	Auteurs
Humain	Homo sapiens	NM_002517	NM_002517.1 GI:4505426	19 Loc=19q13.2-q13.3	1773	590	REFSEQ Provisoire NPAS1 : <i>neuronal PAS domain protein 1</i>	Zhou <i>et al.</i> Hogenesch <i>et al.</i>
		AB054002	AB054002.1 GI:12313661		1773	590	Séquence complète NPAS1 : <i>neuronal PAS domain protein 1</i>	Ohe,N. <i>et al.</i>
		XM_009039	XM_009039.1 GI:11424919	19	1773	590		NCBI
Souris (House mouse)	Mus musculus	ACCESSION NM_008718	NM_008718.1 GI:6679099	7 Loc=7 4.0 cM	1785	594	REFSEQ Provisoire	Zhou <i>et al.</i>

Isoformes SIMs

SIM : single-minded = SIM2 (voir tableau ci-dessous)

Organisme	Espèce	Accession Number	Version et PID	Chromosome et Localisation	Bases	Acides Aminés	Informations supplémentaires	Auteurs
Mus musculus	Mus musculus	D63383	D63383.1 GI:1215806	16 Loc=C3.3-C4	1974	657	mSim Séquence complète	Ema <i>et al.</i>
Drosophila virilis	Drosophila virilis	AF071932	AF071932.1 GI:3789858		177	59		Kasai <i>et al.</i>
African clawed frog	Xenopus laevis	AF283298	AF283298.1 GI:11993329		2283	761	Séquence complète	Coumailleau <i>et al.</i>

SIM2 : single-minded 2 protein = SIM (voir tableau ci-dessus)

Organisme	Espèce	Accession Number	Version et PID	Chromosome et Localisation	Bases	Acides Aminés	Informations supplémentaires	Auteurs
Human	Homo sapiens	XM_009755	XM_009755.2 GI:13646662	21	1515	504	Isoforme Longue	NCBI
		XM_009756	XM_009756.3 GI:13646654	21	1224	407	Isoforme <i>Courte</i>	NCBI
		NM_005069	NM_005069.2 GI:7108363	21 Loc=21q22.13	2004	667	REFSEQ: Cette séquence a été corrigée par le NCBI Isoforme Longue Variation : 3204 /allele=C / allele=T	Chen <i>et al.</i> Chrast <i>et al.</i> Dahmane <i>et al.</i> Hattori <i>et al.</i> Muenke <i>et al.</i>
		NM_009586	NM_009586.1 GI:7108361	21 Loc=21q22.13	1713	570	REFSEQ: Cette séquence a été corrigée par le NCBI Isoforme <i>Courte</i> SIM2s..	
Souris (<i>House mouse</i>)	Mus musculus	AF023873	AF023873.1 GI:2599381	16 Loc=cM position 67.5; Band C3.3-C4			Joindre les séquences : AF023864.1:1777..1951/AF023865.1:30..112 AF023866.1:349..438/AF023867.1:42..150 AF023868.1:340..425/AF023869.1:303..502 AF023870.1:201..307/AF023871.1:160..307 AF023872.1:410..578/AF023872.1:969..1380 AF023873.1:404..798	Fan <i>et al.</i>
		NM_011377	NM_011377.1 GI:7106404	16 Loc=16 67.57 cM	2229	742	REFSEQ Provisoire	Fan,C.-M. and Tessier-Lavigne,M.
		D64135	D64135.1 GI:1754612		1974	657		Yamaki <i>et al.</i>

SIM1 : single-minded protein 1 / homologue of Drosophila Sim

Organisme	Espèce	Accession Number	Version et PID	Chromosome et Localisation	Bases	Acides Aminés	Informations supplémentaires	Auteurs
Souris (<i>House mouse</i>)	Mus musculus	AF038857	AF038857.1 GI:2952264	10 Loc=entre Fyn and Ros1			Joindre les Séquences : AF044913.1:3100..3274/AF038853.1:101..183 AF038854.1:62..151/AF038854.1:629..737 AF038854.1:868..953/AF038854.1:1529..1728 AF038854.1:1944..2050/AF038854.1:2671..2820 AF038855.1:6..172/AF038856.1:305..704 AF038857.1:176..906	Fan <i>et al.</i>
		AB013486	AB013486.1 GI:3138802				Joindre les Séquences : AB013484.1:13133..13307/AB013485.1:124..206 AB013486.1:120..209/AB013487.1:246..354 AB013487.1:486..571/AB013487.1:1146..1345 AB013487.1:1562..1668/AB013488.1:119..266 AB013489.1:387..555/AB013490.1:172..571 AB013491.1:158..888	Hosoya,T.
		NM_011376	NM_011376.1 GI:7106402	10 Loc=10 26.5 cM	2088	695	REFSEQ Provisoire	Fan,C.-M. and Tessier-Lavigne,M.
zebrafish	Danio rerio	AY028626	AY028626.1 GI:13506716		2238	745		Serluca and Fishman
Humain	Homo sapiens	NM_005068	NM_005068.1 GI:4827001	6 Loc=6q16.3-q21	2301	766	REFSEQ	Chrast <i>et al.</i>
Poulet	Gallus gallus	U40058	U40058.1 GI:1173853		261	87	Séquence incomplète	Pourquie <i>et al.</i>

Isoformes TIMs

TIM1 : timeless

Organisme	Espèce	Accession Number	Version et PID	Chromosome et Localisation	Bases	Acides Aminés	Informations supplémentaires	Auteurs
Human	Homo sapiens	NM_003920	NM_003920.1 GI:4507506	12 Loc=12q12-13	3627	1208	REFSEQ Provisoire hTIM1	Koike <i>et al.</i> Sangoram <i>et al.</i> Zylka <i>et al.</i>
		XM_006714	XM_006714.3 GI:13650267	12	2298	765		NCBI
Souris	Mus musculus	AB015598	AB015598.1 GI:4115715	10 Loc=D3	3594	1197	mTIM1 Séquence complète	Koike <i>et al.</i>
		NM_011589	NM_011589.1 GI:6755788	10 Loc=10 18.0 cM	3594	1197	REFSEQ Provisoire	Sangoram <i>et al.</i>
		AB019001	AB019001.2 GI:7861536		3591	1196		Takumi <i>et al.</i>
Rat	Rattus norvegicus	AB019576	AB019576.1 GI:3869210		3618	1205	rTIM Séquence complète	Okada,M. <i>et al.</i>
Mouche (fruit fly)	Drosophila melanogaster	AF032401	AF032401.1 GI:2655280				Joindre les séquences : AF032400.1:2275..2371/AF032400.1:2433..3481 AF032400.1:3539..4086/AF032400.1:4175..4316 AF032400.1:4604..5112/AF032400.1:5169..5367 AF032400.1:5431..5558/AF032400.1:5939..6092 AF032400.1:6155..6307/AF032400.1:6369..6729 AF032400.1:6967..7219/AF032400.1:7308..7409 AF032401.1:867..1265/AF032401.1:2124..2226	Myers <i>et al.</i>
		U37018	U37018.1 GI:1055257	Loc=23F5-6	243..4 412			
Drosophila virilis	Drosophila virilis	AF032402	AF032402.1 GI:2641614				Joindre les séquences : 103..199/ 260..1757/1829..1970/2030..2538/ 2604..2802/2867..2994/3241..3394/3450..3602 3670..4030/AF032402.1 :4319..4559 4619..4720/AF032403.1:525..878 AF032403.1:1385..1478	Myers <i>et al.</i>
		AF038502	AF038502.1 GI:2746732				Joindre 68..164,225..1722,1794..1935,1995..2503,25 69..2767,2832..2959,3202..3355,3411..3563, 3632..3992,4281..4521,4581..>4682	Ousley <i>et al.</i>
Souris (House mouse)	Mus musculus	AF071506	AF071506.1 GI:3818538		3594	1197	Séquence complète	Zylka <i>et al.</i>
		AF098161	AF098161.1 GI:3929580	10 Loc=1.7 cM distal to D10Mit87	3594	1197	mTIM <i>timeless homolog</i>	Sangoram <i>et al.</i>
Chinese oak silkmoth	Antheraea pernyi	AF132032	AF132032.1 GI:7677031		3702	1233	Séquence complète	Reppert,S.M.
Caenorhabditis elegans	Caenorhabditis elegans	AF183401	AF183401.1 GI:6467559	III	4062	1353		Jeon <i>et al.</i>
Sheep	Ovis aries	. AY027884	AY027884.1 GI:13386590		326	108	Séquence incomplète	Messenger,S. <i>et al.</i>
Rat (Norway rat)	Rattus norvegicus	NM_031340	NM_031340.1 GI:13786173		3618	1205	Séquence complète REFSEQ Provisoire	Okada,M. <i>et al.</i>

TIM2

Organisme	Espèce	Accession Number	Version et PID	Chromosome et Localisation	Bases	Acides Aminés	Informations supplémentaires	Auteurs
Mouche (fruit fly)	Drosophila melanogaster	AF279586	AF279586.1 GI:9022430	/Loc="87E1-87E3"	4155	1385	TIM2 Similaire à la protéine TIM	Benna <i>et al.</i>



HIF-1 : régulateur central de l'hypoxie

Emmanuel Gothié
Jacques Pouysségur

L'Homme, comme la plupart des espèces animales, présente une dépendance totale vis-à-vis de l'oxygène (dioxygène) pour sa survie. Sans un apport adéquat en oxygène, l'organisme est donc condamné à mourir extrêmement rapidement. Durant l'embryogenèse, les organismes supérieurs développent des systèmes respiratoire et circulatoire complexes pour assurer la disponibilité de l'oxygène à toutes les cellules de l'organisme. Une diminution en oxygène (hypoxie) va donc entraîner une réponse physiologique générale de l'organisme pour compenser ce manque. Ainsi chez l'animal, une réponse rapide a lieu suite à la détection du taux d'oxygène sanguin au niveau de structures spécialisées situées dans la crosse aortique (les barorécepteurs). Un signal dopaminergique est envoyé au cerveau qui émet à son tour des signaux augmentant la respiration et le rythme cardiaque. Il en résulte une augmentation de la pression sanguine et de la saturation en oxygène nécessaire au métabolisme tissulaire. Dans le cas d'une période prolongée en condition d'hypoxie (exemple de personnes effectuant un séjour en altitude), des modifications telles qu'une augmentation du métabolisme anaérobie - ou glycolyse (avec pour conséquence la sécrétion d'acide lactique dans les muscles) - et du taux de globules rouges sanguins, permettent de compenser le manque d'oxygène et de fournir une énergie suffisante aux processus cellulaires [1-4].

Ces réponses de l'organisme sont bien connues sur le plan physiologique, mais aussi sur le plan moléculaire grâce aux efforts de nombreuses équipes de recherche principalement sur les deux dernières décennies. L'objectif de cette revue est de faire le point sur le régulateur clef de cette réponse cellulaire à l'hypoxie, le Facteur Induit par l'Hypoxie - 1 (*HIF-1 pour Hypoxia Inducible Factor-1*), et de présenter les perspectives de recherches futures pour décrypter cette voie complexe.

MISE EN EVIDENCE DE HIF-1

L'hypoxie a été montrée comme étant capable de stimuler l'expression de l'érythropoïétine (EPO), une hormone glycoprotéique synthétisée principalement au niveau du rein. Cette hormone est acheminée par voie sanguine jusqu'à la moelle osseuse pour y stimuler les précurseurs des globules rouges qui vont proliférer et se différencier en érythrocytes, augmentant le nombre de globules rouges sanguins et donc le potentiel de capture en oxygène du sang. L'étude du promoteur de l'*epo* a permis de mettre en évidence une séquence *enhancer* en position 3' non codante du gène (5'-TACGTGCT-3') qui est sensible à l'hypoxie et qui a été nommée HRE (*Hypoxia Response Element*). Cette séquence fixe en condition d'hypoxie un complexe protéique nommé HIF-1 [5]. La découverte de cette activité HIF-1 a permis le clonage des deux ADN complémentaires impliqués dans

cette activité [6,7] qui codent pour les deux protéines du complexe HIF-1, à savoir HIF-1 α et HIF-1 β . HIF-1 β a été identifié comme étant le facteur ARNT1 (*Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator*), une protéine déjà décrite et impliquée dans les phénomènes de détoxification des cellules. Par contre, HIF-1 α est spécifique à la réponse hypoxique.

HIF-1 α et ARNT1 ont été clonés chez de nombreuses espèces (Souris, Rat, Xénope, *Drosophila* ...) et présentent une très forte conservation au niveau de leur séquence protéique (90% d'homologie entre l'Homme, le Rat et la Souris).

Le gène *hif-1 α* , localisé sur le chromosome 14 (14q21-q24) [8,9], est constitué de 15 exons chez l'Homme. Des isoformes issues d'épissages alternatifs ont été mises en évidence pour HIF-1 α d'abord chez la Souris et le Rat [10-12] et récemment chez l'Homme [13,14]. Ces phénomènes d'épissage ne sont pas tous conservés entre les espèces et

leurs rôles physiologiques restent à déterminer.

Le gène *hif-1 β /arnt1* est localisé sur le chromosome 1 humain (q21) [15]. Des phénomènes d'épissages alternatifs sont aussi décrits pour *arnt*, ainsi le gène humain présente un exon alternatif [16] retrouvé aussi chez le Rat [17]. Un autre épissage est également décrit chez la Truite [18].

Chez l'Homme, les transcrits de *hif-1 α* sont fortement exprimés dans tous les organes de façon constitutive [19,20]. Cette expression ubiquiste a été confirmée chez la Souris [12,21,22]. Les transcrits du gène *arnt1* sont exprimés de façon ubiquiste et constitutive chez la souris [23] et sa distribution est globalement retrouvée chez le rat [17].

STRUCTURE DE HIF-1

HIF-1 est un hétérodimère constitué des deux sous-unités HIF-1 α et ARNT1/HIF-1 β (Fig.1). HIF-1 α et ARNT1 humains

possèdent respectivement 826 et 789 acides aminés. Ils contiennent des domaines bHLH (*basic-Helix Loop Helix*) et PAS (PER-ARNT-SIM) à leur extrémité amino-terminale et font donc partie d'une superfamille de protéines contenant ces domaines (AHR (*Aryl Hydrocarbon Receptor*), SIM (*Single-minded*), PER (*Period*), CYC (*Cycle*)...). 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 la liaison de la protéine à l'ADN. PAS est le sigle provenant des noms des protéines dans lesquelles des séquences répétées imparfaites ont été découvertes initialement (protéines de *Drosophila* PER et SIM, et la

826. Ils sont séparés par un domaine inhibiteur de la transcription [25]. La région précédant le domaine TAD-N, pourrait aussi présenter une activité d'inhibition [26]. ARNT1 contient aussi un domaine TAD dans sa partie carboxy-terminale, mais ce dernier n'est pas impliqué dans la réponse à l'hypoxie. [24,26], ce qui souligne encore HIF-1 α comme l'élément clef de la réponse à l'hypoxie.

Un domaine responsable de la dégradation (*Oxygen-dependent Degradation Domain* ou ODD) de HIF-1 α en normoxie par le protéasome [28] et situé entre les acides aminés 401-603 a été mis en évidence [29] (cf. paragraphe : Régulation de l'activité de HIF-1).

Similar (Sima). Deux séquences PEST de 20 acides aminés (riches en proline, acide glutamique, sérine ou thréonine) ont été décrites pour HIF-1 α , mais ne semblent pas être impliquées de façon claire dans l'instabilité de la protéine [29]. Elles sont localisées au niveau des acides aminés 499-518 et 581-600 [6] à la fin du domaine ODD.

Enfin, deux séquences de localisation nucléaire ont été décrites. La première séquence possède une structure bipartite ¹⁷RRKEKSRDAARRSRKE³³ (similaire au NLS de la nucleoplasmine) et est localisée dans le domaine bHLH. Elle est réprimée par le domaine PAS-B, ce qui entraîne une rétention cytoplasmique de la protéine. La seconde séquence ⁷¹⁸RKRK⁷²¹ est apparentée au NLS retrouvé dans l'antigène Large-T de SV40. Cette séquence jouerait un rôle clef dans l'import nucléaire dépendant de l'hypoxie de HIF-1 α [31].

Les domaines de fixation connus des cofacteurs de HIF-1, p300/CBP, SRC-1, Ref-1, HSP90 et pVHL, sont aussi indiqués sur la Figure 1 (cf. Régulation de l'activité de HIF-1).

REGULATION DE L'ACTIVITE DE HIF-1

Induction hypoxique de HIF-1

Si la signalisation en aval du facteur HIF-1 est bien documentée, les mécanismes en amont par lesquels les variations d'oxygène sont détectées au niveau cellulaire sont demeurées très longtemps inconnues (Fig.2). Ainsi, plusieurs hypothèses sur la nature du *senseur* à l'oxygène étaient avancées sans pour autant que les données disponibles soient suffisantes pour valider un modèle plutôt qu'un autre. Néanmoins les équipes de P.J. Ratcliffe et de W.G. Kaelin Jr viennent de publier des données remarquables sur le mécanisme d'activation du HIF-1 impliquant une activité hydroxylase dépendante du fer et de l'oxygène.

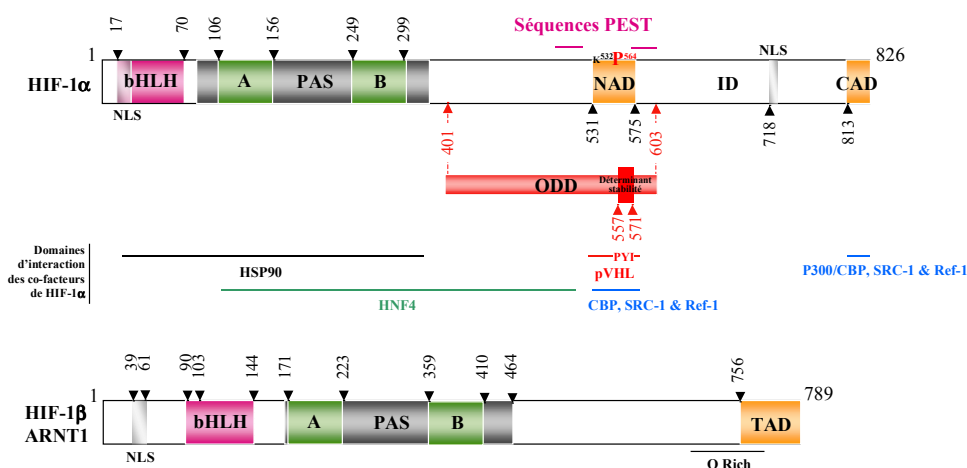


Figure 1 : Structures des sous-unités humaines du HIF-1 - La figure présente les domaines fonctionnels des deux sous-unités de HIF-1 et, lorsqu'ils sont connus, les domaines d'interaction des cofacteurs de HIF-1 α (se reporter au texte pour les explications correspondantes).

protéine des Vertébrés ARNT). HIF-1 α contient d'autres domaines fonctionnels importants pour sa fonction de régulateur de la transcription de gènes cibles sous hypoxie. Il s'agit tout d'abord de ces deux domaines de transactivation situés dans la partie carboxy-terminale. Étudiés par plusieurs équipes, leur structure et leur régulation fine est bien connue [24-27]. Le premier domaine de transactivation (TAD-N ou NAD) correspond aux acides aminés 531-575. Le second TAD (TAD-C ou CAD), en position carboxy-terminale dans la protéine correspond aux acides aminés 813-

Une étude détaillée de ce domaine a montré que les différentes sections (acides aminés 401-496, 497-529 et 530-603) étaient toutes capables de conférer des inductions par l'hypoxie à des degrés différents. Néanmoins, une analyse comparée des séquences des protéines de la famille de HIF-1 α (notée HIF- α) et des expériences complémentaires ont souligné l'importance d'une séquence de 15 acides aminés (557-571) responsable de la stabilisation sous hypoxie des protéines HIF- α [30] et retrouvée aussi dans la protéine homologue de HIF-1 α chez la *Drosophila* :

L'enzyme correspondante - dénommée HIF-PH pour *HIF- α Prolyl-Hydroxylase* - serait le senseur d'oxygène cellulaire mais doit encore être isolée et caractérisée [32,33].

D'autres hypothèses basées sur l'intervention d'enzymes impliquées dans la formation de molécules oxygénées réactives (ROS pour *Reactive Oxygen Species*) sont aussi avancées (cf. Perspectives dans la détermination de la

signalisation en amont de HIF-1). Par ailleurs, des intermédiaires encore inconnus peuvent aussi être impliqués dans l'activation du facteur HIF-1 [3]. En ce qui concerne HIF-1, les éléments clés de sa régulation et de sa fonction sont désormais bien connus même si certaines zones d'ombre demandent encore à être éclaircies. Ainsi, les ARNm des deux sous-unités de HIF-1 sont exprimés de façon constitutive et

stable dans la plupart des cellules [34]. Au niveau protéique, ARNT1/HIF-1 β est aussi stable. Par contre, HIF1 α est dégradé extrêmement rapidement en condition de normoxie (demi-vie de l'ordre de 5 mn [6] par le système Ubiquitine/protéasome [28,29,35,36].

Le facteur suppresseur de tumeur pVHL (von Hippel-Lindau) - cible de mutations dans les cellules germinales donnant le syndrome de cancer héréditaire caractéristique de la maladie du même nom - est clairement impliqué dans ce mécanisme. Il forme avec les élongines B et C et la cullin-2 (Cul-2) un complexe qui présente une activité *E3 ubiquitin ligase* dans des extraits cellulaires. Ce complexe présente aussi des similitudes de structure et de fonction avec les composants du complexe multiprotéique SCF (*Skp1 - Cul-1 - F-box protein*), qui cible les protéines régulatrices du cycle cellulaire au système de dégradation par l'ubiquitine ([37,38] et références citées). pVHL se fixe via son domaine β au domaine de transactivation N-TAD de HIF-1 α contenant le déterminant de 15 acides aminés conservé entre les éléments HIF- α [30,37-39]. Dans cette région, le motif PYI est extrêmement important pour l'interaction entre pVHL et le domaine N-TAD d'HIF-1 α , une mutation de ce triplet abolissant totalement celle-ci. En fait, pVHL reconnaît une forme hydroxylée au niveau de la Proline de ce triplet (Pro564), une modification apportée par HIF-PH. D'autres acides aminés comme les Leu562 et Tyr565, et les Ser551 et Thr552 ont aussi été montrés comme importants, mais sont sans doute impliqués pour faciliter l'hydroxylation de P564 (respectivement [32,33] et [36]). Enfin, la lysine K532 du domaine N-TAD est aussi clairement essentielle pour la dégradation d'HIF-1 α [37]. pVHL dirige directement l'ubiquitinylation d'HIF-1 α (et d'HIF-2 α) et la dégradation par le protéasome en normoxie qui

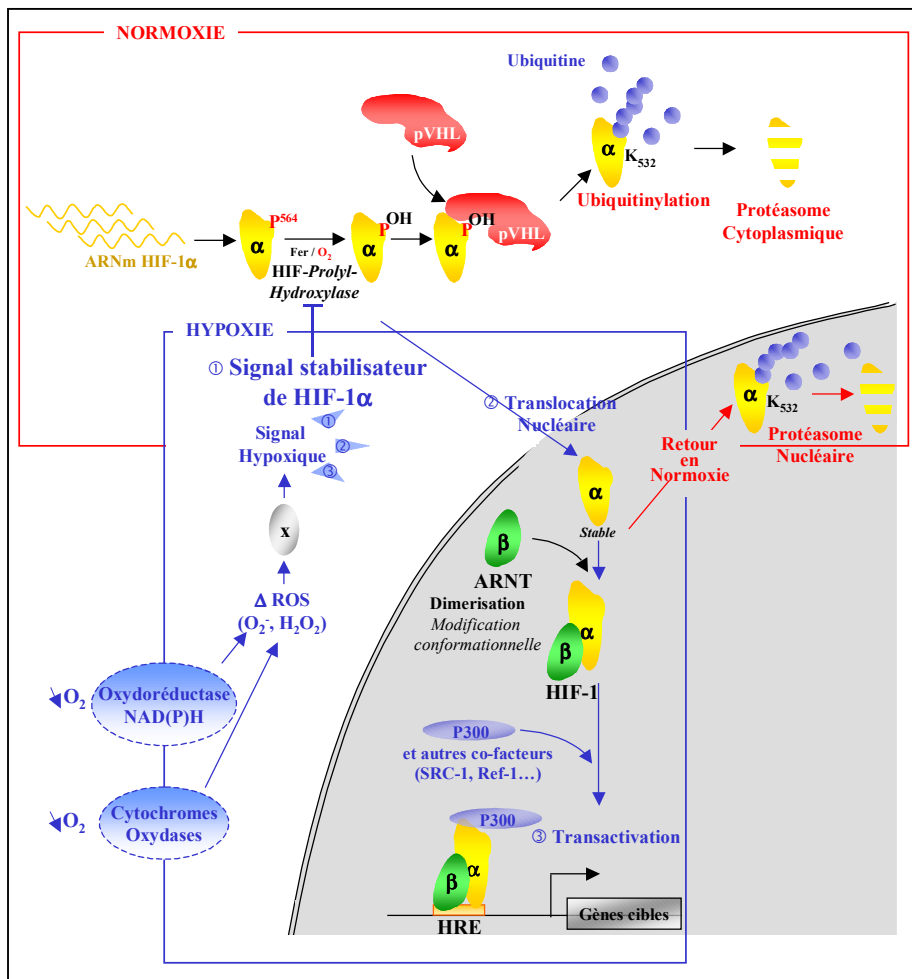


Figure 2 : Régulation de l'activité de HIF-1 - La figure présente les principales étapes de la régulation du facteur HIF-1. En condition de normoxie, la protéine HIF-1 α est hautement instable. Elle fixe pVHL, après une hydroxylation sur sa proline 564 dépendante de l'oxygène et du fer. La protéine pVHL fait partie d'un complexe (contenant les élongines B et C et la protéine CUL-2) qui possède une activité *E3 ubiquitin ligase*. HIF-1 α est donc ubiquitylé en normoxie puis dégradé par le protéasome. En condition d'hypoxie, HIF-1 α n'est plus hydroxylé et ne fixe plus pVHL. Le signal hypoxique va aussi déclencher la translocation nucléaire de HIF-1 α . Il peut dès lors se fixer avec son partenaire HIF-1 β /ARNT1 ainsi qu'à d'autres cofacteurs tels que p300/CBP pour activer des gènes sous dépendances d'éléments de réponses à l'hypoxie (HRE). Enfin, l'hypoxie permet d'augmenter directement la capacité transcriptionnel de HIF-1 via ses domaines transactivateurs. Il est possible que d'autres senseurs (oxydoréductases, cytochromes) participent aussi à l'élaboration du signal hypoxique via les ROS (se reporter au texte pour les explications correspondantes). De retour en hypoxie, HIF-1 α est rapidement dégradé, une étape pouvant être assurée par le protéasome nucléaire [65].

s'en suit [37]. L'hypoxie entraîne la stabilisation de cette sous-unité avec une diminution de l'ubiquitinylation de HIF-1 α [35] - un phénomène spécifique à HIF-1 α puisque l'hypoxie ne modifie pas l'ubiquitinylation de p53 [39] - permettant ainsi son accumulation et l'activation de la voie du HIF-1 consécutive. En fait, l'interaction pVHL/HIF-1 α n'a lieu qu'en normoxie, tandis, que l'hypoxie, le cobalt ou la DFO, empêchant la HIF-PH d'hydroxyler HIF-1 α , inhibe cette interaction et stabilise le facteur de transcription [32,33].

HPTF (*HIF-1 α proteasome targeting factor*), est un facteur aussi impliqué dans la dégradation du HIF-1 α . Il fonctionne selon un mécanisme de régulation par feedback de la dégradation d'HIF-1 α ([40] et Fig.3) analogue à celui rencontré pour le couple p53/MDM2. Dans ce dernier, p53 régule son propre niveau d'expression en induisant

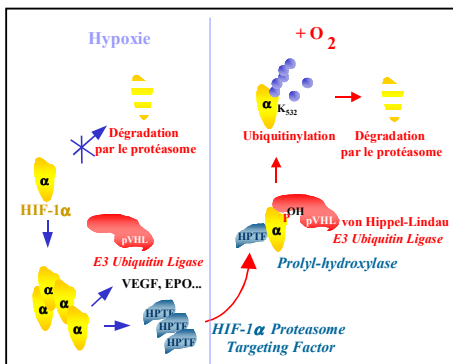


Figure 3 : Boucle de Régulation de HIF-1 α par HPTF - La figure présente la boucle de régulation du facteur HIF-1 par HPTF (*HIF-1 α Proteasome Targeting Factor*). En condition d'hypoxie, le HIF-1 α s'accumule et le complexe HIF-1 entraîne l'expression des gènes cibles spécifiques comme le gène du VEGF, de l'EPO, mais aussi HPTF. Ce facteur s'accumule en hypoxie et participe avec pVHL à la dégradation rapide du HIF-1 α lors du retour en normoxie [40].

l'expression de son régulateur négatif MDM2. HPTF pourrait s'avérer être en réalité le senseur HIF-PH, une hypothèse testée actuellement dans notre laboratoire. De façon intéressante, il a été aussi récemment décrit que p53 peut lui aussi intervenir sur la dégradation par le protéasome de

HIF-1 α suite à une ubiquitinylation dirigée par MDM2 [41].

Une fois stabilisé, HIF-1 α est envoyé dans le noyau. Cette étape est dépendante de son signal de localisation nucléaire sensible à l'hypoxie situé en position carboxy-terminale. Il peut se dimériser dans ce compartiment avec HIF-1 β qui est pour sa part exclusivement nucléaire [42,43]. L'hétérodimère se fixe alors sur les éléments HRE des gènes sensibles à l'hypoxie et induit la transactivation de ces derniers. L'hypoxie joue donc à plusieurs niveaux sur la sous-unité HIF-1 α : en la stabilisant, en favorisant sa translocation nucléaire et enfin en augmentant l'activité transactivatrice de ses deux domaines de transactivation. Plusieurs co-facteurs peuvent intervenir en se fixant au complexe et en augmentant la transactivation. Il a ainsi été montré que p300/CBP est capable de se fixer au domaine C-TAD de HIF-1 α et d'activer la transactivation [31]. TIF2 (pour *Transcription Intermediary Factor 2*) et SRC-1 (pour *Steroid-Receptor Co-activators*) sont aussi capables d'interagir avec HIF-1 α d'une manière dépendante de l'hypoxie et d'augmenter le potentiel de transactivation inducible sous hypoxie. SRC-1 peut produire cet effet en synergie avec p300/CBP et la protéine de régulation redox Ref-1 est capable d'augmenter fortement cet effet, ce qui indique que ces trois protéines sont des composants importants de la voie de signalisation de l'hypoxie [44].

HIF-1 α interagit encore avec d'autres cofacteurs tels que la protéine chaperonne HSP90 [34]. HSP90 est nécessaire pour l'activation de HIF-1 en hypoxie. Il permet notamment, en se liant HIF-1 α en normoxie, que celui-ci adopte une conformation activable par l'hypoxie, un rôle cohérent avec son rôle de protéine chaperonne [45,46]. L'interaction de HSP90 et HIF-1 α semble liée aux conditions d'oxygénation, HSP90 se dissociant de HIF-1 α en condition d'hypoxie [45]. Par ailleurs, la modification de conformation de

HIF-1 α par HIF-1 β dans le noyau n'a pas lieu dans le cas de l'absence d'une conformation de HIF-1 α dirigée par HSP90 [46].

La présence de partenaires cellulaires spécifiques éventuels peut donner lieu à une réponse à l'hypoxie tissu-spécifique. Ainsi, il est proposé que le récepteur nucléaire hépatique HNF4 peut participer avec HIF-1 au contrôle de l'expression de l'érythropoïétine [3,47].

Autres régulations de HIF-1 : Induction non hypoxique de HIF-1 / Phosphorylation / isoformes

Bien l'hypoxie soit le facteur majoritaire d'induction de HIF-1 α au niveau des cellules, d'autres stimuli, tels que l'insuline, l'IGF 1 et 2 (*Insulin-like Growth Factor*), l'EGF (*Epidermal Growth Factor*) ou le FGF (*Fibroblast Growth Factor*), sont capables d'augmenter le niveau de ce facteur de transcription dans certains types cellulaires. Il a en outre été montré une activation consécutive de gènes contrôlés par des HRE tels que le *veg*f, *glut 1* et 3, *alda*, *pgk*. Dans des cellules musculaires lisses vasculaires (VSMC), HIF-1 α est fortement augmenté en condition de normoxie par des agonistes de récepteurs membranaires (Angiotensine II, Thrombine, et PDGF (*Platelet Derived Growth Factor*)) et capable d'induire aussi la formation du VEGF ([48] et références citées).

Une voie indépendante de l'hypoxie est donc aussi capable d'induire la formation du complexe HIF-1 fonctionnel et ce par un mécanisme dépendant également de la stabilisation de HIF-1 α . La corrélation entre l'induction de gènes impliqués dans le transport du glucose ou de la glycolyse par l'hypoxie mais aussi par l'insuline via les mêmes éléments (HIF-1 α et HIF-1 β), laisse penser que ces derniers soient aussi essentiels pour l'activation de gènes nécessaires pour fournir à la cellule l'énergie requise dans des

conditions de normoxie [49]. De façon intéressante, l'augmentation de HIF-1 α dans les VSMC est dépendant de la production de ROS. Cette voie, pour l'instant spécifique de ces cellules, pourrait jouer un rôle clef dans la production du VEGF en normoxie et donc induire la perméabilité des vaisseaux en phase d'inflammation [48].

Des modifications par phosphorylation / déphosphorylation ont été proposées comme essentielles dans la voie menant à l'activation de HIF-1 ([4] et références citées). Notre laboratoire a récemment montré que HIF-1 α était hautement phosphorylé *in vivo*. Cette phosphorylation entraîne des modifications importantes dans le profil de migration de la protéine confirmant les hypothèses de modifications post-traductionnelles déjà émises [6]. Les p42/p44 MAPKs sont capables de phosphoryler HIF-1 α *in vivo*, de reproduire ce profil électrophorétique et d'augmenter son activité transactivatrice [50].

L'existence d'autres membres de la famille bHLH/PAS pouvant fixer HIF-1 β (AHR, SIM...), d'isoformes de HIF-1 α récemment découvertes (HIF-2 α ¹, HIF-3 α ²) ou de formes résultant d'épissages alternatifs laisse supposer des phénomènes de compétition entre les différents éléments [34]. Par ailleurs, la présence d'autres partenaires potentiels pour HIF-1 α (ARNT2 et ARNT3³) laisse envisager d'autres hétérodimères fonctionnels pouvant également interférer avec la voie centrale de la réponse cellulaire dépendante de HIF-1.

¹ : aussi nommé EPAS1 pour *Endothelial PAS domain protein 1*, MOP2 pour *Member Of PAS superfamily*, HLF pour *HIF-1 α Like Factor*, HRF pour *HIF-Related Factor*.

² : aussi appelé MOP7

³ : aussi appelé MOP3, JAP3, BMAL1 pour *Brain and Muscle Arnt-Like protein 1* ou *Cycle* (CYC).

HIF-1, REGULATEUR CENTRAL DE L'EXPRESSION DE GENES SOUS HYPOXIE

Décrit au départ comme le régulateur de l'expression du gène *epo* sous hypoxie, HIF-1 s'est révélé être en réalité le régulateur central de l'expression de nombreux gènes sous hypoxie. Comme vu précédemment, HIF-1 est exprimé dans tous les types cellulaires examinés dont la plupart n'expriment pas d'érythropoïétine. Ainsi, HIF-1 ne semble pas restreint à cette seule activité. Cela a été confirmé par l'analyse de promoteurs de gènes connus pour être sensibles à l'hypoxie, notamment les enzymes de la voie glycolytique, qui pour la plupart présentent des HRE dont l'activité a pu être vérifiée [51]. Ces enzymes permettent un basculement sur le métabolisme anaérobie et la production d'énergie (via la voie glycolytique) nécessaire aux cellules lorsque les apports en oxygène sont réduits. Des sites fonctionnels HRE ont aussi été trouvés dans de nombreux autres gènes parmi lesquels le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF pour *Vascular Endothelial Growth Factor*), qui entraîne une augmentation de l'angiogenèse rencontrée au cours du développement, de processus physiologiques ou physiopathologiques, la NO Synthase inductible (i-NOS) et l'Hème Oxygénase-1 (HO-1) qui donnent lieu à la synthèse des vasodilatateurs oxyde d'azote (NO) et monoxide de carbone (CO) respectivement, la Tyrosine Hydroxylase (TH) qui est une enzyme clef dans la régulation de la respiration, et la transferrine qui comme l'EPO intervient dans l'érythropoïèse [3,52]. L'ensemble de ces gènes permettent au niveau cellulaire, mais aussi à l'échelle de l'organisme, une réponse adaptative à l'hypoxie et HIF-1 est la clef de voûte de l'ensemble de ces réponses physiologiques [3]. Le tableau ci-dessous présente l'intégralité des gènes régulés par

le facteur HIF-1 actuellement connus (d'après [51]).

