

La régulation de HIF-1 α (*Hypoxia-Inducible Factor-1 α*) : un air nouveau dans le domaine de l'hypoxie

par Mélanie Berta, Christiane Brahimi-Horn & Jacques Pouyssegur

Institute of Signaling Developmental Biology and Cancer, CNRS UMR6543, Centre Antoine Lacassagne, 33 avenue de Valombrose, 06189 Nice cedex France. E-mail : berta@unice.fr

Reçu le 26 janvier 2004

RÉSUMÉ

L'angiogenèse, le processus conduisant à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir du réseau vasculaire préexistant, est finement régulée. La compréhension des mécanismes qui contrôlent son activité devrait permettre de nouvelles avancées dans le traitement de maladies comme le cancer ou dans le cas de désordres ischémiques. Dans le cas du cancer, la prolifération rapide des cellules tumorales induit une baisse de la concentration en oxygène ou hypoxie au cœur de la tumeur. Ce stress va servir de signal pour activer l'angiogenèse. Les vaisseaux sanguins qui irriguent la tumeur permettent d'une part la progression de la croissance tumorale *via* l'apport de nutriments, et d'autre part la formation de métastases. Le facteur HIF-1 (*Hypoxia-Inducible Factor-1*)

joue un rôle crucial dans ce processus. HIF-1 est un hétérodimère constitué des sous-unités α et β . HIF-1 α , stabilisé sous hypoxie, se transloque dans le noyau où il va pouvoir se dimériser avec la sous-unité HIF-1 β pour activer ses gènes cibles. Parmi ces gènes, on retrouve le *vegf* (*Vascular Endothelial Growth Factor*) un facteur de croissance clé dans le processus de formation des vaisseaux sanguins. La protéine HIF-1 α subit de multiples modifications post-traductionnelles dont les rôles exacts ne sont pas encore à ce jour totalement élucidés, mais qui sont la base de la régulation de la réponse des cellules à l'hypoxie. Dans cette revue, nous exposerons tout particulièrement les nombreuses modifications post-traductionnelles qui régulent l'activité de la protéine HIF-1 α .

SUMMARY Regulation of the Hypoxia-Inducible Factor-1 α (HIF-1 α): a breath of fresh air in hypoxia research

Angiogenesis, a process that leads to the formation of new blood vessels, from a existing network of vessels is tightly regulated. The understanding of mechanisms that control its activity should lead to progress in the treatment of diseases such as cancer and ischemic disorders. In the case of cancer, the rapid growth of tumor cells results in a decrease in the concentration of oxygen, or hypoxia, in the center of the tumor. This stress is the signal that induces angiogenesis. Blood vessels bring nutrients and oxygen to the tumor, allowing it to grow and to metastase. The Hypoxia-Inducible Factor 1, HIF-1, plays a crucial

role in this process. HIF-1 is a heterodimer composed of two subunits, α and β . Under hypoxic conditions, HIF-1 α is stabilized and enters the nucleus, to form a dimer with HIF-1 β , where it induces the expression of its target genes. Among these genes is *vegf* (*vascular endothelial growth factor*), a key player in blood vessel formation. The protein HIF-1 α is subjected to post-translational modifications that are the molecular basis of the hypoxic response although the mechanisms are not completely understood. In this review, we will discuss in particular the multiple post-translational modifications regulating HIF-1 α activity.

INTRODUCTION

L'angiogenèse est un processus dynamique qui engendre la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir du réseau vasculaire préexistant. Chez l'adulte, le réseau vasculaire est relativement stable, le réarran-

gement de celui-ci est généralement associé à des pathologies où l'on retrouve une dérégulation de la néo-vascularisation comme le cancer, certains types de diabète ou l'athérosclérose (Bruick & McKnight, 2001). Depuis plusieurs décennies, les mécanismes qui régulent l'angiogenèse sont particulièrement étudiés dans le but d'amé-

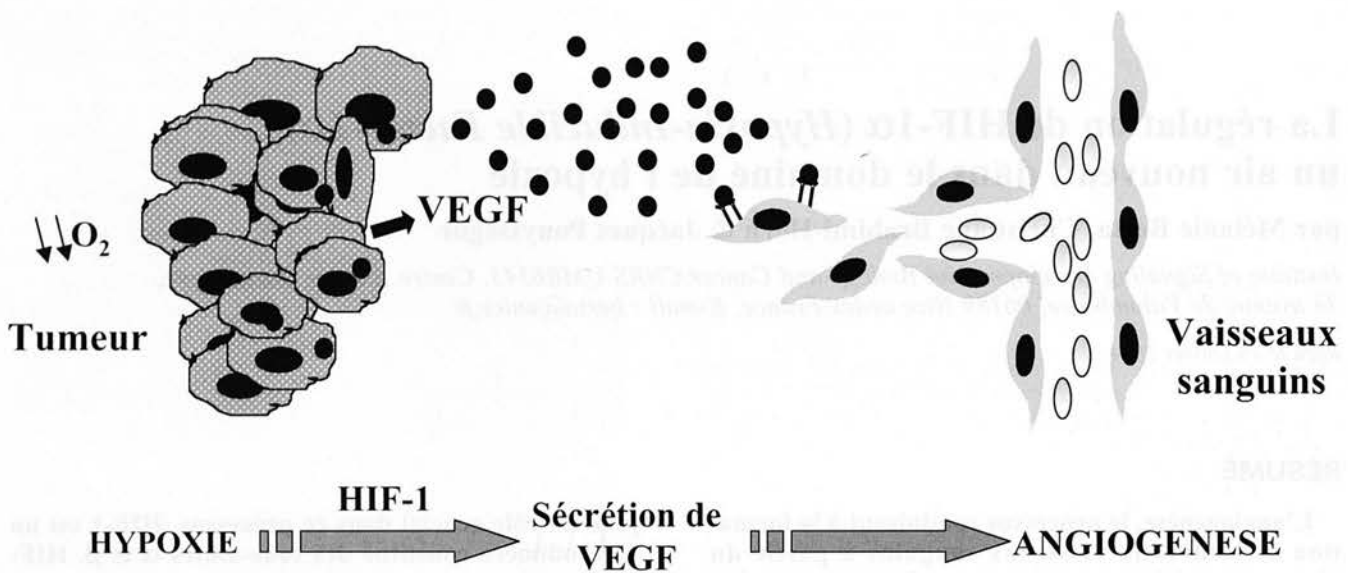


FIG. 1. – L'angiogenèse tumorale.

