

HIF-1 : régulateur central de l'hypoxie

Emmanuel Gothié, Jacques Pouysségur

> Les espèces animales ont mis en place un système ingénieux et conservé d'adaptation rapide et durable à de fortes baisses de concentration d'oxygène. Le stress hypoxique est " géré " par la stabilisation et l'activation d'une sous-unité (HIF-1 α) du facteur de transcription central, HIF-1. Ce facteur transcriptionnel coordonne l'induction de plusieurs gènes et unités physiologiques (stimulation de l'angiogenèse, de l'érythropoïèse et de la glycolyse anaérobie, par exemple) qui concourent à compenser la rareté d'oxygène. Le rôle décisif joué par HIF-1 dans le contrôle de l'expression du facteur de croissance vasculaire (VEGF) et de l'angiogenèse tumorale a suscité un regain d'intérêt pour l'étude de HIF-1 et du système " senseur d'oxygène ". Cette synthèse fait le point sur les acquis les plus récents de la " signalisation hypoxique " avec un éclairage particulier pour les mécanismes de contrôle de HIF-1.

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 à la suite de 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 nécessaires 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 nombre 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 au cours des deux dernières décennies. L'objectif de cette revue est de faire le point sur le régulateur clé 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 évidence 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 captage 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

E. Gothié, J. Pouysségur :
Institut de Recherches
Signalisation, Biologie du
développement et Cancer ,
Cnrs UMR 6543, IFR 72, Centre
A. Lacassagne, 33, avenue de
Valombrose, 06189 Nice,
France.
pouysseg@unice.fr

(*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, 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. En revanche, HIF-1 α est spécifique de la réponse hypoxique.

Les gènes codant pour HIF-1 α et ARNT1 ont été clonés chez de nombreuses espèces (souris, rat, xénope, drosophile...) et leur séquence protéique est très conservée (90 % d'homologie entre l'homme, le rat et la souris).

Le gène *hif-1 α* , localisé sur le chromosome 14 (14q21-q24), 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 [8, 9] puis récemment chez l'homme [10]. 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 (1q21). Des phénomènes d'épissage alternatif sont aussi décrits pour *arnt1*, ainsi le gène humain présente un exon alternatif retrouvé aussi chez le rat. Un autre épissage est également décrit chez la truite.

Chez l'homme, les transcrits de *hif-1 α* sont fortement

exprimés dans tous les organes de façon constitutive [11]. Cette expression ubiquiste a été confirmée chez la souris [9,12]. Les transcrits du gène *arnt1* sont exprimés de façon ubiquiste et constitutive chez la souris [13], une distribution semblable étant globalement retrouvée chez le rat [14].

Structure de HIF-1

HIF-1 est un hétérodimère constitué des deux sous-unités HIF-1 α et ARNT1/HIF-1 β (Figure 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 *drosophile*, PER et SIM, et la protéine des vertébrés ARNT). HIF-1 α contient d'autres domaines fonctionnels importants pour sa fonction de régulateur de la transcription de gènes cibles par l'hypoxie. Il s'agit tout d'abord de ses deux domaines de transactivation situés dans la partie carboxy-terminale. Étudiés par plusieurs

équipes, leur structure et leur régulation fine sont bien connues [15-17]. 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 813-826. Ils sont séparés par un domaine inhibiteur de la transcription [15]. La région précédant le domaine TAD-N, pourrait aussi présenter une activité d'inhibition [16]. ARNT1 contient aussi un domaine TAD dans sa partie carboxy-terminale, mais ce dernier n'est pas impliqué dans la réponse