Gènes régulés au niveau transcriptionnel par HIF-1

<p>Métabolisme du Glucose & Prolifération Cellulaire / Viabilité</p> <p>Adenylate kinase 3, Aldolase A, Aldolase C, Enolase 1, Glucose transporter 1, Glucose transporter 3, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, Hexokinase 1, Hexokinase 2, Insulin-like growth factor 2, IGF binding protein 1, IGF binding protein 2, IGF binding protein 3, Lactate dehydrogenase A, NIP3, Phosphofructokinase L, Phosphoglycerate kinase 1, Pyruvate kinase M, p21, Transforming Growth Factor β3, Triosephosphate isomerase</p>	
<p>Métabolisme du fer & Erythropoïèse</p> <p>Ceruloplasmin, Erythropoietin, Transferrin, Transferrin receptor</p>	
<p>Développement Vasculaire / Remodelage et tonus Vasomoteur</p> <p>α_{1B}-adrenergic receptor, Adrenomedullin, Endothelin-1, Heme oxygenase-1, Nitric oxide synthase 2, Plasminogen activator inhibitor 1, Vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF receptor FLT-1</p>	
<p>Autres</p> <p>Carbonic anhydrase 9, p35srj, Prolyl-4-hydroxylase α(I)</p>	

IMPLICATION DE HIF-1 DANS L'EMBRYOGENESE ET LA PHYSIOPATHOLOGIE

La démonstration de l'importance de HIF-1 dans l'homéostasie de l'oxygène a été clairement établie par l'invalidation des gènes (KO pour *Knock-Out*) codant pour les deux sous-unités du complexe. En premier lieu, le KO de HIF-1 β [53] a permis de montrer l'importance du complexe HIF-1. En effet, l'invalidation du gène entraîne un retard développemental, des défauts au niveau du tube neural, de la vésicule vitelline, du placenta, qui conduit à la mort embryonnaire au jour E 10.5 de la gestation. Dans un second temps, plusieurs équipes indépendantes [54-56] ont réalisé le KO de HIF-1 α et ont ainsi pu démontrer un rôle global de HIF-1 α au niveau du développement et de la physiologie vasculaire. En effet, des souris HIF-1 α ^{-/-} ne sont pas viables (mort embryonnaire au

jour E 10.5 de la gestation) présentant une déficience au niveau de la vascularisation et des malformations cardiaques et neuronales [54]. Des similitudes avec le phénotype d'embryon VEGF^{-/+} [57,58] montrent un lien clair entre l'expression du VEGF et celle de HIF-1 α , nécessaire pour un développement harmonieux de la structure vasculaire. Les différentes isoformes d'HIF-1 α ou d'HIF-1 β ne peuvent pas remplacer les sous-unités manquantes et compenser totalement leur fonction dans la réponse à l'hypoxie. HIF-1 α et HIF-1 β ne sont donc pas des gènes redondants et l'hétérodimère HIF-1 exerce indiscutablement un rôle essentiel dans le développement embryonnaire.

Les études réalisées sur des cellules ES HIF-1 α ^{-/-} ont aussi pu démontrer le rôle central de ce facteur de transcription dans la régulation des gènes impliqués dans la cascade de signalisation de la glycolyse [54,55].

L'adaptation des cellules cancéreuses à l'hypoxie est une étape critique pour la progression tumorale. Des tumeurs induites chez la souris nude par injection de cellules d'hépatome c4 déficientes en ARNT1, sont significativement moins abondantes que celles induites par les cellules sauvages Hepa1 et présentent une densité capillaire moindre corrélée à une absence de transcrits du VEGF [59]. En ce qui concerne HIF-1 α , les tumeurs induites chez la souris nude par injection de cellules ES HIF-1 α ^{-/-} sont faiblement vascularisées et moyennement hémorragiques contrairement à celles issues de cellules ES HIF-1 α ^{+/+}. Le facteur de transcription HIF-1 joue donc un rôle clef dans le développement tumoral par son action angiogénique via le contrôle de l'expression du VEGF.

PERSPECTIVES DANS LA DETERMINATION DE LA SIGNALISATION EN AMONT DE HIF-1

Si la découverte de l'implication d'une Proline Hydroxylase est une avancée majeure pour la compréhension de la voie de la réponse à l'hypoxie, il reste encore à isoler l'enzyme et à étudier ces propriétés, ce qui permettra notamment de savoir si seules les protéines HIF- α sont les cibles de l'enzyme ou si d'autres substrats suivent la même voie. Par ailleurs, les phénomènes de phosphorylation sont essentiels dans la signalisation du HIF-1 : à quels niveaux interviennent-ils et quelles sont les kinases/phosphatases responsables de la régulation de l'activité de HIF-1. Existe-t-il aussi d'autres facteurs intermédiaires ? Enfin, si les effets du cobalt et de la DFO sont expliqués par leur action au niveau de la formation du complexe pVHL/HIF-1 α , plusieurs observations expérimentales concernant notamment les ROS, restent à éclaircir. Ces métabolites de l'oxygène pourraient effectivement constituer des seconds messagers impliqués dans la signalisation de l'hypoxie, et les enzymes les générant être d'autres senseurs d'oxygène cellulaires. Par exemple, une oxydase NAD(P)H et la superoxyde-dismutase peuvent respectivement générer des anions superoxyde (O₂⁻) et de l'eau oxygénée (H₂O₂). Dans ce sens, une oxydoreductase NAD(P)H de type cytochrome b a été identifiée chez les mammifères et proposée comme senseur d'oxygène [60]. La diminution de la formation de ces espèces oxygénées réactives en hypoxie pourrait être les déclencheurs de la signalisation d'HIF-1 [61]. Par ailleurs, les cytochromes oxydases - éléments de la chaîne mitochondriale de transport des électrons - pourraient elles aussi avoir un rôle dans cette signalisation. En effet, en condition d'hypoxie, la réduction de l'oxygène en eau est diminuée au profit de la

formation d'O₂⁻, un résultat inverse au modèle précédent. Néanmoins, diverses expériences ont donné des résultats supportant l'un ou l'autre des modèles, et restent ainsi insuffisantes pour trancher le débat [61]. Les limitations inhérentes aux outils pharmacologiques sont donc ici indiscutables et il s'avère nécessaire de développer des approches génétiques pour décortiquer entièrement cette voie de signalisation complexe.

Une première approche consistant à exprimer dans des cellules des marqueurs de surface exprimés en hypoxie à l'aide de constructions sous contrôle d'éléments de réponses à l'hypoxie, a permis d'isoler plusieurs mutants exprimant faiblement ou pas le marqueur de surface. Un seul s'est révélé positif et correspondait à une mutation pour HIF-1 α [62]. Dans l'étude menée, aucun autre élément de la voie de l'hypoxie n'a pu être découvert. Notre laboratoire développe actuellement une approche similaire, mais basée cette fois sur une sélection négative. L'objectif est de faire exprimer dans des lignées cellulaires des constructions cyostatiques ou cytotoxiques sous dépendance de HRE. Des clones cellulaires résistants devront présenter des mutations au niveau de la voie de signalisation d'HIF-1. Une étude de ces mutants devrait nous permettre de caractériser la Proline hydroxylase spécifique de HIF- α et éventuellement d'autres intermédiaires de la voie de l'hypoxie.

Par ailleurs, les cellules tumorales situées au sein des tumeurs solides étant très souvent extrêmement résistantes à la radiothérapie, l'utilisation de tels vecteurs activables par l'hypoxie reste un outil thérapeutique potentiel. Une expérience similaire réalisée par Ruan *et al.* a notamment déjà permis de montrer que l'expression régulée par l'hypoxie d'une protéine toxique (protéine apoptotique bax sous dépendance de HRE) est possible dans des cellules tumorales de

cerveau (U-87 MG et U-251 MG-NCI) et entraîne la mort par apoptose des cellules transfectées sous anoxie [63].

Le rôle essentiel du facteur HIF-1 au cours du développement, dans la physiologie ou au niveau pathologique fait de la découverte des mécanismes clefs de son activation un véritable challenge. Les découvertes à venir sur cette voie de signalisation permettront sans aucun doute de nouvelles approches pour le traitement de maladies sévères comme le cancer, ou les ischémies cérébrales ou cardiaques. Allant dans ce sens, il a été récemment montré que le peptide apparenté à la cathéline PR39 (*Prolin and Arginine-rich peptide*) est capable d'induire fortement l'angiogenèse en inhibant la dégradation d'HIF-1 α par le système ubiquitine/protéasome. Ce peptide et des analogues de celui-ci pourraient donc s'avérer être des agents efficaces pour l'induction de l'angiogenèse thérapeutique [64].

Remerciements : Je remercie vivement Edurne Berra, Christiane Brahimi et David Busti pour la relecture du manuscrit et leurs suggestions. Les Travaux provenant de notre laboratoire ont été soutenus par le CNRS, l'INSERM, l'Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC), la Ligue pour la Recherche contre le Cancer, *the Human Frontiers Science Program* et *the Canadian Institutes of Health Research* (CIHR).

BIBLIOGRAPHIE

1. Goldberg, M. A., and Schneider, T. J. Similarities between the oxygen-sensing mechanisms regulating the expression of vascular endothelial growth factor and erythropoietin. *J Biol Chem* 1994; 269: 4355-9.
2. Jiang, B. H., Rue, E., Wang, G. L., Roe, R., and Semenza, G. L. Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 1996; 271: 17771-8.
3. Guillemin, K., and Krasnow, M. A. The hypoxic response: huffing and HIFing. *Cell* 1997; 89: 9-12.
4. Semenza, G. L. Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O₂ homeostasis. *Curr Opin Genet Dev* 1998; 8: 588-94.
5. Semenza, G. L., Nejfelt, M. K., Chi, S. M., and Antonarakis, S. E. Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 5680-4.
6. Wang, G. L., Jiang, B. H., Rue, E. A., and Semenza, G. L. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 5510-4.
7. Wang, G. L., and Semenza, G. L. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 1995; 270: 1230-7.
8. Semenza, G. L., Rue, E. A., Iyer, N. V., Pang, M. G., and Kearns, W. G. Assignment of the hypoxia-inducible factor 1alpha gene to a region of conserved synteny on mouse chromosome 12 and human chromosome 14q. *Genomics* 1996; 34: 437-9.
9. Iyer, N. V., Leung, S. W., and Semenza, G. L. The human hypoxia-inducible factor 1alpha gene: HIF1A structure and evolutionary conservation. *Genomics* 1998; 52: 159-65.
10. Wenger, R. H., Rolfs, A., Kvietikova, I., Spielmann, P., Zimmermann, D. R., and Gassmann, M. The mouse gene for hypoxia-inducible factor-1alpha--genomic organization, expression and characterization of an alternative first exon and 5' flanking sequence. *Eur J Biochem* 1997; 246: 155-65.
11. Wenger, R. H., Rolfs, A., Spielmann, P., Zimmermann, D. R., and Gassmann, M. Mouse hypoxia-inducible factor-1alpha is encoded by two different mRNA isoforms: expression from a tissue-specific and a housekeeping-type promoter. *Blood* 1998; 91: 3471-80.
12. Luo, G., Gu, Y. Z., Jain, S., Chan, W. K., Carr, K. M., Hogenesch, J. B., and Bradfield, C. A. Molecular characterization of the murine Hif-1 alpha locus. *Gene Expr* 1997; 6: 287-99.
13. Gothie, E., Richard, D. E., Berra, E., Pages, G., and Pouyssegur, J. Identification of alternative spliced variants of human hypoxia-inducible factor-1alpha. *J Biol Chem* 2000; 275: 6922-7.
14. Drutel, G., Kathmann, M., Heron, A., Gros, C., Mace, S., Schwartz, J. C., and Arrang, J. M. Two splice variants of the hypoxia-inducible factor HIF-1alpha as potential dimerization partners of ARNT2 in neurons. *Eur J Neurosci* 2000; 12: 3701-8.
15. Johnson, B., Brooks, B. A., Heinzmann, C., Diep, A., Mohandas, T., Sparkes, R. S., Reyes, H., Hoffman, E., Lange, E., Gatti, R. A., and *et al.* The Ah receptor nuclear translocator gene (ARNT) is located on q21 of human chromosome 1 and on mouse chromosome 3 near Cf-3. *Genomics* 1993; 17: 592-8.
16. Hoffman, E. C., Reyes, H., Chu, F. F., Sander, F., Conley, L. H., Brooks, B. A., and Hankinson, O. Cloning of a factor required for activity of the Ah (dioxin) receptor. *Science* 1991; 252: 954-8.
17. Drutel, G., Kathmann, M., Heron, A., Schwartz, J. C., and Arrang, J. M. Cloning and selective expression in brain and kidney of ARNT2 homologous to the Ah receptor nuclear translocator (ARNT). *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 225: 333-9.
18. Pollenz, R. S., Sullivan, H. R., Holmes, J., Necela, B., and Peterson, R. E. Isolation and expression of cDNAs from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) that encode two novel basic helix-loop-helix/PER-ARNT-SIM (bHLH/PAS) proteins with distinct functions in the presence of the aryl hydrocarbon receptor. Evidence for alternative mRNA splicing and dominant negative activity in the bHLH/PAS family. *J Biol Chem* 1996; 271: 30886-96.
19. Tian, H., McKnight, S. L., and Russell, D. W. Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev* 1997; 11: 72-82.
20. Wiener, C. M., Booth, G., and Semenza, G. L. In vivo expression of mRNAs encoding hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 225: 485-8.
21. Wenger, R. H., Rolfs, A., Marti, H. H., Guenet, J. L., and Gassmann, M. Nucleotide sequence, chromosomal assignment and mRNA expression of mouse hypoxia-inducible factor-1 alpha. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 223: 54-9.
22. Ema, M., Taya, S., Yokotani, N., Sogawa, K., Matsuda, Y., and Fujii-Kuriyama, Y. A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1alpha regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 4273-8.
23. Hirose, K., Morita, M., Ema, M., Mimura, J., Hamada, H., Fujii, H., Saijo, Y., Gotoh, O., Sogawa, K., and Fujii-Kuriyama, Y. cDNA cloning and tissue-specific expression of a novel basic helix-loop-helix/PAS factor (Arnt2) with close sequence similarity to the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (Arnt). *Mol Cell Biol* 1996; 16: 1706-13.
24. Li, H., Ko, H. P., and Whitlock, J. P. Induction of phosphoglycerate kinase 1 gene expression by hypoxia. Roles of Arnt and HIF1alpha. *J Biol Chem* 1996; 271: 21262-7.
25. Jiang, B. H., Zheng, J. Z., Leung, S. W., Roe, R., and Semenza, G. L. Transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor 1alpha. Modulation of transcriptional activity by oxygen tension. *J Biol Chem* 1997; 272: 19253-60.
26. Pugh, C. W., O'Rourke, J. F., Nagao, M., Gleadle, J. M., and Ratcliffe, P. J. Activation of hypoxia-inducible factor-1; definition of regulatory domains within the alpha subunit. *J Biol Chem* 1997; 272: 11205-14.
27. O'Rourke, J. F., Tian, Y. M., Ratcliffe, P. J., and Pugh, C. W. Oxygen-regulated and transactivating domains in endothelial PAS protein 1: comparison with hypoxia-inducible factor-1alpha. *J Biol Chem* 1999; 274: 2060-71.
28. Salceda, S., and Caro, J. Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem* 1997; 272: 22642-7.
29. Huang, L. E., Gu, J., Schau, M., and 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* 1998; 95: 7987-92.
30. Srinivas, V., Zhang, L. P., Zhu, X. H., and Caro, J. Characterization of an oxygen/redox-dependent degradation domain of hypoxia-inducible factor alpha (HIF-alpha) proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 260: 557-61.
31. Kallio, P. J., Okamoto, K., O'Brien, S., Carrero, P., Makino, Y., Tanaka, H., and 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* 1998; 17: 6573-86.
32. Jaakkola, P., Mole, D. R., Tian, Y., Wilson, M. I., Gielbert, J., Gaskell, S. J., Kriegsheim, A., Hebestreit, H. F., Mukherji, M., Schofield, C. J., Maxwell, P. H., Pugh, C. W., and Ratcliffe, P. J. Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau Ubiquitylation Complex by O₂-Regulated Prolyl Hydroxylation. *Published online/www.scienceexpress.org /*, 5 April 2001;10.1126/science.1059796 2001; .
33. Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., Kim, W., Valiando, J., Ohh, M., Salic, A., Asara, J. M., Lane, W. S., and Kaelin Jr., W. G. HIF alpha Targeted for VHL-Mediated Destruction by Proline Hydroxylation: Implications for O₂ Sensing. *Published online/www.scienceexpress.org /*, 5 April 2001;10.1126/science.1059817 2001; .

34. Gradin, K., McGuire, J., Wenger, R. H., Kvietikova, I., Thitellaw, M. L., Toftgard, R., Tora, L., Gassmann, M., and Poellinger, L. Functional interference between hypoxia and dioxin signal transduction pathways: competition for recruitment of the Arnt transcription factor. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 5221-31.
35. Kallio, P. J., Wilson, W. J., O'Brien, S., Makino, Y., and Poellinger, L. Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1alpha by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem* 1999; 274: 6519-25.
36. Sutter, C. H., Laughner, E., and Semenza, G. L. Hypoxia-inducible factor 1alpha protein expression is controlled by oxygen-regulated ubiquitination that is disrupted by deletions and missense mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 4748-53.
37. Tanimoto, K., Makino, Y., Pereira, T., and Poellinger, L. Mechanism of regulation of the hypoxia-inducible factor-1 alpha by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *Embo J* 2000; 19: 4298-309.
38. Cockman, M. E., Masson, N., Mole, D. R., Jaakkola, P., Chang, G. W., Clifford, S. C., Maher, E. R., Pugh, C. W., Ratcliffe, P. J., and Maxwell, P. H. Hypoxia inducible factor-1alpha binding and ubiquitination by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *J Biol Chem* 2000; 275: 25733-41.
39. Ohh, M., Park, C. W., Ivan, M., Hoffman, M. A., Kim, T. Y., Huang, L. E., Pavletich, N., Chau, V., and Kaelin, W. G. Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the beta-domain of the von Hippel-Lindau protein. *Nat Cell Biol* 2000; 2: 423-7.
40. Berra, E., Richard, D. E., Gothie, E., and Pouyssegur, J. HIF-1-dependent transcriptional activity is required for oxygen-mediated HIF-1alpha degradation. *FEBS Lett* 2001; 491: 85-90.
41. Ravi, R., Mookerjee, B., Bhujwala, Z. M., Sutter, C. H., Artemov, D., Zeng, Q., Dillehay, L. E., Madan, A., Semenza, G. L., and Bedi, A. Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Genes Dev* 2000; 14: 34-44.
42. Pollenz, R. S., Sattler, C. A., and Poland, A. The aryl hydrocarbon receptor and aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein show distinct subcellular localizations in Hepa 1c1c7 cells by immunofluorescence microscopy. *Mol Pharmacol* 1994; 45: 428-38.
43. Eguchi, H., Ikuta, T., Tachibana, T., Yoneda, Y., and Kawajiri, K. A nuclear localization signal of human aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator/hypoxia-inducible factor 1beta is a novel bipartite type recognized by the two components of nuclear pore-targeting complex. *J Biol Chem* 1997; 272: 17640-7.
44. Carrero, P., Okamoto, K., Coumailleau, P., O'Brien, S., Tanaka, H., and Poellinger, L. Redox-regulated recruitment of the transcriptional coactivators CREB-binding protein and SRC-1 to hypoxia-inducible factor 1alpha. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 402-15.
45. Minet, E., Mottet, D., Michel, G., Roland, I., Raes, M., Remacle, J., and Michiels, C. Hypoxia-induced activation of HIF-1: role of HIF-1alpha-Hsp90 interaction. *FEBS Lett* 1999; 460: 251-6.
46. Kallio, P. J., Pongratz, I., Gradin, K., McGuire, J., and Poellinger, L. Activation of hypoxia-inducible factor 1alpha: posttranscriptional regulation and conformational change by recruitment of the Arnt transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 5667-72.
47. Galson, D. L., Tsuchiya, T., Tendler, D. S., Huang, L. E., Ren, Y., Ogura, T., and Bunn, H. F. The orphan receptor hepatic nuclear factor 4 functions as a transcriptional activator for tissue-specific and hypoxia-specific erythropoietin gene expression and is antagonized by EAR3/COUP-TF1. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 2135-44.
48. Richard, D. E., Berra, E., and Pouyssegur, J. Nonhypoxic pathway mediates the induction of hypoxia-inducible factor 1alpha in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2000; 275: 26765-71.
49. Zelzer, E., Levy, Y., Kahana, C., Shilo, B. Z., Rubinstein, M., and Cohen, B. Insulin induces transcription of target genes through the hypoxia-inducible factor HIF-1alpha/ARNT. *Embo J* 1998; 17: 5085-94.
50. Richard, D. E., Berra, E., Gothie, E., Roux, D., and Pouyssegur, J. p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. *J Biol Chem* 1999; 274: 32631-7.
51. Semenza, G. L. Hypoxia-Inducible Factor 1: Oxygen Homeostasis and Disease Pathophysiology. *Trends Mol. Med.* 2001; In press.
52. Bianchi, L., Tacchini, L., and Cairo, G. HIF-1-mediated activation of transferrin receptor gene transcription by iron chelation. *Nucleic Acids Res* 1999; 27: 4223-7.
53. Maltepe, E., Schmidt, J. V., Baunoch, D., Bradfield, C. A., and Simon, M. C. Abnormal angiogenesis and responses to glucose and oxygen deprivation in mice lacking the protein ARNT. *Nature* 1997; 386: 403-7.
54. Iyer, N. V., Kotch, L. E., Agani, F., Leung, S. W., Laughner, E., Wenger, R. H., Gassmann, M., Gearhart, J. D., Lawler, A. M., Yu, A. Y., and Semenza, G. L. Cellular and developmental control of O2 homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes Dev* 1998; 12: 149-62.
55. Carmeliet, P., Dor, Y., Herbert, J. M., Fukumura, D., Brusselmans, K., Dewerchin, M., Neeman, M., Bono, F., Abramovitch, R., Maxwell, P., Koch, C. J., Ratcliffe, P., Moons, L., Jain, R. K., Collen, D., Keshet, E., and Keshet, E. Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature* 1998; 394: 485-90.
56. Ryan, H. E., Lo, J., and Johnson, R. S. HIF-1 alpha is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *Embo J* 1998; 17: 3005-15.
57. Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G., Pollefeyt, S., Kieckens, L., Gertszenstein, M., Fahrig, M., Vandenhoek, A., Harpal, K., Eberhardt, C., Declercq, C., Pawling, J., Moons, L., Collen, D., Risau, W., and Nagy, A. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 1996; 380: 435-9.
58. Ferrara, N., Carver-Moore, K., Chen, H., Dowd, M., Lu, L., O'Shea, K. S., Powell-Braxton, L., Hillan, K. J., and Moore, M. W. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 1996; 380: 439-42.
59. Maxwell, P. H., Dachs, G. U., Gleadle, J. M., Nicholls, L. G., Harris, A. L., Stratford, I. J., Hankinson, O., Pugh, C. W., and Ratcliffe, P. J. Hypoxia-inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 8104-9.
60. Zhu, H., Qiu, H., Yoon, H. W., Huang, S., and Bunn, H. F. Identification of a cytochrome b-type NAD(P)H oxidoreductase ubiquitously expressed in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 14742-7.
61. Semenza, G. L. Perspectives on oxygen sensing. *Cell* 1999; 98: 281-4.
62. Wood, S. M., Wiesener, M. S., Yeates, K. M., Okada, N., Pugh, C. W., Maxwell, P. H., and Ratcliffe, P. J. Selection and analysis of a mutant cell line defective in the hypoxia-inducible factor-1 alpha-subunit (HIF-1alpha). Characterization of hif-1alpha-dependent and -independent hypoxia-inducible gene expression. *J Biol Chem* 1998; 273: 8360-8.
63. Ruan, H., Wang, J., Hu, L., Lin, C. S., Lamborn, K. R., and Deen, D. F. Killing of brain tumor cells by hypoxia-responsive element mediated expression of BAX. *Neoplasia* 1999; 1: 431-7.
64. Li, J., Post, M., Volk, R., Gao, Y., Li, M., Metais, C., Sato, K., Tsai, J., Aird, W., Rosenberg, R. D., Hampton, T. G., Sellke, F., Carmeliet, P., and Simons, M. PR39, a peptide regulator of angiogenesis. *Nat Med* 2000; 6: 49-55.
65. Berra, E., Roux, D., Richard, D. E., and Pouyssegur, J. Hypoxia-Inducible Factor -1alpha (HIF-1alpha) escapes O2-driven proteosomal degradation irrespective of its subcellular localization. *EMBO* 2001; In press.

HIF-1-dependent transcriptional activity is required for oxygen-mediated HIF-1 α degradation

Edurne Berra*, Darren E. Richard, Emmanuel Gothié, Jacques Pouyssegur

Institute of Signaling, Developmental Biology and Cancer Research, CNRS-UMR 6543, Centre Antoine Lacassagne, 33 Avenue Valombrose, 06189 Nice, France

Received 8 January 2001; accepted 22 January 2001

First published online 31 January 2001

Edited by Jacques Hanoune

Abstract Hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) plays a central role in oxygen homeostasis. In normoxia, HIF-1 α is a short lived protein, whereas hypoxia rapidly increases HIF-1 α protein levels by relaxing its ubiquitin–proteasome-dependent degradation. In this study, we show that the p42/p44 MAP kinase cascade, known to phosphorylate HIF-1 α , does not modulate the degradation/stabilization profile of HIF-1 α . However, we present evidence that the rate of HIF-1 α degradation depends on the duration of hypoxic stress. We demonstrate that degradation of HIF-1 α is suppressed by: (i) inhibiting general transcription with actinomycin D or (ii) specifically blocking HIF-1-dependent transcriptional activity. In keeping with these findings, we postulate that HIF-1 α is targeted to the proteasome via a HIF-1 α proteasome targeting factor (HPTF) which expression is directly under the control of HIF-1-mediated transcriptional activity. Although HPTF is not yet molecularly identified, it is clearly distinct from the von Hippel–Lindau protein (pVHL). © 2001 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Key words: Hypoxia; HIF-1; Proteasome; pVHL

1. Introduction

Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) is a heterodimeric transcription factor composed of the HIF-1 α (120 kDa) and HIF-1 β subunits (94 kDa) [1]. Both HIF-1 subunits belong to the subfamily of basic-helix-loop-helix transcription factors containing a PAS (PER-ARNT-SIM) motif [2]. HIF-1 β is the already characterized aryl hydrocarbon nuclear translocator (ARNT) previously shown to heterodimerize with the aryl hydrocarbon receptor, whereas the HIF-1 α subunit is specific for the hypoxic responses [3]. Recently, in addition to HIF-1 α and HIF-1 β , cloning experiments have identified several new members of the HIF family of transcription factors [4]. HIF-1 plays a central role in oxygen homeostasis by inducing the expression of a broad range of genes in a hypoxic-dependent manner: erythropoietin (EPO), vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGFR-1, glucose transporter-1 (GLUT-1), inducible nitric oxide synthase (i-NOS), heme oxygenase (HO-1), transferrin, tyrosine hydroxylase, and almost every gene in the glycolytic pathway [5,6]. All these genes contain at least one hypoxia response element that specifies the binding of HIF-1.

Several studies have demonstrated that the hypoxic activation of HIF-1 is a multistage and a complex process. However, hypoxia-mediated induction of HIF-1 α appears to be the primary mode of regulation since the expression of the rate limiting α subunit determines the activity of the HIF-1 complex [7,8]. HIF-1 α is a short lived protein that is maintained at low and often undetectable levels in normoxia, whereas it is strongly induced in hypoxic cells [2,7]. Indeed, as quickly as HIF-1 α is induced, it is even more rapidly degraded upon return to normoxic conditions [2,7]. Previous results have shown that, in oxygenated cells, HIF-1 α is quickly ubiquitinated and degraded by the proteasome system, whereas hypoxia induces HIF-1 α by relaxing its ubiquitin–proteasome-mediated degradation [8–10]. Hence, regulation of the proteasome-dependent degradation of HIF-1 α appears to be a pivotal step in the hypoxic induction of HIF-1.

In spite of extensive studies on the molecular mechanisms underlying the proteasome-dependent degradation of HIF-1 α , it is only recently that a major breakthrough has been done. The product of the von Hippel–Lindau tumor suppressor gene (pVHL) has been demonstrated to interact directly with HIF-1 α as a component of an E3 ubiquitin–protein ligase complex responsible for the degradation of HIF-1 α [11–14]. However, the association of pVHL and HIF-1 α has been reported to be constitutive and independent of oxygen levels. Indeed, the signaling components regulating the ‘switch’ to proteasomal degradation in normoxic conditions are not still fully characterized. In this work, we show that p42/p44 MAP kinases, known to phosphorylate HIF-1 α , are not implicated in the stabilization of HIF-1 α protein or the regulation of its ubiquitin–proteasome-dependent degradation. We present evidence that HIF-1 α degradation depends on HIF-1-mediated transcriptional activity. We propose a model in which a HIF-1 α proteasome targeting factor, referred to here as HPTF, is involved in this process. We demonstrate that HPTF is distinct from the previously characterized pVHL, and we propose that a hypoxia-regulated gene encodes HPTF. This working model provides an autoregulatory feedback mechanism for HIF-1 α degradation.

2. Materials and methods

2.1. Material and plasmid construction

The transcriptional inhibitor, actinomycin D, was from Boehringer Mannheim. PD 98059 was from New England Biolabs. Estradiol and monoclonal anti-phospho-p42/p44 MAP kinases antibody were from Sigma. The anti-HIF-1 α antibody (antiserum 2087) was raised in our laboratory in rabbits immunized against the last 20 amino acids C-terminal of the human HIF-1 α . Monoclonal antibody against pVHL

*Corresponding author. Fax: (33)-4-92 03 12 25.
E-mail: berra@unice.fr

was from Pharmingen (Ig32). The HIF-1 α expression vector pcDNA3-HA-DN-HIF-1 α has previously been described [15].

2.2. Cell culture and transfections

HeLa cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 7.5% inactivated fetal calf serum (FCS), penicillin G (50 U/ml), and streptomycin (50 μ g/ml) (Gibco-BRL) in a CO₂ incubator (5% CO₂) at 37°C. CCL39-Raf-1:ER cells were cultured in the same media but in the absence of phenol red in order to reduce the basal activity of the chimera. Cells were arrested by total serum deprivation for 24 h. Hypoxic conditions were performed by incubation of cells in a sealed 'Bug-Box' anaerobic workstation (Ruskin Technologies, Jouan, France). The oxygen in this workstation was maintained at 1–2% with residual gas mixture being 93–94% nitrogen, and 5% carbon dioxide.

Subconfluent HeLa cells on 60 mm culture dishes were transfected with 10 μ g of either pcDNA3 or pcDNA3-HA-DN-HIF-1 α by the calcium phosphate method. After 16 h, plasmid DNA was removed and cells were incubated in DMEM medium containing 7.5% FCS. At 48 h post-transfection, cells were incubated under normoxia (20% O₂) or hypoxia (1–2% O₂) for 3 h after which hypoxic cells were returned to 20% O₂ for different times. Under these conditions and using GFP as a co-marker, we usually transfected about 70–80% of cells.

2.3. Immunoprecipitation and immunoblot analysis

In order to analyze HIF-1 α expression, cellular proteins were extracted with Triton X-100 lysis buffer (0.1% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM sodium fluoride, 40 mM β -glycerophosphate, 200 μ M sodium orthovanadate, 5 μ g/ml aprotinin, 0.7 μ g/ml pepstatin, 0.5 μ g/ml leupeptin, and 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride) and total cellular extracts (50 μ g) were resolved in sodium dodecyl sulfate (SDS)–polyacrylamide (7.5%) gels. For the pVHL protein, proteins from HeLa cells were extracted by using the previously described lysis buffer with addition of 0.5% sodium deoxycholate. Clarified lysates (500 μ g) were incubated for 2 h with the anti-HIF-1 α antiserum (5 μ l). Immunocomplexes were collected on protein A Sepharose (Pharmacia), washed three times with the lysis buffer, boiled in Laemmli loading buffer, and separated by SDS-PAGE (12%). Afterwards, proteins were electrophoretically transferred onto a PVDF membrane (Immobilon-P, Millipore) and revealed with the specific antibodies as indicated. The bands were visualized with the ECL system (Amersham Pharmacia Biotech).

3. Results

3.1. p42/p44 MAP kinase activity does not affect the stabilization/degradation pattern of HIF-1 α

Phosphorylation and dephosphorylation activities have often been implicated in the stabilization and/or degradation of a number of transcription factors, and other proteins regulated by the proteasome system [16]. Interestingly, results from our laboratory have demonstrated that HIF-1 α is a phosphoprotein that is specifically phosphorylated by p42/p44 MAP kinases in vitro and in vivo [17]. In order to specifically evaluate whether p42/p44 MAP kinase activity affects ubiquitin–proteasome-mediated degradation of HIF-1 α , we used a derivative of the CCL39 cell line stably expressing the Raf-1:ER chimera. This protein is a fusion between the catalytic domain of Raf-1, the MAPKKK upstream activator of the p42/p44 MAP kinase pathway, and the ligand binding domain of the estradiol receptor. Addition of estradiol to these arrested cells induces a rapid and strong stimulation of p42/p44 MAP kinases that persists as long as estradiol is present in the medium [18–20]. Therefore, CCL39-Raf-1:ER starved cells were incubated either in normoxic (20% O₂) or hypoxic (1–2% O₂) conditions as indicated in the legend in the presence of either estradiol or the MEK inhibitor, PD 98059, for the last 30 min. HIF-1 α protein levels were determined by

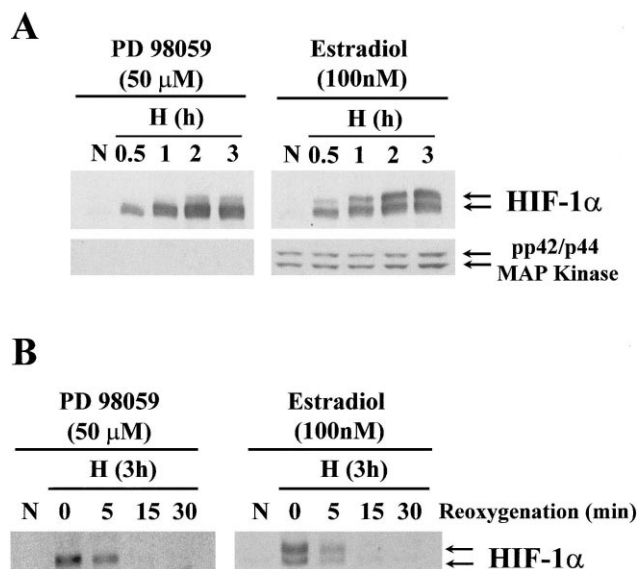


Fig. 1. p42/p44 MAP kinase activation does not affect the expression patterns of HIF-1 α . (A) CCL39-Raf-1:ER cells were starved for 24 h, and then incubated under normoxia (20% O₂; N) or hypoxia (1–2% O₂; H) for different times. Before the end of each treatment (30 min), cells were stimulated with either 50 μ M PD 98059 or 100 nM estradiol. (B) Starved CCL39-Raf-1:ER cells were incubated under normoxia (20% O₂; N) or hypoxia (1–2% O₂; H) for 3 h after which hypoxic cells were returned to 20% O₂ for 0–30 min. 30 min before the end of the hypoxic stress, Raf-1:ER cells were stimulated with either 50 μ M PD 98059 or 100 nM estradiol. Total cell lysates were analyzed by immunoblotting with the antibodies to HIF-1 α and anti-phospho-p42/p44 MAP kinase. Essentially identical results were obtained in three independent experiments.

immunoblot analysis of total cell extracts. Results from Fig. 1A showed that HIF-1 α is strongly and rapidly induced by hypoxia either in PD 98059-treated or estradiol-stimulated cells. Of note the marked differences in the migration pattern of HIF-1 α corresponding to varying levels of phosphorylation. As we have previously demonstrated, HIF-1 α migrates as a single band in quiescent cells, whereas the activation of the p42/p44 MAP kinase pathway induces the phosphorylation and the 'shift-up' of HIF-1 α (Fig. 1). We next evaluated the profile of HIF-1 α degradation upon reoxygenation in the same experimental conditions. As shown in Fig. 1B, this profile remained very similar in control or estradiol-stimulated cells. Interestingly, the rate of degradation seems to be identical for the hypophosphorylated and upper form of HIF-1 α (Fig. 1B, right panel). These results demonstrate that p42/p44 MAP kinase cascade, in CCL39 cells, does not significantly modulate the stabilization/degradation kinetics of HIF-1 α .