La prolifération rapide des cellules tumorales entraîne une baisse du niveau d'oxygène au cœur de la tumeur. Cette hypoxie locale provoque la sécrétion du facteur de croissance VEGF (Vascular-Endothelial-Growth Factor) dont l'expression est sous le contrôle du complexe HIF-1. Le VEGF va agir sur les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins environnants pour initier la formation des nouveaux vaisseaux sanguins qui vont venir irriguer la tumeur.

liorer les traitements de ces maladies. Dans le cas du cancer, la prolifération rapide des cellules tumorales entraîne une baisse du niveau d'oxygène, ou hypoxie, au cœur de la tumeur, qui va être perçue par l'environnement cellulaire comme un signal d'activation de la néo-vascularisation (Fig. 1).

D'un point de vue moléculaire, l'hypoxie provoque l'induction d'un ensemble de gènes parmi lesquels on retrouve l'angiopoïétine 2, dont la fonction est de déstabiliser le réseau vasculaire préexistant, ou encore les gènes codant pour le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) et son récepteur VEGFR2, des éléments cruciaux dans la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. L'irrigation par le système sanguin apporte à la tumeur nutriments et oxygène nécessaires à sa croissance, faute de quoi elle serait vouée à la nécrose. De plus, la circulation sanguine représente une voie royale permettant à la tumeur de s'étendre à des organes plus éloignés via la formation de métastases. La clé de la transmission de l'information hypoxique est le facteur inductible par l'hypoxie HIF-1 (*Hypoxia-Inducible Factor-1*). En réponse au stress hypoxique, HIF-1 contrôle l'expression de gènes dont les fonctions physiologiques convergent toutes vers le maintien de l'homéostasie de l'oxygène : augmentation par exemple de la fréquence respiratoire ou du flux sanguin par vasodilatation, du nombre de globules rouges et de la densité du réseau vasculaire (Krieg *et al.*, 2000) (Fig. 2).

En plus de sa stabilisation par l'hypoxie, HIF-1 α peut être induit et activé par divers facteurs comme l'insuline, les cytokines, l'IGF1 et 2 (*Insulin-like Growth Factor*), l'EGF (*Epidermal Growth Factor*), le TNF α (*Tumour*

Necrosis Factor) ou encore les agents vaso-actifs comme la thrombine et l'angiotensine 2. Cette induction est généralement moins intense que celle provoquée par l'hypoxie et bien qu'elle semble passer par la voie Akt/mTOR elle n'est pas à ce jour complètement élucidée. Ainsi, il a été montré que les formes constitutivement actives des oncogènes Ras, Her2, Src ou mTOR ainsi que les formes inactivées des suppresseurs de tumeur pVHL, PTEN ou p53 sont associées à un fort niveau d'expression de HIF-1 α dans de nombreux cancers (Semenza, 2002).

MISE EN ÉVIDENCE DU COMPLEXE HIF-1

Il est établi depuis longtemps que les conditions hypoxiques sont capables de stimuler l'expression de l'érythropoïétine (EPO), une hormone augmentant le nombre de globules rouges et donc le potentiel de capture de l'oxygène du sang. Les premières observations mettant en lumière un rapport entre l'érythropoïèse et l'hypoxie datent de la fin du XIX^e 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 faible teneur en oxygène rencontrée en haute altitude. La base moléculaire de cette réponse devra attendre un siècle avant d'être élucidée, avec la purification du facteur érythropoïétique EPO, et la mise en évidence de son rôle sur la prolifération et la différenciation des globules rouges. Une région *enhancer* en 3' non codant du gène *epo* a été identifiée comme responsable de l'induction de la transcription de l'*epo* en