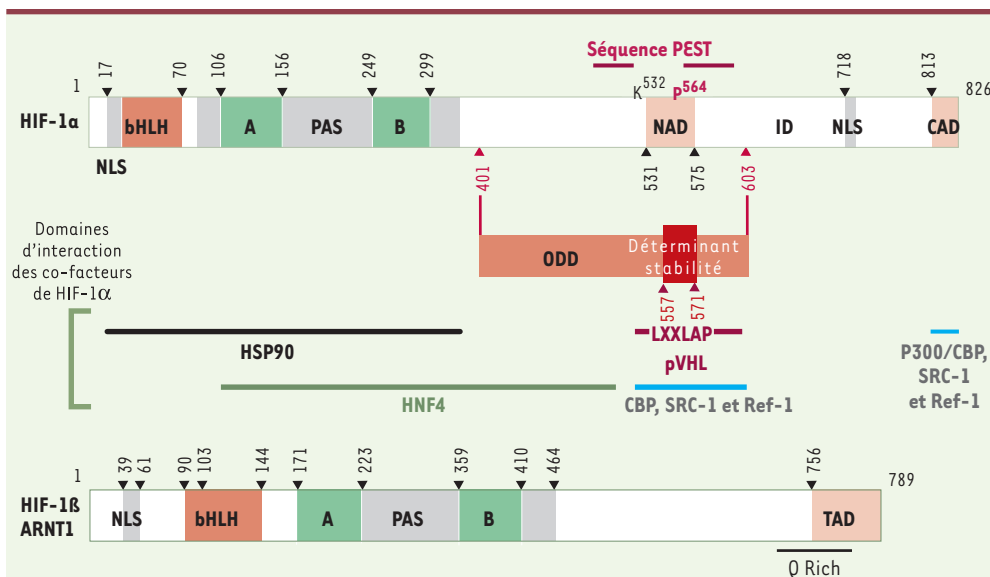


Figure 1. Structure des sous-unités humaines de HIF-1. Domaines fonctionnels des deux sous-unités de HIF-1 et, lorsqu'ils sont connus, domaines d'interaction des co-facteurs de HIF-1 α . ODD : *oxygen dependent degradation motif* ; LXXLAP : motif conservé de *C. elegans* à l'homme, et reconnu par la HIF-proline hydroxylase ; pVHL : *von Hippel Lindau protein* ; PAS : Per, Arnt, Sim motif ; NAD et CAD : domaines de transactivation N- et C-terminal ; NLS : séquences de localisation nucléaire.

à l'hypoxie [16], ce qui souligne encore que HIF-1 α est l'élément clé 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 [18] et situé entre les acides aminés 401-603 a été mis en évidence [19] (voir Régulation de l'activité de HIF-1). 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 par l'hypoxie des protéines HIF- α [20] et retrouvée aussi dans la protéine homologue de HIF-1 α chez la drosophile : *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 [19]. 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 ¹⁷RRKEKSRDAARSRRKE⁵³ (similaire au NLS, *nuclear localisation sequence*, de la nucléoplasmine) 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 grand-T de SV40. Cette séquence jouerait un rôle clé dans l'import nucléaire dépendant de l'hypoxie de HIF-1 α [21]. Les domaines de fixation connus des co-facteurs de HIF-1, p300/CBP, SRC-1, Ref-1, HSP90 et pVHL, sont aussi indiqués sur la figure 1 (voir Régulation de l'activité de HIF-1).