3.2. Degradation of HIF-1 α depends on the duration of hypoxic stress

HIF-1 α is highly up-regulated by hypoxia in almost every cell type tested. Interestingly, in HeLa cells as compared to the CCL39 cell line, induced HIF-1 α migrates with a pattern showing the different phosphorylated forms of the protein [17]. Therefore, for the rest of the study we used HeLa cells as our cellular model. Thus, HeLa cells were incubated under hypoxia for 1 h or 8 h after which they were returned to an oxygenated atmosphere for periods of time varying between 0 and 30 min. As previously demonstrated, results from Fig. 2A

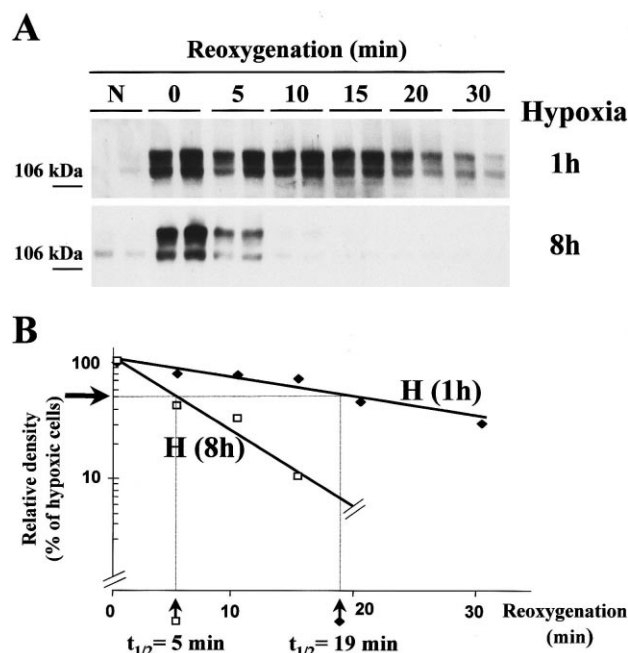


Fig. 2. HIF-1 α half-life is inversely proportional to the duration of hypoxic stress. HeLa cells were incubated under normoxia (20% O₂; N) or hypoxia (1–2% O₂; H) for 1 h (◆) or 8 h (□) after which hypoxic cells were returned to 20% O₂ for 0–30 min. Total cell lysates were immunoblotted with anti-HIF-1 α (A). The intensity of HIF-1 α signals in A was quantified and plotted (B). Essentially identical results were obtained in three independent experiments performed in duplicate.

showed that HIF-1 α is strongly induced by hypoxia and rapidly degraded upon reoxygenation of hypoxic cells. However and more interestingly, these results revealed that the rate of HIF-1 α degradation depends on the duration of hypoxic stress. The increase of the hypoxic treatment from 1 h to 8 h reduced the half-life of HIF-1 α by 5-fold. Cells which underwent the shortest hypoxic stress (1 h) had the longest HIF-1 α half-life (19 min), whereas the $t_{1/2}$ of HIF-1 α drastically fell to 5 min in cells that were maintained in hypoxia for 8 h (Fig. 2B). Indeed, cells stressed for 3 h showed an intermediate $t_{1/2}$ (data not shown). As a control, the same cellular lysates were analyzed by Western blot with an antibody against p42 MAP kinase. The protein levels of this kinase, which is not affected by O₂ tension, remained unmodified (data not shown). These findings suggest that the degradation of HIF-1 α is dependent on hypoxia-induced transcription and/or translation.

3.3. Actinomycin D inhibits HIF-1 α degradation

We wanted to evaluate whether transcriptional or translational activities were implicated in the regulation of HIF-1 α breakdown. Unfortunately, since HIF-1 α induction involves on-going protein synthesis, the use of cycloheximide was ruled out. To test whether oxygen-mediated HIF-1 α degradation depends on a hypoxia-induced transcriptional activity, HeLa cells were incubated in 1–2% O₂ for 8 h, either in the absence or in the presence of actinomycin D, and then reoxygenated for the indicated periods of time. In agreement with previous studies showing that the HIF-1 α mRNA is constitutively expressed and is not significantly affected by hypoxia, results from Fig. 3A demonstrated that inhibition of transcription did not affect the induction of HIF-1 α protein upon hypoxic

stress. The addition of actinomycin D, however, had a significant inhibitory effect on HIF-1 α degradation upon reoxygenation, whereas the p42 MAP kinase protein levels remained unaffected. The same result was obtained when the experiment was performed in the presence of another transcriptional inhibitor, 5,6-dichlorobenzimidazole riboside (data not shown). These findings suggest that hypoxia induces the transcription of a gene(s) encoding a regulatory protein(s), which controls the oxygen-mediated degradation of HIF-1 α .

3.4. HIF-1-dependent transcriptional activity is required for HIF-1 α degradation

As we mentioned in Section 1, HIF-1 is a key mediator of the hypoxic induction of many hypoxia-regulated genes. We therefore wanted to evaluate the possibility that HIF-1-dependent transcriptional activation controls oxygen-mediated HIF-1 α degradation. If we are right, the inhibition of the transcriptional activity of HIF-1 should be able to slow down HIF-1 α degradation. Hence, we transfected HeLa cells with a dominant negative mutant of HIF-1 α . This mutant (pcDNA3-HA-DN-HIF-1 α) was obtained by a carboxyl-terminal truncation of HIF-1 α that eliminates the transactivating domains (amino acids 390–826). Accordingly, the expression of this construct has been shown to inhibit induction of reporter genes by endogenous HIF-1 in a dose-dependent manner (Gothié, E. and Pouyssegur, J., unpublished data). At 48 h post-transfection, cells were incubated either in normoxia or hypoxia for 3 h after which hypoxic cells were returned to 20% O₂ for 0, 15 or 30 min. Total cell extracts were prepared, and HIF-1 α

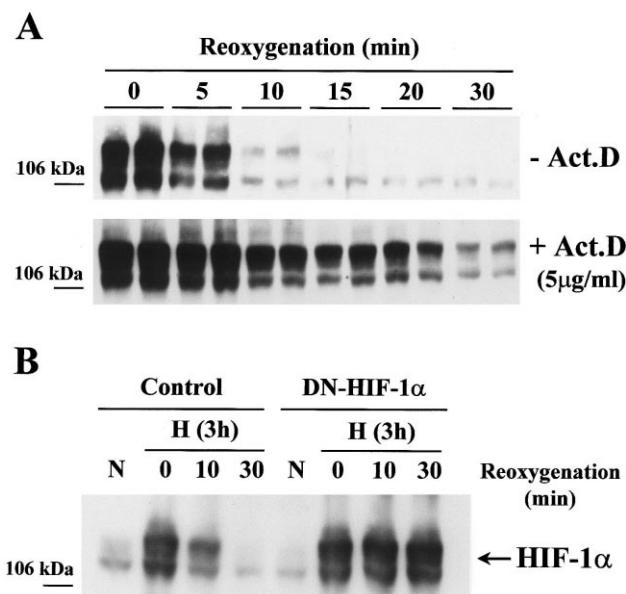


Fig. 3. HIF-1-dependent transcriptional activity controls oxygen-mediated degradation of HIF-1 α . (A) HeLa cells, either untreated or treated with 5 μ g/ml of actinomycin D for 30 min, were incubated under normoxia (20% O₂; N) or hypoxia (1–2% O₂; H) for 8 h after which hypoxic cells were returned to 20% O₂ for 0–30 min. Total cell lysates were immunoblotted with anti-HIF-1 α (B). Subconfluent HeLa cells were transfected with 10 μ g of either empty vector or HA-DN-HIF-1 α expression vector. At 48 h post-transfection, cells were incubated under normoxia (20% O₂; N) or hypoxia (1–2% O₂; H) for 3 h after which hypoxic cells were returned to 20% O₂ for 0, 15, or 30 min. Total cell lysates were analyzed by immunoblotting with the antibody to HIF-1 α . Results are representative of three independent experiments.

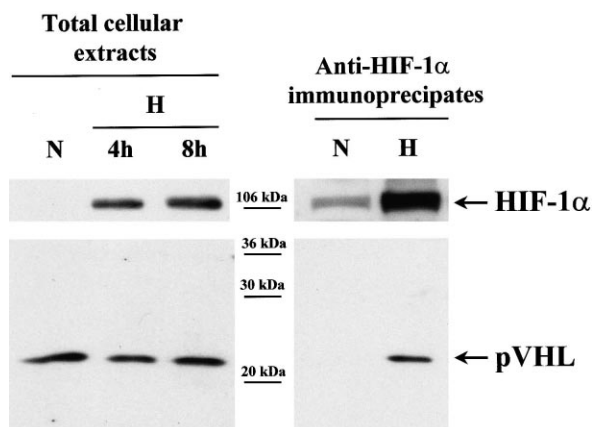


Fig. 4. Hypoxia does not modulate the expression of the von Hippel–Lindau protein (pVHL). HeLa cells were incubated under normoxia (20% O₂; N) or hypoxia (1–2% O₂; H) for 4 h or 8 h. Total cell lysates were immunoblotted with anti-HIF-1α or anti-pVHL antibodies (left panel). The same cellular extracts (N and H (8 h)) were immunoprecipitated using the anti-HIF-1α antibody. These immunoprecipitates were analyzed by SDS–PAGE and immunoblotted with the antibody to HIF-1α or pVHL (right panel). Essentially identical results were obtained in three independent experiments.

protein levels analyzed by immunoblotting. Interestingly, results from Fig. 3B demonstrated that the ability of oxygen to induce HIF-1α degradation was strongly inhibited by expression of the HIF-1α dominant negative mutant. Of note, HIF-1α construct was expressed at similar levels (data not shown). Taken together, these results clearly show that during hypoxia, HIF-1 is critically involved in the induction of a regulatory protein(s), which is necessary for oxygen-mediated HIF-1α degradation.

3.5. VHL is not a hypoxia-inducible gene

Ratcliffe's group has nicely demonstrated that the product of the von Hippel–Lindau tumor suppressor gene (pVHL) plays an essential role on HIF-1α degradation [11]. In addition, our above results lead to the notion that hypoxia via HIF-1 controls the expression of a factor(s) which is critical for the oxygen-induced degradation of HIF-1α. Is pVHL this hypoxia-inducible regulatory protein? To answer this question, cellular lysates from HeLa cells incubated for different periods in normoxia or hypoxia were analyzed by immunoblot using an antibody against pVHL. This antibody detects a single protein migrating in a 12% SDS–polyacrylamide gel as a band which corresponds to a molecular mass of 24 kDa. This band has been validated as pVHL by a coimmunoprecipitation assay using the anti-HIF-1α specific antibodies (Fig. 4, right panel). Results from Fig. 4 (left panel) clearly demonstrated that the expression level of pVHL in whole cellular extracts is not affected even after 8 h of incubation in 1–2% O₂, whereas the same hypoxic treatment was found to drastically accelerate the rate of HIF-1α degradation (Fig. 2A). In addition, we showed that the interaction between HIF-1α and pVHL, by immunoprecipitation assays, was not modified by the length of the hypoxic stress (data not shown). Hence, we conclude that pVHL is distinct from the regulatory protein, actinomycin D-sensitive and HIF-1-dependent, which would be implicated in the regulatory mechanism here presented.

4. Discussion

HIF-1 plays an essential role in embryonic development, cellular and systemic physiology [5,6]. HIF-1 activity is critically dependent on the expression of HIF-1α [7,8], which protein levels are tightly regulated by oxygen concentrations via the ubiquitin–proteasome system [11–14]. In this work, we

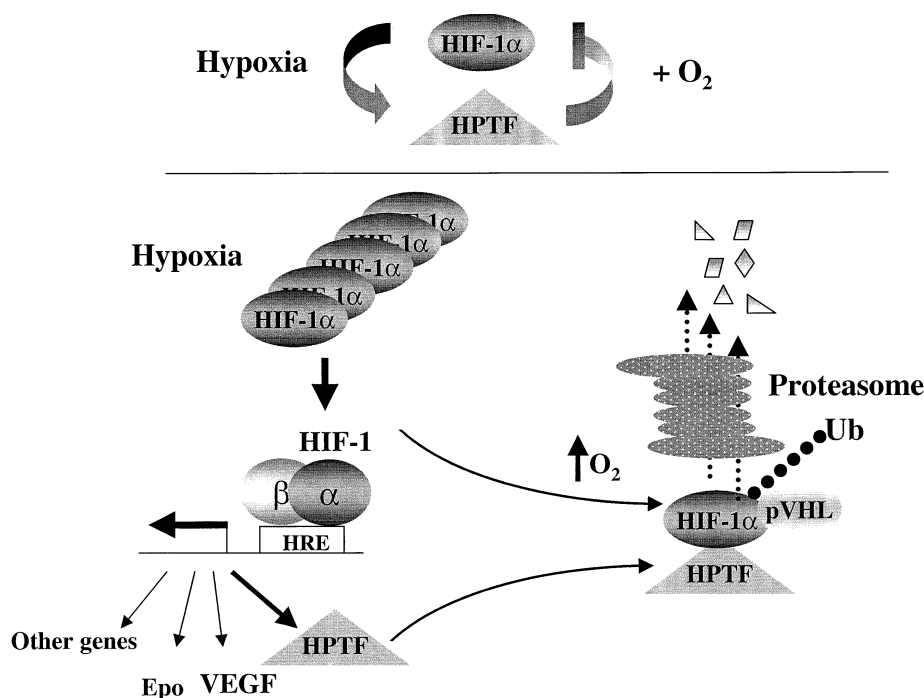


Fig. 5. Working model depicting a potential mechanism by which HIFα degradation can be regulated. During hypoxia, HIFα is induced and HIF-1-dependent transcriptional activation leads to the expression of HPTF. Upon normoxia, HPTF associates with the HIFα/pVHL complex and targets HIF-1α to the proteasome. HIF-2α should also be subjected to a similar regulatory mechanism.

focused our attention on the characterization of the mechanisms controlling proteasome-mediated degradation of HIF-1 α .

The ubiquitin-dependent proteolysis is a highly complex, temporally controlled, and acutely regulated enzymatic process [16]. Regulation of certain proteins by the proteasome machinery may be dependent on post-translational modifications such as phosphorylation [21–24]. We and others have previously demonstrated that p42/p44 MAP kinases phosphorylate HIF-1 α /HIF-2 α , *in vitro* and *in vivo* [17,25–27]. Hence, we attempted to investigate the possible role of the p42/p44 MAP kinase cascade in HIF-1 α degradation/stabilization. In this study, we have demonstrated that either strong and persistent activation of the p42/p44 MAP kinase pathway or its inhibition with the MEK inhibitor, PD 98059, does not significantly modify the induction/degradation pattern of HIF-1 α . These results correlate well with the previously demonstrated data showing that the basal and growth factor-stimulated activity of p42/p44 MAP kinases is not modified by hypoxia in the cellular model we used [17]. Recently, Giacchia's and Semenza's groups have shown that PI-3kinase/PTEN/Akt cascade regulates hypoxia- and growth factor-induced HIF-1 α stabilization in human glioblastoma-derived cells and prostate cancer cells, respectively [28,29]. However, in the cellular systems we use to induce HIF-1 α in response to a moderate or drastic hypoxic stress, the PI-3kinase/Akt pathway is not activated (Berra, E. and Pouyssegur, J., unpublished observations).

Alternatively, association with an ancillary protein may control the targeting of some proteins through the proteasome. A relevant example is the promoted instability of p53 by association with either papilloma virus E6 protein or MDM2 [30–32]. p53/MDM2 form an autoregulatory feedback loop, in which p53 can control its own levels by inducing the expression of its negative regulator, MDM2. By analogy, we hypothesized that the latter mechanism could also take place in the case of HIF-1 α . To test this hypothesis, we performed the series of experiments summarized in this work. Taken together, our findings greatly support an autoregulatory feedback loop controlled by the hypoxic stress. We first demonstrate that the length of the hypoxic stress affects HIF-1 α half-life upon reoxygenation. Second, we present evidence that HIF-1 α degradation is dependent on hypoxia-induced transcription since actinomycin D is able to reduce the degradation rate. Finally, and more specifically, we demonstrate that HIF-1-dependent transcription is required for the induction of a regulatory factor(s) targeting HIF-1 α degradation. Furthermore, the second isoform HIF-2 α , which expression like for HIF-1 α is also controlled by O₂ tension, appears to be subjected to the same regulatory mechanism (data not shown). Therefore, in keeping with the results presented here, we would like to propose the model depicted in Fig. 5 for the degradation of HIF-1 α . In this model we propose that, under normal pO₂, HIF-1 α is targeted to the proteasome by a HPTF. According to this model, HPTF is a hypoxia-inducible gene product which accumulates as a function of the length of hypoxia, and therefore of HIF-1 activity. Along this work, two proteins, pVHL and MDM2, have been suggested to target the proteasomal degradation of HIF-1 α [11,33]. If some uncertainty remains for the case of MDM2, the role of pVHL in the control of HIF-1 α and HIF-2 α has been clearly established. It was therefore crucial to answer whether

HPTF is either pVHL or MDM2. pVHL was rapidly eliminated, among these candidates, since hypoxia does regulate neither the level of this protein nor its association with HIF-1 α (Fig. 4 and data not shown). As far as MDM2 is concerned, it does not appear to be a hypoxia-regulated gene although p53 tends to accumulate in response to severe hypoxia [34]. Moreover, it has been reported that MDM2-mediated p53 degradation requires nuclear export [35]. Indeed, leptomycin B, known to prevent p53 degradation by blocking nuclear export, does not affect HIF-1 α degradation (Berra, E., Roux, D. and Pouyssegur, J., manuscript in preparation). Furthermore, it is important to note that pVHL associates constitutively with HIF-1 α , even in hypoxic conditions suggesting that there necessarily exists a complementary mechanism(s) modulating the oxygen-dependent pVHL-mediated degradation of HIF-1 α . We speculate that HPTF is responsible for the conditional 'switch' of HIF-1 α to O₂-mediated degradation. Upon return to an oxygenated environment, interaction of HPTF with the HIF-1 α /pVHL complex could 'switch on' the ubiquitination of HIF-1 α ensuring rapid degradation, and maintenance of low levels during normoxia. We do not yet know the molecular nature of HPTF nor the mechanisms regulating its interaction with the HIF-1 α /pVHL complex. Is there a direct interaction of HPTF and HIF-1 α or is this association mediated by pVHL? HIF-2 α is also subjected to the same regulatory mechanism, and essentially identical results were obtained in every cellular system tested (HeLa, HepG2, and 293) but how generalizable is this model? Further research will help us to clarify these important questions.

Acknowledgements: We thank Drs. G. Pagès, and F. Viñals for their helpful suggestions and support, Dominique Grall for the excellent technical assistance. This work was supported by grants from the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Le Ministère de l'Éducation, de la Recherche et de la Technologie, La Ligue Nationale Contre le Cancer (équipe labellisée), and the GIP HMR (contract no. 1/9743B-A3). E.B. is a recipient of fellowships from the Human Frontiers Science Program. D.E.R. is a recipient of a fellowship from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and E.G. from l'Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC).

References

- [1] Wang, G.L. and Semenza, G.L. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 1230–1237.
- [2] Wang, G.L., Jiang, B.H., Rue, E.A. and Semenza, G.L. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 5510–5514.
- [3] Hoffman, E.C., Reyes, H., Chu, F.F., Sander, F., Conley, L.H., Brooks, B.A. and Hankinson, O. (1991) *Science* 252, 954–958.
- [4] Semenza, G.L. (1999) *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 15, 551–578.
- [5] Guillemin, K. and Krasnow, M.A. (1997) *Cell* 89, 9–12.
- [6] Semenza, G.L. (1998) *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8, 588–594.
- [7] Huang, L.E., Arany, Z., Livingston, D.M. and Bunn, H.F. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 32253–32259.
- [8] Huang, L.E., Gu, J., Schau, M. and Bunn, H.F. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 7987–7992.
- [9] Salceda, S. and Caro, J. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 22642–22647.
- [10] Kallio, P.J., Wilson, W.J., O'Brien, S., Makino, Y. and Poellinger, L. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 6519–6525.
- [11] Maxwell, P.H. et al. (1999) *Nature* 399, 271–275.
- [12] Cockman, M.E. et al. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 25733–25741.
- [13] Ohh, M. et al. (2000) *Nat. Cell. Biol.* 2, 423–427.
- [14] Tanimoto, K., Makino, Y., Pereira, T. and Poellinger, L. (2000) *EMBO J.* 19, 4298–4309.
- [15] Richard, D.E., Berra, E. and Pouyssegur, J. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 26765–26771.
- [16] Ciechanover, A. (1998) *EMBO J.* 17, 7151–7160.

- [17] Richard, D.E., Berra, E., Gothie, E., Roux, D. and Pouyssegur, J. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 32631–32637.
- [18] Samuels, M.L., Weber, M.J., Bishop, J.M. and McMahon, M. (1993) *Mol. Cell. Biol.* 13, 6241–6252.
- [19] Samuels, M.L. and McMahon, M. (1994) *Mol. Cell. Biol.* 14, 7855–7866.
- [20] Lenormand, P., McMahon, M. and Pouyssegur, J. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 15762–15768.
- [21] Traenckner, E.B., Pahl, H.L., Henkel, T., Schmidt, K.N., Wilk, S. and Baeuerle, P.A. (1995) *EMBO J.* 14, 2876–2883.
- [22] Chen, Z., Hagler, J., Palombella, V.J., Melandri, F., Scherer, D., Ballard, D. and Maniatis, T. (1995) *Genes Dev.* 9, 1586–1597.
- [23] Shieh, S.Y., Ikeda, M., Taya, Y. and Prives, C. (1997) *Cell* 91, 325–334.
- [24] Siliciano, J.D., Canman, C.E., Taya, Y., Sakaguchi, K., Appella, E. and Kastan, M.B. (1997) *Genes Dev.* 11, 3471–3481.
- [25] Conrad, P.W., Freeman, T.L., Beitner-Johnson, D. and Millhorn, D.E. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 33709–33713.
- [26] Sodhi, A., Montaner, S., Patel, V., Zohar, M., Bais, C., Mesri, E.A. and Gutkind, J.S. (2000) *Cancer Res.* 60, 4873–4880.
- [27] Minet, E., Arnould, T., Michel, G., Roland, I., Mottet, D., Raes, M., Remacle, J. and Michiels, C. (2000) *FEBS Lett.* 468, 53–58.
- [28] Zundel, W. et al. (2000) *Genes Dev.* 14, 391–396.
- [29] Zhong, H., Chiles, K., Feldser, D., Laughner, E., Hanrahan, C., Georgescu, M.M., Simons, J.W. and Semenza, G.L. (2000) *Cancer Res.* 60, 1541–1545.
- [30] Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A. and Oren, M. (1997) *Nature* 387, 296–299.
- [31] Kubbutat, M.H., Jones, S.N. and Vousden, K.H. (1997) *Nature* 387, 299–303.
- [32] Scheffner, M., Werness, B.A., Huibregtse, J.M., Levine, A.J. and Howley, P.M. (1990) *Cell* 63, 1129–1136.
- [33] Ravi, R. et al. (2000) *Genes Dev.* 14, 34–44.
- [34] An, W.G., Kanekal, M., Simon, M.C., Maltepe, E., Blagosklonny, M.V. and Neckers, L.M. (1998) *Nature* 392, 405–408.
- [35] Freedman, D.A. and Levine, A.J. (1998) *Mol. Cell. Biol.* 18, 7288–7293.



Signaling Angiogenesis via p42/p44 MAP Kinase and Hypoxia

*Eduard Berra, Julie Milanini, Darren E. Richard, Maude Le Gall, Francesc Viñals, Emmanuel Gothié, Danièle Roux, Gilles Pagès and Jacques Pouyssegur**

INSTITUTE OF SIGNALING, DEVELOPMENTAL BIOLOGY, AND CANCER RESEARCH, CNRS UMR 6543,
CENTRE ANTOINE LACASSAGNE, 06189 NICE, FRANCE

ABSTRACT. Angiogenesis is associated with a number of pathological situations. In this study, we have focused our attention on the role of p42/p44 MAP (mitogen-activated protein) kinases and hypoxia in the control of angiogenesis. We demonstrate that p42/p44 MAP kinases play a pivotal role in angiogenesis by exerting a determinant action at three levels: i) persistent activation of p42/p44 MAP kinases abrogates apoptosis; ii) p42/p44 MAP kinase activity is critical for controlling proliferation and growth arrest of confluent endothelial cells; and iii) p42/p44 MAP kinases promote VEGF (vascular endothelial growth factor) expression by activating its transcription via recruitment of the AP-2/Sp1 (activator protein-2) complex on the proximal region (–88/–66) of the VEGF promoter and by direct phosphorylation of hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α). HIF-1 α plays a crucial role in the control of HIF-1 activity, which mediates hypoxia-induced VEGF expression. We show that oxygen-regulated HIF-1 α protein levels are not affected by intracellular localization (nucleus versus cytoplasm). Finally, we propose a model which suggests an autoregulatory feedback mechanism controlling HIF-1 α and therefore HIF-1-dependent gene expression. *BIOCHEM PHARMACOL* 60;8:1171–1178, 2000. © 2000 Elsevier Science Inc.

KEY WORDS. VEGF promoter; p42/p44 MAP kinases; hypoxia; HIF-1; angiogenesis; apoptosis

The growth of new blood vessels from the pre-existing vascular tree is known as angiogenesis. In the normal healthy adult, blood vessel growth is practically non-existent, except for certain processes such as the female reproductive cycle. However, deregulated angiogenesis has been associated with a broad number of pathological situations such as wound and fracture healing, arthritis, retinopathies, cardiovascular and cerebral ischemia, and nearly every type of cancer. In this context, several studies have demonstrated that angiogenesis is a rate-limiting step in tumor growth and progression. There is also a direct correlation between intratumoral vessel density and metastasis [1–4].

VEGF \dagger is a critical mediator of angiogenesis. VEGF, initially described as a permeability factor, is a member of a family of secreted growth factors structurally related to platelet-derived growth factor (PDGF) [5, 6]. VEGF is a potent and specific mitogen for vascular endothelial cells, the essential components of blood vessels. Different isoforms of 121, 165, 189, and 206 amino acids result from

alternative splicing of the same gene [7]. VEGF is expressed in virtually all tissues and cell types examined, but this expression is highly up-regulated in tumors [8]. The pivotal role played by VEGF in angiogenesis has been elegantly demonstrated. Surprisingly, inactivation of one single VEGF allele dramatically stops embryonic development at a very early stage because of a failure in vasculature formation [9, 10]. A similar phenotype was observed after inactivation of both alleles of either VEGFR-1 or VEGFR-2, two receptor tyrosine kinases involved in migration, proliferation, and survival of vascular endothelial cells [11, 12].

The expression of VEGF is tightly regulated at transcriptional and posttranscriptional levels. The precise mechanisms underlying VEGF induction have been extensively investigated in recent years. In this short paper, we summarize recent data obtained in our laboratory concerning the implication of the p42/p44 MAP kinase signaling pathway and hypoxia in the control of angiogenesis and notably in the expression of VEGF.

p42/p44 MAP KINASE CASCADE AND CELL SURVIVAL

MAP kinases are a family of serine/threonine kinases that are activated through a signaling pathway triggered by numerous agonists such as growth factors, hormones, lymphokines, extracellular matrix components, tumor promot-

* Corresponding author: Dr. Jacques Pouyssegur, Institute of Signaling, Developmental Biology & Cancer Research, UMR CNRS 6543, Centre Antoine Lacassagne, 33, av. Valombrose, F-06189 Nice, France. Tel. +33-4 92 03 12 22; FAX +33-4 92 03 12 25; E-mail: pouysseg@unice.fr.

\dagger Abbreviations: VEGF, vascular endothelial growth factor; MAP, mitogen-activated protein; MKK or MAPKK, MAP kinase kinase; ER, estradiol receptor; MAPKKK, MAP kinase kinase kinase; PARP, poly-(ADP-ribose) polymerase; AP-2, activator protein-2; and HIF-1, hypoxia-inducible factor.

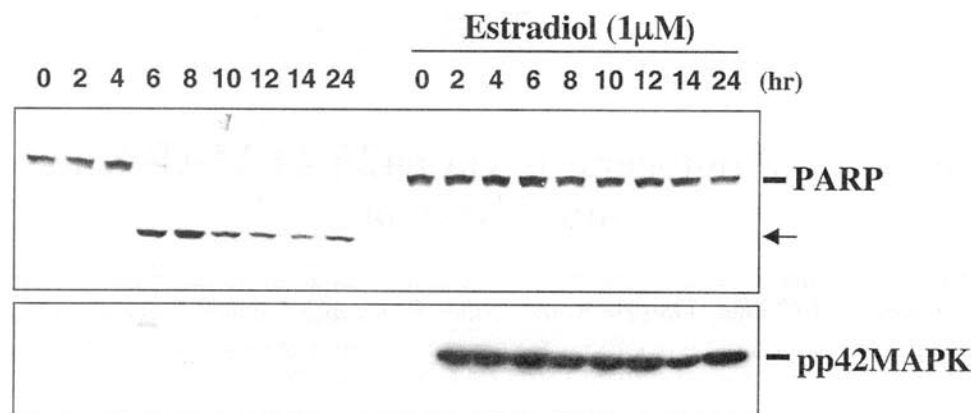


FIG. 1. Inhibition of apoptosis following anchorage and serum withdrawal by p42/p44 MAP kinase activation. CCL39-Raf-1:ER cells were deprived of anchorage and serum in the presence or absence of 1 μ M estradiol for the indicated times. PARP cleavage (top) and p42 MAP kinase activation (bottom) following the detachment of cells in the presence or absence of estradiol are shown. (Reproduced from [19]).

ers, and stress factors. This activation is attained after dual phosphorylation on threonine and tyrosine residues. Their specific upstream activators represent a set of dual specificity protein kinases, called MKK or MAPKK, which are in turn activated by upstream MAPKKK. These kinase cascades, extremely well conserved from yeast to man, have been extensively investigated. Our laboratory has devoted much effort to the characterization of the spatio-temporal control of the p42/p44 MAP kinase pathway. These two closely related MAP kinase isoforms (also called ERK [extracellular signal-regulated kinase] 2 and ERK 1, respectively) have been implicated in a wide range of cellular functions including the control of protein synthesis, nucleotide metabolism, cell growth, cell fate, and differentiation [13–18].