HIF-1 et la réponse hypoxique

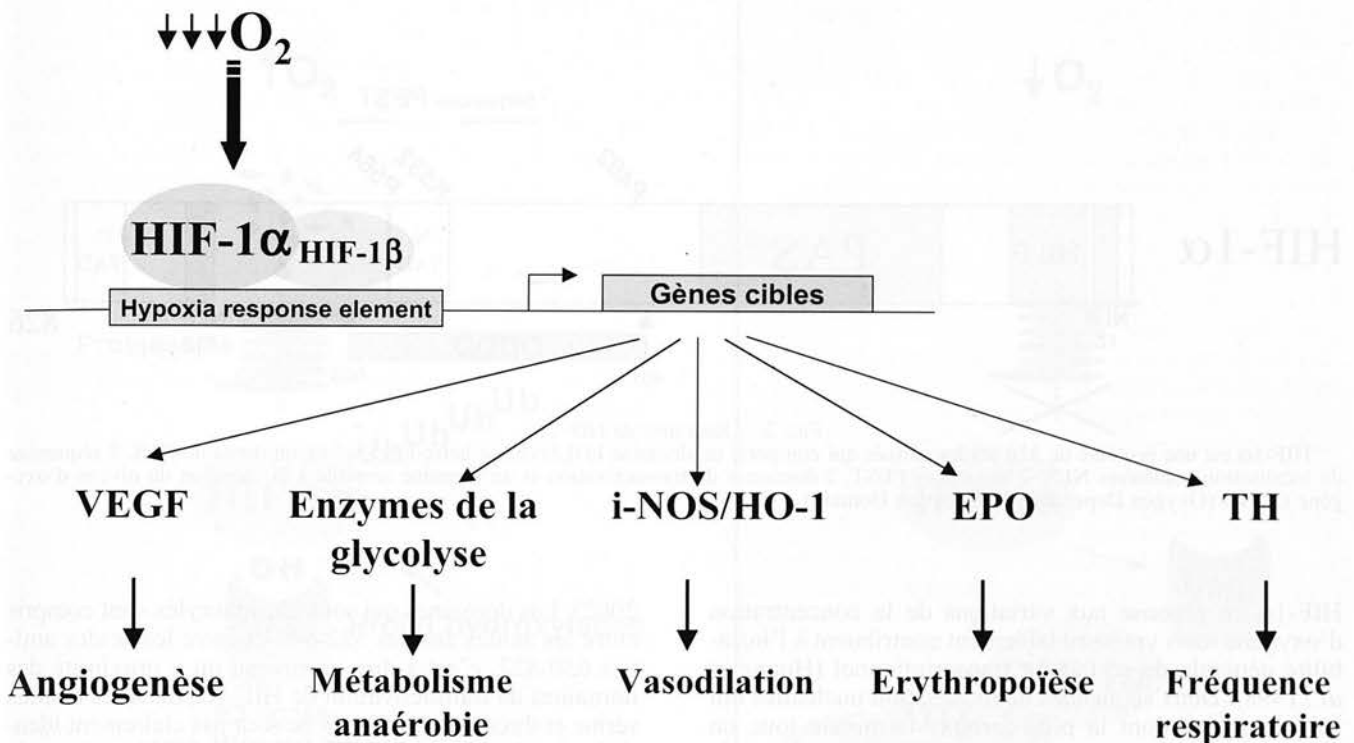


FIG. 2. – HIF-1 α contrôle l'expression de gènes qui répondent à la baisse du niveau d'oxygène.

Sous hypoxie, la sous-unité α du complexe HIF-1 est stabilisée, elle se dimérise avec la sous-unité β et le dimère se fixe au niveau d'un élément de réponse à l'hypoxie (Hypoxia Response Element, HRE). Les fonctions des gènes qui sont sous le contrôle de HIF-1 convergent toutes vers le maintien de l'homéostasie de l'oxygène.

réponse à l'hypoxie. Cette région identifiée par le groupe de G. Semenza (Semenza *et al.*, 1991) est nommée HRE (*Hypoxia Reponse Element*). Cette séquence fixe en hypoxie un complexe protéique nommé HIF-1 (*Hypoxia-Inducible Factor-1*). La découverte de HIF-1 a permis le clonage de deux ADN complémentaires (Wang *et al.*, 1995; Wang & Semenza, 1995) 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, impliquée dans les phénomènes de détoxication des cellules et exprimée de façon constitutive. En revanche, bien que la protéine HIF-1 α soit en permanence synthétisée, ce n'est qu'en condition hypoxique qu'elle sera stabilisée et pourra remplir sa fonction. Le gène *hif-1 α* , localisé sur le chromosome 14 (14q21-q24) (Semenza *et al.*, 1996; Iyer *et al.*, 1998) est constitué de 15 exons chez l'Homme. Il existe trois isoformes de la sous-unité α , HIF-1 α , HIF-2 α (aussi connue sous le nom de EPAS-1, MOP2, HLF et HRF) et HIF-3 α . De plus, plusieurs formes issues d'épissages alternatifs ont été mises en évidence pour la forme humaine de HIF-1 α , mais leurs rôles physiologiques restent à déterminer (Drutel *et al.*, 2000; Gothié *et al.*, 2000).

Chez l'Homme les transcrits de HIF-1 α sont fortement exprimés dans tous les organes de façon constitutive (Wiener *et al.*, 1996).

STRUCTURE DE HIF-1 α

La forme humaine de HIF-1 α est constituée de 826 acides aminés. Elle contient un domaine bHLH (basic-Helix-Loop-Helix) et un domaine PAS (PER-ARNT-SIM) à son extrémité amino-terminale et fait donc partie d'une superfamille de protéines contenant ces domaines (AHR (*Aryl Hydrocarbon Receptor*), SIM (*Single-Minded*), PER (*Period*)...). Le motif HLH intervient dans la dimérisation de la protéine avec la sous-unité HIF-1 β , tandis que la région basique qui le précède intervient dans la fixation et la spécificité de la liaison 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 protéine des Vertébrés ARNT). Deux séquences PEST de 20 acides aminés (riches en proline, acide glutamique, sérine ou thréonine) ont été décrites, elles ne semblent pas être impliquées dans l'instabilité de



Structure de la protéine HIF-1 α

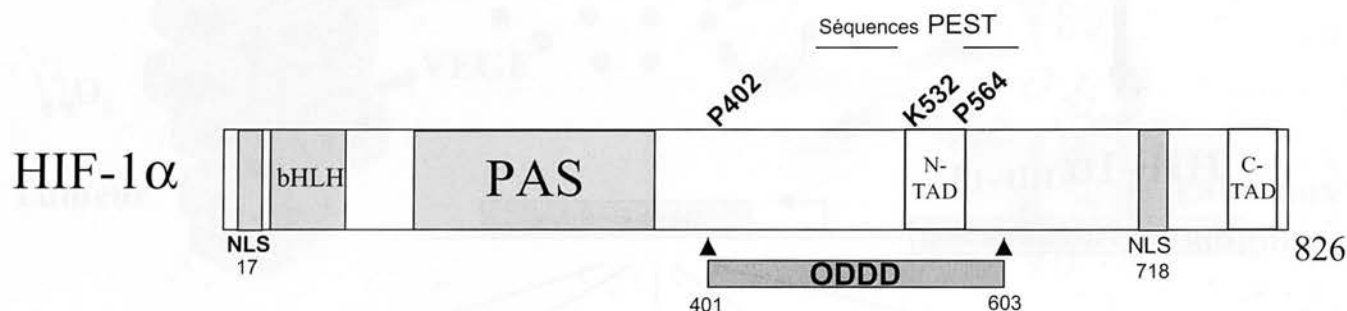


FIG. 3. – Structure de HIF-1 α .

HIF-1 α est une protéine de 826 acides aminés qui comporte un domaine bHLH (basic helix-loop-helix), un domaine PAS, 2 séquences de localisation nucléaires NLS, 2 séquences PEST, 2 domaines de transactivation et un domaine sensible à la variation du niveau d'oxygène ODDD (Oxygen-Dependant Degradation Domain).

HIF-1 α en réponse aux variations de la concentration d'oxygène mais vraisemblablement contribuent à l'instabilité générale de ce facteur transcriptionnel (Huang *et al.*, 1998). Deux séquences de localisation nucléaires ont été identifiées dont la plus carboxy-terminale joue un rôle clef dans l'import nucléaire de HIF-1 α sous hypoxie (Kallio *et al.*, 1998). HIF-1 α contient deux domaines de transactivation (TAD) situés dans sa partie carboxy-terminale (N-TAD entre les aminoacides 531-575 et C-TAD entre les aminoacides 786-826), et un domaine, sensible aux concentrations d'oxygène et responsable de la dégradation (*Oxygen-Dependent-Degradation Domain*, (ODDD) situé entre les acides aminés 401 et 603 (Fig. 3).

Ce domaine critique pour la régulation de HIF-1 α est le siège de nombreuses modifications post-traductionnelles.

LES MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES DE HIF-1 α

La phosphorylation

HIF-1 α est une protéine fortement phosphorylée ce qui altère sa mobilité électrophorétique en gel de polyacrylamide de plusieurs kDa. Un blocage des MAP kinases phosphatases, par une exposition courte des cellules à l'oxovanadate, active pleinement les formes nucléaires de ERK1 et ERK2. Cette action induit une phosphorylation complète du pool de HIF-1 α (Richard *et al.*, 1999; Volmat *et al.*, 2001). À ce jour, seule la voie p42/p44 MAPK (ERK1/ERK2) a été montrée comme étant capable de phosphoryler HIF-1 α avec une augmentation concomitante de son potentiel transactivateur. Cependant, cette phosphorylation n'a pas d'effet sur sa stabilité ni sur sa capacité de liaison à l'ADN (Lee *et al.*,

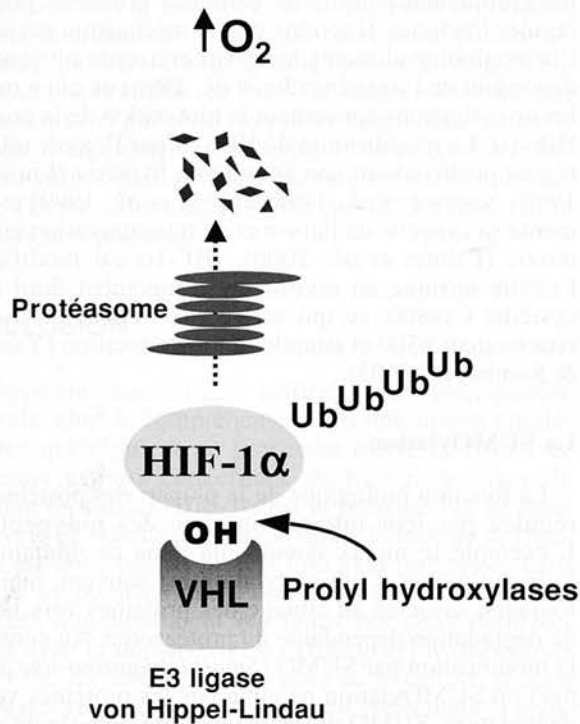
2002). Les domaines qui sont phosphorylés sont compris entre les acides aminés 522-649 et entre les acides aminés 650-822, c'est-à-dire au niveau ou à proximité des domaines de transactivation de HIF-1 α , mais les résidus sérine et thréonine impliqués ne sont pas clairement identifiés. La phosphorylation de HIF-1 α est indépendante de l'hypoxie puisqu'elle peut être observée en normoxie dans le cas de surexpression de la protéine (Richard *et al.*, 1999). Cela suggère donc que la phosphorylation de HIF-1 α a lieu dès que la protéine est produite, mais des phosphorylations additionnelles pourraient encore avoir lieu en réponse à l'hypoxie pour induire l'activation complète de HIF-1 α .

L'hydroxylation

En normoxie, c'est-à-dire en conditions normales d'oxygène (21 % d'O₂), la protéine HIF-1 α est exprimée de façon constitutive mais est en permanence dégradée par le système ubiquitine-protéasome. Cette dégradation (demi-vie < à 5 minutes) a lieu à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau (Berra *et al.*, 2001), indiquant que les mécanismes ciblant l'entrée de HIF-1 α dans le protéasome doivent opérer dans les deux compartiments cellulaires. L'ubiquitine E3 ligase pVHL (*von Hippel-Lindau*) ubiquitine HIF-1 α au niveau de son domaine ODDD. En hypoxie (niveau d'oxygène < à 21 %) HIF-1 α est stabilisé et va pouvoir se transloquer dans le noyau pour activer ses gènes cibles (Fig. 4).