Recently, we have shown that besides controlling cell proliferation, sustained activation of the p42/p44 MAP kinase pathway efficiently protects CCL39 fibroblasts and Madin–Darby canine kidney (MDCK) epithelial cells from apoptosis [19]. In order to specifically evaluate the contribution of the p42/p44 MAP kinase pathway in cell survival, we used a derivative of the CCL39 and MDCK cell lines stably expressing the Raf-1:ER chimera. This protein is a fusion between the catalytic domain of Raf-1, the MAPKKK upstream activator of the p42/p44 MAP kinase pathway, and the ligand-binding domain of the estradiol receptor. Addition of estradiol to these cells induces a rapid and strong stimulation of p42/p44 MAP kinases that persists as long as estradiol is present in the medium [20–22]. Our results show that the addition of estradiol to Raf-1:ER cells markedly inhibits the apoptotic process triggered by anchorage and serum removal that is determined by the cleavage of PARP (Fig. 1). In our model, suppression of apoptosis by Raf-1 activation occurs without detectable activation of Akt, suggesting that the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway is not necessary for promoting survival of anchorage-deprived cells [19]. The finding that the antiapoptotic activity of estradiol correlates well

with activation of the p42/p44 MAP kinases is supported by the fact that constitutively active MKK1 SS/DD (p42/p44 MAPKK)-expressing cells are clearly protected from apoptosis [19]. Furthermore, pharmacological inhibition of activated MKK1 with PD 98059 reverses Raf-1:ER-mediated inhibition of PARP cleavage and cell survival [19]. These results are particularly interesting since matrix breakdown occurs during the first stages of angiogenesis and loss of anchorage dependence correlates with tumor growth *in vivo*. Although these results have not yet been directly demonstrated to take place in vascular endothelial cells, we have reason to believe that the contribution of the p42/p44 MAP kinase signaling cascade is a general process in cell survival.

p42/p44 MAP KINASE CASCADE AND CONFLUENCY IN ENDOTHELIAL CELLS

As predicted, activation of the p42/p44 MAP kinase cascade also plays a central role in the control of vascular endothelial cell proliferation. Thus, p42/p44 MAP kinases are stimulated by classical endothelial cell mitogens such as VEGF or fibroblast growth factor-2 (FGF-2) and the specific inhibition of this pathway blocks cell proliferation [23–27]. However, we have found that after growth factor stimulation, p42/p44 MAP kinase activation is restrained to confluent endothelial cells as compared to non-confluent cells [28]. This apparent resistance to activate p42/p44 MAP kinases in confluent cells correlates well with their poor proliferation capacity. On the contrary, the forced activation of p42/p44 MAP kinases by transfection of the Raf-1:ER chimera is sufficient to restore the entry of confluent cells into the cell cycle measured by BrdU (bromodeoxyuridine) or thymidine incorporation (Fig. 2 and [28]). The effect of cell confluency on p42/p44 MAP kinase activity seems to be absent in other model systems such as NIH3T3 or Swiss 3T3 fibroblasts. Our results predict that the overexpression of an orthovanadate-sensitive phosphatase should be implicated in the “repression” of

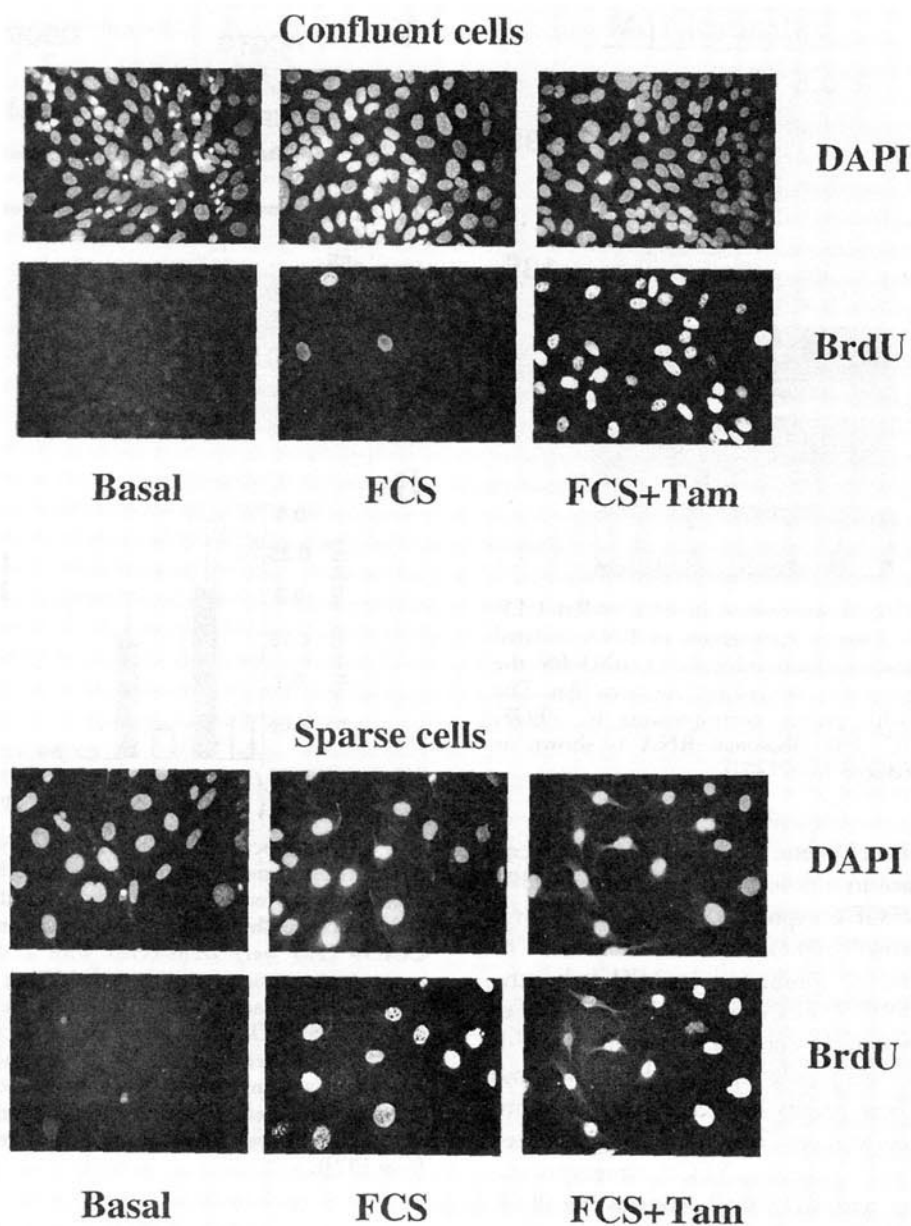


FIG. 2. Forced activation of p42/p44 MAP kinases induces confluent endothelial cell entry into the cell cycle. 1G11-Raf-1:ER cells were grown under conditions promoting sparseness or confluency and serum-deprived for 24 hr. Cells were stimulated or not (basal) with 20% FCS (fetal calf serum) or 1 mM tamoxifen plus 20% FCS (FCS + Tam) for 24 hr. During the last 4 hr, cells were labeled with BrdU (bromodeoxyuridine). DNA synthesis was assessed by immunodetection of cells that had incorporated BrdU. Nuclei were stained with DAPI (4',6-diamidino-2'-phenylindole dihydrochloride). (Reproduced from [28]).

p42/p44 MAP kinase activity at confluency and also suggest that p42/p44 MAP kinase activity tightly controls the state of proliferation of endothelial cells [28].

p42/p44 MAP KINASE CASCADE AND VEGF PROMOTER ACTIVITY

A variety of cytokines and growth factors, including EGF (epidermal growth factor), TGF (transforming growth factor)- α , TGF- β as well as oncogenic agents like *v-H-Ras* and *v-Raf* have been shown to induce VEGF expression in several cell lines [29–36]. However, the precise mechanisms leading to this increased expression have not been

fully elucidated. We compared the expression of VEGF in quiescent, serum-stimulated, or oncogenically transformed CCL39 fibroblasts. Starved and exponentially growing non-transformed cells express barely detectable levels of VEGF mRNA. As expected, serum stimulation of growth-arrested cells triggers the induction of VEGF mRNA [37]. More importantly, this expression is strongly elevated in cells transformed with polyomavirus, *v-H-Ras*, or MKK1 SS/DD. These results suggest that the regulation of VEGF expression occurs through a p42/p44 MAP kinase-dependent mechanism. In order to confirm the role of this kinase pathway, we have again used our CCL39 cell line stably

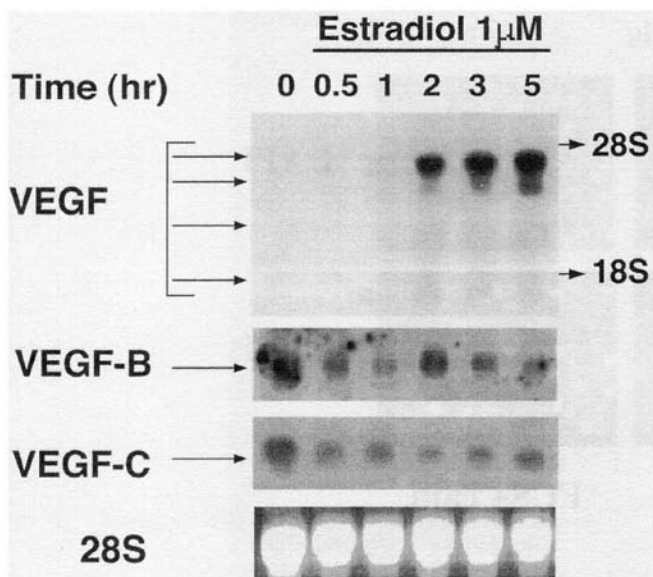


FIG. 3. Regulation of VEGF expression in CCL39-Raf-1:ER stably expressing cells. Twenty micrograms of RNA isolated from quiescent or estradiol-stimulated cells ($1 \mu\text{M}$) for the indicated periods of time were analyzed by Northern blot. The blot was hybridized with probes corresponding to VEGF, VEGF-B, and VEGF-C. 28S ribosomal RNA is shown as loading control. (Reproduced from [37]).

expressing the Raf-1:ER chimera. VEGF mRNA is induced in response to estradiol in a dose-dependent manner [37]. As shown in Fig. 3, VEGF is expressed at a detectable level after 2 hr with maximal expression attained after 3 hr stimulation. Furthermore, inhibition of MKK1 by the specific inhibitor PD 98059 blocks p42/p44 MAP kinase-induced VEGF expression. In contrast to VEGF, VEGF-B and VEGF-C isoforms are poorly regulated by growth and oncogenic factors. These results have recently been confirmed by Rak and co-workers. They have demonstrated that in Ras-transformed fibroblasts, VEGF expression was inhibited by treatment with PD 98059, whereas the PI3-K inhibitor LY 294002 had no effect [36]. Taken together, these results clearly demonstrate the specific role of the p42/p44 MAP kinase pathway in VEGF gene expression.

To further evaluate the mechanism by which the p42/p44 MAP kinase cascade stimulates VEGF expression, we directly analyzed the activation of the VEGF promoter coupled to a luciferase reporter gene. Constitutively active Ras (Ras-Val¹²) or MKK1 (MKK1 SS/DD) can strongly stimulate the VEGF promoter even in the absence of serum. Thus, two upstream members of the p42/p44 MAP kinase cascade can activate VEGF gene transcription. Transfection of p38 and c-Jun N-terminal kinase (JNK) in the presence of activating agents or their constitutively active activating kinases (MKK3 or MKK4) had no effect on VEGF promoter activity, confirming the specific role played by the p42/p44 MAP kinase cascade in the control of VEGF gene transcription. We next characterized the specific p42/p44 MAP kinase-responsive region on the VEGF promoter. Figure 4A shows the detailed structure of

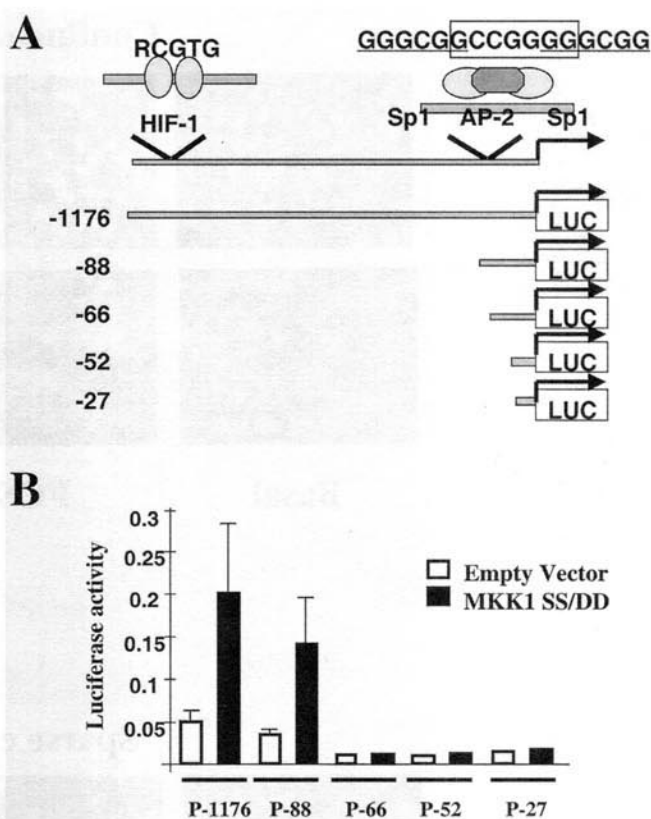


FIG. 4. (A) Description of the VEGF promoter. Shown are the different domains of the promoter and the constructs used in transient transfection assays. (B) Identification of a p42/p44 MAP kinase pathway-responsive region on the VEGF promoter. CCL39 cells were transfected with 250 ng of the different reporter gene constructions and 100 ng of a control plasmid coding for β -galactosidase in the presence or absence of 200 ng of MKK1 SS/DD. After 16 hr of transfection, cells were rinsed with PBS and grown in medium supplemented with 7.5% FCS (fetal calf serum) for 48 hr. Cells were lysed and luciferase activity measured. These results are representative of three independent experiments performed in triplicate. (Reproduced from [37]).

this promoter and the different constructs used in transfection assays. The VEGF promoter contains binding sites for AP-2, Sp1, or Sp1-related factors as well as for HIF-1, which regulates the transcription of the gene under hypoxia. We compared the activities of the different truncations in the presence or absence of MKK1 SS/DD. Our results demonstrate that sequences between -88 and -66 are absolutely required for basal and p42/p44 MAP kinase-stimulated promoter activity (Fig. 4B). Based on these data, we evaluated the potential contribution of putative AP-2 or Sp1-binding sites present in this region (GC-rich region) in p42/p44 MAP kinase-induced VEGF gene transcription. Wild-type or mutant constructs for the AP-2, both Sp1, or the three binding sites were transfected and activation of the VEGF promoter was analyzed by luciferase assays. Interestingly, only the combined mutation of the AP-2 and both Sp1-binding sites blocked basal and MKK1 SS/DD-dependent transcriptional activation [37]. This finding suggests a cooperative effect of both transcription factors for

maximal VEGF induction. We have further analyzed the -88/-66 region by electrophoretic mobility shift assay (EMSA) and supershift experiments. With the use of specific antibodies, we confirmed that AP-2 and Sp1 are components of the more intense complex that is increased upon estradiol stimulation [37].

HIF-1 α AND THE HYPOXIA-DEPENDENT EXPRESSION OF VEGF

As previously mentioned, hypoxia is also a major inducer of VEGF expression. Transcriptional up-regulation has been shown to play a pivotal role in the hypoxic induction of VEGF gene [38, 39]. In this case, another distal region (hypoxia-responsive element [HRE]) of the VEGF promoter is regulated by fixation of HIF-1 (see Fig. 4A). HIF-1 is a heterodimer composed of the HIF-1 α (120 kDa) and HIF-1 β subunits (94 kDa) (Fig. 5A). Both HIF-1 subunits belong to the subfamily of bHLH (basic helix-loop-helix) transcription factors containing a PAS (PER, ARNT, SIM) motif [40]. HIF-1 β is the already-characterized ARNT (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator) previously shown to heterodimerize with the AHR (aryl hydrocarbon receptor). In contrast, HIF-1 α specifically mediates hypoxic responses. HIF-1 plays a central role in oxygen homeostasis by inducing the expression of a broad range of genes in a hypoxic-dependent manner (VEGF, VEGFR-1, inducible nitric oxide synthase, transferrin, tyrosine hydroxylase, glucose transporter-1, and almost every gene in the glycolytic pathway) [41]. The molecular mechanisms by which cells sense low oxygen concentration and activate HIF-1 are still largely unknown. Several studies have demonstrated that HIF-1 activation is a multistage and complex process. However, hypoxia-mediated induction of HIF-1 α appears to be the primary mode of regulation, since the expression of the rate-limiting α subunit determines the activity of the HIF-1 complex [42]. HIF-1 α is a short-lived protein that is maintained at low and often undetectable levels in normoxia, whereas it is strongly induced in hypoxic cells [43–46]. As shown in Fig. 5B and C, after 3 hr of incubation in a hypoxic environment (1% O₂), the HIF-1 α protein is strongly induced and found in the nucleus. However, as quickly as HIF-1 α is induced, it is even more rapidly degraded upon return to normoxic conditions (Fig. 5D). Previous results have shed light on the mechanism by which HIF-1 α protein levels are so tightly regulated by oxygen concentration [47–49]. They have shown that, in normoxic cells, HIF-1 α is quickly ubiquitinated and degraded by the proteasome system, whereas hypoxia induces HIF-1 α by relaxing its ubiquitin-proteasome degradation (Fig. 5E). In order to evaluate the role of subcellular localization in the HIF-1 α stabilization/degradation pattern, we prevented HIF-1 α nuclear translocation by expressing a membrane-bound HIF-1 α chimeric protein. Interestingly, the kinetics of induction and/or degradation of the chimeric protein are similar to those of the endogenous HIF-1 α protein. Our results indicate both

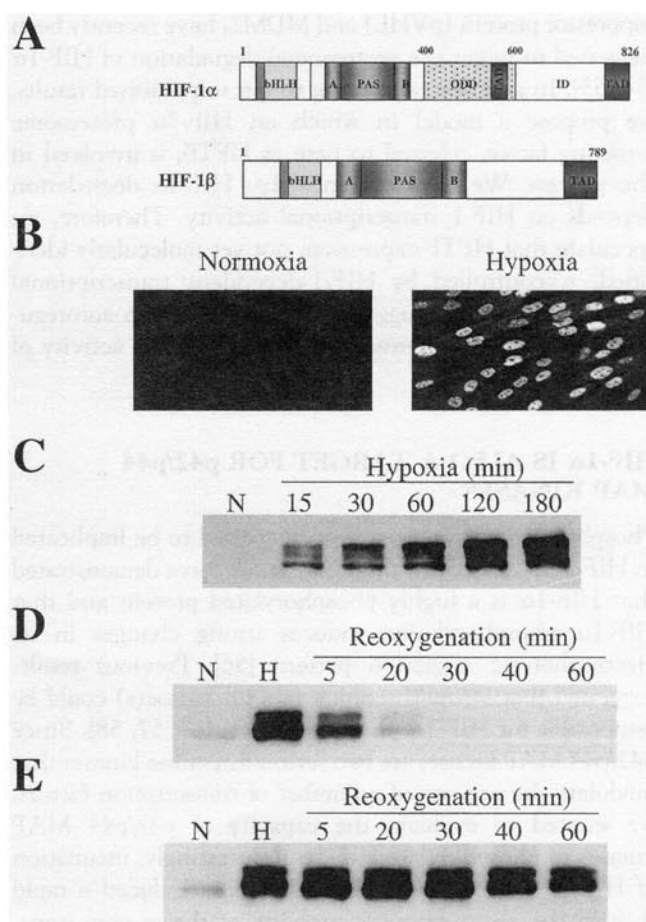


FIG. 5. (A) Schematic representation of the HIF-1 transcription factor subunits HIF-1 α and HIF-1 β bHLH, basic helix-loop-helix; PAS, PER, ARNT, SIM; ODD, oxygen-mediated degradation domain; TAD, transactivation domain. (B) HIF-1 α induction. CCL39 cells were incubated for 3 hr in a normoxic (20% O₂) or hypoxic environment (1% O₂) and HIF-1 α was revealed by immunofluorescence with a specific antibody. (C) Time-course of HIF-1 α induction. HeLa cells were incubated in normoxia or for different periods of time in hypoxia and cellular proteins were resolved by SDS-PAGE and immunoblotted with a specific anti-HIF-1 α antibody generated in our laboratory. (D) Time-course of HIF-1 α degradation. After a 3 hr incubation in a hypoxic environment, HeLa cells were returned to normal oxygen concentrations (20%) for different periods of time. (E) Proteasome inhibition blocks HIF-1 α degradation. HeLa cells were incubated as in D in the presence of 20 μ M lactacystin. Similar results have been shown in Refs. 43–45. (Reproduced from [46]).

that nuclear translocation is not necessary for HIF-1 α stabilization upon hypoxia and that both “nuclear” and “cytoplasmic” proteasomal activities are competent to degrade HIF-1 α in an oxygenated environment.

Regulation of the proteasome-dependent degradation of HIF-1 α appears to be a pivotal step in the hypoxic activation of HIF-1. Giaccia's group has recently shown that PTEN and Akt participate in this process [50]. Indeed, acute regulation of protein levels by the proteasome machinery often requires a targeting mechanism [51–53]. In this context, two proteins, the von Hippel-Lindau tumor

suppressor protein (pVHL) and MDM2, have recently been suggested to target the proteasomal degradation of HIF-1 α [54, 55]. In addition, according to our unpublished results, we propose a model in which an HIF-1 α proteasome targeting factor, referred to here as HPTF, is involved in this process. We have evidence that HIF-1 α degradation depends on HIF-1 transcriptional activity. Therefore, we speculate that HPTF expression, not yet molecularly identified, is controlled by HIF-1-dependent transcriptional activity. This model suggests the presence of an autoregulatory feedback mechanism which controls the activity of HIF-1.

HIF-1 α IS ALSO A TARGET FOR p42/p44 MAP KINASES

Phosphorylation has often been suggested to be implicated in HIF-1 activation. In this context, we have demonstrated that HIF-1 α is a highly phosphorylated protein and that HIF-1 α phosphorylation induces strong changes in its electrophoretic migration pattern [56]. Previous results suggested that serine/threonine protein kinase(s) could be responsible for HIF-1 α phosphorylation [47, 57, 58]. Since p42/p44 MAP kinases are two serine/threonine kinases that modulate the activity of a number of transcription factors, we wanted to evaluate the capacity of p42/p44 MAP kinases to phosphorylate HIF-1 α . Interestingly, incubation of HIF-1 α with active p42 MAP kinase induced a rapid shift in the electrophoretic mobility of the *in vitro* translated protein with a $t_{1/2}$ of 5 min and a complete shift at 20 min (Fig. 6A). We therefore analyzed the specificity of this phosphorylation by assessing whether the stress-activated kinases (p38 and JNK) could phosphorylate HIF-1 α . Our results indicate that the phosphorylation of HIF-1 α by MAP kinases is specific to the p42 et p44 MAP kinase isoforms [56]. More interestingly, we demonstrate that HIF-1 α is phosphorylated by p42/p44 MAP kinases *in vivo*. To this purpose, we used the previously described CCL39-Raf-1:ER cells. As seen in Fig. 6B, HIF-1 α is induced upon hypoxia and migrates as a single band at approximately 104 kDa. In contrast, after 30 min of stimulation with estradiol, a form of HIF-1 α appeared at 116 kDa. The induction of the HIF-1 α shift closely followed the activation of p42/p44 MAP kinases. Furthermore, this shift was inhibited by treatment of cells with the specific MKK1 inhibitor, PD 98059 [56]. We next evaluated the possible effect of HIF-1 α phosphorylation by p42/p44 MAP kinases on HIF-1 transcriptional activity. To perform this experiment, we used a luciferase reporter plasmid driven by the VEGF promoter in which the combined mutation of the AP-2 and both Sp1-binding sites had eliminated the previously shown p42/p44 MAP kinase response element. This construction was co-transfected with HIF-1 α and HIF-1 β plasmids in the Raf-1:ER cells. Addition of estradiol strikingly activated the mutated VEGF promoter by almost 6-fold over untreated cells without affecting basal levels in cells transfected with the reporter only [56]. These results demon-

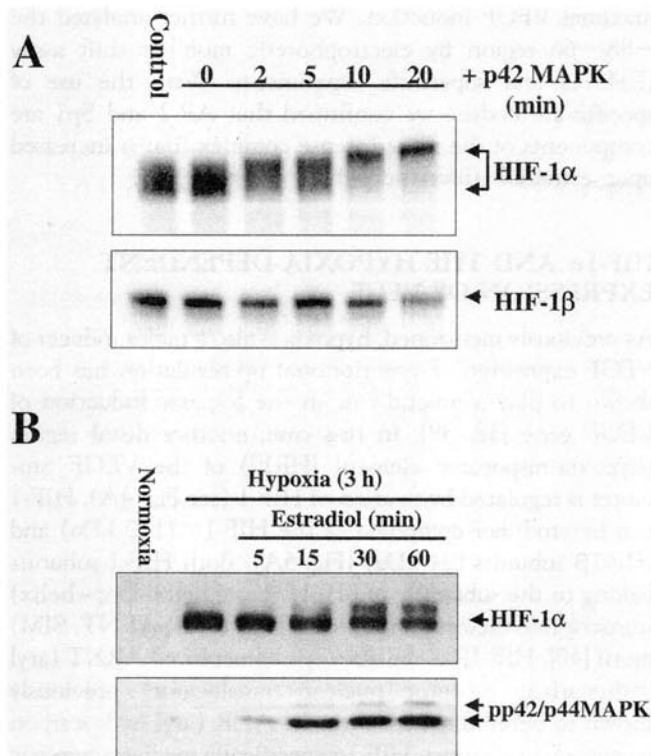


FIG. 6. (A) *In vitro* phosphorylation of HIF-1 α by p42 MAP kinase. *In vitro*-translated hemagglutinin (HA) epitope-tagged forms of either HIF-1 α or HIF-1 β (labeled) were immunoprecipitated using an anti-HA antibody and incubated in the presence of active purified recombinant p42 MAP kinase for the times indicated at 30°. The samples were then analyzed by SDS-PAGE (7.5% gel) and autoradiography. (B) p42/p44 MAP kinase activation induces HIF-1 α phosphorylation *in vivo*. CCL39-Raf-1:ER cells were FCS (fetal calf serum)-starved for 24 hr before 3 hr of hypoxia. Before the end of the hypoxic period, Raf-1:ER cells were stimulated with 100 nM estradiol for the times indicated. Whole cell extracts (50 μ g) were analyzed by SDS-PAGE (7.5% gel) and immunoblotted. (Reproduced from [56]).

strate that strong activation of p42/p44 MAP kinases is sufficient to effectively promote the transcriptional activity of HIF-1.

CONCLUSIONS

Angiogenesis occurs in a number of pathological situations and in particular is a promoting event for tumor growth and metastasis. Hence, tumor angiogenesis has been one of the most heavily studied subjects in oncology in recent years. In this study, we have summarized our more recent findings focusing on the control of VEGF expression and action. We have demonstrated that the activation of p42/p44 MAP kinases, a key signaling pathway in the control of cell growth and differentiation, can also play a central role at different levels during angiogenesis. In fact, forced activation of this kinase pathway offers protection from apoptosis, promotes endothelial cell entry into the cell cycle, and induces VEGF expression by increasing transcription. We

have demonstrated that this transcriptional activation is mediated by recruitment of AP-2 and Sp1 to a proximal region of the VEGF promoter and also by phosphorylation of HIF-1 α . HIF-1 α is the rate-limiting subunit of HIF-1 responsible for the hypoxia-induced expression of VEGF. HIF-1 α expression is tightly regulated by oxygen concentrations. We have shown that HIF-1 α can be stabilized even if nuclear translocation is impaired. Finally, we propose a model in which HIF-1 α degradation is mediated by a HIF-1 α proteasome targeting factor, HPTF.

The finding that HIF-1 α is phosphorylated by p42/p44 MAP kinases suggest a cooperation between hypoxic and growth factor signals, which ultimately leads to an increase in HIF-1-dependent gene expression. Altogether, these data highlight the importance of the p42/p44 MAP kinase pathway and hypoxia in controlling different steps of the angiogenic program. This cooperation is very important since angiogenesis normally occurs under conditions of low oxygen concentrations. The further comprehension of the molecular mechanisms regulating the proliferation of new blood vessels would undoubtedly help us in the development of new therapeutic targets.

This work was supported by grants from the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Le Ministère de la Recherche (ACC-SV9), La Ligue Nationale Contre le Cancer, l'Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC), and the European Community (contract B104-CT97-2071).

References

- Folkman J, What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 82:4-6, 1990.
- Folkman J and Shing Y, Angiogenesis. *J Biol Chem* 267: 10931-10934, 1992.
- Folkman J, Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1:27-31, 1995.
- Gasparini G and Harris AL, Clinical importance of the determination of tumor angiogenesis in breast carcinoma: Much more than a new prognostic tool. *J Clin Oncol* 13:765-782, 1995.
- Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV and Ferrara N, Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 246:1306-1309, 1989.
- Risau W, Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386:671-674, 1997.
- Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC and Abraham JA, The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon Splicing. *J Biol Chem* 266:11947-11954, 1991.
- Berse B, Brown LF, Van de Water L, Dvorak HF and Senger DR, Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) gene is expressed differentially in normal tissues, macrophages, and tumors. *Mol Biol Cell* 3:211-220, 1992.
- Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoek A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W and Nagy A, Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 380:435-439, 1996.
- Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ and Moore MW, Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 380:439-442, 1996.
- Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML and Schuh AC, Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 376: 62-66, 1995.
- Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M and Breitman ML, Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 376:66-70, 1995.
- Cobb MH and Goldsmith EJ, How MAP kinases are regulated. *J Biol Chem* 270:14843-14846, 1995.
- Marshall MS, Ras target proteins in eukaryotic cells. *FASEB J* 9:1311-1318, 1995.
- Seger R and Krebs EG, The MAPK signaling cascade. *FASEB J* 9:726-735, 1995.
- Waskiewicz AJ, Johnson JC, Penn B, Mahalingam M, Kimball SR and Cooper JA, Phosphorylation of the cap-binding protein eukaryotic translation initiation factor 4E by protein kinase Mnk1 *in vivo*. *Mol Cell Biol* 19:1871-1880, 1999.
- Pyronnet S, Imataka H, Gingras AC, Fukunaga R, Hunter T and Sonenberg N, Human eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) recruits mnk1 to phosphorylate eIF4E. *EMBO J* 18:270-279, 1999.
- Graves LM, Guy HI, Kozlowski P, Huang M, Lazarowski E, Pope RM, Collins MA, Dahlstrand EN, Earp HS and Evans DR, Regulation of carbamoyl phosphate synthetase by MAP kinase. *Nature* 403:328-332, 2000.
- Le Gall M, Chambard JC, Breitmayer JP, Grall D, Pouyssegur J, and Van Obberghen-Schilling E, The p42/p44 MAP kinase pathway prevents apoptosis induced by anchorage and serum removal. *Mol Biol Cell* 11:1103-1112, 2000.
- Samuels ML, Weber MJ, Bishop JM and McMahon M, Conditional transformation of cells and rapid activation of the mitogen-activated protein kinase cascade by an estradiol-dependent human raf-1 protein kinase. *Mol Cell Biol* 13: 6241-6252, 1993.
- Samuels ML and McMahon M, Inhibition of platelet-derived growth factor- and epidermal growth factor-mediated mitogenesis and signaling in 3T3 cells expressing delta Raf-1:ER, an estradiol-regulated form of Raf-1. *Mol Cell Biol* 14:7855-7866, 1994.
- Lenormand P, McMahon M and Pouyssegur J, Oncogenic Raf-1 activates p70 S6 kinase via a mitogen-activated protein kinase-independent pathway. *J Biol Chem* 271:15762-15768, 1996.
- Sosnowski RG, Feldman S and Feramisco JR, Interference with endogenous ras function inhibits cellular responses to wounding. *J Cell Biol* 121:113-119, 1993.
- Kroll J and Waltenberger J, The vascular endothelial growth factor receptor KDR activates multiple signal transduction pathways in porcine aortic endothelial cells. *J Biol Chem* 272:32521-32527, 1997.
- Rousseau S, Houle F, Landry J and Huot J, p38 MAP kinase activation by vascular endothelial growth factor mediates actin reorganization and cell migration in human endothelial cells. *Oncogene* 15:2169-2177, 1997.
- Sexl V, Mancusi G, Holler C, Gloria-Maercker E, Schutz W and Freissmuth M, Stimulation of the mitogen-activated protein kinase via the A2A-adenosine receptor in primary human endothelial cells. *J Biol Chem* 272:5792-5799, 1997.
- Parenti A, Morbidelli L, Cui XL, Douglas JG, Hood JD, Granger HJ, Ledda F and Ziche M, Nitric oxide is an upstream signal of vascular endothelial growth factor-induced extracellular signal-regulated kinase1/2 activation in postcapillary endothelium. *J Biol Chem* 273:4220-4226, 1998.
- Vinals F and Pouyssegur J, Confluence of vascular endothelial

- cells induces cell cycle exit by inhibiting p42/p44 mitogen-activated protein kinase activity. *Mol Cell Biol* **19**:2763–2772, 1999.
29. Pertovaara L, Kaipainen A, Mustonen T, Orpana A, Ferrara N, Saksela O and Alitalo K, Vascular endothelial growth factor is induced in response to transforming growth factor-beta in fibroblastic and epithelial cells. *J Biol Chem* **269**: 6271–6274, 1994.
 30. Frank S, Hubner G, Breier G, Longaker MT, Greenhalgh DG and Werner S, Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes. Implications for normal and impaired wound healing. *J Biol Chem* **270**:12607–12613, 1995.
 31. Grugel S, Finkenzeller G, Weindel K, Barleon B and Marme D, Both v-Ha-Ras and v-Raf stimulate expression of the vascular endothelial growth factor in NIH 3T3 cells. *J Biol Chem* **270**:25915–25919, 1995.
 32. Enholm B, Paavonen K, Ristimäki A, Kumar V, Gunji Y, Klefstrom J, Kivinen L, Laiho M, Olofsson B, Joukov V, Eriksson U and Alitalo K, Comparison of VEGF, VEGF-B, VEGF-C and Ang-1 mRNA regulation by serum, growth factors, oncoproteins and hypoxia. *Oncogene* **14**:2475–2483, 1997.
 33. Gille J, Swerlick RA and Caughman SW, Transforming growth factor-alpha-induced transcriptional activation of the vascular permeability factor (VPF/VEGF) gene requires AP-2-dependent DNA binding and transactivation. *EMBO J* **16**:750–759, 1997.
 34. Mazure NM, Chen EY, Yeh P, Laderoute KR and Giaccia AJ, Oncogenic transformation and hypoxia synergistically act to modulate vascular endothelial growth factor expression. *Cancer Res* **56**:3436–3440, 1996.
 35. Mazure NM, Chen EY, Laderoute KR and Giaccia AJ, Induction of vascular endothelial growth factor by hypoxia is modulated by a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway in Ha-ras-transformed cells through a hypoxia inducible factor-1 transcriptional element. *Blood* **90**:3322–3331, 1997.
 36. Rak J, Mitsuhashi Y, Sheehan C, Tamir A, Vitoria-Petit A, Filmus J, Mansour SJ, Ahn NG and Kerbel RS, Oncogenes and tumor angiogenesis: Differential modes of vascular endothelial growth factor up-regulation in ras-transformed epithelial cells and fibroblasts. *Cancer Res* **60**:490–498, 2000.
 37. Milanini J, Vinals F, Pouyssegur J and Pagès G, p42/p44 MAP kinase module plays a key role in the transcriptional regulation of the vascular endothelial growth factor gene in fibroblasts. *J Biol Chem* **273**:18165–18172, 1998.
 38. Levy AP, Levy NS, Wegner S and Goldberg MA, Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia. *J Biol Chem* **270**:13333–13340, 1995.
 39. Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD and Semenza GL, Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* **16**:4604–4613, 1996.
 40. Wang GL and Semenza GL, Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* **270**:1230–1237, 1995.
 41. Guillemin K and Krasnow MA, The hypoxic response: Hugging and HIFing. *Cell* **89**:9–12, 1997.
 42. Huang LE, Arany Z, Livingston DM and Bunn HF, Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit. *J Biol Chem* **271**:32253–32259, 1996.
 43. Gradin K, McGuire J, Wenger RH, Kvietikova I, Fhitelaw ML, Toftgard R, Tora L, Gassmann M and Poellinger L, Functional interference between hypoxia and dioxin signal transduction pathways: Competition for recruitment of the Arnt transcription factor. *Mol Cell Biol* **16**:5221–5231, 1996.
 44. Kallio PJ, Pongratz I, Gradin K, McGuire J and Poellinger L, Activation of hypoxia-inducible factor 1alpha: Posttranscriptional regulation and conformational change by recruitment of the Arnt transcription factor. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**:5667–5672, 1997.
 45. Tian H, McKnight SL and Russell DW, Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev* **11**:72–82, 1997.
 46. Richard DE, Berra E and Pouyssegur J, Angiogenesis: How a tumor adapts to hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun* **266**:718–722, 1999.
 47. Salceda S and Caro J, Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem* **272**:22642–22647, 1997.
 48. Huang LE, Gu J, Schau M and Bunn HF, Regulation of hypoxia-inducible factor 1 alpha is mediated by an O2-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**:7987–7992, 1998.
 49. Kallio PJ, Wilson WJ, O'Brien S, Makino Y and Poellinger L, Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1alpha by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem* **274**: 6519–6525, 1999.
 50. Zundel W, Schindler C, Haas-Kogan D, Koong A, Kaper F, Chen E, Gottschalk AR, Ryan HE, Johnson RS, Jefferson AB, Stokoe D and Giaccia AJ, Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression. *Genes Dev* **14**:391–396, 2000.
 51. Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ and Howley PM, The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* **63**:1129–1136, 1990.
 52. Haupt Y, Maya R, Kazanietz A and Oren M, Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* **387**:296–299, 1997.
 53. Kubbutat MH, Jones SN and Vousden KH, Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* **387**:299–303, 1997.
 54. Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, Wykoff CC, Pugh CW, Maher ER and Ratcliffe PJ, The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* **399**:271–275, 1999.
 55. Ravi R, Mookerjee B, Bhujwalla ZM, Sutter CH, Artemov D, Zeng Q, Dillehay LE, Madan A, Semenza GL and Bedi A, Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Genes Dev* **14**:34–44, 2000.
 56. Richard DE, Berra E, Gothi   E, Roux D and Pouyssegur J, p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. *J Biol Chem* **274**:32631–32637, 1999.
 57. Wang GL, Jiang BH and Semenza GL, Effect of protein kinase and phosphatase inhibitors on expression of hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Biophys Res Commun* **216**:669–675, 1995.
 58. Semenza GL, Hypoxia-inducible factor 1: Master regulator of O2 homeostasis. *Curr Opin Genet Dev* **8**:588–594, 1998.

p42/p44 Mitogen-activated Protein Kinases Phosphorylate Hypoxia-inducible Factor 1 α (HIF-1 α) and Enhance the Transcriptional Activity of HIF-1*

(Received for publication, June 30, 1999)

Darren E. Richard \ddagger , Edurne Berra \S , Emmanuel Gothi é l, Danièle Roux, and Jacques Pouyssegur

From the Institute of Signaling, Developmental Biology and Cancer Research, UMR CNRS 6543, Centre Antoine Lacassagne, 33 Avenue Valombrose, 06189 Nice, France

Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) controls the expression of a number of genes such as vascular endothelial growth factor and erythropoietin in low oxygen conditions. However, the molecular mechanisms that underlie the activation of the limiting subunit, HIF-1 α , are still poorly resolved. Results showing that endogenous HIF-1 α migrated 12 kDa higher than *in vitro* translated protein led us to evaluate the possible role of phosphorylation on this phenomenon. We report here that HIF-1 α is strongly phosphorylated *in vivo* and that phosphorylation is responsible for the marked differences in the migration pattern of HIF-1 α . *In vitro*, HIF-1 α is phosphorylated by p42 and p44 mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and not by p38 MAPK or c-Jun N-terminal kinase. Interestingly, p42/p44 MAPK stoichiometrically phosphorylate HIF-1 α *in vitro*, as judged by a complete upper shift of HIF-1 α . More importantly, we demonstrate that activation of the p42/p44 MAPK pathway in quiescent cells induced the phosphorylation and shift of HIF-1 α , which was abrogated in presence of the MEK inhibitor, PD 98059. Finally, we found that in a vascular endothelial growth factor promoter mutated at sites previously shown to be MAPK-sensitive (SP1/AP2-88-66 site), p42/p44 MAPK activation is sufficient to promote the transcriptional activity of HIF-1. This interaction between HIF-1 α and p42/p44 MAPK suggests a cooperation between hypoxic and growth factor signals that ultimately leads to the increase in HIF-1-mediated gene expression.

The growth of new blood vessels in the adult is termed angiogenesis. Angiogenesis occurs in natural situations such as the female reproductive cycle, or in pathological situations such as wound healing, retinopathy, tumor proliferation, and metastasis. In the latter cases, these events share a common characteristic of occurring in a hypoxic environment.

A major mediator of vasculogenesis and angiogenesis is vas-

cular endothelial growth factor (VEGF)¹ (1, 2). In many cell types, hypoxia has been shown to promote VEGF expression (2–9). Induction of VEGF is a multistage process in which the hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) plays a key role in transcriptional activation (10). During hypoxia, HIF-1 is expressed, binds to DNA, and induces the transcription of VEGF mRNA. HIF-1 is composed of two subunits, HIF-1 α and HIF-1 β (11). Each subunit contains an N-terminal basic-helix-loop-helix domain. They also contain a PAS motif, which is found in a number of transcription factors including the *Drosophila* proteins Period, Single-minded, and Trachealess, and mammalian proteins such as the aryl hydrocarbon receptor (AHR) and the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT). HIF-1 β was identified as being the previously described ARNT protein (11). The basic domain is responsible for DNA binding, while the helix-loop-helix and PAS domains play a role in heterodimerization (12). C-terminal transactivation domains can be found on both HIF-1 α and HIF-1 β (13–16). HIF-1 α and HIF-1 β are constitutively expressed in cells. However, while HIF-1 β is quite stable in normoxic conditions, HIF-1 α is extremely unstable ($t_{1/2}$ < 5 min) and previous studies have shown that, in oxygenated cells, HIF-1 α is quickly degraded by the ubiquitin-proteasome system (17, 18). Hypoxia rapidly stabilizes HIF-1 α by inhibiting its degradation by the proteasome. Recently, three independent laboratories succeeded in the knockout of the mouse HIF-1 α gene (HIF-1 α ^{−/−}) (19–21). They observed that HIF-1 α ^{−/−} mice were not viable (death occurring at embryonic day 10.5). They also showed that HIF-1 α ^{−/−} mice were deficient in vascularization and had cardiac and neuronal abnormalities. Tumors formed from HIF-1 α ^{−/−} ES cells were retarded in growth, and vascularization was absent. These results clearly show the irrevocable role that HIF-1 α plays in neovascularization and embryogenesis. A large quantity of information concerning HIF-1 α has been published in a very short period. However, molecular signals underlying activation of HIF-1 α are still unknown. Very little is known about the post-translational modifications of HIF-1 α and, more precisely, the possible role of phosphorylation. In this work, we show that HIF-1 α is highly phosphorylated *in vivo* and that HIF-1 α phosphorylation induces strong changes in its electrophoretic migration pattern. We also show that, *in vitro*, p42/p44 MAPK duplicate this phosphorylation. More interestingly, direct activation of the p42/p44 MAPK pathway in quiescent cells induces the same striking shift in molecular mass. Finally, this activa-

* This work was supported by grants from CNRS, Le Ministère de la Recherche (ACC-SV9), La Ligue Nationale Contre le Cancer, and l'Association pour la Recherche contre le Cancer, and by European Community Contract B104-CT97-2071. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

\ddagger Recipient of fellowships from the Heart and Stroke Foundation of Canada, le Ministère des Affaires Étrangères Français, and the O'Brien Foundation; presently supported by ELF-Aquitaine. To whom correspondence should be addressed. Tel.: 33-4-92-03-12-28; Fax: 33-4-92-03-12-25; E-mail: drichard@unice.fr.

\S Supported by an EMBO long term fellowship. Recipient of a fellowship from the Human Frontiers Science Program.

¶ Recipient of a scholarship from CNRS and Roussel Uclaf.

¹ The abbreviations used are: VEGF, vascular endothelial growth factor; HIF, hypoxia-inducible factor; MAPK, mitogen-activated protein kinase; FCS, fetal calf serum; HA, hemagglutinin; PCR, polymerase chain reaction; ER, endoplasmic reticulum; JNK, c-Jun N-terminal kinase; DTT, dithiothreitol; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium.

tion of p42/p44 MAPK can promote the transcriptional activation of HIF-1.

MATERIALS AND METHODS

Cell Culture—The established Chinese hamster fibroblast cell line CCL39 and their corresponding transfected cells, HA-p44 MAPK, HA-p38 MAPK, and HA-JNK cells, were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 7.5% fetal calf serum (FCS), penicillin (50 units/ml), and streptomycin (50 μ g/ml) (Life Technologies, Inc.). Mouse embryo fibroblasts were cultured on gelatin-coated culture plates in the same medium as above. Raf-1:ER clonal cell line (clone 19) is a derivative of the CCL39 cell line, which stably expresses a fusion protein between the catalytic domain of Raf-1 and the ligand binding domain of the estrogen receptor (22, 23). This clone allows the exclusive activation of the p42/p44 MAPK pathway upon estradiol treatment, and its characteristics have been previously described (24). These cells were cultured in the same medium as described above in the absence of phenol red in order to reduce the basal activity of the Raf-1:ER chimera. Human 293, HeLa, and HepG2 cell lines were cultured in DMEM containing 7.5% heat-inactivated FCS. Mouse endothelial 1G11 cells were cultured on gelatin-coated plates in the DMEM medium supplemented with 20% FCS, 100 μ g/ml heparin, and 100 μ g/ml endothelial cell growth supplement (25). Cell growth was arrested by total deprivation of serum for 16–20 h if not otherwise indicated. Hypoxic conditions were obtained placing the cells in a sealed "Bug-Box" anaerobic workstation (Ruskin Technologies, Leeds, UK/Jouan, Saint Herblain, France). The oxygen in this workstation was maintained at 1–2% with the residual gas mixture being 93–94% nitrogen and 5% carbon dioxide.

Plasmids—The hemagglutinin (HA)-tagged HIF-1 α and HIF-1 β were cloned by reverse transcription-PCR. Briefly, poly(A) RNA was extracted from hypoxic 293 cells with the use of the mRNA isolation kit (Roche Molecular Biochemicals) and reverse transcribed using the Expand reverse transcriptase system (Roche Molecular Biochemicals). HIF-1 α and HIF-1 β were amplified with the Expand high fidelity PCR system (Roche Molecular Biochemicals) using the primers: sense 5'-ATGGAGGGCGCCGCGCGAG-3' and antisense 5'-GTAACTTGATCCAAAGCTCTGAG-3' for HIF-1 α and sense 5'-TGGCGCGGACTACTGCCAACCC-3' and antisense 5'-TTCTGAAAGGGGGGAAAC-3' for HIF-1 β . Conditions for PCR amplification were: 35 cycles with 30 s at 95 °C, 1 min at 55 °C, 2.5 min at 72 °C, and a last cycle of elongation at 72 °C for 10 min. Blunt ended fragments were 3' A-tailed with Taq DNA polymerase, purified, and ligated into the PCR fragment cloning vector pTag (Ingenius; R&D Systems). To construct the HA-tagged forms of HIF-1 α and HIF-1 β , a new PCR reaction was performed using the p-Tag constructions as templates and the same sense (initiation codons ATG were mutated to GAG) and antisense primers (containing a SmaI and a XbaI restriction site, respectively) previously utilized. The PCR products were digested with SmaI and XbaI and subcloned into the pECE/HA expression vector (26). Finally, the two tagged forms were subcloned into the pcDNA3 expression vector (Invitrogen). The complete sequence was verified by Eurogentec (Liège, Belgium). The luciferase reporter used in these experiments is a modified version of the original VEGF promoter gene construct that was generously provided by Dr. Werner Risau. Two SP1 and one AP2 binding sites, which have been recently implicated in p42/p44 MAPK-mediated VEGF expression, were point mutated as previously reported (6). GST-ATP2 construct was a generous gift from Dr. Roger Davis.

Transient Transfection and Luciferase Assay—Raf-1:ER cells or parental CCL39 cells in 12-well plates (1.5×10^5 cells/well) were transiently transfected by CaPO₄ precipitation. 100 ng/well reporter plasmid were used along with the indicated concentrations of expression vector, 100 ng/well virus β -galactosidase as a control for transfection efficiency and the empty vector, pcDNA3, to normalize the quantity of DNA transfected to a total of 1 μ g/well. Four hours after transfection, cells were FCS-starved for 5 h, followed by stimulation for 16 h. Cells were then washed twice with cold PBS, and luciferase assays were performed as follows. Cells were lysed in a lysis buffer (25 mM Tris-phosphate (pH 7.8), 2 mM DTT, 2 mM 1,2-diaminocyclohexane-N,N,N',N'-tetraacetic acid, 10% glycerol, and 1% Triton X-100) for 15 min at room temperature, and the lysate was cleared by centrifugation. The luciferase assay was performed in a buffer containing 20 mM Tricine, 1.07 mM (MgCO₃)/Mg(OH)₂·5H₂O (Sigma), 2.67 mM MgSO₄, 3.1 mM EDTA, 33.3 mM DTT, 270 μ M coenzyme A (Sigma), 470 μ M beetle luciferin (Promega), and 530 μ M ATP. β -Galactosidase activity was evaluated with the use of Galacto-Light chemiluminescent reporter assay kit from Tropix (Bedford, MA). Results were quantified with a MicroBeta TRILUX luminescence counter (Wallac) and expressed as

the fold induction over control cells. Control cells were transfected with the reporter only and underwent the same treatments as cells transfected with HIF-1 α and HIF-1 β .

Antibodies—Anti-HIF-1 α antiserum 2087 was raised in rabbits immunized against the last 20 amino acids of the C-terminal end of human HIF-1 α . Mouse monoclonal anti-hemagglutinin (HA) antibody 12CA5 was from BabCO (Richmond, CA). Rabbit anti-phospho-p44/p42 MAPK polyclonal antibody was from New England Biolabs and horseradish peroxidase-coupled anti-mouse and anti-rabbit antibody were from Promega. Rabbit p42 MAPK antiserum E1B4 was produced and characterized in our laboratory (48).

Western Blot Analysis—Confluent cells were lysed in a lysis buffer containing 0.1% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM sodium fluoride, 40 mM β -glycerophosphate, 200 μ M sodium orthovanadate, 5 μ g/ml aprotinin, 0.7 μ g/ml pepstatin, 0.5 μ g/ml leupeptin, and 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride. Protein concentration was determined with the use of a Bio-Rad assay. 50 μ g of whole cell extracts were resolved in SDS-polyacrylamide gels (7.5% or 12.5%) and electrophoretically transferred onto a polyvinylidene difluoride membrane (Immobilon-P, Millipore). HA-HIF-1 α was immunoprobed with an anti-HA antibody (1:1000) while endogenous HIF-1 α was revealed with an anti-HIF-1 α antiserum (1:1000). The bands were visualized with the ECL system (Amersham Pharmacia Biotech).

In Vitro Phosphorylation—Bacterially expressed and purified active p42 MAPK was generously provided by Dr. Melanie Cobb (27). HA-tagged p44 MAPK, p38 MAPK, and JNK were obtained by immunoprecipitation from stably expressing cell lines developed in our laboratory (28). HA-HIF-1 α or HA-HIF-1 β were translated *in vitro* using the TNT-coupled reticulocyte lysate system (Promega). For radiolabeled HIF-1 α , translation was performed in the presence of 40 μ Ci of [³⁵S]methionine (Amersham Pharmacia Biotech). For unlabeled HIF-1 α , translation was performed in the presence of 20 μ M L-methionine (Sigma). 5 μ l of the translation mixture (for each condition) were immunoprecipitated using anti-HA antibody and used as substrate. The kinase assay was performed in a buffer containing 20 mM Hepes, 10 mM MgCl₂, 0.5 mM DTT, 5 mM *p*-nitrophenyl phosphate, 50 μ M ATP with or without 2 μ Ci of [γ -³²P]ATP for the desired time at 30 °C. Proteins were then resolved in SDS-polyacrylamide gels (7.5%) and revealed by autoradiography and Western blotting.

Dephosphorylation Assay—Endogenous HIF-1 α from HeLa cells was used as substrate. HIF-1 α was immunoprecipitated using an anti-HIF-1 α antiserum and washed three times with the previously mentioned lysis buffer. Immunoprecipitates were then washed twice with the phosphatase buffer supplied by the manufacturer and incubated with λ phosphatase (New England Biolabs) for 1 h at 37 °C. Proteins were resolved in SDS-polyacrylamide gels (7.5%) and revealed by Western blotting.

RESULTS

HIF-1 α Is Strongly Modified by Phosphorylation—We developed a high affinity anti-HIF-1 α antibody that specifically allows us to evaluate HIF-1 α expression *in vitro* and in whole cell extracts. Human HIF-1 α , translated *in vitro* in a rabbit reticulocyte system, migrated in a 7.5% SDS-polyacrylamide gel as a sharp band, which corresponded to a molecular mass of 104 kDa (Fig. 1). We then compared the *in vitro* expressed protein to endogenous HIF-1 α from different exponentially growing cell lines. In all the cases tested, HIF-1 α was strongly induced by hypoxia. The migration patterns of the endogenous HIF-1 α are different between cell lines. However, one common occurrence is noted: induced HIF-1 α migrated with a very diffused pattern (104–116 kDa) as compared with the *in vitro* translated protein (Fig. 1). Since very few post-translational modifications can occur *in vitro*, these results suggested that HIF-1 α , expressed in a whole cell system, undergoes strong post-translational modifications.

It has often been demonstrated that phosphorylation can markedly modify the migration pattern of proteins in SDS-polyacrylamide gels. Therefore, we wanted to evaluate whether these changes in electrophoretic migration (about 12 kDa) were due to phosphorylation. Endogenous HIF-1 α from HeLa cells was dephosphorylated with the use of a nonspecific protein phosphatase, λ phosphatase. As shown in Fig. 2, when HeLa cells were incubated in hypoxic conditions and HIF-1 α was

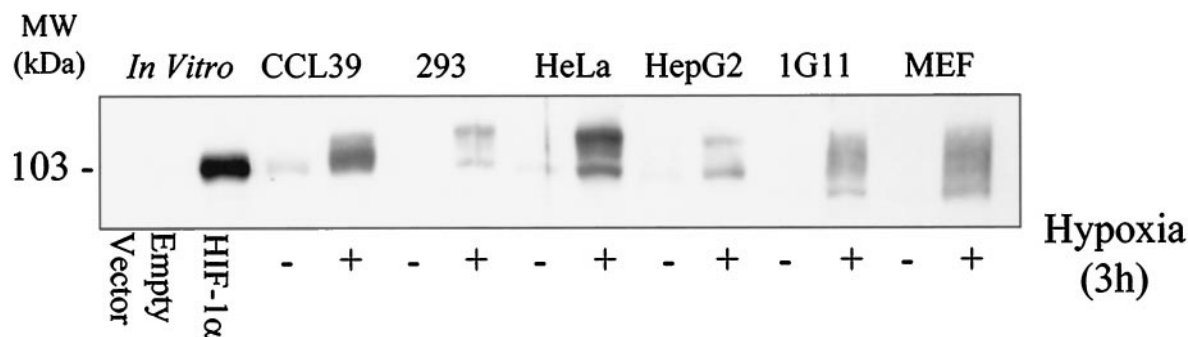


FIG. 1. **Comparison of *in vitro* translated and endogenous HIF-1 α .** Different cell lines were maintained under normoxic (21% O₂) or hypoxic (1% O₂) conditions for 3 h. Whole cell extracts (50 μ g) were analyzed by SDS-PAGE (7.5% gel) and immunoblotting using an anti-HIF-1 α antiserum. *In vitro* translated HA epitope-tagged human HIF-1 α was obtained with the use of the TNT-coupled reticulocyte lysate system (Promega). 1 μ l of the reaction mixture was used in this experiment.

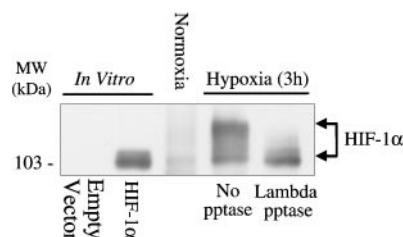


FIG. 2. **Dephosphorylation of HIF-1 α .** HeLa cells were maintained under normoxic (21% O₂) or hypoxic (1% O₂) conditions for 3 h. Whole cell extracts (1 mg) were immunoprecipitated using an anti-HIF-1 α antiserum. The immunoprecipitates were then treated with λ phosphatase for 1 h at 30 °C. The samples were then analyzed by SDS-PAGE (7.5% gel) and immunoblotting using an anti-HIF-1 α antiserum. *In vitro* translated HIF-1 α (unlabeled) was prepared as described previously.

immunoprecipitated with anti-HIF-1 α antibody and revealed with the same antibody, hypoxia strongly induced HIF-1 α , which migrated as two distinct bands: the first at 104 kDa and the second at 116 kDa. Incubation of immunoprecipitated HIF-1 α with λ phosphatase drastically decreased the molecular mass of HIF-1 α to a value that corresponded exactly to *in vitro* translated HIF-1 α , *i.e.* 104 kDa. These results show that HIF-1 α is phosphorylated *in vivo* and that phosphorylation is responsible for increase in HIF-1 α 's apparent molecular mass.

p42/44 MAPK Can Phosphorylate HIF-1 α *In Vitro*—We next wanted to identify a kinase capable of phosphorylating HIF-1 α and inducing this 12-kDa shift in molecular mass. Results from our laboratory showed that treatment of CCL39 cells with the potent serine/threonine phosphatase inhibitor okadaic acid led to a clear increase in HIF-1 α 's molecular mass (data not shown). This suggested that serine/threonine protein phosphatase(s) dephosphorylate(s) HIF-1 α and therefore, serine/threonine protein kinase(s) should be responsible for the mobility shift of HIF-1 α .

p42/44 MAPK are two serine/threonine protein kinases activated by mitogenic stimulation and modulate the activity of a number of transcription factors (for review, see Ref. 29). Recently, Elk-1 was shown to be phosphorylated during hypoxic conditions by MAPK, inducing the transcription of the *c-fos* gene (30). We therefore wanted to evaluate the capacity of p42/p44 MAPK to phosphorylate HIF-1 α . HIF-1 α was translated *in vitro* with [³⁵S]methionine and incubated for different periods of time with active p42 MAPK. Surprisingly, incubation of HIF-1 α with p42 MAPK induced a rapid shift in the electrophoretic mobility of HIF-1 α with a $t_{1/2}$ of 5 min and a complete shift of the molecule at 20 min (Fig. 3). The molecular mass of the shifted HIF-1 α was strikingly similar to the uppermost band seen for endogenous HIF-1 α expressed in human cells, *i.e.* 116 kDa. As a control, HIF-1 β was also translated *in vitro* and

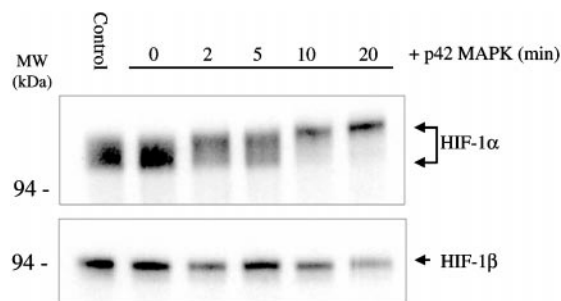


FIG. 3. **Phosphorylation of human HIF-1 α by p42 MAPK.** *In vitro* translated HA epitope-tagged forms of either HIF-1 α or HIF-1 β (labeled) was obtained with the use of the TNT-coupled reticulocyte lysate system in the presence of [³⁵S]methionine. 5 μ l of the mixture were immunoprecipitated using an anti-HA antibody and incubated in the presence of active purified recombinant p42 MAPK for the times indicated at 30 °C. The samples were then analyzed by SDS-PAGE (7.5% gel) and autoradiography.

incubated with p42 MAPK. In contrast to HIF-1 α , the migration of HIF-1 β was not modified by p42 MAPK (Fig. 3). These results suggest that HIF-1 α is phosphorylated *in vitro* by p42 MAPK and, more importantly, that this phosphorylation is able to reproduce the SDS gel mobility shift observed *in vivo*.

To this point, we have evaluated the phosphorylation of *in vitro* translated HIF-1 α by p42 MAPK. However, we next wanted to examine whether this phosphorylation was reproducible on endogenous HIF-1 α expressed in an intact cell system. Therefore, we performed phosphorylation assays with active p42 MAPK on λ phosphatase dephosphorylated HIF-1 α from HeLa cells. As previously shown in Fig. 2, dephosphorylated HIF-1 α was shifted to a lower molecular mass of approximately 104 kDa, which corresponds to the unmodified *in vitro* translated HIF-1 α . After dephosphorylation, HIF-1 α was incubated in the presence of p42 MAPK for 20 min at 30 °C. As expected, HIF-1 α now migrated at a molecular mass that corresponded to the uppermost band of untreated HIF-1 α from HeLa cells (Fig. 4). In these conditions, the shift is complete, all of HIF-1 α migrating as the higher molecular mass band. This suggests a good stoichiometric phosphorylation of HIF-1 α by p42 MAPK, since every molecule is phosphorylated on the site(s) responsible for this shift. The same results can be seen with HIF-1 α from other cell types and transiently transfected HA-HIF-1 α (data not shown). These results demonstrate that endogenous HIF-1 α can be phosphorylated by p42 MAPK. We also show that this phosphorylation can reproduce the maximal SDS gel shift detected for HIF-1 α induced in intact cells.

Phosphorylation of HIF-1 α by MAPKs Is Specific to p42/44 MAPK (ERKs)—The MAPK family of protein kinases includes the mitogen-stimulated p42/p44 MAPK or ERKs and also the stress-activated kinases p38 MAPK and JNK (31). We there-

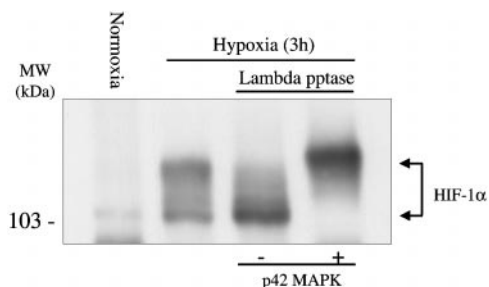


FIG. 4. Phosphorylation of endogenous HIF-1 α by p42 MAPK. HeLa cells were maintained under normoxic (21% O₂) or hypoxic (1% O₂) conditions for 3 h. Whole cell extracts (1 mg) were immunoprecipitated using an anti-HIF-1 α antiserum. The immunoprecipitates were treated with λ phosphatase for 1 h at 30 °C followed by extensive washing. Active recombinant p42 MAPK was then added for 20 min at 30 °C. The samples were analyzed by SDS-PAGE (7.5% gel) and immunoblotting using an anti-HIF-1 α antiserum.

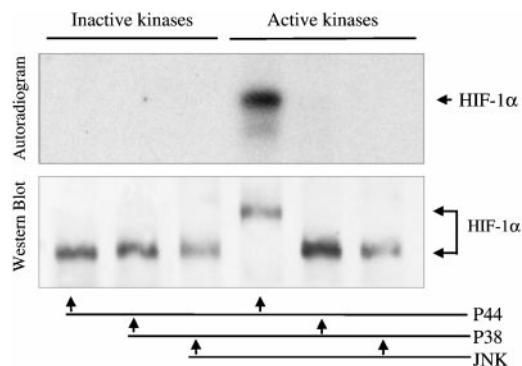


FIG. 5. Phosphorylation of HIF-1 α by MAPKs is specific to p42/p44 MAPK. *In vitro* translated HA-HIF-1 α (unlabeled) was obtained with the use of the TNT-coupled reticulocyte lysate system. 5 μ l of the mixture was immunoprecipitated using an anti-HA antibody and incubated with [γ -³²P]ATP in the presence of active or inactive p44 MAPK, p38 MAPK and JNK for 20 min at 30 °C, followed by SDS-PAGE (7.5% gel). Proteins were transferred to an Immobilon-P membrane and analyzed by autoradiography and immunoblotting using an anti-HA antibody. As a control of kinase activity, p44 MAPK was incubated with the substrate myelin basic protein (MBP), while p38 MAPK and JNK were incubated with their known substrate ATF2. Samples were analyzed by SDS-PAGE (12.5% gel) followed by autoradiography (data not shown).

fore evaluated the specificity of the p42/p44 MAPK phosphorylation by assessing whether p38 MAPK or JNK could phosphorylate HIF-1 α . In this experiment, HA-tagged kinases, stimulated or not, were immunoprecipitated from CCL39 cells stably transfected with the corresponding expression vector and incubated with *in vitro* translated HIF-1 α as substrate. In the case of p44 MAPK, cells were incubated for 5 min with 10% FCS, a condition that gives a maximal activation of p42/p44 MAPK. As for p38 MAPK and JNK, cells were maximally activated by addition of 1 μ g/ml anisomycin for 20 min. Incubation of unlabeled HIF-1 α with [γ -³²P]ATP and activated p44 MAPK strongly phosphorylated HIF-1 α (Fig. 5, autoradiography) and induced a marked shift in its molecular mass (Fig. 5, Western blot). Neither p38 MAPK or JNK were able to phosphorylate HIF-1 α or induce changes in HIF-1 α 's migration pattern. These results indicate that the phosphorylation of HIF-1 α by MAPK is specific to p42/p44 MAPK.

Hypoxia Does Not Activate p42/p44 MAPK in CCL39 Fibroblasts—We now wanted to evaluate if hypoxia could activate p42/p44 MAPK, which would then phosphorylate HIF-1 α and induce the molecular mass shift. Hypoxia has been shown to activate p42/p44 MAPK in HeLa cells (30). The HeLa cell line is a difficult model to evaluate p42/p44 MAPK activity, since

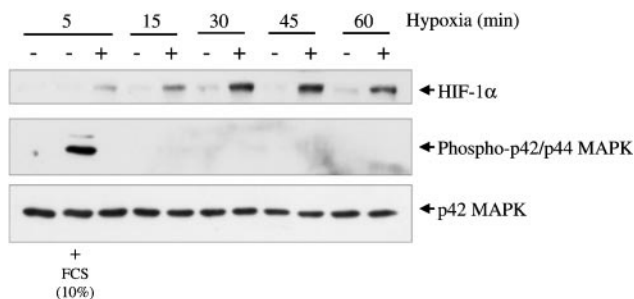


FIG. 6. Hypoxia does not activate p42/p44 MAPK in growth-arrested CCL39 cells. CCL39 cells, deprived of FCS for 24 h, were stimulated with 10% FCS (v/v) for 5 min as a control or maintained under normoxic (21% O₂) or hypoxic (1% O₂) conditions for the times indicated. Whole cell extracts (50 μ g) were analyzed by SDS-PAGE (12.5% gel) and transferred protein were immunoblotted with anti-HIF-1 α antiserum, anti-phospho-p42/p44 MAPK polyclonal antibody, or anti-p42 MAPK antiserum (E1B4).

these cells are highly transformed and have a high basal level of p42/p44 MAPK activity even in FCS-starved conditions (32). In contrast, CCL39 cells are an excellent model for studying p42/p44 MAPK activation. When deprived of FCS, CCL39 cells arrest well and show very low levels of p42/p44 MAPK activity. Therefore, we evaluated the effect of hypoxia on p42/p44 MAPK activation in CCL39 cells. Since dual phosphorylation of p42/p44 MAPK is a clear indication of activation (33, 34), we used an anti-phospho-p42/p44 MAPK antibody to evaluate variations in p44/p42 MAPK activity. As seen in Fig. 6, stimulation of quiescent CCL39 cells with 10% FCS (v/v) induced a strong activation of p42 MAPK. However, no active p42 MAPK could be detected after exposure to hypoxia (1% oxygen) for 5–60 min while the levels HIF-1 α rapidly and steadily increased under the same conditions. Longer times were also performed (up to 24 h of hypoxia) without any detectable phosphorylation of p42 MAPK (data not shown). p42 MAPK protein levels did not vary during hypoxia. It is important to note that in this model system and with the antibody used, detection of active p44 MAPK is very faint even if p44 MAPK is present in a relatively similar quantity as p42 MAPK (data not shown). These results suggested that p42/p44 MAPKs are not activated by hypoxia. To confirm these results, p42/p44 MAPK activity was also analyzed by a kinase assay. Serum stimulation (10% v/v) induced a strong phosphorylation of MBP (over 10-fold) while hypoxia (from 5 min to 24 h in 1% oxygen) did not significantly increase the phosphorylation of MBP over basal levels (data not shown). Taken together, these results demonstrate that p42/p44 MAPK activity is not increased by hypoxia in growth-arrested CCL39 cells. Therefore, the phosphorylation of HIF-1 α by p42/p44 MAPK and the changes in molecular mass induced by this phosphorylation are not those induced by hypoxia.

p42/p44 MAPK Activation Induces HIF-1 α Phosphorylation *In Vivo*—Since hypoxia did not activate p42/p44 MAPKs, the induction of HIF-1 α mobility shift should not be apparent in quiescent hypoxic cells and would be induced by an activation of the p42/p44 MAPK pathway. To investigate this possibility, we used a derivative of the CCL39 cell line that stably expresses the chimera Raf-1:ER. This protein is a fusion between the catalytic domain of Raf-1, an upstream activator of the p42/p44 MAPK cascade, and the ligand binding domain of the estradiol receptor. Estradiol stimulation of Raf-1:ER cells leads to a rapid and exclusive p42/p44 MAPK activation. As seen in Fig. 7A, when quiescent CCL39/Raf-1:ER cells are incubated in hypoxic conditions for 3 h, HIF-1 α is induced and migrated as a single band at approximately 104 kDa. This demonstrated that the phosphorylation inducing HIF-1 α 's shift in molecular

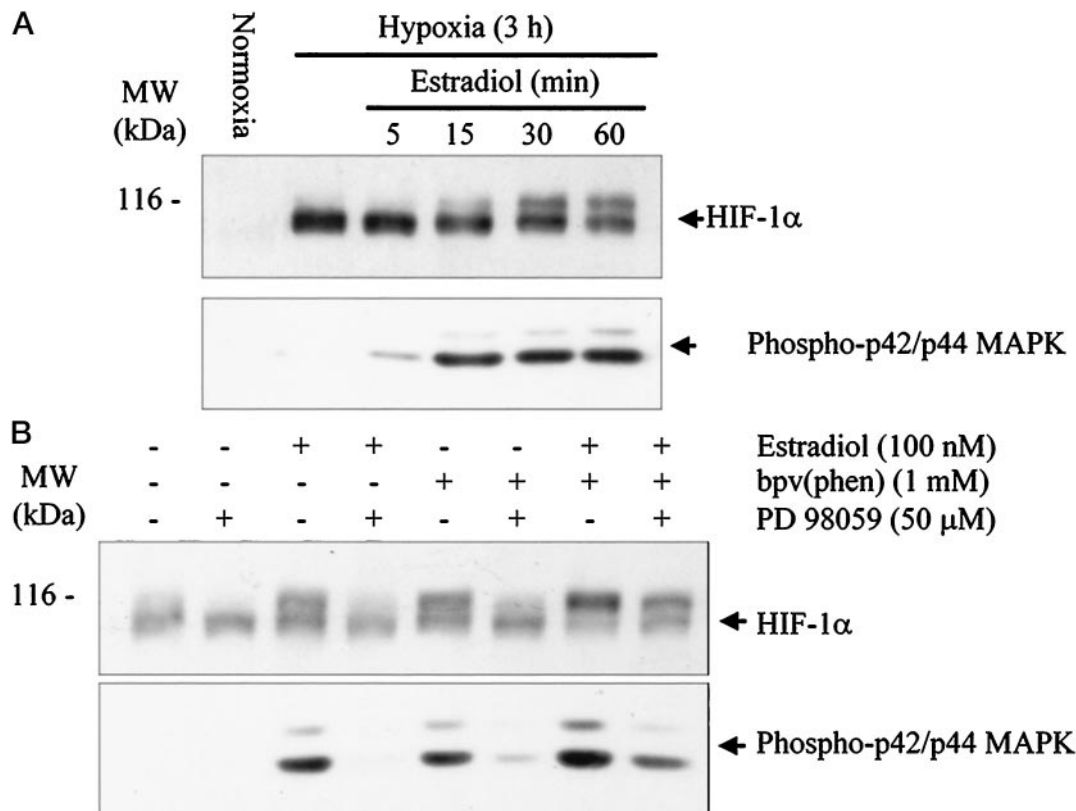


FIG. 7. **p42/p44 MAPK activation induces HIF-1 α phosphorylation *in vivo*.** CCL39 cells stably expressing the Raf-1:ER chimera (Raf-1:ER cells) were FCS-starved for 24 h before 3 h of hypoxia. **A**, before the end of the hypoxic period, Raf-1:ER cells were stimulated with 100 nM estradiol for the times indicated. **B**, before the end of the hypoxic period, Raf-1:ER cells were pretreated or not with 50 μ M PD 98059 for 30 min followed or not by a stimulation with either 100 nM estradiol for 30 min, 1 mM bpV(phen) for 15 min or a combination of both. Whole cell extracts (50 μ g) were analyzed by SDS-PAGE (7.5% gel) and immunoblotting using an anti-HIF-1 α antiserum or an anti-phospho-p42/p44 MAPK polyclonal antibody.

mass does not occur in quiescent cells. When these cells were treated with estradiol for different intervals before the end of the 3-h hypoxic period, a form of HIF-1 α appeared at 116 kDa, which corresponded exactly to the molecular mass of HIF-1 α phosphorylated *in vitro* by p42/p44 MAPK. The induction of the HIF-1 shift closely followed the activation of p42/p44 MAPK. Essentially the same results were obtained using another stimulus shown to activate p42/p44 MAPK, 10% FCS (data not shown). Furthermore, this shift was inhibited by treatment of cells with the specific p42/p44 MAPK pathway inhibitor, PD 98059 (Fig. 7B). However, the mobility shift of HIF-1 α after estradiol stimulation was not complete. We suspected that strong phosphatase activity in the nucleus was the cause of the partial HIF-1 α phosphorylation and that if we could increase the level of p42/p44 MAPK activity, we could induce a complete shift of HIF-1 α . We therefore incubated the cells with a potent tyrosine phosphatase inhibitor, the vanadate-derived compound, bpV(phen) (Calbiochem). Treatment of cells with bpV(phen) alone strongly activated p42/p44 MAPK activity in CCL39 cells (Fig. 7B, *phospho-p42/p44 MAPK*) and also induced a partial HIF-1 α mobility shift. As with the estradiol stimulation, the shift induced by bpV(phen) was blocked by the PD 98059 compound. More interestingly, when the cells were treated with both estradiol and bpV(phen), this had an additive effect on p42/p44 MAPK activity and induced a complete shift of the HIF-1 α molecule. In these conditions, the strong increase in p42/p44 MAPK activity along with the HIF-1 α shift could only be partially blocked with 50 μ M PD 98059. However, at 100 μ M a complete inhibition could be achieved by PD 98059 (data not shown). Taken together, these results strongly suggest that HIF-1 α is phosphorylated *in vivo* by p42/p44 MAPK.

Activation of p42/p44 MAPK Promotes HIF-1-dependent

Transcriptional Activation—The ultimate goal of HIF-1 induction is the transcription of target genes such as VEGF and erythropoietin (35). Phosphorylation by p42/p44 MAPK has been shown to modulate the activity of a number of transcription factors. We therefore wanted to evaluate the possible effect of a phosphorylation of HIF-1 α by p42/p44 MAPK on HIF-1 transcriptional activity. To perform these experiments, we used a luciferase reporter plasmid driven by the VEGF promoter in which a mutation (Mut Sp1/AP2) has eliminated the previously shown site for p42/p44 MAPK activation (6). This reporter is completely insensitive to p42/p44 MAPK stimulation (Ref. 6; Fig. 8, reporter only). This construct was co-transfected with HIF-1 α and HIF-1 β constructions in the Raf-1:ER expressing cell line. Since overexpression of HA-HIF-1 α allows us to detect HIF-1 α protein even in normoxic conditions (data not shown), this system permitted us to directly evaluate the role of MAPK activation on the HIF-1 complex independently of HIF-1 α 's hypoxic induction. In these conditions, if the stimulation of p42/p44 MAPK increases the expression of the VEGF/luciferase reporter, this effect can only be through the HIF-1 complex. As shown in Fig. 8, FCS-starved Raf-1:ER cells transiently expressing HIF-1 α and HIF-1 β only slightly increased the activation of the mutated VEGF promoter under normoxic conditions. However, addition of 100 nM estradiol strikingly activated the mutated VEGF promoter by almost 5-fold over untreated cells without affecting basal levels in cells transfected with the reporter only. To a lesser degree, an increase in VEGF promoter expression could also be seen when cells were transfected with only HIF-1 α . However, when cells were transfected with HIF-1 β only, no increase in reporter expression could be seen. This demonstrates that HIF-1 α expression is essential for this induction. Finally, estradiol had no effect on

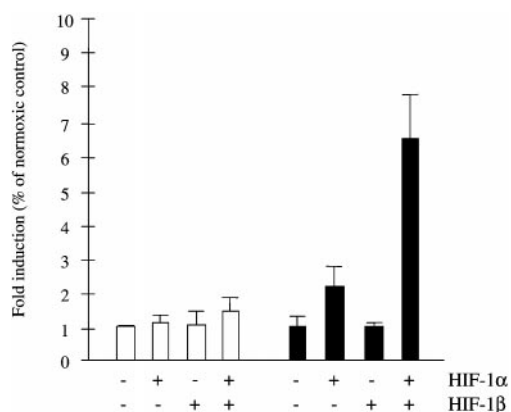


FIG. 8. **p42/p44 MAPK activity promotes HIF-1-dependent transcriptional activation.** Raf-1:ER cells (1.5×10^5) were transfected either with 100 ng of reporter plasmid and either empty pcDNA3 expression vector, 500 ng of HIF-1 α , 50 ng of HIF-1 β , or a combination of both 500 ng of HIF-1 α and 50 ng of HIF-1 β . In all cases, 100 ng of an expression vector coding for β -galactosidase was co-transfected in order to normalize for transfection efficiency. At 4 h after transfection, cells were deprived of FCS for 5 h, followed by stimulation with estradiol (black bars) or not (empty bars) and cells were maintained under normoxic conditions for 16 h. At this point, cells were lysed and luciferase and β -galactosidase activity were measured as described under "Materials and Methods." This experiment is the average of at least five independent experiments performed in triplicate.