Le mécanisme par lequel HIF-1 α est stabilisé en hypoxie est longtemps resté un mystère jusqu'à ce que deux groupes découvrent que l'hydroxylation post-traductionnelle de HIF-1 α jouait un rôle clé dans la stabilité de la protéine (Ivan *et al.*, 2001; Jaakkola *et al.*, 2001). En effet, l'hydroxylation de résidus proline présents dans le domaine ODDD de HIF-1 α est absolument requise pour la reconnaissance et l'interaction de HIF-1 α

NORMOXIE



HYPOXIE

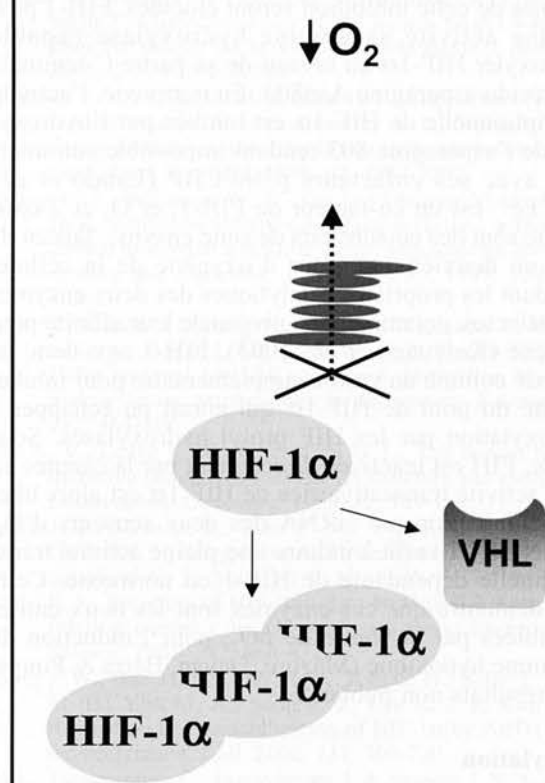


FIG. 4. – HIF-1 α est en permanence dégradé par le système ubiquitine protéasome en normoxie mais est stabilisé sous hypoxie.

En normoxie, les prolyl-hydroxylases hydroxylent HIF-1 α ce qui permet son interaction avec l'ubiquitine ligase pVHL et donc son ubiquitination et son ciblage vers la voie de dégradation dépendante du protéasome. Sous hypoxie, les HIF prolyl-hydroxylases sont inactivées, l'interaction entre HIF-1 α et pVHL est inhibée et donc la protéine HIF-1 α s'accumule dans la cellule.

avec le suppresseur de tumeur pVHL (Ivan *et al.*, 2001 ; Jaakkola *et al.*, 2001). L'enzyme impliquée dans l'hydroxylation de HIF-1 α est conservée de *Caenorhabditis elegans* à l'Homme et partage des caractéristiques communes avec les prolyl-4-hydroxylases qui modifient le collagène. Ces enzymes possèdent l'ion Fe²⁺ au cœur de leur site catalytique, et nécessitent O₂, 2-oxoglutarate et ascorbate comme co-substrats. Ces prolyl hydroxylases, dont l'activité est directement liée à la concentration en O₂ cellulaire, sont de véritables senseurs d'oxygène. En conséquence, la baisse de pO₂ tissulaire s'accompagne d'une baisse de l'activité des hydroxylases voire de leur inactivation totale en anoxie. Les prolyl hydroxylases jouent donc le rôle de senseurs d'oxygène de la cellule, et sont directement inactivées par la carence de l'un ou l'autre de leurs cofacteurs. Trois HIF prolyl hydroxylases (PHD1, 2 et 3) ont été identifiées chez les Mammifères pour leur capacité à hydroxyler HIF-1 α *in vitro* au niveau des résidus proline Pro402 et Pro564 (Epstein *et al.*, 2001). La séquence peptidique contenant ces prolines, le motif LXXLAP, est hautement conservée entre les espèces et retrouvée dans les trois isoformes HIF-1 α ,

HIF-2 α et HIF-3 α ; pour cette dernière isoforme cependant, seul le deuxième site est conservé (Hirsila *et al.*, 2003). Bien que trois enzymes aient été mises en évidence, notre équipe a récemment montré que l'inhibition spécifique de l'isoforme PHD2 *via* l'utilisation d'ARN interférence est suffisante pour stabiliser et activer HIF-1 α en normoxie. Dans toutes les cellules humaines analysées nous montrons que PHD2 est l'enzyme limitante clé contrôlant l'instabilité de HIF-1 α en normoxie (Berra *et al.*, 2003). Par ailleurs cette enzyme, localisée dans le cytoplasme, est capable de faire la navette cytoplasme-noyau et donc contribue à la dégradation de HIF-1 α dans les deux compartiments cellulaires (Ginouves, Roux, Berra & Pouyssegur, résultats non publiés). De plus, il est tout à fait intéressant de noter que, sous hypoxie, HIF-1 α induit l'expression du gène *phd2*, régulant ainsi sa propre dégradation par l'accumulation de la protéine PHD2, qui sera capable d'hydroxyler HIF-1 α plus rapidement lors d'un retour en conditions normales d'oxygène (Berra *et al.*, 2003).