VEGF promoter activity in parental CCL39 cells that did not express the Raf-1:ER chimera (data not shown). These results demonstrate that strong activation of p42/p44 MAPK is sufficient to effectively promote the transcriptional activity of HIF-1.

DISCUSSION

Phosphorylation and dephosphorylation activities have been suggested to be critical in the signaling pathway leading to HIF-1 activation (18, 35). Wang *et al.* (36) demonstrated that treatment of cells with the tyrosine protein kinase inhibitors genistein and herbimycin A, the serine/threonine protein kinase inhibitor, 2-aminopurine and the serine/threonine protein phosphatase inhibitor sodium fluoride blocked the induction of HIF-1 α . Inversely, sodium orthovanadate, a tyrosine phosphatase inhibitor increased basal HIF-1 α levels and activity. Interestingly, okadaic acid, another serine/threonine phosphatase inhibitor, did not inhibit HIF-1 α expression but rather increased the proportion of the high molecular mass form of HIF-1 α (data not shown). All these results suggested that different protein kinases and phosphatases are capable of regulating HIF-1 α . However, no studies have directly investigated the possible phosphorylation of HIF-1 α and the effect on its activity. A number of studies have shown that the electrophoretic migration of HIF-1 α is very diffuse (Refs. 12, 37, and 38; our present work). This was suggested to be caused by post-translational modifications of the HIF-1 α protein (12). In accordance with this proposal, *in vitro* translated HA-tagged human HIF-1 α , which is not modified post-translationally, migrates as a sharp band at 104 kDa. Our hypothesis was that these post-translational modifications were caused by phosphorylation.

In this work, we have shown evidence that HIF-1 α is phosphorylated *in vivo* and that this phosphorylation can dramatically affect the migration pattern of HIF-1 α . We also show that the differently migrating bands of HIF-1 α protein were due to varying levels of phosphorylation. These changes in molecular mass induced by phosphorylation are clearly independent of hypoxia since they can be seen when HIF-1 α is overexpressed even in normoxic conditions (Ref. 37; data not shown). These

results suggest that phosphorylation of the HIF-1 α molecule occurs once HIF-1 α is produced in the cell. However, we can not exclude that additional phosphorylations are implicated in the hypoxic response. Subsequent phosphorylations could possibly occur during hypoxia to induce the full activation of the HIF-1 complex.

Active p42/p44 MAPK induced a rapid phosphorylation of HIF-1 α , either *in vitro* translated or immunoprecipitated and dephosphorylated from HeLa cells. This phosphorylation increases HIF-1 α 's molecular mass to a value similar to the uppermost band detected after HIF-1 α induction in many cell systems. This same phosphorylation can be seen in an intact cell system when the p42/p44 MAPK pathway is activated. Taken together, these results strongly suggest that p42/p44 MAPK do phosphorylate HIF-1 α *in vivo*. Interestingly, p38 MAPK and JNK did not phosphorylate nor affect the migration pattern of HIF-1 α , suggesting that this effect is specific to p42/p44 MAPK. We also demonstrated that HIF-1 β is not shifted when incubated with p42 MAPK. These results suggest that HIF-1 β does not undergo the same type of modifications as HIF-1 α and strengthen the specificity of p42/p44 MAPK on HIF-1 α phosphorylation.

At this point, the HIF-1 α sites which are phosphorylated by p42/p44 MAPK have not been elucidated. Two p42/p44 MAPK consensus sites (PXSP) exist on human HIF-1 α (positions 515 and 687). In order to evaluate the role of these residues, we point mutated the two serines into alanine and glycine, respectively. However, the ability of p42 MAPK to induce modifications in HIF-1 α 's migration pattern remained unchanged (data not shown). We are currently investigating other possible phosphorylation sites.

The finding that p42/p44 MAPKs are not activated by hypoxia correlates well with the previously mentioned results showing that overexpressed HIF-1 α is phosphorylated and migrates in a diffuse pattern even in normoxia (Ref. 37; data not shown). It is simply possible that the basal level of p42/p44 MAPK activity is responsible for the phosphorylation of induced HIF-1 α . This would explain the different migration patterns observed between the different exponentially growing cell types. Interestingly, cells with a low basal level of p42/p44 MAPK activity, like CCL39 cells, showed less of the uppermost migrating HIF-1 α band. However, 293 and HeLa cell lines, which are highly transformed cells with a elevated basal p42/p44 MAPK activity, demonstrate an increased level of the high migrating HIF-1 α . In the same context, it is important to note that CCL39 derivatives expressing constitutively active Ras and MEK (v-Ras and MEK SS/DD) showed an augmented level of the higher migrating HIF-1 α as compared with parent CCL39 cells (data not shown).

MAPK activity has been shown to regulate the induction and/or degradation of certain transcription factors (39–42). However, the p42/p44 MAPK pathway does not seem to be implicated in the stabilization of the HIF-1 α molecule or the regulation of its ubiquitin-proteasome-mediated degradation. Two unpublished experiments from our laboratory support this statement. First, the induction or degradation kinetics of HIF-1 α are essentially the same in the case of exponentially growing cells in the presence of 10% FCS and serum-starved quiescent cells. Second, strong activation of the p42/p44 MAPK pathway with the Raf-1:ER chimera does not modify the rate of HIF-1 α induction or degradation. Therefore, if phosphorylation events are implicated in these phenomena, they are independent on the phosphorylation by p42/p44 MAPK.

The last and major finding in this work is that strong and sustained p42/p44 MAPK activation induces the expression of HIF-1-dependent reporter genes in normoxic cells when the

HIF-1 is forcibly induced by overexpression of the HIF-1 α and HIF-1 β proteins. Increases in reporter gene expression can also be detected in FCS-stimulated cells, but to a lesser degree (data not shown). This is possibly due to the temporal activation of p42/p44 MAPK with estradiol, which is much more prolonged and sustained than with FCS. In addition, these experiments show that MAPK activation alone is sufficient to promote HIF-1-mediated transcriptional activation. These results are in agreement with previous work, which demonstrated that treatment with PD98059, an upstream inhibitor of the p42/p44 MAPK pathway, inhibited HIF-1-mediated target gene activation (43). The mechanism underlying this activation is still unknown. Phosphorylation of HIF-1 α by p42/p44 MAPK may favor dimerization with partners like HIF-1 β to form the HIF-1 complex. We have performed co-immunoprecipitation experiments to evaluate this possibility. We have not seen any differences in the level of HIF-1 β that co-immunoprecipitates with HIF-1 α when cells are stimulated with estradiol. Another possibility is that phosphorylation may increase the interaction of the complex with its DNA binding site. In this context, it has been shown that treatment with PD98059 does not alter the DNA binding activity of the HIF-1 complex (43). However, these experiments were not done in conditions of strong MAPK activation. Another possibility is that phosphorylation of HIF-1 α augments its interaction with the basal transcriptional machinery. Finally, phosphorylation may modify the interaction between HIF-1 α and another partner(s) to increase HIF-1-mediated gene activation. HIF-1 α has been shown to interact with CBP/p300 and p53 (44–47). These interactions modulate the transcriptional activity of the HIF-1 complex. It is still not known whether phosphorylation is implicated in this interaction. These research avenues are currently being investigated.

In summary, we have demonstrated that HIF-1 α is a highly phosphorylated protein *in vivo* and that this phosphorylation of HIF-1 α induces strong changes in the HIF-1 α 's migration pattern. We also show that *in vitro*, p42/p44 MAPK can reproduce this phosphorylation. In quiescent cells, strong activation of p42/p44 MAPK induces the phosphorylation of HIF-1 α and increases HIF-1-dependent transcriptional activity. The further comprehension of these phosphorylation processes will undoubtedly be a major contribution in the understanding of the signaling pathways that modulate HIF-1 activity and HIF-1-mediated gene expression.

Acknowledgments—We thank Dr. W. Risau and J. Milanini for the VEGF promoter constructs; Dr. M. Cobb for the active recombinant p42 MAPK; Dr. R. Davis for the GST-ATF2 construct; Drs. G. Pagès, F. R. McKenzie, and F. Vinals for helpful suggestions; and D. Grall and Y. Fantei for excellent technical assistance.

REFERENCES

- Risau, W. (1997) *Nature* **386**, 671–674
- Shweiki, D., Itin, A., Soffer, D., and Keshet, E. (1992) *Nature* **359**, 843–845
- Ladoux, A., and Frelin, C. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **240**, 552–556
- Gleadle, J. M., Ebert, B. L., Firth, J. D., and Ratcliffe, P. J. (1995) *Am. J. Physiol.* **268**, C1362–C1368
- Goldberg, M. A., and Schneider, T. J. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 4355–4359
- Milanini, J., Vinals, F., Pouyssegur, J., and Pages, G. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 18165–18172
- Minchenko, A., Salceda, S., Bauer, T., and Caro, J. (1994) *Cell Mol Biol Res* **40**, 35–39
- Nomura, M., Yamagishi, S., Harada, S., Hayashi, Y., Yamashita, T., Yamashita, J., and Yamamoto, H. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 28316–28324
- Vasir, B., Aiello, L. P., Yoon, K. H., Quicquel, R. R., Bonner, W. S., and Weir, G. C. (1998) *Diabetes* **47**, 1894–1903
- Forsythe, J. A., Jiang, B. H., Iyer, N. V., Agani, F., Leung, S. W., Koos, R. D., and Semenza, G. L. (1996) *Mol. Cell. Biol.* **16**, 4604–4613
- Wang, G. L., and Semenza, G. L. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 1230–1237
- Wang, G. L., Jiang, B. H., Rue, E. A., and Semenza, G. L. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 5510–5514
- Jiang, B. H., Zheng, J. Z., Leung, S. W., Roe, R., and Semenza, G. L. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 19253–19260
- Li, H., Dong, L., and Whitlock, J. P., Jr. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 28098–28105
- Pugh, C. W., O'Rourke, J. F., Nagao, M., Gleadle, J. M., and Ratcliffe, P. J. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 11205–11214
- Whitelaw, M. L., Gustafsson, J. A., and Poellinger, L. (1994) *Mol. Cell. Biol.* **14**, 8343–8355
- Huang, L. E., Gu, J., Schau, M., and Bunn, H. F. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 7987–7992
- Salceda, S., and Caro, J. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 22642–22647
- Iyer, N. V., Kotch, L. E., Agani, F., Leung, S. W., Laughner, E., Wenger, R. H., Gassmann, M., Gearhart, J. D., Lawler, A. M., Yu, A. Y., and Semenza, G. L. (1998) *Genes Dev.* **12**, 149–162
- Carmeliet, P., Dor, Y., Herbert, J. M., Fukumura, D., Brusselmans, K., Dewerchin, M., Neeman, M., Bono, F., Abramovitch, R., Maxwell, P., Koch, C. J., Ratcliffe, P., Moons, L., Jain, R. K., Collen, D., Keshet, E. (1998) *Nature* **394**, 485–490
- Ryan, H. E., Lo, J., and Johnson, R. S. (1998) *EMBO J.* **17**, 3005–3015
- Samuels, M. L., Weber, M. J., Bishop, J. M., and McMahon, M. (1993) *Mol. Cell. Biol.* **13**, 6241–6252
- Samuels, M. L., and McMahon, M. (1994) *Mol. Cell. Biol.* **14**, 7855–7866
- Lenormand, P., McMahon, M., and Pouyssegur, J. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 15762–15768
- Dong, Q. G., Bernasconi, S., Lostaglio, S., De, C. R., Martin, P. I., Breviaro, F., Garlanda, C., Ramponi, S., Mantovani, A., and Vecchi, A. (1997) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **17**, 1599–1604
- Ellis, L., Morgan, D. O., Clauser, E., Ederly, M., Jong, S. M., Wang, L. H., Roth, R. A., and Rutter, W. J. (1986) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **2**, 773–784
- Khokhlatchev, A., Xu, S., English, J., Wu, P., Schaefer, E., and Cobb, M. H. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 11057–11062
- Brunet, A., and Pouyssegur, J. (1996) *Science* **272**, 1652–1655
- Cobb, M. H., and Goldsmith, E. J. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 14843–14846
- Muller, J. M., Krauss, B., Kaltschmidt, C., Baeuerle, P. A., and Rupec, R. A. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 23435–23439
- Karin, M. (1998) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **851**, 139–146
- Berra, E., Diaz-Meco, M. T., and Mocat, J. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 10792–10797
- Payne, D. M., Rossomando, A. J., Martino, P., Erickson, A. K., Her, J. H., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., Weber, M. J., and Sturgill, T. W. (1991) *EMBO J.* **10**, 885–892
- Anderson, N. G., Maller, J. L., Tonks, N. K., and Sturgill, T. W. (1990) *Nature* **343**, 651–653
- Semenza, G. L. (1998) *Curr. Opin. Genet. Dev.* **8**, 588–594
- Wang, G. L., Jiang, B. H., and Semenza, G. L. (1995) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **216**, 669–675
- Jiang, B. H., Rue, E., Wang, G. L., Roe, R., and Semenza, G. L. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 17771–17778
- Kallio, P. J., Pongratz, I., Gradin, K., McGuire, J., and Poellinger, L. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 5667–5672
- Musti, A. M., Treier, M., and Bohmann, D. (1997) *Science* **275**, 400–402
- Niu, H., Ye, B. H., and Dalla, F. R. (1998) *Genes Dev.* **12**, 1953–1961
- Okazaki, K., and Sagata, N. (1995) *EMBO J.* **14**, 5048–5059
- Song, X., Sheppard, H. M., Norman, A. W., and Liu, X. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 1677–1682
- Salceda, S., Beck, I., Srinivas, V., and Caro, J. (1997) *Kidney Int.* **51**, 556–559
- An, W. G., Kanekal, M., Simon, M. C., Maltepe, E., Blagosklonny, M. V., and Neckers, L. M. (1998) *Nature* **392**, 405–408
- Blagosklonny, M. V., An, W. G., Romanova, L. Y., Trepel, J., Fojo, T., and Neckers, L. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 11995–11998
- Ebert, B. L., and Bunn, H. F. (1998) *Mol. Cell. Biol.* **18**, 4089–4096
- Kallio, P. J., Okamoto, K., O'Brien, S., Carrero, P., Makino, Y., Tanaka, H., and Poellinger, L. (1998) *EMBO J.* **17**, 6573–6586
- Brondello, J. M., Brunet, A., Pouyssegur, J., and McKenzie, F. R. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 1368–1376

BIBLIOGRAPHIE

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Abbott, B.D., Birnbaum, L.S. and Perdew, G.H. (1995) Developmental expression of two members of a new class of transcription factors: I. Expression of aryl hydrocarbon receptor in the C57BL/6N mouse embryo. *Dev Dyn*, **204**, 133-43.
2. Abbott, B.D. and Probst, M.R. (1995) Developmental expression of two members of a new class of transcription factors: II. Expression of aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator in the C57BL/6N mouse embryo. *Dev Dyn*, **204**, 144-55.
3. Abnet, C.C., Tanguay, R.L., Hahn, M.E., Heideman, W. and Peterson, R.E. (1999) Two forms of aryl hydrocarbon receptor type 2 in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Evidence for differential expression and enhancer specificity. *J Biol Chem*, **274**, 15159-66.
4. Acker, H. (1994) Mechanisms and meaning of cellular oxygen sensing in the organism. *Respir Physiol*, **95**, 1-10.
5. Allada, R., White, N.E., So, W.V., Hall, J.C. and Rosbash, M. (1998) A mutant *Drosophila* homolog of mammalian Clock disrupts circadian rhythms and transcription of period and timeless. *Cell*, **93**, 791-804.
6. Amati, B., Brooks, M.W., Levy, N., Littlewood, T.D., Evan, G.I. and Land, H. (1993) Oncogenic activity of the c-Myc protein requires dimerization with Max. *Cell*, **72**, 233-45.
7. An, W.G., Kanekal, M., Simon, M.C., Maltepe, E., Blagosklonny, M.V. and Neckers, L.M. (1998) Stabilization of wild-type p53 by hypoxia-inducible factor 1alpha. *Nature*, **392**, 405-8.
8. Aragonés, J., Jones, D.R., Martin, S., San Juan, M.A., Alfranca, A., Vidal, F., Vara, A., Merida, I. and Landazuri, M.O. (2001) Evidence for the involvement of diacylglycerol kinase in the activation of hypoxia-inducible transcription factor-1 by low oxygen tension. *J Biol Chem*.
9. Arany, Z., Huang, L.E., Eckner, R., Bhattacharya, S., Jiang, C., Goldberg, M.A., Bunn, H.F. and Livingston, D.M. (1996) An essential role for p300/CBP in the cellular response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 12969-73.
10. Baca, M., Borgstahl, G.E., Boissinot, M., Burke, P.M., Williams, D.R., Slater, K.A. and Getzoff, E.D. (1994) Complete chemical structure of photoactive yellow protein: novel thioester-linked 4-hydroxycinnamyl chromophore and photocycle chemistry. *Biochemistry*, **33**, 14369-77.
11. Bacon, N.C., Wappner, P., O'Rourke, J.F., Bartlett, S.M., Shilo, B., Pugh, C.W. and Ratcliffe, P.J. (1998) Regulation of the *Drosophila* bHLH-PAS protein Sima by hypoxia: functional evidence for homology with mammalian HIF-1 alpha. *Biochem Biophys Res Commun*, **249**, 811-6.
12. Bae, K., Lee, C., Hardin, P.E. and Edery, I. (2000) dCLOCK is present in limiting amounts and likely mediates daily interactions between the dCLOCK-CYC transcription factor and the PER-TIM complex. *J Neurosci*, **20**, 1746-53.

13. Bae, K., Lee, C., Sidote, D., Chuang, K.Y. and Edery, I. (1998) Circadian regulation of a *Drosophila* homolog of the mammalian Clock gene: PER and TIM function as positive regulators. *Mol Cell Biol*, **18**, 6142-51.
14. Bannister, A.J. and Kouzarides, T. (1996) The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature*, **384**, 641-3.
15. Berghard, A., Gradin, K., Pongratz, I., Whitelaw, M. and Poellinger, L. (1993) Cross-coupling of signal transduction pathways: the dioxin receptor mediates induction of cytochrome P-450IA1 expression via a protein kinase C-dependent mechanism. *Mol Cell Biol*, **13**, 677-89.
16. Berra, E., Richard, D.E., Gothie, E. and Pouyssegur, J. (2001a) HIF-1-dependent transcriptional activity is required for oxygen-mediated HIF-1 α degradation. *FEBS Lett*, **491**, 85-90.
17. Berra, E., Roux, D., Richard, D.E. and Pouyssegur, J. (2001b) Hypoxia-Inducible Factor -1 α (HIF-1 α) escapes O₂-driven proteosomal degradation irrespectively of its subcellular localization. *EMBO*, **In press**.
18. Bhattacharya, S., Michels, C.L., Leung, M.K., Arany, Z.P., Kung, A.L. and Livingston, D.M. (1999) Functional role of p35srj, a novel p300/CBP binding protein, during transactivation by HIF-1. *Genes Dev*, **13**, 64-75.
19. Bianchi, L., Tacchini, L. and Cairo, G. (1999) HIF-1-mediated activation of transferrin receptor gene transcription by iron chelation. *Nucleic Acids Res*, **27**, 4223-7.
20. Bibikov, S.I., Biran, R., Rudd, K.E. and Parkinson, J.S. (1997) A signal transducer for aerotaxis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **179**, 4075-9.
21. Black, D.L. (2000) Protein diversity from alternative splicing: a challenge for bioinformatics and post-genome biology. *Cell*, **103**, 367-70.
22. Black, S.C., Huang, J.Q., Rezaiefar, P., Radinovic, S., Eberhart, A., Nicholson, D.W. and Rodger, I.W. (1998) Co-localization of the cysteine protease caspase-3 with apoptotic myocytes after in vivo myocardial ischemia and reperfusion in the rat. *J Mol Cell Cardiol*, **30**, 733-42.
23. Blagosklonny, M.V., An, W.G., Romanova, L.Y., Trepel, J., Fojo, T. and Neckers, L. (1998) p53 inhibits hypoxia-inducible factor-stimulated transcription. *J Biol Chem*, **273**, 11995-8.
24. Borgstahl, G.E., Williams, D.R. and Getzoff, E.D. (1995) 1.4 Å structure of photoactive yellow protein, a cytosolic photoreceptor: unusual fold, active site, and chromophore. *Biochemistry*, **34**, 6278-87.
25. Boyd, J.M., Malstrom, S., Subramanian, T., Venkatesh, L.K., Schaeper, U., Elangovan, B., D'Sa-Eipper, C. and Chinnadurai, G. (1994) Adenovirus E1B 19 kDa and Bcl-2 proteins interact with a common set of cellular proteins. *Cell*, **79**, 341-51.
26. Bradfield, C.A., Glover, E. and Poland, A. (1991) Purification and N-terminal amino acid sequence of the Ah receptor from the C57BL/6J mouse. *Mol Pharmacol*, **39**, 13-9.
27. Brogi, E., Wu, T., Namiki, A. and Isner, J.M. (1994) Indirect angiogenic cytokines upregulate VEGF and bFGF gene expression in vascular smooth muscle cells, whereas hypoxia upregulates VEGF expression only. *Circulation*, **90**, 649-52.

28. Brown, J.M. (2000) Exploiting the hypoxic cancer cell: mechanisms and therapeutic strategies. *Mol Med Today*, **6**, 157-62.
29. Bruick, R.K. (2000) Expression of the gene encoding the proapoptotic Nip3 protein is induced by hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 9082-7.
30. Budinger, G.R., Duranteau, J., Chandel, N.S. and Schumacker, P.T. (1998) Hibernation during hypoxia in cardiomyocytes. Role of mitochondria as the O₂ sensor. *J Biol Chem*, **273**, 3320-6.
31. Burbach, K.M., Poland, A. and Bradfield, C.A. (1992) Cloning of the Ah-receptor cDNA reveals a distinctive ligand-activated transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 8185-9.
32. Cabrera, C.V. and Alonso, M.C. (1991) Transcriptional activation by heterodimers of the achaete-scute and daughterless gene products of *Drosophila*. *Embo J*, **10**, 2965-73.
33. Canbolat, O., Fandrey, J. and Jelkmann, W. (1998) Effects of modulators of the production and degradation of hydrogen peroxide on erythropoietin synthesis. *Respir Physiol*, **114**, 175-83.
34. Carlstedt-Duke, J.M. (1979) Tissue distribution of the receptor for 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in the rat. *Cancer Res*, **39**, 3172-6.
35. Carmeliet, P., Dor, Y., Herbert, J.M., Fukumura, D., Brusselmans, K., Dewerchin, M., Neeman, M., Bono, F., Abramovitch, R., Maxwell, P., Koch, C.J., Ratcliffe, P., Moons, L., Jain, R.K., Collen, D., Keshert, E. and Keshet, E. (1998) Role of HIF-1 α in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis [published erratum appears in *Nature* 1998 Oct 1;395(6701):525]. *Nature*, **394**, 485-90.
36. Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G., Pollefeyt, S., Kieckens, L., Gertsenstein, M., Fahrig, M., Vandenhoek, A., Harpal, K., Eberhardt, C., Declercq, C., Pawling, J., Moons, L., Collen, D., Risau, W. and Nagy, A. (1996) Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*, **380**, 435-9.
37. Carmeliet, P. and Jain, R.K. (2000) Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, **407**, 249-57.
38. Carrero, P., Okamoto, K., Coumailleau, P., O'Brien, S., Tanaka, H. and Poellinger, L. (2000) Redox-regulated recruitment of the transcriptional coactivators CREB-binding protein and SRC-1 to hypoxia-inducible factor 1 α . *Mol Cell Biol*, **20**, 402-15.
39. Carroll, N.M., Chiocca, E.A., Takahashi, K. and Tanabe, K.K. (1996) Enhancement of gene therapy specificity for diffuse colon carcinoma liver metastases with recombinant herpes simplex virus. *Ann Surg*, **224**, 323-9; discussion 329-30.
40. Carver, L.A. and Bradfield, C.A. (1997) Ligand-dependent interaction of the aryl hydrocarbon receptor with a novel immunophilin homolog in vivo. *J Biol Chem*, **272**, 11452-6.
41. Carver, L.A., Hogenesch, J.B. and Bradfield, C.A. (1994) Tissue specific expression of the rat Ah-receptor and ARNT mRNAs. *Nucleic Acids Res*, **22**, 3038-44.
42. Chandel, N.S., Budinger, G.R., Choe, S.H. and Schumacker, P.T. (1997) Cellular respiration during hypoxia. Role of cytochrome oxidase as the oxygen sensor in hepatocytes. *J Biol Chem*, **272**, 18808-16.

43. Chandel, N.S., Maltepe, E., Goldwasser, E., Mathieu, C.E., Simon, M.C. and Schumacker, P.T. (1998) Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 11715-20.
44. Chandel, N.S., McClintock, D.S., Feliciano, C.E., Wood, T.M., Melendez, J.A., Rodriguez, A.M. and Schumacker, P.T. (2000) Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1 α during hypoxia: a mechanism of O₂ sensing. *J Biol Chem*, **275**, 25130-8.
45. Chandel, N.S. and Schumacker, P.T. (2000) Cellular oxygen sensing by mitochondria: old questions, new insight. *J Appl Physiol*, **88**, 1880-9.
46. Chen, C., Pore, N., Behrooz, A., Ismail-Beigi, F. and Maity, A. (2000) Regulation of glut1 mRNA by HIF-1: Interaction between H-ras and hypoxia. *J Biol Chem*.
47. Chen, G., Ray, R., Dubik, D., Shi, L., Cizeau, J., Bleackley, R.C., Saxena, S., Gietz, R.D. and Greenberg, A.H. (1997a) The E1B 19K/Bcl-2-binding protein Nip3 is a dimeric mitochondrial protein that activates apoptosis. *J Exp Med*, **186**, 1975-83.
48. Chen, H., Lin, R.J., Schiltz, R.L., Chakravarti, D., Nash, A., Nagy, L., Privalsky, M.L., Nakatani, Y. and Evans, R.M. (1997b) Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300. *Cell*, **90**, 569-80.
49. Cheng, W., Kajstura, J., Nitahara, J.A., Li, B., Reiss, K., Liu, Y., Clark, W.A., Krajewski, S., Reed, J.C., Olivetti, G. and Anversa, P. (1996) Programmed myocyte cell death affects the viable myocardium after infarction in rats. *Exp Cell Res*, **226**, 316-27.
50. Chrast, R., Scott, H.S., Chen, H., Kudoh, J., Rossier, C., Minoshima, S., Wang, Y., Shimizu, N. and Antonarakis, S.E. (1997) Cloning of two human homologs of the Drosophila single-minded gene SIM1 on chromosome 6q and SIM2 on 21q within the Down syndrome chromosomal region. *Genome Res*, **7**, 615-24.
51. Chu, T.H., Martinez, I., Sheay, W.C. and Dornburg, R. (1994) Cell targeting with retroviral vector particles containing antibody-envelope fusion proteins. *Gene Ther*, **1**, 292-9.
52. Ciechanover, A. (1998) The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. *Embo J*, **17**, 7151-60.
53. Ciechanover, A. and Schwartz, A.L. (1998) The ubiquitin-proteasome pathway: the complexity and myriad functions of proteins death. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 2727-30.
54. Cockman, M.E., Masson, N., Mole, D.R., Jaakkola, P., Chang, G.W., Clifford, S.C., Maher, E.R., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J. and Maxwell, P.H. (2000) Hypoxia inducible factor- α binding and ubiquitylation by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *J Biol Chem*, **275**, 25733-41.
55. Coumailleau, P., Poellinger, L., Gustafsson, J.A. and Whitelaw, M.L. (1995) Definition of a minimal domain of the dioxin receptor that is associated with Hsp90 and maintains wild type ligand binding affinity and specificity. *J Biol Chem*, **270**, 25291-300.
56. Cox, L.S. (1997) Multiple pathways control cell growth and transformation: overlapping and independent activities of p53 and p21Cip1/WAF1/Sdi1. *J Pathol*, **183**, 134-40.

57. Crews, S.T., Thomas, J.B. and Goodman, C.S. (1988) The *Drosophila* single-minded gene encodes a nuclear protein with sequence similarity to the *per* gene product. *Cell*, **52**, 143-51.
58. Croft, L., Schandorff, S., Clark, F., Burrage, K., Arctander, P. and Mattick, J.S. (2000) ISIS, the intron information system, reveals the high frequency of alternative splicing in the human genome. *Nat Genet*, **24**, 340-1.
59. Dachs, G.U., Dougherty, G.J., Stratford, I.J. and Chaplin, D.J. (1997) Targeting gene therapy to cancer: a review. *Oncol Res*, **9**, 313-25.
60. Dang, C.V., Lewis, B.C., Dolde, C., Dang, G. and Shim, H. (1997) Oncogenes in tumor metabolism, tumorigenesis, and apoptosis. *J Bioenerg Biomembr*, **29**, 345-54.
61. Davarinos, N.A. and Pollenz, R.S. (1999) Aryl hydrocarbon receptor imported into the nucleus following ligand binding is rapidly degraded via the cytoplasmic proteasome following nuclear export. *J Biol Chem*, **274**, 28708-15.
62. de Caestecker, M.P., Yahata, T., Wang, D., Parks, W.T., Huang, S., Hill, C.S., Shioda, T., Roberts, A.B. and Lechleider, R.J. (2000) The Smad4 activation domain (SAD) is a proline-rich, p300-dependent transcriptional activation domain. *J Biol Chem*, **275**, 2115-22.
63. Dolwick, K.M., Schmidt, J.V., Carver, L.A., Swanson, H.I. and Bradfield, C.A. (1993) Cloning and expression of a human Ah receptor cDNA. *Mol Pharmacol*, **44**, 911-7.
64. Donehower, L.A., Harvey, M., Slagle, B.L., McArthur, M.J., Montgomery, C.A., Jr., Butel, J.S. and Bradley, A. (1992) Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature*, **356**, 215-21.
65. Dong, Z., Venkatachalam, M.A., Wang, J., Patel, Y., Saikumar, P., Semenza, G.L., Force, T. and Nishiyama, J. (2001) Up-regulation of apoptosis inhibitory protein IAP-2 by hypoxia. Hif-1-independent mechanisms. *J Biol Chem*, **276**, 18702-9.
66. Drutel, G., Kathmann, M., Heron, A., Gros, C., Mace, S., Schwartz, J.C. and Arrang, J.M. (2000) Two splice variants of the hypoxia-inducible factor HIF-1alpha as potential dimerization partners of ARNT2 in neurons [In Process Citation]. *Eur J Neurosci*, **12**, 3701-8.
67. Drutel, G., Kathmann, M., Heron, A., Schwartz, J.C. and Arrang, J.M. (1996) Cloning and selective expression in brain and kidney of ARNT2 homologous to the Ah receptor nuclear translocator (ARNT). *Biochem Biophys Res Commun*, **225**, 333-9.
68. Dunlap, J. (1998) Circadian rhythms. An end in the beginning. *Science*, **280**, 1548-9.
69. Dunlap, J.C. (1999) Molecular bases for circadian clocks. *Cell*, **96**, 271-90.
70. Ebert, B.L. and Bunn, H.F. (1998) Regulation of transcription by hypoxia requires a multiprotein complex that includes hypoxia-inducible factor 1, an adjacent transcription factor, and p300/CREB binding protein. *Mol Cell Biol*, **18**, 4089-96.
71. Edery, I., Zwiebel, L.J., Dembinska, M.E. and Rosbash, M. (1994) Temporal phosphorylation of the *Drosophila* period protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 2260-4.

72. Eguchi, H., Ikuta, T., Tachibana, T., Yoneda, Y. and Kawajiri, K. (1997) A nuclear localization signal of human aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator/hypoxia-inducible factor 1beta is a novel bipartite type recognized by the two components of nuclear pore-targeting complex. *J Biol Chem*, **272**, 17640-7.
73. Ehleben, W., Bolling, B., Merten, E., Porwol, T., Strohmaier, A.R. and Acker, H. (1998) Cytochromes and oxygen radicals as putative members of the oxygen sensing pathway. *Respir Physiol*, **114**, 25-36.
74. Ehleben, W., Porwol, T., Fandrey, J., Kummer, W. and Acker, H. (1997) Cobalt and desferrioxamine reveal crucial members of the oxygen sensing pathway in HepG2 cells. *Kidney Int*, **51**, 483-91.
75. Ema, M., Hirota, K., Mimura, J., Abe, H., Yodoi, J., Sogawa, K., Poellinger, L. and Fujii-Kuriyama, Y. (1999) Molecular mechanisms of transcription activation by HLF and HIF1alpha in response to hypoxia: their stabilization and redox signal-induced interaction with CBP/p300. *Embo J*, **18**, 1905-14.
76. Ema, M., Matsushita, N., Sogawa, K., Ariyama, T., Inazawa, J., Nemoto, T., Ota, M., Oshimura, M. and Fujii-Kuriyama, Y. (1994) Human arylhydrocarbon receptor: functional expression and chromosomal assignment to 7p21. *J Biochem (Tokyo)*, **116**, 845-51.
77. Ema, M., Morita, M., Ikawa, S., Tanaka, M., Matsuda, Y., Gotoh, O., Saijoh, Y., Fujii, H., Hamada, H., Kikuchi, Y. and Fujii-Kuriyama, Y. (1996a) Two new members of the murine Sim gene family are transcriptional repressors and show different expression patterns during mouse embryogenesis. *Mol Cell Biol*, **16**, 5865-75.
78. Ema, M., Sogawa, K., Watanabe, N., Chujoh, Y., Matsushita, N., Gotoh, O., Funae, Y. and Fujii-Kuriyama, Y. (1992) cDNA cloning and structure of mouse putative Ah receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, **184**, 246-53.
79. Ema, M., Suzuki, M., Morita, M., Hirose, K., Sogawa, K., Matsuda, Y., Gotoh, O., Saijoh, Y., Fujii, H., Hamada, H. and Fujii-Kuriyama, Y. (1996b) cDNA cloning of a murine homologue of Drosophila single-minded, its mRNA expression in mouse development, and chromosome localization. *Biochem Biophys Res Commun*, **218**, 588-94.
80. Ema, M., Taya, S., Yokotani, N., Sogawa, K., Matsuda, Y. and Fujii-Kuriyama, Y. (1997) A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1alpha regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 4273-8.
81. Emmons, R.B., Duncan, D., Estes, P.A., Kiefel, P., Mosher, J.T., Sonnenfeld, M., Ward, M.P., Duncan, I. and Crews, S.T. (1999) The spineless-aristapedia and tango bHLH-PAS proteins interact to control antennal and tarsal development in Drosophila. *Development*, **126**, 3937-45.
82. Fan, C.M., Kuwana, E., Bulfone, A., Fletcher, C.F., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Crews, S., Martinez, S., Puellas, L., Rubenstein, J.L. and Tessier-Lavigne, M. (1996) Expression patterns of two murine homologs of Drosophila single-minded suggest possible roles in embryonic patterning and in the pathogenesis of Down syndrome. *Mol Cell Neurosci*, **7**, 1-16.