Par ailleurs, il a été montré que HIF-1 α interagit avec la protéine FIH-1 (*Factor Inhibiting HIF-1 α*) au niveau

du domaine C-TAD ce qui inhibe la fonction transactivatrice de HIF-1 α (Mahon *et al.*, 2001). En réalité, ce n'est que deux années plus tard que les mécanismes responsables de cette inhibition seront élucidés. FIH-1 possède une activité asparagine hydroxylase capable d'hydroxyler HIF-1 α au niveau de sa partie C-terminale sur le résidu asparagine Asn803. En normoxie, l'activité transcriptionnelle de HIF-1 α est inhibée par l'hydroxylation de l'asparagine 803 rendant impossible son interaction avec ses cofacteurs p300/CBP (Lando *et al.*, 2002). Fe²⁺ est un co-facteur de FIH-1, et O₂ et 2-oxoglutarate sont des co-substrats de cette enzyme, faisant de FIH-1 un deuxième senseur d'oxygène de la cellule. Cependant les propriétés catalytiques des deux enzymes sont distinctes, notamment au niveau de leur affinité pour l'oxygène (Koivunen *et al.*, 2003). FIH-1 agit donc en normoxie comme un verrou supplémentaire pour inhiber l'activité du pool de HIF-1 α qui aurait pu échapper à l'hydroxylation par les HIF prolyl hydroxylases. Sous hypoxie, FIH est inactivée directement par la carence en O₂ et l'activité transactivatrice de HIF-1 α est alors libérée. L'élimination par siRNA des deux senseurs d'O₂, PHD2 et FIH-1 suffit à induire une pleine activité transcriptionnelle dépendante de HIF-1 en normoxie. Cette action démontre que ces enzymes sont les deux entités clés, ciblées par la baisse de pO₂, pour l'induction du programme hypoxique (Mazure, Dayan, Berra & Pouyssegur, résultats non publiés).

L'acétylation

L'acétylation est une modification post-traductionnelle dont l'exemple le mieux documenté est celui de l'acétylation des histones. Son rôle est d'ouvrir la chromatine pour la rendre accessible aux facteurs de transcription. De nombreuses histones acétyl-transférases ont été décrites, (PCAF, p300/CBP, SRC1 and MOZ) (Kouzarides, 1999). Plus récemment, la fonction de ces enzymes s'est élargie à leur capacité de modifier des facteurs intervenant dans le processus général de transcription, par exemple E2F1, MyoD, GATA-1, p53 (Kouzarides, 2000). De façon similaire à la phosphorylation, l'acétylation peut réguler l'affinité des facteurs de transcription pour l'ADN ou encore leur interaction avec d'autres protéines. Dans le cas de HIF-1 α , l'acétylation de la lysine Lys532 par l'acétyl-transférase ARD1 (homologue mammifère de la protéine de levure *ARrest Defective protein 1*) joue un rôle sur la stabilité de la protéine. Cette modification a pour effet d'augmenter l'affinité de HIF-1 α pour l'ubiquitine-ligase pVHL ce qui entraîne une déstabilisation de la protéine (Jeong *et al.*, 2002). Bien que les mécanismes exacts de cette voie ne soient pas clairement identifiés, il a été décrit par ailleurs que les inhibiteurs de HDAC (Histones Desacétylases) tels que la trichostatine A, autrement dit des molécules qui favorisent l'acétylation d'une façon générale, ont un effet anti-angiogénique qui passe par l'inhibition de la protéine HIF-1 α (Kim *et al.*, 2001; Deroanne *et al.*, 2002) ce qui semble cohérent avec le rôle décrit pour l'acétylation de HIF-1 α par ARD1.

La S-nitrosation

L'oxyde nitrique est capable de créer une liaison avec les groupements thiols de certaines protéines pour en réguler l'activité. Il semble que le mécanisme par lequel l'hémoglobine alimente les tissus en oxyde nitrique soit dépendant de l'oxygène (Jia *et al.*, 1996) ce qui a motivé les investigations concernant la nitrosation de la protéine HIF-1 α . La modification de HIF-1 α par l'oxyde nitrique régule positivement son activité en hypoxie (Liu *et al.*, 1998; Sogawa *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 1999) et augmente sa capacité de liaison et de transactivation en normoxie (Palmer *et al.*, 2000). HIF-1 α est modifié par l'oxyde nitrique au niveau du groupement thiol de la cystéine Cys800, ce qui active son interaction avec le coactivateur p300 et stimule sa transactivation (Yasinska & Sumbayev, 2003).

La SUMOylation

La fonction biologique de la plupart des protéines est régulée par leur interaction avec des polypeptides. L'exemple le mieux documenté dans ce domaine est l'ubiquitylation. L'ubiquitylation est souvent, mais pas toujours, associée au ciblage des protéines vers la voie de dégradation dépendante du protéasome. Au contraire, la modification par SUMO (*Small Ubiquitine-like Modifier*) ou SUMOylation ne cible pas les protéines vers la dégradation. SUMO présente une forte homologie structurale avec l'ubiquitine et comme elle, sera transféré au niveau d'une lysine de la protéine cible *via* une cascade enzymatique comprenant les activités d'activation E1, de conjugaison E2 et de ligase E3 (Melchior, 2000). Cependant, les rôles de SUMO sont variés suivant les substrats et ne sont pas encore totalement compris. Parmi les fonctions décrites à l'heure actuelle pour SUMO, on trouve par exemple *i*) la relocalisation subcellulaire; c'est le cas par exemple de RanGAP1 au niveau du pore nucléaire (Mahajan *et al.*, 1997) ou de la protéine PML (*Promyelocytic Leukemia*) au niveau des corps nucléaires PML (Zhong *et al.*, 2000), *ii*) la protection contre la dégradation; c'est le cas de la protéine I κ Ba, pour laquelle SUMO et ubiquitine entrent en compétition au niveau de la même lysine (Desterro *et al.*, 1998) ou encore *iii*) la modulation de l'activité transactivatrice des protéines-cibles. Concernant les facteurs de transcription, de plus en plus d'exemples de facteurs modifiés par SUMO sont décrits dans la littérature, et dans la majorité des cas, cette modification réprime l'activité transcriptionnelle de ces facteurs en relocalisant ces derniers dans des compartiments nucléaires spécifiques. On citera par exemple la SUMOylation du facteur Sp3 dont l'activité est réprimée *via* sa séquestration dans les "nuclear speckles" (petites taches nucléaires) (Ross *et al.*, 2002; Sapetschnig *et al.*, 2002) ou encore celle de Lef-1 dont la répression passe par sa relocalisation dans les corps PML (Sachdev *et al.*, 2001). Comme cela a été récemment décrit, la sous-unité β du facteur HIF-1 est également modifiée par SUMO et, là encore, cela conduit à une réduction de son activité transactivatrice.

(Tojo *et al.*, 2002). De nombreuses expériences réalisées au sein de notre équipe tendent à montrer que la sous-unité α du complexe HIF-1 est également modifiée par SUMO à la fois *in vitro* et *in vivo*. Bien que la fonction de cette modification ne soit pas clairement démontrée, il semble que SUMO joue un rôle répresseur dans l'activité transcriptionnelle de HIF-1 α lorsque l'on mesure l'expression d'un gène "reporter luciférase" sous le contrôle d'un élément de réponse à l'hypoxie. Ce résultat reste néanmoins à valider par une approche indépendante (Berta, Mazure, Pouyssegur & Brahimi-Horn, résultats non publiés).

CONCLUSION

L'hypoxie joue un rôle central dans l'angiogenèse tumorale, ainsi la compréhension des mécanismes moléculaires qui régulent ce processus ouvre la voie à de nouveaux espoirs concernant les traitements dans le domaine du cancer. HIF-1 α est la protéine clé au cœur de la voie de signalisation hypoxique, l'étude de sa régulation est donc primordiale si l'on veut progresser dans la mise au point de nouvelles thérapies. Bien que des avancées majeures aient été faites ces deux dernières années avec la découverte des HIF-prolyl hydroxylases et de FIH, les senseurs d'oxygène de la cellule, il reste encore de nombreux points à éclaircir concernant la régulation de HIF-1 α .

BIBLIOGRAPHIE

- Berra E., Benizri E., Ginouves A., Volmat V., Roux D. & Pouyssegur J., HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1 α in normoxia. *Embo. J.*, 2003, 22, 4082-4090.
- Berra E., Roux D., Richard D. E. & Pouyssegur J., Hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) escapes O₂-driven proteasomal degradation irrespective of its subcellular localization: nucleus or cytoplasm. *Embo. Rep.*, 2001, 7, 615-620.
- Bruick R. K. & McKnight S. L., Building better vasculature. *Genes Dev.*, 2001, 15, 2497-2502.
- Deroanne C. F., Bonjean K., Servotte S., Devy L., Colige A., Clausse N., Blacher S., Verdin E., Foidart J. M., Nusgens B. V. & Castronovo V., Histone deacetylases inhibitors as anti-angiogenic agents altering vascular endothelial growth factor signaling. *Oncogene*, 2002, 21, 427-436.
- Desterro J. M., Rodriguez M. S. & Hay R. T., SUMO-1 modification of I κ B α inhibits NF-kappaB activation. *Mol. Cell.*, 1998, 2, 233-239.
- Drutel G., Kathmann M., Heron A., Gros C., Mace S., Schwartz J. C. & Arrang J. M., Two splice variants of the hypoxia-inducible factor HIF-1 α as potential dimerization partners of ARNT2 in neurons. *Eur. J. Neurosci.*, 2000, 12, 3701-3708.
- Epstein A. C., Gleadle J. M., McNeill L. A., Hewitson K. S., O'Rourke J., Mole D. R., Mukherji M., Metzen E., Wilson M. I., Dhanda A., Tian Y. M., Masson N., Hamilton D. L., Jaakkola P., Barstead R., Hodgkin J., Maxwell P. H., Pugh C. W., Schofield C. J. & Ratcliffe P. J., *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell*, 2001, 107, 43-54.
- Gothié E., Richard D. E., Berra E., Pages G. & Pouyssegur J., Identification of alternative spliced variants of human hypoxia-inducible factor-1 α . *J. Biol. Chem.*, 2000, 275, 6922-6927.
- Hirsila M., Koivunen P., Gunzler V., Kivirikko K. I. & Myllyharju J., Characterization of the human prolyl 4-hydroxylases that modify the hypoxia-inducible factor. *J. Biol. Chem.*, 2003, 278, 30772-30780.
- Huang L. E., Gu J., Schau M. & Bunn H. F., Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, 95, 7987-7992.
- Huang L. E., Willmore W. G., Gu J., Goldberg M. A. & Bunn H. F., Inhibition of hypoxia-inducible factor 1 activation by carbon monoxide and nitric oxide. Implications for oxygen sensing and signaling. *J. Biol. Chem.*, 1999, 274, 9038-9044.
- Ivan M., Kondo K., Yang H., Kim W., Valiando J., Ohh M., Salic A., Asara J. M., Lane W. S. & Kaelin W. G., Jr., HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science*, 2001, 292, 464-468.
- Iyer N. V., Leung S. W. & Semenza G. L., The human hypoxia-inducible factor 1 α gene: HIF1A structure and evolutionary conservation. *Genomics*, 1998, 52, 159-165.
- Jaakkola P., Mole D. R., Tian Y. M., Wilson M. I., Gielbert J., Gaskell S. J., Kriegsheim A., Hebestreit H. F., Mukherji M., Schofield C. J., Maxwell P. H., Pugh C. W. & Ratcliffe P. J., Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science*, 2001, 292, 468-472.
- Jeong J. W., Bae M. K., Ahn M. Y., Kim S. H., Sohn T. K., Bae M. H., Yoo M. A., Song E. J., Lee K. J. & Kim K. W., Regulation and destabilization of HIF-1 α by ARD1-mediated acetylation. *Cell*, 2002, 111, 709-720.
- Jia L., Bonaventura C., Bonaventura J. & Stamler J. S., S-nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control. *Nature*, 1996, 380, 221-226.
- Kallio P. J., Okamoto K., O'Brien S., Carrero P., Makino Y., Tanaka H. & Poellinger L., Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1 α . *Embo. J.*, 1998, 17, 6573-6586.
- Kim M. S., Kwon H. J., Lee Y. M., Baek J. H., Jang J. E., Lee S. W., Moon E. J., Kim H. S., Lee S. K., Chung H. Y., Kim C. W. & Kim K. W., Histone deacetylases induce angiogenesis by negative regulation of tumor suppressor genes. *Nat. Med.*, 2001, 7, 437-443.
- Koivunen P., Hirsila M., Gunzler V., Kivirikko K. I. & Myllyharju J., Catalytic properties of the asparaginyl hydroxylase (FIH) in the oxygen sensing pathway are distinct from those of its prolyl 4-hydroxylases. *J. Biol. Chem.*, 2004, 279, 9899-9904.
- Kouzarides T., Histone acetylases and deacetylases in cell proliferation. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 1999, 9, 40-48.
- Kouzarides T., Acetylation: a regulatory modification to rival phosphorylation? *Embo. J.*, 2000, 19, 1176-1179.
- Krieg M., Haas R., Brauch H., Acker T., Flamme I. & Plate K. H., Up-regulation of hypoxia-inducible factors HIF-1 α and HIF-2 α under normoxic conditions in renal carcinoma cells by von Hippel-Lindau tumor suppressor gene loss of function. *Oncogene*, 2000, 19, 5435-5443.
- Lando D., Peet D. J., Gorman J. J., Whelan D. A., Whitelaw M. L. & Bruick R. K., FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev.*, 2002, 16, 1466-1471.
- Lee E., Yim S., Lee S. K. & Park H., Two transactivation domains of hypoxia-inducible factor-1 α regulated by the MEK-1/p42/p44 MAPK pathway. *Mol. Cells*, 2002, 14, 9-15.