83. Fandrey, J., Frede, S., Ehleben, W., Porwol, T., Acker, H. and Jelkmann, W. (1997) Cobalt chloride and desferrioxamine antagonize the inhibition of erythropoietin production by reactive oxygen species. *Kidney Int*, **51**, 492-6.
84. Fandrey, J., Frede, S. and Jelkmann, W. (1994) Role of hydrogen peroxide in hypoxia-induced erythropoietin production. *Biochem J*, **303**, 507-10.
85. Fandrey, J., Seydel, F.P., Siegers, C.P. and Jelkmann, W. (1990) Role of cytochrome P450 in the control of the production of erythropoietin. *Life Sci*, **47**, 127-34.
86. Feldser, D., Agani, F., Iyer, N.V., Pak, B., Ferreira, G. and Semenza, G.L. (1999) Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha and insulin-like growth factor 2. *Cancer Res*, **59**, 3915-8.
87. Ferrara, N., Carver-Moore, K., Chen, H., Dowd, M., Lu, L., O'Shea, K.S., Powell-Braxton, L., Hillan, K.J. and Moore, M.W. (1996) Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature*, **380**, 439-42.
88. Fjeld, C.C., Rice, A.E., Kim, Y., Gee, K.R. and Denu, J.M. (2000) Mechanistic basis for catalytic activation of mitogen-activated protein kinase phosphatase 3 by extracellular signal-regulated kinase. *J Biol Chem*, **275**, 6749-57.
89. Flamme, I., Frohlich, T., von Reutern, M., Kappel, A., Damert, A. and Risau, W. (1997) HRF, a putative basic helix-loop-helix-PAS-domain transcription factor is closely related to hypoxia-inducible factor-1 alpha and developmentally expressed in blood vessels. *Mech Dev*, **63**, 51-60.
90. Franks, R.G. and Crews, S.T. (1994) Transcriptional activation domains of the single-minded bHLH protein are required for CNS midline cell development. *Mech Dev*, **45**, 269-77.
91. Fu, W., Jack, R.F., Morgan, T.V., Dean, D.R. and Johnson, M.K. (1994) nifU gene product from *Azotobacter vinelandii* is a homodimer that contains two identical [2Fe-2S] clusters. *Biochemistry*, **33**, 13455-63.
92. Fukunaga, B.N., Probst, M.R., Reisz-Porszasz, S. and Hankinson, O. (1995) Identification of functional domains of the aryl hydrocarbon receptor. *J Biol Chem*, **270**, 29270-8.
93. Galson, D.L., Tsuchiya, T., Tendler, D.S., Huang, L.E., Ren, Y., Ogura, T. and Bunn, H.F. (1995) The orphan receptor hepatic nuclear factor 4 functions as a transcriptional activator for tissue-specific and hypoxia-specific erythropoietin gene expression and is antagonized by EAR3/COUP-TF1. *Mol Cell Biol*, **15**, 2135-44.
94. Garceau, N.Y., Liu, Y., Loros, J.J. and Dunlap, J.C. (1997) Alternative initiation of translation and time-specific phosphorylation yield multiple forms of the essential clock protein FREQUENCY. *Cell*, **89**, 469-76.
95. Genick, U.K., Borgstahl, G.E., Ng, K., Ren, Z., Pradervand, C., Burke, P.M., Srajer, V., Teng, T.Y., Schildkamp, W., McRee, D.E., Moffat, K. and Getzoff, E.D. (1997) Structure of a protein photocycle intermediate by millisecond time-resolved crystallography. *Science*, **275**, 1471-5.
96. Genick, U.K., Soltis, S.M., Kuhn, P., Canestrelli, I.L. and Getzoff, E.D. (1998) Structure at 0.85 Å resolution of an early protein photocycle intermediate. *Nature*, **392**, 206-9.

97. Giannone, J.V., Li, W., Probst, M. and Okey, A.B. (1998) Prolonged depletion of AH receptor without alteration of receptor mRNA levels after treatment of cells in culture with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Biochem Pharmacol*, **55**, 489-97.
98. Gilles-Gonzalez, M.A., Gonzalez, G., Perutz, M.F., Kiger, L., Marden, M.C. and Poyart, C. (1994) Heme-based sensors, exemplified by the kinase FixL, are a new class of heme protein with distinctive ligand binding and autooxidation. *Biochemistry*, **33**, 8067-73.
99. Gleadle, J.M., Ebert, B.L. and Ratcliffe, P.J. (1995) Diphenylene iodonium inhibits the induction of erythropoietin and other mammalian genes by hypoxia. Implications for the mechanism of oxygen sensing. *Eur J Biochem*, **234**, 92-9.
100. Glenn, D.J. and Maurer, R.A. (1999) MRG1 binds to the LIM domain of Lhx2 and may function as a coactivator to stimulate glycoprotein hormone alpha-subunit gene expression. *J Biol Chem*, **274**, 36159-67.
101. Goldberg, M.A., Dunning, S.P. and Bunn, H.F. (1988) Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein. *Science*, **242**, 1412-5.
102. Goldberg, M.A., Gaut, C.C. and Bunn, H.F. (1991) Erythropoietin mRNA levels are governed by both the rate of gene transcription and posttranscriptional events. *Blood*, **77**, 271-7.
103. Goldberg, M.A., Glass, G.A., Cunningham, J.M. and Bunn, H.F. (1987) The regulated expression of erythropoietin by two human hepatoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 7972-6.
104. Goldberg, M.A. and Schneider, T.J. (1994) Similarities between the oxygen-sensing mechanisms regulating the expression of vascular endothelial growth factor and erythropoietin. *J Biol Chem*, **269**, 4355-9.
105. Gong, W., Hao, B., Mansy, S.S., Gonzalez, G., Gilles-Gonzalez, M.A. and Chan, M.K. (1998) Structure of a biological oxygen sensor: a new mechanism for heme-driven signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 15177-82.
106. Gothie, E., Richard, D.E., Berra, E., Pages, G. and Pouyssegur, J. (2000) Identification of alternative spliced variants of human hypoxia-inducible factor-1alpha. *J Biol Chem*, **275**, 6922-7.
107. Gradin, K., McGuire, J., Wenger, R.H., Kvietikova, I., Whitelaw, M.L., Toftgard, R., Tora, L., Gassmann, M. and Poellinger, L. (1996) Functional interference between hypoxia and dioxin signal transduction pathways: competition for recruitment of the Arnt transcription factor. *Mol Cell Biol*, **16**, 5221-31.
108. Graeber, T.G., Osmanian, C., Jacks, T., Housman, D.E., Koch, C.J., Lowe, S.W. and Giaccia, A.J. (1996) Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature*, **379**, 88-91.
109. Greenblatt, M.S., Bennett, W.P., Hollstein, M. and Harris, C.C. (1994) Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res*, **54**, 4855-78.
110. Gu, J., Milligan, J. and Huang, L.E. (2000) Molecular mechanism of HIF1{alpha}-p300 interaction: A leucine-rich interface regulated by a single cysteine. *J Biol Chem*, **274**, 23.

111. Gu, W. and Roeder, R.G. (1997) Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell*, **90**, 595-606.
112. Gu, Y.Z., Moran, S.M., Hogenesch, J.B., Wartman, L. and Bradfield, C.A. (1998) Molecular characterization and chromosomal localization of a third alpha-class hypoxia inducible factor subunit, HIF3alpha. *Gene Expr*, **7**, 205-13.
113. Guillemin, K. and Krasnow, M.A. (1997) The hypoxic response: huffing and HIFing. *Cell*, **89**, 9-12.
114. Hahn, M.E., Karchner, S.I., Shapiro, M.A. and Perera, S.A. (1997) Molecular evolution of two vertebrate aryl hydrocarbon (dioxin) receptors (AHR1 and AHR2) and the PAS family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 13743-8.
115. Hall, J.C. (1998) Genetics of biological rhythms in drosophila. *Adv Genet*, **38**, 135-84.
116. Halterman, M.W. and Federoff, H.J. (1999) HIF-1alpha and p53 promote hypoxia-induced delayed neuronal death in models of CNS ischemia. *Exp Neurol*, **159**, 65-72.
117. Halterman, M.W., Miller, C.C. and Federoff, H.J. (1999) Hypoxia-inducible factor-1alpha mediates hypoxia-induced delayed neuronal death that involves p53. *J Neurosci*, **19**, 6818-24.
118. Hankinson, O. (1995) The aryl hydrocarbon receptor complex. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **35**, 307-40.
119. Harder, D.R., Narayanan, J., Birks, E.K., Liard, J.F., Imig, J.D., Lombard, J.H., Lange, A.R. and Roman, R.J. (1996) Identification of a putative microvascular oxygen sensor. *Circ Res*, **79**, 54-61.
120. Hardin, P.E., Hall, J.C. and Rosbash, M. (1990) Feedback of the Drosophila period gene product on circadian cycling of its messenger RNA levels. *Nature*, **343**, 536-40.
121. Hardin, P.E., Hall, J.C. and Rosbash, M. (1992) Circadian oscillations in period gene mRNA levels are transcriptionally regulated. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 11711-5.
122. Heery, D.M., Kalkhoven, E., Hoare, S. and Parker, M.G. (1997) A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature*, **387**, 733-6.
123. Hill, S., Austin, S., Eydmann, T., Jones, T. and Dixon, R. (1996) Azotobacter vinelandii NIFL is a flavoprotein that modulates transcriptional activation of nitrogen-fixation genes via a redox-sensitive switch. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 2143-8.
124. Hirose, K., Morita, M., Ema, M., Mimura, J., Hamada, H., Fujii, H., Saijo, Y., Gotoh, O., Sogawa, K. and Fujii-Kuriyama, Y. (1996) cDNA cloning and tissue-specific expression of a novel basic helix-loop-helix/PAS factor (Arnt2) with close sequence similarity to the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (Arnt). *Mol Cell Biol*, **16**, 1706-13.
125. Hoffman, E.C., Reyes, H., Chu, F.F., Sander, F., Conley, L.H., Brooks, B.A. and Hankinson, O. (1991) Cloning of a factor required for activity of the Ah (dioxin) receptor. *Science*, **252**, 954-8.
126. Hogenesch, J.B., Chan, W.K., Jackiw, V.H., Brown, R.C., Gu, Y.Z., Pray-Grant, M., Perdew, G.H. and Bradfield, C.A. (1997) Characterization of a subset of the basic-helix-loop-helix-PAS superfamily that interacts with components of the dioxin signaling pathway. *J Biol Chem*, **272**, 8581-93.

- 127.Hogenesch, J.B., Gu, Y.Z., Jain, S. and Bradfield, C.A. (1998) The basic-helix-loop-helix-PAS orphan MOP3 forms transcriptionally active complexes with circadian and hypoxia factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 5474-9.
- 128.Hogenesch, J.B., Gu, Y.Z., Moran, S.M., Shimomura, K., Radcliffe, L.A., Takahashi, J.S. and Bradfield, C.A. (2000) The basic helix-loop-helix-PAS protein MOP9 is a brain-specific heterodimeric partner of circadian and hypoxia factors. *J Neurosci (Online)*, **20**, RC83.
- 129.Holmes, J.L. and Pollenz, R.S. (1997) Determination of aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein concentration and subcellular localization in hepatic and nonhepatic cell culture lines: development of quantitative Western blotting protocols for calculation of aryl hydrocarbon receptor and aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein in total cell lysates. *Mol Pharmacol*, **52**, 202-11.
- 130.Huang, L.E., Arany, Z., Livingston, D.M. and Bunn, H.F. (1996) Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit. *J Biol Chem*, **271**, 32253-9.
- 131.Huang, L.E., Gu, J., Schau, M. and Bunn, H.F. (1998) 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**, 7987-92.
- 132.Huang, L.E., Ho, V., Arany, Z., Krainc, D., Galson, D., Tendler, D., Livingston, D.M. and Bunn, H.F. (1997) Erythropoietin gene regulation depends on heme-dependent oxygen sensing and assembly of interacting transcription factors. *Kidney Int*, **51**, 548-52.
- 133.Huang, L.E., Willmore, W.G., Gu, J., Goldberg, M.A. and Bunn, H.F. (1999) Inhibition of hypoxia-inducible factor 1 activation by carbon monoxide and nitric oxide. Implications for oxygen sensing and signaling. *J Biol Chem*, **274**, 9038-44.
- 134.Huang, Z.J., Edery, I. and Rosbash, M. (1993) PAS is a dimerization domain common to Drosophila period and several transcription factors. *Nature*, **364**, 259-62.
- 135.Ikeda, M. and Nomura, M. (1997) cDNA cloning and tissue-specific expression of a novel basic helix-loop-helix/PAS protein (BMAL1) and identification of alternatively spliced variants with alternative translation initiation site usage. *Biochem Biophys Res Commun*, **233**, 258-64.
- 136.Ikuta, T., Eguchi, H., Tachibana, T., Yoneda, Y. and Kawajiri, K. (1998) Nuclear localization and export signals of the human aryl hydrocarbon receptor. *J Biol Chem*, **273**, 2895-904.
- 137.Imhof, A., Yang, X.J., Ogryzko, V.V., Nakatani, Y., Wolffe, A.P. and Ge, H. (1997) Acetylation of general transcription factors by histone acetyltransferases. *Curr Biol*, **7**, 689-92.
- 138.Isaac, D.D. and Andrew, D.J. (1996) Tubulogenesis in Drosophila: a requirement for the tracheless gene product. *Genes Dev*, **10**, 103-17.
- 139.Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., Kim, W., Valiando, J., Ohh, M., Salic, A., Asara, J.M., Lane, W.S. and Kaelin Jr., W.G. (2001) HIF alpha Targeted for VHL-Mediated Destruction by Proline Hydroxylation: Implications for O₂ Sensing. *Published online/www.sciencexpress.org /, 5 April 2001;10.1126/science.1059817.*

140. Iwai, K., Drake, S.K., Wehr, N.B., Weissman, A.M., LaVaute, T., Minato, N., Klausner, R.D., Levine, R.L. and Rouault, T.A. (1998) Iron-dependent oxidation, ubiquitination, and degradation of iron regulatory protein 2: implications for degradation of oxidized proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 4924-8.
141. Iwai, K., Yamanaka, K., Kamura, T., Minato, N., Conaway, R.C., Conaway, J.W., Klausner, R.D. and Pause, A. (1999) Identification of the von Hippel-lindau tumor-suppressor protein as part of an active E3 ubiquitin ligase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 12436-41.
142. Iyer, N.V., Kotch, L.E., Agani, F., Leung, S.W., Laughner, E., Wenger, R.H., Gassmann, M., Gearhart, J.D., Lawler, A.M., Yu, A.Y. and Semenza, G.L. (1998a) Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes Dev*, **12**, 149-62.
143. Iyer, N.V., Leung, S.W. and Semenza, G.L. (1998b) The human hypoxia-inducible factor 1alpha gene: HIF1A structure and evolutionary conservation. *Genomics*, **52**, 159-65.
144. Jaakkola, P., Mole, D.R., Tian, Y., Wilson, M.I., Gielbert, J., Gaskell, S.J., Kriegsheim, A., Hebestreit, H.F., Mukherji, M., Schofield, C.J., Maxwell, P.H., Pugh, C.W. and Ratcliffe, P.J. (2001) Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau Ubiquitylation Complex by O₂-Regulated Prolyl Hydroxylation. *Published online/www.sciencexpress.org /*, 5 April 2001;10.1126/science.1059796.
145. Jain, S., Dolwick, K.M., Schmidt, J.V. and Bradfield, C.A. (1994) Potent transactivation domains of the Ah receptor and the Ah receptor nuclear translocator map to their carboxyl termini. *J Biol Chem*, **269**, 31518-24.
146. Jayaraman, L., Murthy, K.G., Zhu, C., Curran, T., Xanthoudakis, S. and Prives, C. (1997) Identification of redox/repair protein Ref-1 as a potent activator of p53. *Genes Dev*, **11**, 558-70.
147. Jelkmann, W., Huwiler, A., Fandrey, J. and Pfeilschifter, J. (1991) Inhibition of erythropoietin production by phorbol ester is associated with down-regulation of protein kinase C-alpha isoenzyme in hepatoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **179**, 1441-8.
148. Jiang, B.H., Agani, F., Passaniti, A. and Semenza, G.L. (1997a) V-SRC induces expression of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and transcription of genes encoding vascular endothelial growth factor and enolase 1: involvement of HIF-1 in tumor progression. *Cancer Res*, **57**, 5328-35.
149. Jiang, B.H., Rue, E., Wang, G.L., Roe, R. and Semenza, G.L. (1996) Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem*, **271**, 17771-8.
150. Jiang, B.H., Zheng, J.Z., Leung, S.W., Roe, R. and Semenza, G.L. (1997b) Transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor 1alpha. Modulation of transcriptional activity by oxygen tension. *J Biol Chem*, **272**, 19253-60.
151. Kaelin, W.G., Jr. (1999) Cancer. Many vessels, faulty gene [news; comment]. *Nature*, **399**, 203-4.
152. Kallio, P.J., Okamoto, K., O'Brien, S., Carrero, P., Makino, Y., Tanaka, H. and Poellinger, L. (1998) Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1alpha. *Embo J*, **17**, 6573-86.

153. Kallio, P.J., Pongratz, I., Gradin, K., McGuire, J. and Poellinger, L. (1997) Activation of hypoxia-inducible factor 1 α : posttranscriptional regulation and conformational change by recruitment of the Arnt transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 5667-72.
154. Kallio, P.J., Wilson, W.J., O'Brien, S., Makino, Y. and Poellinger, L. (1999) Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1 α by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem*, **274**, 6519-25.
155. Karchner, S.I., Powell, W.H. and Hahn, M.E. (1999) Identification and functional characterization of two highly divergent aryl hydrocarbon receptors (AHR1 and AHR2) in the teleost *Fundulus heteroclitus*. Evidence for a novel subfamily of ligand-binding basic helix loop helix-Per-ARNT-Sim (bHLH-PAS) factors. *J Biol Chem*, **274**, 33814-24.
156. Kasahara, N., Dozy, A.M. and Kan, Y.W. (1994) Tissue-specific targeting of retroviral vectors through ligand-receptor interactions. *Science*, **266**, 1373-6.
157. Kay, S.A. (1997) PAS, present, and future: clues to the origins of circadian clocks. *Science*, **276**, 753-4.
158. Kazlauskas, A., Poellinger, L. and Pongratz, I. (1999) Evidence that the co-chaperone p23 regulates ligand responsiveness of the dioxin (Aryl hydrocarbon) receptor. *J Biol Chem*, **274**, 13519-24.
159. Kietzmann, T., Porwol, T., Zierold, K., Jungermann, K. and Acker, H. (1998) Involvement of a local fenton reaction in the reciprocal modulation by O₂ of the glucagon-dependent activation of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene and the insulin-dependent activation of the glucokinase gene in rat hepatocytes. *Biochem J*, **335**, 425-32.
160. Kimura, H., Weisz, A., Kurashima, Y., Hashimoto, K., Ogura, T., D'Acquisto, F., Addeo, R., Makuuchi, M. and Esumi, H. (2000) Hypoxia response element of the human vascular endothelial growth factor gene mediates transcriptional regulation by nitric oxide: control of hypoxia-inducible factor-1 activity by nitric oxide. *Blood*, **95**, 189-97.
161. King, D.P., Zhao, Y., Sangoram, A.M., Wilsbacher, L.D., Tanaka, M., Antoch, M.P., Steeves, T.D., Vitaterna, M.H., Kornhauser, J.M., Lowrey, P.L., Turek, F.W. and Takahashi, J.S. (1997) Positional cloning of the mouse circadian clock gene. *Cell*, **89**, 641-53.
162. Kobayashi, A., Numayama-Tsuruta, K., Sogawa, K. and Fujii-Kuriyama, Y. (1997) CBP/p300 functions as a possible transcriptional coactivator of Ah receptor nuclear translocator (Arnt). *J Biochem (Tokyo)*, **122**, 703-10.
163. Koumenis, C., Alarcon, R., Hammond, E., Sutphin, P., Hoffman, W., Murphy, M., Derr, J., Taya, Y., Lowe, S.W., Kastan, M. and Giaccia, A. (2001) Regulation of p53 by Hypoxia: Dissociation of Transcriptional Repression and Apoptosis from p53-Dependent Transactivation. *Mol Cell Biol*, **21**, 1297-1310.
164. Koury, S.T., Bondurant, M.C. and Koury, M.J. (1988) Localization of erythropoietin synthesizing cells in murine kidneys by in situ hybridization. *Blood*, **71**, 524-7.
165. Koury, S.T., Koury, M.J., Bondurant, M.C., Caro, J. and Graber, S.E. (1989) Quantitation of erythropoietin-producing cells in kidneys of mice by in situ hybridization: correlation with hematocrit, renal erythropoietin mRNA, and serum erythropoietin concentration. *Blood*, **74**, 645-51.

- 166.Kumagai, T., Tanio, Y., Osaki, T., Hosoe, S., Tachibana, I., Ueno, K., Kijima, T., Horai, T. and Kishimoto, T. (1996) Eradication of Myc-overexpressing small cell lung cancer cells transfected with herpes simplex virus thymidine kinase gene containing Myc-Max response elements. *Cancer Res*, **56**, 354-8.
- 167.Kung, A.L., Wang, S., Klco, J.M., Kaelin, W.G. and Livingston, D.M. (2000) Suppression of tumor growth through disruption of hypoxia-inducible transcription. *Nat Med*, **6**, 1335-40.
- 168.Ladoux, A. and Frelin, C. (1997) Cardiac expressions of HIF-1 alpha and HLF/EPAS, two basic loop helix/PAS domain transcription factors involved in adaptative responses to hypoxic stresses. *Biochem Biophys Res Commun*, **240**, 552-6.
- 169.Lagarias, D.M., Wu, S.H. and Lagarias, J.C. (1995) Atypical phytochrome gene structure in the green alga *Mesotaenium caldariorum*. *Plant Mol Biol*, **29**, 1127-42.
- 170.Lahiri, S., Buerk, D.G., Chugh, D., Osanai, S. and Mokashi, A. (1995) Reciprocal photolabile O₂ consumption and chemoreceptor excitation by carbon monoxide in the cat carotid body: evidence for cytochrome a₃ as the primary O₂ sensor. *Brain Res*, **684**, 194-200.
- 171.Lee, C., Bae, K. and Edery, I. (1999) PER and TIM inhibit the DNA binding activity of a Drosophila CLOCK-CYC/DBMAL1 heterodimer without disrupting formation of the heterodimer: a basis for circadian transcription. *Mol Cell Biol*, **19**, 5316-25.
- 172.Lees, M.J. and Whitelaw, M.L. (1999) Multiple roles of ligand in transforming the dioxin receptor to an active basic helix-loop-helix/PAS transcription factor complex with the nuclear protein Arnt. *Mol Cell Biol*, **19**, 5811-22.
- 173.Lenormand, P., McMahon, M. and Pouyssegur, J. (1996) Oncogenic Raf-1 activates p70 S6 kinase via a mitogen-activated protein kinase-independent pathway. *J Biol Chem*, **271**, 15762-8.
- 174.Li, H., Dong, L. and Whitlock, J.P., Jr. (1994) Transcriptional activation function of the mouse Ah receptor nuclear translocator. *J Biol Chem*, **269**, 28098-105.
- 175.Li, H., Ko, H.P. and Whitlock, J.P. (1996) Induction of phosphoglycerate kinase 1 gene expression by hypoxia. Roles of Arnt and HIF1alpha. *J Biol Chem*, **271**, 21262-7.
- 176.Li, J., Post, M., Volk, R., Gao, Y., Li, M., Metais, C., Sato, K., Tsai, J., Aird, W., Rosenberg, R.D., Hampton, T.G., Sellke, F., Carmeliet, P. and Simons, M. (2000) PR39, a peptide regulator of angiogenesis [published erratum appears in Nat Med 2000 Mar;6(3):356]. *Nat Med*, **6**, 49-55.
- 177.Li, S.Y. and Dougherty, J.J. (1997) Inhibitors of serine/threonine-specific protein phosphatases stimulate transcription by the Ah receptor/Arnt dimer by affecting a step subsequent to XRE binding. *Arch Biochem Biophys*, **340**, 73-82.
- 178.Liebermann, D.A., Hoffman, B. and Steinman, R.A. (1995) Molecular controls of growth arrest and apoptosis: p53-dependent and independent pathways. *Oncogene*, **11**, 199-210.
- 179.Lisztwan, J., Imbert, G., Wirbelauer, C., Gstaiger, M. and Krek, W. (1999) The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein is a component of an E3 ubiquitin-protein ligase activity. *Genes Dev*, **13**, 1822-33.

180. Littlewood, T.D. and Evan, G.I. (1995) Transcription factors 2: helix-loop-helix. *Protein Profile*, **2**, 621-702.
181. Liu, Y., Christou, H., Morita, T., Laughner, E., Semenza, G.L. and Kourembanas, S. (1998) Carbon monoxide and nitric oxide suppress the hypoxic induction of vascular endothelial growth factor gene via the 5' enhancer. *J Biol Chem*, **273**, 15257-62.
182. Lonergan, K.M., Iliopoulos, O., Ohh, M., Kamura, T., Conaway, R.C., Conaway, J.W. and Kaelin, W.G. (1998) Regulation of hypoxia-inducible mRNAs by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein requires binding to complexes containing elongins B/C and Cul2. *Mol Cell Biol*, **18**, 732-41.
183. Long, W.P., Chen, X. and Perdew, G.H. (1999) Protein kinase C modulates aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein-mediated transactivation potential in a dimer context. *J Biol Chem*, **274**, 12391-400.
184. Lopez, A.J. (1998) Alternative splicing of pre-mRNA: developmental consequences and mechanisms of regulation. *Annu Rev Genet*, **32**, 279-305.
185. Lundblad, J.R., Kwok, R.P., Laurance, M.E., Harter, M.L. and Goodman, R.H. (1995) Adenoviral E1A-associated protein p300 as a functional homologue of the transcriptional co-activator CBP. *Nature*, **374**, 85-8.
186. Luo, G., Gu, Y.Z., Jain, S., Chan, W.K., Carr, K.M., Hogenesch, J.B. and Bradfield, C.A. (1997) Molecular characterization of the murine Hif-1 alpha locus. *Gene Expr*, **6**, 287-99.
187. Ma, Q. and Whitlock, J.P., Jr. (1997) A novel cytoplasmic protein that interacts with the Ah receptor, contains tetratricopeptide repeat motifs, and augments the transcriptional response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *J Biol Chem*, **272**, 8878-84.
188. Mahon, M.J. and Gasiewicz, T.A. (1995) Ah receptor phosphorylation: localization of phosphorylation sites to the C-terminal half of the protein. *Arch Biochem Biophys*, **318**, 166-74.
189. Maltepe, E., Schmidt, J.V., Baunoch, D., Bradfield, C.A. and Simon, M.C. (1997) Abnormal angiogenesis and responses to glucose and oxygen deprivation in mice lacking the protein ARNT. *Nature*, **386**, 403-7.
190. Manning, G. and Krasnow, M.A. (1993) *Development of Drosophila tracheal system*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
191. Maxwell, P.H., Dachs, G.U., Gleadle, J.M., Nicholls, L.G., Harris, A.L., Stratford, I.J., Hankinson, O., Pugh, C.W. and Ratcliffe, P.J. (1997) Hypoxia-inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 8104-9.
192. Maxwell, P.H., Wiesener, M.S., Chang, G.W., Clifford, S.C., Vaux, E.C., Cockman, M.E., Wykoff, C.C., Pugh, C.W., Maher, E.R. and Ratcliffe, P.J. (1999) The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*, **399**, 271-5.
193. Mazure, N.M., Chen, E.Y., Laderoute, K.R. and Giaccia, A.J. (1997) Induction of vascular endothelial growth factor by hypoxia is modulated by a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway in Ha-ras-transformed cells through a hypoxia inducible factor-1 transcriptional element. *Blood*, **90**, 3322-31.

194. McGuire, J., Coumailleau, P., Whitelaw, M.L., Gustafsson, J.A. and Poellinger, L. (1995) The basic helix-loop-helix/PAS factor Sim is associated with hsp90. Implications for regulation by interaction with partner factors. *J Biol Chem*, **270**, 31353-7.
195. McGuire, J., Whitelaw, M.L., Pongratz, I., Gustafsson, J.A. and Poellinger, L. (1994) A cellular factor stimulates ligand-dependent release of hsp90 from the basic helix-loop-helix dioxin receptor. *Mol Cell Biol*, **14**, 2438-46.
196. Meyer, B.K. and Perdew, G.H. (1999) Characterization of the AhR-hsp90-XAP2 core complex and the role of the immunophilin-related protein XAP2 in AhR stabilization. *Biochemistry*, **38**, 8907-17.
197. Meyer, B.K., Pray-Grant, M.G., Vanden Heuvel, J.P. and Perdew, G.H. (1998) Hepatitis B virus X-associated protein 2 is a subunit of the unliganded aryl hydrocarbon receptor core complex and exhibits transcriptional enhancer activity. *Mol Cell Biol*, **18**, 978-88.
198. Milanini, J., Vinals, F., Pouyssegur, J. and Pages, G. (1998) p42/p44 MAP kinase module plays a key role in the transcriptional regulation of the vascular endothelial growth factor gene in fibroblasts. *J Biol Chem*, **273**, 18165-72.
199. Minet, E., Mottet, D., Michel, G., Roland, I., Raes, M., Remacle, J. and Michiels, C. (1999) Hypoxia-induced activation of HIF-1: role of HIF-1 α -Hsp90 interaction. *FEBS Lett*, **460**, 251-6.
200. Moffett, P., Dayo, M., Reece, M., McCormick, M.K. and Pelletier, J. (1996) Characterization of msim, a murine homologue of the Drosophila sim transcription factor. *Genomics*, **35**, 144-55.
201. Moffett, P. and Pelletier, J. (2000) Different transcriptional properties of mSim-1 and mSim-2. *FEBS Lett*, **466**, 80-6.
202. Moffett, P., Reece, M. and Pelletier, J. (1997) The murine Sim-2 gene product inhibits transcription by active repression and functional interference. *Mol Cell Biol*, **17**, 4933-47.
203. Monson, E.K., Ditta, G.S. and Helinski, D.R. (1995) The oxygen sensor protein, FixL, of *Rhizobium meliloti*. Role of histidine residues in heme binding, phosphorylation, and signal transduction. *J Biol Chem*, **270**, 5243-50.
204. Morais Cabral, J.H., Lee, A., Cohen, S.L., Chait, B.T., Li, M. and Mackinnon, R. (1998) Crystal structure and functional analysis of the HERG potassium channel N terminus: a eukaryotic PAS domain. *Cell*, **95**, 649-55.
205. Murre, C., McCaw, P.S., Vaessin, H., Caudy, M., Jan, L.Y., Jan, Y.N., Cabrera, C.V., Buskin, J.N., Hauschka, S.D., Lassar, A.B. and et al. (1989) Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell*, **58**, 537-44.
206. Myers, M.P., Wager-Smith, K., Rothenfluh-Hilfiker, A. and Young, M.W. (1996) Light-induced degradation of TIMELESS and entrainment of the Drosophila circadian clock. *Science*, **271**, 1736-40.
207. Nambu, J.R., Franks, R.G., Hu, S. and Crews, S.T. (1990) The single-minded gene of Drosophila is required for the expression of genes important for the development of CNS midline cells. *Cell*, **63**, 63-75.

- 208.Nambu, J.R., Lewis, J.O., Wharton, K.A. and Crews, S.T. (1991) The *Drosophila* single-minded gene encodes a helix-loop-helix protein that acts as a master regulator of CNS midline development. *Cell*, **67**, 1157-67.
- 209.Narula, J., Haider, N., Virmani, R., DiSalvo, T.G., Kolodgie, F.D., Hajjar, R.J., Schmidt, U., Semigran, M.J., Dec, G.W. and Khaw, B.A. (1996) Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure. *N Engl J Med*, **335**, 1182-9.
- 210.Neuhold, L.A. and Wold, B. (1993) HLH forced dimers: tethering MyoD to E47 generates a dominant positive myogenic factor insulated from negative regulation by Id. *Cell*, **74**, 1033-42.
- 211.Newton, A.L., Sharpe, B.K., Kwan, A., Mackay, J.P. and Crossley, M. (2000) The transactivation domain within cysteine/histidine-rich region 1 of CBP comprises two novel zinc-binding modules. *J Biol Chem*, **275**, 15128-34.
- 212.Ogryzko, V.V., Schiltz, R.L., Russanova, V., Howard, B.H. and Nakatani, Y. (1996) The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell*, **87**, 953-9.
- 213.Ohh, M., Park, C.W., Ivan, M., Hoffman, M.A., Kim, T.Y., Huang, L.E., Pavletich, N., Chau, V. and Kaelin, W.G. (2000) Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the beta-domain of the von Hippel-Lindau protein. *Nat Cell Biol*, **2**, 423-7.
- 214.Ohshiro, T. and Saigo, K. (1997) Transcriptional regulation of breathless FGF receptor gene by binding of TRACHEALESS/dARNT heterodimers to three central midline elements in *Drosophila* developing trachea. *Development*, **124**, 3975-86.
- 215.O'Rourke, J.F., Tian, Y.M., Ratcliffe, P.J. and Pugh, C.W. (1999) Oxygen-regulated and transactivating domains in endothelial PAS protein 1: comparison with hypoxia-inducible factor-1alpha. *J Biol Chem*, **274**, 2060-71.
- 216.Ozaki, K., Yoshida, T., Ide, H., Saito, I., Ikeda, Y., Sugimura, T. and Terada, M. (1996) Use of von Willebrand factor promoter to transduce suicidal gene to human endothelial cells, HUVEC. *Hum Gene Ther*, **7**, 1483-90.
- 217.Palmer, L.A., Gaston, B. and Johns, R.A. (2000) Normoxic stabilization of hypoxia-inducible factor-1 expression and activity: redox-dependent effect of nitrogen oxides [In Process Citation]. *Mol Pharmacol*, **58**, 1197-203.
- 218.Park, S., Henry, E.C. and Gasiewicz, T.A. (2000) Regulation of DNA binding activity of the ligand-activated aryl hydrocarbon receptor by tyrosine phosphorylation [In Process Citation]. *Arch Biochem Biophys*, **381**, 302-12.
- 219.Pellequer, J.L., Wager-Smith, K.A., Kay, S.A. and Getzoff, E.D. (1998) Photoactive yellow protein: a structural prototype for the three-dimensional fold of the PAS domain superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 5884-90.
- 220.Plautz, J.D., Kaneko, M., Hall, J.C. and Kay, S.A. (1997) Independent photoreceptive circadian clocks throughout *Drosophila*. *Science*, **278**, 1632-5.
- 221.Poellinger, L. (1995) *Mechanisms of signal transduction by the basic helix-loop-helix dioxin receptor*.