- Liu Y., Christou H., Morita T., Laughner E., Semenza G. L. & Kourembanas S., Carbon monoxide and nitric oxide suppress the hypoxic induction of vascular endothelial growth factor gene via the 5' enhancer. *J. Biol. Chem.*, 1998, 273, 15257-15262.
- Mahajan R., Delphin C., Guan T., Gerace L. & Melchior F., A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. *Cell*, 1997, 88, 97-107.
- Mahon P. C., Hirota K. & Semenza G. L., FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1 α and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes Dev.*, 2001, 15, 2675-2686.
- Melchior F., SUMO-nonclassical ubiquitin. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 2000, 16, 591-626.
- Palmer L. A., Gaston B. & Johns R. A., Normoxic stabilization of hypoxia-inducible factor-1 expression and activity: redox-dependent effect of nitrogen oxides. *Mol. Pharmacol.*, 2000, 58, 1197-1203.
- Richard D. E., Berra E., Gothie E., Roux D. & Pouyssegur J., p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. *J. Biol. Chem.*, 1999, 274, 32631-32637.
- Ross S., Best J. L., Zon L. I. & Gill G., SUMO-1 modification represses Sp3 transcriptional activation and modulates its subnuclear localization. *Mol. Cell*, 2002, 10, 831-842.
- Sachdev S., Bruhn L., Sieber H., Pichler A., Melchior F. & Groschedl R., PIASy, a nuclear matrix-associated SUMO E3 ligase, represses LEF1 activity by sequestration into nuclear bodies. *Genes Dev.*, 2001, 15, 3088-3103.
- Sapetschnig A., Rischitor G., Braun H., Doll A., Schergaut M., Melchior F. & Suske G., Transcription factor Sp3 is silenced through SUMO modification by PIAS1. *Embo. J.*, 2002, 21, 5206-5215.
- Semenza G.L., HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. *Trends Mol. Med.*, 2002, 8, S62-S67.
- Semenza G. L., Rue E. A., Iyer N. V., Pang M. G. & Kearns W. G., Assignment of the hypoxia-inducible factor 1 α gene to a region of conserved synteny on mouse chromosome 12 and human chromosome 14q. *Genomics*, 1996, 34, 437-439.
- Semenza G. L., Neifelt M. K., Chi S. M. & Antonarakis S. E., Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, 88, 5680-5684.
- Sogawa K., Numayama-Tsuruta K., Ema M., Abe M., Abe H. & Fujii-Kuriyama Y., Inhibition of hypoxia-inducible factor 1 activity by nitric oxide donors in hypoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, 95, 7368-7373.
- Tojo M., Matsuzaki K., Minami T., Honda Y., Yasuda H., Chiba T., Saya H., Fujii-Kuriyama Y. & Nakao M., The aryl hydrocarbon receptor nuclear transporter is modulated by the SUMO-1 conjugation system. *J. Biol. Chem.*, 2002, 277, 46576-46585.
- Volmat V., Camps M., Arkinstall S., Pouyssegur J. & Lenormand P., The nucleus, a site for signal termination by sequestration and inactivation of p42/p44 MAP kinases. *J. Cell. Sci.*, 2001, 114, 3433-3443.
- Wang G. L., Jiang B. H., Rue E. A. & Semenza G. L., Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, 92, 5510-5514.
- Wang G. L. & Semenza G. L., Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J. of Biol. Chem.* 1995, 270, 1230-1237.
- Wiener C. M., Booth G. & Semenza G. L., *In vivo* expression of mRNAs encoding hypoxia-inducible factor 1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1996, 225, 485-488.
- Yasinska I. M. & Sumbayev V. V., S-nitrosation of Cys-800 of HIF-1 α protein activates its interaction with p300 and stimulates its transcriptional activity. *FEBS Lett.*, 2003, 549, 105-109.
- Zhong S., Muller S., Ronchetti S., Freemont P. S., Dejean A. & Pandolfi P. P., Role of SUMO-1-modified PML in nuclear body formation. *Blood*, 2000, 95, 2748-2752.