222. Poland, A. and Glover, E. (1990) Characterization and strain distribution pattern of the murine Ah receptor specified by the Ahd and Ahb-3 alleles. *Mol Pharmacol*, **38**, 306-12.
223. Poland, A., Glover, E. and Taylor, B.A. (1987) The murine Ah locus: a new allele and mapping to chromosome 12. *Mol Pharmacol*, **32**, 471-8.
224. Poland, A. and Knutson, J.C. (1982) 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **22**, 517-54.
225. Poland, A., Palen, D. and Glover, E. (1994) Analysis of the four alleles of the murine aryl hydrocarbon receptor. *Mol Pharmacol*, **46**, 915-21.
226. Pollenz, R.S., Sattler, C.A. and Poland, A. (1994) The aryl hydrocarbon receptor and aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein show distinct subcellular localizations in Hepa 1c1c7 cells by immunofluorescence microscopy. *Mol Pharmacol*, **45**, 428-38.
227. Pollenz, R.S., Sullivan, H.R., Holmes, J., Necela, B. and Peterson, R.E. (1996) Isolation and expression of cDNAs from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) that encode two novel basic helix-loop-Helix/PER-ARNT-SIM (bHLH/PAS) proteins with distinct functions in the presence of the aryl hydrocarbon receptor. Evidence for alternative mRNA splicing and dominant negative activity in the bHLH/PAS family. *J Biol Chem*, **271**, 30886-96.
228. Pollenz, R.S. and Barbour, E.R. (2000) Analysis of the complex relationship between nuclear export and aryl hydrocarbon receptor-mediated gene regulation. *Mol Cell Biol*, **20**, 6095-104.
229. Pongratz, I., Antonsson, C., Whitelaw, M.L. and Poellinger, L. (1998) Role of the PAS domain in regulation of dimerization and DNA binding specificity of the dioxin receptor. *Mol Cell Biol*, **18**, 4079-88.
230. Porwol, T., Ehleben, W., Zierold, K., Fandrey, J. and Acker, H. (1998) The influence of nickel and cobalt on putative members of the oxygen-sensing pathway of erythropoietin-producing HepG2 cells. *Eur J Biochem*, **256**, 16-23.
231. Powell, W.H., Karchner, S.I., Bright, R. and Hahn, M.E. (1999) Functional diversity of vertebrate ARNT proteins: identification of ARNT2 as the predominant form of ARNT in the marine teleost, *Fundulus heteroclitus*. *Arch Biochem Biophys*, **361**, 156-63.
232. Powell-Coffman, J.A., Bradfield, C.A. and Wood, W.B. (1998) *Caenorhabditis elegans* orthologs of the aryl hydrocarbon receptor and its heterodimerization partner the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 2844-9.
233. Probst, M.R., Fan, C.M., Tessier-Lavigne, M. and Hankinson, O. (1997) Two murine homologs of the *Drosophila* single-minded protein that interact with the mouse aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein. *J Biol Chem*, **272**, 4451-7.
234. Probst, M.R., Reisz-Porszasz, S., Agbunag, R.V., Ong, M.S. and Hankinson, O. (1993) Role of the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein in aryl hydrocarbon (dioxin) receptor action. *Mol Pharmacol*, **44**, 511-8.

235. Pugh, C.W., O'Rourke, J.F., Nagao, M., Gleadle, J.M. and Ratcliffe, P.J. (1997) Activation of hypoxia-inducible factor-1; definition of regulatory domains within the alpha subunit. *J Biol Chem*, **272**, 11205-14.
236. Pugh, C.W., Tan, C.C., Jones, R.W. and Ratcliffe, P.J. (1991) Functional analysis of an oxygen-regulated transcriptional enhancer lying 3' to the mouse erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 10553-7.
237. Rak, J., Mitsuhashi, Y., Sheehan, C., Tamir, A., Vitoria-Petit, A., Filmus, J., Mansour, S.J., Ahn, N.G. and Kerbel, R.S. (2000) Oncogenes and tumor angiogenesis: differential modes of vascular endothelial growth factor up-regulation in ras-transformed epithelial cells and fibroblasts. *Cancer Res*, **60**, 490-8.
238. Ravi, R., Mookerjee, B., Bhujwalla, Z.M., Sutter, C.H., Artemov, D., Zeng, Q., Dillehay, L.E., Madan, A., Semenza, G.L. and Bedi, A. (2000) Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Genes Dev*, **14**, 34-44.
239. Ray, R., Chen, G., Vande Velde, C., Cizeau, J., Park, J.H., Reed, J.C., Gietz, R.D. and Greenberg, A.H. (2000) BNIP3 heterodimerizes with Bcl-2/Bcl-X(L) and induces cell death independent of a Bcl-2 homology 3 (BH3) domain at both mitochondrial and nonmitochondrial sites. *J Biol Chem*, **275**, 1439-48.
240. Richard, D.E., Berra, E., Gothie, E., Roux, D. and Pouyssegur, J. (1999) p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. *J Biol Chem*, **274**, 32631-7.
241. Richard, D.E., Berra, E. and Pouyssegur, J. (2000) Nonhypoxic pathway mediates the induction of hypoxia-inducible factor 1alpha in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*, **275**, 26765-71.
242. Roberts, B.J. and Whitelaw, M.L. (1999) Degradation of the basic helix-loop-helix/Per-ARNT-Sim homology domain dioxin receptor via the ubiquitin/proteasome pathway. *J Biol Chem*, **274**, 36351-6.
243. Rosbash, M., Allada, R., Dembinska, M., Guo, W.Q., Le, M., Marrus, S., Qian, Z., Rutila, J., Yaglom, J. and Zeng, H. (1996) A Drosophila circadian clock. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **61**, 265-78.
244. Rowlands, J.C. and Gustafsson, J.A. (1997) Aryl hydrocarbon receptor-mediated signal transduction. *Crit Rev Toxicol*, **27**, 109-34.
245. Roy, N.K. and Wirgin, I. (1997) Characterization of the aromatic hydrocarbon receptor gene and its expression in Atlantic tomcod. *Arch Biochem Biophys*, **344**, 373-86.
246. Ruan, H., Wang, J., Hu, L., Lin, C.S., Lamborn, K.R. and Deen, D.F. (1999) Killing of brain tumor cells by hypoxia-responsive element mediated expression of BAX. *Neoplasia*, **1**, 431-7.
247. Russell, S.J., Hawkins, R.E. and Winter, G. (1993) Retroviral vectors displaying functional antibody fragments. *Nucleic Acids Res*, **21**, 1081-5.
248. Rutila, J.E., Suri, V., Le, M., So, W.V., Rosbash, M. and Hall, J.C. (1998) CYCLE is a second bHLH-PAS clock protein essential for circadian rhythmicity and transcription of Drosophila period and timeless. *Cell*, **93**, 805-14.
249. Ryan, H.E., Lo, J. and Johnson, R.S. (1998) HIF-1 alpha is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *Embo J*, **17**, 3005-15.

250. Salceda, S., Beck, I. and Caro, J. (1996) Absolute requirement of aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein for gene activation by hypoxia. *Arch Biochem Biophys*, **334**, 389-94.
251. Salceda, S. and Caro, J. (1997) Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem*, **272**, 22642-7.
252. Schmidt, J.V. and Bradfield, C.A. (1996) Ah receptor signaling pathways. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **12**, 55-89.
253. Schmidt, J.V., Carver, L.A. and Bradfield, C.A. (1993) Molecular characterization of the murine Ahr gene. Organization, promoter analysis, and chromosomal assignment. *J Biol Chem*, **268**, 22203-9.
254. Schmucker, D., Clemens, J.C., Shu, H., Worby, C.A., Xiao, J., Muda, M., Dixon, J.E. and Zipursky, S.L. (2000) Drosophila Dscam is an axon guidance receptor exhibiting extraordinary molecular diversity. *Cell*, **101**, 671-84.
255. Semenza, G.L. (1998) Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O₂ homeostasis. *Curr Opin Genet Dev*, **8**, 588-94.
256. Semenza, G.L. (1999) Perspectives on oxygen sensing. *Cell*, **98**, 281-4.
257. Semenza, G.L. (2000) HIF-1 and human disease: one highly involved factor. *Genes Dev*, **14**, 1983-91.
258. Semenza, G.L. (2001) Hypoxia-Inducible Factor 1: Oxygen Homeostasis and Disease Pathophysiology. *Trends Mol. Med.*, **In press**.
259. Semenza, G.L., Nejfelt, M.K., Chi, S.M. and Antonarakis, S.E. (1991) Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 5680-4.
260. Semenza, G.L., Roth, P.H., Fang, H.M. and Wang, G.L. (1994) Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem*, **269**, 23757-63.
261. Semenza, G.L., Rue, E.A., Iyer, N.V., Pang, M.G. and Kearns, W.G. (1996) Assignment of the hypoxia-inducible factor 1alpha gene to a region of conserved synteny on mouse chromosome 12 and human chromosome 14q. *Genomics*, **34**, 437-9.
262. Semenza, G.L. and Wang, G.L. (1992) 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**, 5447-54.
263. Shearman, L.P., Zylka, M.J., Reppert, S.M. and Weaver, D.R. (1999) Expression of basic helix-loop-helix/PAS genes in the mouse suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience*, **89**, 387-97.
264. Shikama, N., Chan, H.M., Krstic-Demonacos, M., Smith, L., Lee, C.W., Cairns, W. and La Thangue, N.B. (2000) Functional interaction between nucleosome assembly proteins and p300/CREB-binding protein family coactivators. *Mol Cell Biol*, **20**, 8933-43.
265. Shioda, T., Fenner, M.H. and Isselbacher, K.J. (1997) MSG1 and its related protein MRG1 share a transcription activating domain. *Gene*, **204**, 235-41.

266. Shioda, T., Lechleider, R.J., Dunwoodie, S.L., Li, H., Yahata, T., de Caestecker, M.P., Fenner, M.H., Roberts, A.B. and Isselbacher, K.J. (1998) Transcriptional activating activity of Smad4: roles of SMAD hetero-oligomerization and enhancement by an associating transactivator. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 9785-90.
267. So, W.V. and Rosbash, M. (1997) Post-transcriptional regulation contributes to *Drosophila* clock gene mRNA cycling. *Embo J*, **16**, 7146-55.
268. Sodhi, A., Montaner, S., Patel, V., Zohar, M., Bais, C., Mesri, E.A. and Gutkind, J.S. (2000) The Kaposi's sarcoma-associated herpes virus G protein-coupled receptor up-regulates vascular endothelial growth factor expression and secretion through mitogen-activated protein kinase and p38 pathways acting on hypoxia-inducible factor 1alpha. *Cancer Res*, **60**, 4873-80.
269. Sogawa, K., Nakano, R., Kobayashi, A., Kikuchi, Y., Ohe, N., Matsushita, N. and Fujii-Kuriyama, Y. (1995) Possible function of Ah receptor nuclear translocator (Arnt) homodimer in transcriptional regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 1936-40.
270. Sogawa, K., Numayama-Tsuruta, K., Ema, M., Abe, M., Abe, H. and Fujii-Kuriyama, Y. (1998) Inhibition of hypoxia-inducible factor 1 activity by nitric oxide donors in hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 7368-73.
271. Sojka, K.M., Kern, C.B. and Pollenz, R.S. (2000) Expression and subcellular localization of the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) protein in mouse and chicken over developmental time [In Process Citation]. *Anat Rec*, **260**, 327-34.
272. Sonnenfeld, M., Ward, M., Nystrom, G., Mosher, J., Stahl, S. and Crews, S. (1997) The *Drosophila* tango gene encodes a bHLH-PAS protein that is orthologous to mammalian Arnt and controls CNS midline and tracheal development. *Development*, **124**, 4571-82.
273. Srinivas, V., Zhang, L.P., Zhu, X.H. and Caro, J. (1999) Characterization of an oxygen/redox-dependent degradation domain of hypoxia-inducible factor alpha (HIF-alpha) proteins. *Biochem Biophys Res Commun*, **260**, 557-61.
274. Stebbins, C.E., Kaelin, W.G., Jr. and Pavletich, N.P. (1999) Structure of the VHL-ElonginC-ElonginB complex: implications for VHL tumor suppressor function. *Science*, **284**, 455-61.
275. Steeves, T.D., King, D.P., Zhao, Y., Sangoram, A.M., Du, F., Bowcock, A.M., Moore, R.Y. and Takahashi, J.S. (1999) Molecular cloning and characterization of the human CLOCK gene: expression in the suprachiasmatic nuclei. *Genomics*, **57**, 189-200.
276. Sugaya, S., Fujita, K., Kikuchi, A., Ueda, H., Takakuwa, K., Kodama, S. and Tanaka, K. (1996) Inhibition of tumor growth by direct intratumoral gene transfer of herpes simplex virus thymidine kinase gene with DNA-liposome complexes. *Hum Gene Ther*, **7**, 223-30.
277. Sun, Z.S., Albrecht, U., Zhuchenko, O., Bailey, J., Eichele, G. and Lee, C.C. (1997) RIGUI, a putative mammalian ortholog of the *Drosophila* period gene. *Cell*, **90**, 1003-11.
278. Sutter, C.H., Laughner, E. and Semenza, G.L. (2000) Hypoxia-inducible factor 1alpha protein expression is controlled by oxygen-regulated ubiquitination that is disrupted by deletions and missense mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 4748-53.

279. Suzuki, T., Kimura, A., Nagai, R. and Horikoshi, M. (2000) Regulation of interaction of the acetyltransferase region of p300 and the DNA-binding domain of Sp1 on and through DNA binding. *Genes Cells*, **5**, 29-41.
280. Swanson, H.I., Chan, W.K. and Bradfield, C.A. (1995) DNA binding specificities and pairing rules of the Ah receptor, ARNT, and SIM proteins. *J Biol Chem*, **270**, 26292-302.
281. Takahashi, Y., Nakayama, K., Shimojima, T., Itoh, S. and Kamataki, T. (1996) Expression of aryl hydrocarbon receptor (AhR) and aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (Arnt) in adult rabbits known to be non-responsive to cytochrome P-450 1A1 (CYP1A1) inducers. *Eur J Biochem*, **242**, 512-8.
282. Takahata, S., Sogawa, K., Kobayashi, A., Ema, M., Mimura, J., Ozaki, N. and Fujii-Kuriyama, Y. (1998) Transcriptionally active heterodimer formation of an Arnt-like PAS protein, Arnt3, with HIF-1 α , HLF, and clock. *Biochem Biophys Res Commun*, **248**, 789-94.
283. Talks, K.L., Turley, H., Gatter, K.C., Maxwell, P.H., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J. and Harris, A.L. (2000) The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1 α and HIF-2 α in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *Am J Pathol*, **157**, 411-21.
284. Tan, C.C. and Ratcliffe, P.J. (1991) Effect of inhibitors of oxidative phosphorylation on erythropoietin mRNA in isolated perfused rat kidneys. *Am J Physiol*, **261**, F982-7.
285. Tanaka, M., Ito, H., Adachi, S., Akimoto, H., Nishikawa, T., Kasajima, T., Marumo, F. and Hiroe, M. (1994) Hypoxia induces apoptosis with enhanced expression of Fas antigen messenger RNA in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Circ Res*, **75**, 426-33.
286. Tanguay, R.L., Abnet, C.C., Heideman, W. and Peterson, R.E. (1999) Cloning and characterization of the zebrafish (*Danio rerio*) aryl hydrocarbon receptor. *Biochim Biophys Acta*, **1444**, 35-48.
287. Tanimoto, K., Makino, Y., Pereira, T. and Poellinger, L. (2000) Mechanism of regulation of the hypoxia-inducible factor-1 α by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *Embo J*, **19**, 4298-309.
288. Taylor, B.L. and Zhulin, I.B. (1999) PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol Mol Biol Rev*, **63**, 479-506.
289. Taylor, C.T., Lisco, S.J., Awtrey, C.S. and Colgan, S.P. (1998) Hypoxia inhibits cyclic nucleotide-stimulated epithelial ion transport: role for nucleotide cyclases as oxygen sensors. *J Pharmacol Exp Ther*, **284**, 568-75.
290. Tei, H., Okamura, H., Shigeyoshi, Y., Fukuhara, C., Ozawa, R., Hirose, M. and Sakaki, Y. (1997) Circadian oscillation of a mammalian homologue of the *Drosophila* period gene. *Nature*, **389**, 512-6.
291. Tian, H., McKnight, S.L. and Russell, D.W. (1997) Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev*, **11**, 72-82.
292. Torchia, J., Glass, C. and Rosenfeld, M.G. (1998) Co-activators and co-repressors in the integration of transcriptional responses. *Curr Opin Cell Biol*, **10**, 373-83.
293. Torchia, J., Rose, D.W., Inostroza, J., Kamei, Y., Westin, S., Glass, C.K. and Rosenfeld, M.G. (1997) The transcriptional co-activator p/CIP binds CBP and mediates nuclear-receptor function. *Nature*, **387**, 677-84.

294. Voegel, J.J., Heine, M.J., Zechel, C., Chambon, P. and Gronemeyer, H. (1996) TIF2, a 160 kDa transcriptional mediator for the ligand-dependent activation function AF-2 of nuclear receptors. *Embo J*, **15**, 3667-75.
295. Wang, G.L., Jiang, B.H., Rue, E.A. and Semenza, G.L. (1995a) Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 5510-4.
296. Wang, G.L., Jiang, B.H. and Semenza, G.L. (1995b) Effect of protein kinase and phosphatase inhibitors on expression of hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Biophys Res Commun*, **216**, 669-75.
297. Wang, G.L. and Semenza, G.L. (1993a) Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia. *J Biol Chem*, **268**, 21513-8.
298. Wang, G.L. and Semenza, G.L. (1993b) Desferrioxamine induces erythropoietin gene expression and hypoxia-inducible factor 1 DNA-binding activity: implications for models of hypoxia signal transduction. *Blood*, **82**, 3610-5.
299. Wang, G.L. and Semenza, G.L. (1993c) General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 4304-8.
300. Wang, G.L. and Semenza, G.L. (1995) Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem*, **270**, 1230-7.
301. Ward, M.P., Mosher, J.T. and Crews, S.T. (1998) Regulation of bHLH-PAS protein subcellular localization during Drosophila embryogenesis. *Development*, **125**, 1599-608.
302. Wenger, R.H. (2000) Mammalian oxygen sensing, signalling and gene regulation. *J Exp Biol*, **203 Pt 8**, 1253-63.
303. Wenger, R.H., Camenisch, G., Desbaillets, I., Chilov, D. and Gassmann, M. (1998a) Up-regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha is not sufficient for hypoxic/anoxic p53 induction. *Cancer Res*, **58**, 5678-80.
304. Wenger, R.H., Marti, H.H., Schuerer-Maly, C.C., Kvietikova, I., Bauer, C., Gassmann, M. and Maly, F.E. (1996a) Hypoxic induction of gene expression in chronic granulomatous disease-derived B-cell lines: oxygen sensing is independent of the cytochrome b558-containing nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase. *Blood*, **87**, 756-61.
305. Wenger, R.H., Rolfs, A., Kvietikova, I., Spielmann, P., Zimmermann, D.R. and Gassmann, M. (1997) The mouse gene for hypoxia-inducible factor-1alpha--genomic organization, expression and characterization of an alternative first exon and 5' flanking sequence. *Eur J Biochem*, **246**, 155-65.
306. Wenger, R.H., Rolfs, A., Marti, H.H., Guenet, J.L. and Gassmann, M. (1996b) Nucleotide sequence, chromosomal assignment and mRNA expression of mouse hypoxia-inducible factor-1 alpha. *Biochem Biophys Res Commun*, **223**, 54-9.
307. Wenger, R.H., Rolfs, A., Spielmann, P., Zimmermann, D.R. and Gassmann, M. (1998b) Mouse hypoxia-inducible factor-1alpha is encoded by two different mRNA isoforms: expression from a tissue-specific and a housekeeping-type promoter. *Blood*, **91**, 3471-80.

308. Wharton, K.A., Jr., Franks, R.G., Kasai, Y. and Crews, S.T. (1994) Control of CNS midline transcription by asymmetric E-box-like elements: similarity to xenobiotic responsive regulation. *Development*, **120**, 3563-9.
309. Whitelaw, M.L., Gottlicher, M., Gustafsson, J.A. and Poellinger, L. (1993) Definition of a novel ligand binding domain of a nuclear bHLH receptor: co-localization of ligand and hsp90 binding activities within the regulable inactivation domain of the dioxin receptor. *Embo J*, **12**, 4169-79.
310. Whitelaw, M.L., Gustafsson, J.A. and Poellinger, L. (1994) Identification of transactivation and repression functions of the dioxin receptor and its basic helix-loop-helix/PAS partner factor Arnt: inducible versus constitutive modes of regulation. *Mol Cell Biol*, **14**, 8343-55.
311. Whitmore, D., Sassone-Corsi, P. and Foulkes, N.S. (1998) PASTing together the mammalian clock. *Curr Opin Neurobiol*, **8**, 635-41.
312. Wiener, C.M., Booth, G. and Semenza, G.L. (1996) In vivo expression of mRNAs encoding hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Biophys Res Commun*, **225**, 485-8.
313. Wilk, R., Weizman, I. and Shilo, B.Z. (1996) trachealess encodes a bHLH-PAS protein that is an inducer of tracheal cell fates in Drosophila. *Genes Dev*, **10**, 93-102.
314. Williams, B., Baker, A.Q., Gallacher, B. and Lodwick, D. (1995) Angiotensin II increases vascular permeability factor gene expression by human vascular smooth muscle cells. *Hypertension*, **25**, 913-7.
315. Wilson, D.F., Mokashi, A., Chugh, D., Vinogradov, S., Osanai, S. and Lahiri, S. (1994) The primary oxygen sensor of the cat carotid body is cytochrome a3 of the mitochondrial respiratory chain. *FEBS Lett*, **351**, 370-4.
316. Wingrove, J.A. and O'Farrell, P.H. (1999) Nitric oxide contributes to behavioral, cellular, and developmental responses to low oxygen in Drosophila. *Cell*, **98**, 105-14.
317. Wood, S.M., Wiesener, M.S., Yeates, K.M., Okada, N., Pugh, C.W., Maxwell, P.H. and Ratcliffe, P.J. (1998) Selection and analysis of a mutant cell line defective in the hypoxia-inducible factor-1 alpha-subunit (HIF-1alpha). Characterization of hif-1alpha-dependent and -independent hypoxia-inducible gene expression. *J Biol Chem*, **273**, 8360-8.
318. Xanthoudakis, S., Miao, G., Wang, F., Pan, Y.C. and Curran, T. (1992) Redox activation of Fos-Jun DNA binding activity is mediated by a DNA repair enzyme. *Embo J*, **11**, 3323-35.
319. Yamaki, A., Noda, S., Kudoh, J., Shindoh, N., Maeda, H., Minoshima, S., Kawasaki, K., Shimizu, Y. and Shimizu, N. (1996) The mammalian single-minded (SIM) gene: mouse cDNA structure and diencephalic expression indicate a candidate gene for Down syndrome. *Genomics*, **35**, 136-43.
320. Yang, X.J., Ogryzko, V.V., Nishikawa, J., Howard, B.H. and Nakatani, Y. (1996) A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A. *Nature*, **382**, 319-24.
321. Yao, E.F. and Denison, M.S. (1992) DNA sequence determinants for binding of transformed Ah receptor to a dioxin-responsive enhancer. *Biochemistry*, **31**, 5060-7.
322. Yasuda, M., Theodorakis, P., Subramanian, T. and Chinnadurai, G. (1998) Adenovirus E1B-19K/BCL-2 interacting protein BNIP3 contains a BH3 domain and a mitochondrial targeting sequence. *J Biol Chem*, **273**, 12415-21.

323. Yu, W., Ikeda, M., Abe, H., Honma, S., Ebisawa, T., Yamauchi, T., Honma, K. and Nomura, M. (1999) Characterization of three splice variants and genomic organization of the mouse BMAL1 gene. *Biochem Biophys Res Commun*, **260**, 760-7.
324. Zelzer, E., Levy, Y., Kahana, C., Shilo, B.Z., Rubinstein, M. and Cohen, B. (1998) Insulin induces transcription of target genes through the hypoxia-inducible factor HIF-1 α /ARNT. *Embo J*, **17**, 5085-94.
325. Zelzer, E., Wappner, P. and Shilo, B.Z. (1997) The PAS domain confers target gene specificity of Drosophila bHLH/PAS proteins. *Genes Dev*, **11**, 2079-89.
326. Zeng, H., Qian, Z., Myers, M.P. and Rosbash, M. (1996) A light-entrainment mechanism for the Drosophila circadian clock. *Nature*, **380**, 129-35.
327. Zhang, W., Tsuchiya, T. and Yasukochi, Y. (1999) Transitional change in interaction between HIF-1 and HNF-4 in response to hypoxia. *J Hum Genet*, **44**, 293-9.
328. Zhao, G.Q., Zhao, Q., Zhou, X., Mattei, M.G. and de Crombrughe, B. (1993) TFEC, a basic helix-loop-helix protein, forms heterodimers with TFE3 and inhibits TFE3-dependent transcription activation. *Mol Cell Biol*, **13**, 4505-12.
329. Zheng, B., Larkin, D.W., Albrecht, U., Sun, Z.S., Sage, M., Eichele, G., Lee, C.C. and Bradley, A. (1999) The mPer2 gene encodes a functional component of the mammalian circadian clock. *Nature*, **400**, 169-73.
330. Zhong, H., Chiles, K., Feldser, D., Laughner, E., Hanrahan, C., Georgescu, M.M., Simons, J.W. and Semenza, G.L. (2000) Modulation of hypoxia-inducible factor 1 α expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. *Cancer Res*, **60**, 1541-5.
331. Zhou, Y.D., Barnard, M., Tian, H., Li, X., Ring, H.Z., Francke, U., Shelton, J., Richardson, J., Russell, D.W. and McKnight, S.L. (1997) Molecular characterization of two mammalian bHLH-PAS domain proteins selectively expressed in the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 713-8.
332. Zhu, H., Qiu, H., Yoon, H.W., Huang, S. and Bunn, H.F. (1999) Identification of a cytochrome b-type NAD(P)H oxidoreductase ubiquitously expressed in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 14742-7.
333. Zundel, W., Schindler, C., Haas-Kogan, D., Koong, A., Kaper, F., Chen, E., Gottschalk, A.R., Ryan, H.E., Johnson, R.S., Jefferson, A.B., Stokoe, D. and Giaccia, A.J. (2000) Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression. *Genes Dev*, **14**, 391-6.

RÉSUMÉS

Version Française – Complète

L'Homme, comme la plupart des espèces animales, présente une dépendance totale vis-à-vis de l'oxygène pour sa survie. Les réponses de l'organisme à l'hypoxie sont bien connues sur le plan physiologique, mais aussi sur le plan moléculaire. Le régulateur clef de cette réponse cellulaire à l'hypoxie est le facteur HIF-1 (*Hypoxia Inducible Factor-1*), un hétérodimère constitué des sous-unités HIF-1 α et HIF-1 β (identifiée comme étant le facteur ARNT1 - *Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator-1* - et impliquée dans les phénomènes de détoxification) membres de la superfamille des protéines à domaines bHLH/PAS.

Pour débiter notre étude sur le facteur HIF-1, nous avons cloné par RT-PCR (*Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*) les deux ADN complémentaires (ADNc) du HIF-1 humain. Lors de cette étape, nous avons isolé deux clones d'ADNc supplémentaires pour le HIF-1 α . Nous avons alors réalisé leur étude afin de les caractériser. Les différences observées par rapport au HIF-1 α sauvage sont dues à des phénomènes d'épissages alternatifs entraînant pour le premier clone l'ajout de trois paires de bases supplémentaires entre les exons 1 et 2 et pour le second clone, l'absence de 127 pb (exon 14) en plus de la modification précédente.

Nous avons démontré que l'ARNm de cette dernière isoforme est présent dans plusieurs lignées cellulaires humaines, dans des fibroblastes de peau humaine, mais apparemment pas chez les Rongeurs. La protéine correspondante de 736 acides aminés (HIF-1 α ⁷³⁶) possède des propriétés comparables à la forme longue de HIF-1 α et les résultats obtenus suggèrent que cette isoforme module l'expression de gènes sous hypoxie.

Nous avons décidé d'un autre côté de développer un système fiable permettant l'étude approfondie des étapes d'activation du HIF-1 encore mal connues. Ce système est basé sur l'expression du gène cytotatique MKP3 - une phosphatase spécifique des p42/p44 MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*) essentielles pour le cycle cellulaire - sous contrôle d'éléments de réponse à l'hypoxie (HRE) fixant le facteur HIF-1. Une des constructions développée nous a ainsi permis d'inhiber fortement la croissance cellulaire en condition d'hypoxie. A terme, des constructions basées sur le même principe doivent permettre d'isoler des mutants de la voie de signalisation du HIF-1, non affectés par ces dernières. Ce type de vecteur permet également d'envisager des outils thérapeutiques potentiels pouvant être utilisés dans le cadre de thérapies géniques anticancéreuses en s'exprimant spécifiquement

dans les zones hypoxiques retrouvées au sein des tumeurs et souvent extrêmement résistantes à la radiothérapie.

Discipline : Biochimie, Biologie Moléculaire et Cellulaire

Mots Clefs : Angiogenèse, bHLH/PAS, Epissage Alternatif, HIF-1, HRE, MKP3, p42/p44 MAPK, VEGF.

Laboratoire : Institut de Signalisation, Biologie du Développement et Cancer (ISBC) - CNRS - UMR6543 - Centre Antoine Lacassagne - 33 Avenue de Valombrose - 06189 Nice Cedex 2 – France

Version Française – 200 Mots

Etude de la voie de signalisation du « Hypoxia Inducible Factor-1 » (HIF-1) menant à l'induction du « Vascular Endothelial Growth Factor » (VEGF) impliqué dans le phénomène de néovascularisation tumorale

Le régulateur clef de la réponse cellulaire à l'hypoxie HIF-1 est un hétérodimère constitué des sous-unités HIF-1alpha et HIF-1beta/ARNT1 (*Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator-1*) membres de la superfamille des protéines à domaines bHLH/PAS.

Pour étudier le facteur HIF-1, nous avons cloné par RT-PCR (*Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*) les deux ADN complémentaires (ADNc) du HIF-1 humain. Lors de cette étape, nous avons isolé deux clones d'ADNc supplémentaires pour HIF-1alpha résultant d'épissages alternatifs. Le premier clone présente l'ajout de trois paires de bases entre les exons 1 et 2, et le second, l'absence de l'exon 14 en plus de la modification précédente. Cette dernière isoforme est étudiée en détail.

Nous développons également un système d'étude des étapes d'activation du HIF-1. Ce système est basé sur l'expression du gène cytotatique MKP3 (phosphatase spécifique des p42/p44 MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*)) sous contrôle d'éléments de réponse à l'hypoxie (HRE) fixant HIF-1. Une des constructions développées inhibe fortement la croissance cellulaire en hypoxie. Des constructions similaires doivent permettre d'isoler des mutants de la voie de signalisation du HIF-1, non affectés par ces dernières. Il est également possible d'envisager leur utilisation en thérapie génique anticancéreuses dans les zones hypoxiques des tumeurs extrêmement résistantes à la radiothérapie.

Discipline : Biochimie, Biologie Moléculaire et Cellulaire

Mots-Clefs : Angiogenèse, bHLH/PAS, Epissage Alternatif, HIF-1, HRE, MKP3, p42/p44 MAPK, VEGF.

Laboratoire : Institut de Signalisation, Biologie du Développement et Cancer (ISBC) - CNRS - UMR6543 - Centre Antoine Lacassagne - 33 Avenue de Valombrose - 06189 Nice Cedex 2 – FRANCE

Study of the Hypoxia Inducible Factor-1 (HIF-1) Signaling pathway leading to the induction of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and implicated in tumor angiogenesis

HIF-1, the key component of the hypoxia signaling pathway, is a heterodimer composed of two members of the basic helix-loop-helix transcription factor superfamily containing a PAS (PER-ARNT-SIM) domain: HIF-1alpha and HIF-1beta/ARNT.

Cloning of human HIF-1 subunits by reverse transcriptase-polymerase chain reaction, revealed two alternatively spliced variants of the HIF-1alpha gene. Both variants possess three additional base pairs between exons 1 and 2. In addition, one lacks 127 base pairs comprising exon 14. This latter isoform was characterised in detail.

In order to genetically dissect signal transduction mechanisms involved in the activation of HIF-1, we have developed a novel cell system which should allow us to select mutants of the HIF-1 pathway. This model is based on HIF-1-dependent expression of the cytostatic protein, MKP3 (Mitogen-activated protein Kinase Phosphatase-3), a specific p42/p44 MAPK phosphatase. In one cell line obtained to date, cell growth is severely compromised under hypoxic conditions. This cell line should serve as a preliminary tool for the study of HIF-1 activation and prove to be helpful in the selection of additional mutants. In the future, DNA constructs which shut down cell growth in hypoxic zones of solid tumors, resistant to radiation therapy, may be useful for gene therapy.

Discipline : Biochemical, Molecular and Cellular Biology

Key-Words : Angiogenesis, bHLH/PAS, alternative splicing, HIF-1, HRE, MKP3, p42/p44 MAPK, VEGF.

Laboratory : Institut of Signaling, Developmental Biology and Cancer Research (ISBC) - CNRS - UMR6543 - Centre Antoine Lacassagne - 33 Avenue de Valombrose - 06189 Nice Cedex 2 – FRANCE

ETUDE DE LA VOIE DE SIGNALISATION DU « HYPOXIA INDUCIBLE FACTOR-1 » (HIF-1) MENANT A L'INDUCTION DU « VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR » (VEGF) IMPLIQUE DANS LE PHENOMENE DE NEOVASCULARISATION TUMORALE

Le régulateur clef de la réponse cellulaire à l'hypoxie HIF-1 est un hétérodimère constitué des sous-unités HIF-1alpha et HIF-1beta/ARNT1 (*Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator-1*) membres de la superfamille des protéines à domaines bHLH/PAS.

Pour étudier le facteur HIF-1, nous avons cloné par RT-PCR (*Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*) les deux ADN complémentaires (ADNc) du HIF-1 humain. Lors de cette étape, nous avons isolé deux clones d'ADNc supplémentaires pour HIF-1alpha résultant d'épissages alternatifs. Le premier clone présente l'ajout de trois paires de bases entre les exons 1 et 2, et le second, l'absence de l'exon 14 en plus de la modification précédente. Cette dernière isoforme est étudiée en détail.

Nous développons également un système d'étude des étapes d'activation du HIF-1. Ce système est basé sur l'expression du gène cytotatique MKP3 (phosphatase spécifique des p42/p44 MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*)) sous contrôle d'éléments de réponse à l'hypoxie (HRE) fixant HIF-1. Une des constructions développées inhibe fortement la croissance cellulaire en hypoxie. Des constructions similaires doivent permettre d'isoler des mutants de la voie de signalisation du HIF-1, non affectés par ces dernières. Il est également possible d'envisager leur utilisation en thérapie génique anticancéreuses dans les zones hypoxiques des tumeurs extrêmement résistantes à la radiothérapie.

Discipline : Biochimie, Biologie Moléculaire et Cellulaire

Mots-Clefs : Angiogenèse, bHLH/PAS, Epissage Alternatif, HIF-1, HRE, MKP3, p42/p44 MAPK, VEGF.

Laboratoire : Institut de Signalisation, Biologie du Développement et Cancer (ISBC) - CNRS - UMR6543 - Centre Antoine Lacassagne - 33 Avenue de Valombrose - 06189 Nice Cedex 2 – FRANCE

ETUDE DE LA VOIE DE SIGNALISATION DU « HYPOXIA INDUCIBLE FACTOR-1 » (HIF-1) MENANT A L'INDUCTION DU « VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR » (VEGF) IMPLIQUE DANS LE PHENOMENE DE NEOVASCULARISATION TUMORALE

Le régulateur clef de la réponse cellulaire à l'hypoxie HIF-1 est un hétérodimère constitué des sous-unités HIF-1alpha et HIF-1beta/ARNT1 (*Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator-1*) membres de la superfamille des protéines à domaines bHLH/PAS.

Pour étudier le facteur HIF-1, nous avons cloné par RT-PCR (*Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*) les deux ADN complémentaires (ADNc) du HIF-1 humain. Lors de cette étape, nous avons isolé deux clones d'ADNc supplémentaires pour HIF-1alpha résultant d'épissages alternatifs. Le premier clone présente l'ajout de trois paires de bases entre les exons 1 et 2, et le second, l'absence de l'exon 14 en plus de la modification précédente. Cette dernière isoforme est étudiée en détail.

Nous développons également un système d'étude des étapes d'activation du HIF-1. Ce système est basé sur l'expression du gène cytotatique MKP3 (phosphatase spécifique des p42/p44 MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*)) sous contrôle d'éléments de réponse à l'hypoxie (HRE) fixant HIF-1. Une des constructions développées inhibe fortement la croissance cellulaire en hypoxie. Des constructions similaires doivent permettre d'isoler des mutants de la voie de signalisation du HIF-1, non affectés par ces dernières. Il est également possible d'envisager leur utilisation en thérapie génique anticancéreuses dans les zones hypoxiques des tumeurs extrêmement résistantes à la radiothérapie.

Discipline : Biochimie, Biologie Moléculaire et Cellulaire

Mots-Clefs : Angiogenèse, bHLH/PAS, Epissage Alternatif, HIF-1, HRE, MKP3, p42/p44 MAPK, VEGF.

Laboratoire : Institut de Signalisation, Biologie du Développement et Cancer (ISBC) - CNRS - UMR6543 - Centre Antoine Lacassagne - 33 Avenue de Valombrose - 06189 Nice Cedex 2 - FRANCE