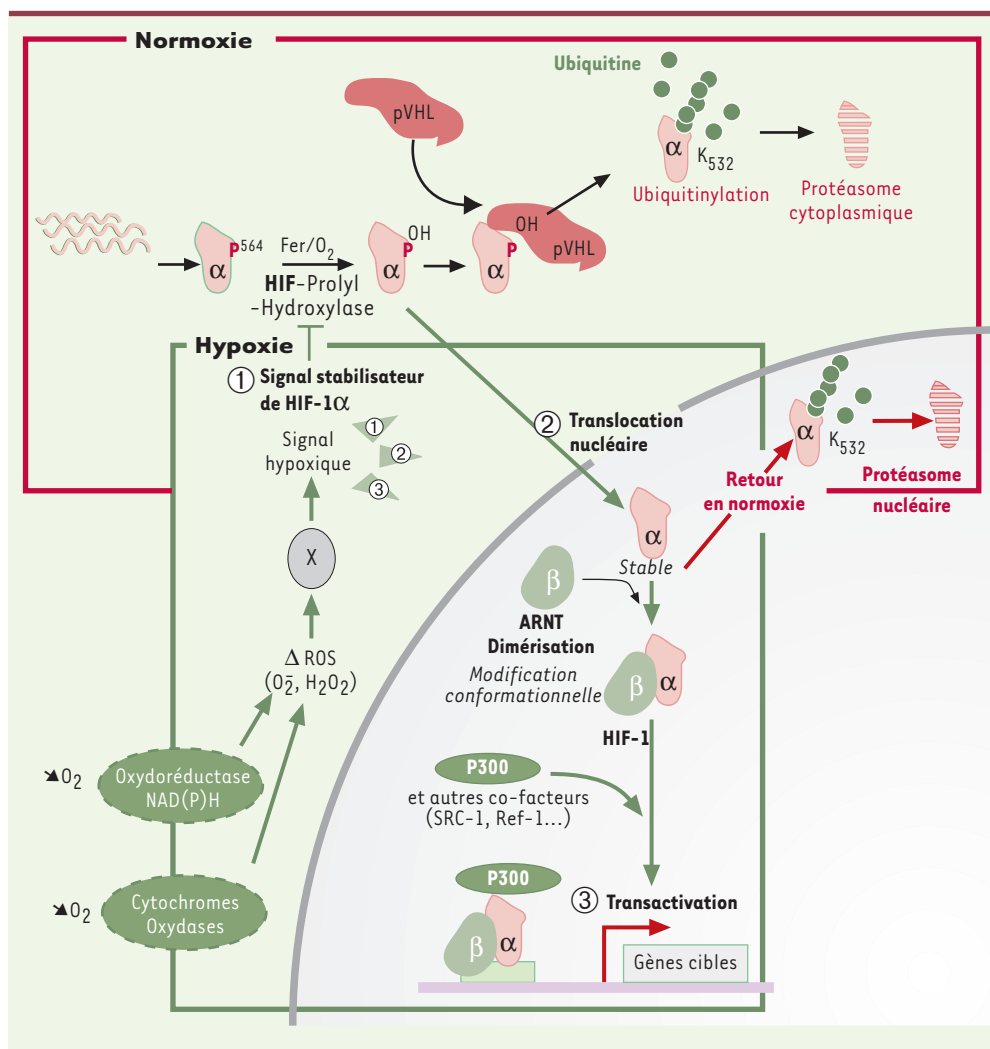


Figure 2. Régulation de l'activité de HIF-1. En condition de normoxie, la protéine HIF-1 α est très instable. Elle fixe pVHL, après une hydroxylation sur sa proline 564 dépendante de l'oxygène et du fer. La protéine pVHL fait partie d'un complexe (contenant les élongines B et C et la protéine CUL-2) qui possède une activité E3 ubiquitine 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 à son partenaire HIF-1 β /ARNT1 ainsi qu'à d'autres co-facteurs tels que p300/CBP pour activer des gènes sous la dépendance d'éléments de réponse 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 senseurs (oxydoréductases, cytochromes) participent aussi à l'élaboration du signal hypoxique via les ROS. De retour en hypoxie, HIF-1 α est rapidement dégradé, une étape pouvant être assurée par le protéasome nucléaire [55].



Régulation de l'activité de HIF-1

Induction hypoxique de HIF-1

Si les voies de signalisation en aval du facteur HIF-1 sont bien documentées, les mécanismes en amont par lesquels les variations d'oxygène sont détectées au niveau cellulaire sont demeurés très longtemps inconnus (Figure 2). Ainsi, plusieurs hypothèses sur la nature du senseur de 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 de HIF-1 impliquant une activité hydroxylase dépendante du fer et de l'oxygène. L'enzyme correspondante - dénommée HIF-PH pour *HIF- α prolyl-hydroxylase* - serait le senseur de l'oxygène cellulaire [22, 23]. Tout récemment, trois HIF-PH conservées de *C. elegans* à l'homme viennent d'être identifiées [56-57]*. D'autres hypothèses fondées sur l'intervention d'enzymes impliquées dans la formation de molécules oxygénées réactives (ROS pour *reactive oxygen species*) sont aussi avancées (voir Perspectives dans la détermination de la signalisation en amont de HIF-1). En ce qui concerne HIF-1, les éléments clés de sa régulation et de son activité 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 [24]. Au niveau protéique, ARNT1/HIF-1 β est lui aussi stable. En revanche, HIF-1 α est dégradé extrêmement rapidement en condition de normoxie (demi-vie de l'ordre de 5 min) [6] par le système ubiquitine/protéasome [18, 19, 25, 26].

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 culline-2 (Cul-2), un complexe qui présente une activité E3 ubiquitine 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 (→) [27, 28]. 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 [20, 27-29]. Dans cette région, le motif LXXLAP est

extrêmement important pour l'interaction entre pVHL et le domaine N-TAD d'HIF-1 α , une mutation de ce domaine abolissant totalement celle-ci. En fait, pVHL reconnaît une forme hydroxylée au niveau de la proline de ce domaine (Pro564), une modification apportée par HIF-PH. D'autres acides aminés comme les Leu562 et Tyr565, et les Ser551 et Thr552 sont aussi importants, mais sont sans doute impliqués pour faciliter l'hydroxylation de P564 (respectivement [22, 23] et [26]). Enfin, la lysine K532 du domaine N-TAD est clairement essentielle pour la dégradation d'HIF-1 α [27]. pVHL dirige directement l'ubiquitinylation d'HIF-1 α (et d'HIF-2 α) et la dégradation par le protéasome en normoxie qui s'ensuit [27]. L'hypoxie entraîne la stabilisation de cette sous-unité avec une diminution de l'ubiquitinylation de HIF-1 α [25] - un phénomène spécifique de HIF-1 α puisque l'hypoxie ne modifie pas l'ubiquitinylation de p53 [29] - 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 , inhibent cette interaction et stabilisent le facteur de transcription [22, 23].

HPTF (*HIF-1 α proteasome targeting factor*) est aussi un facteur impliqué dans la dégradation de HIF-1 α . Il fonctionne selon un mécanisme de régulation par rétrocontrôle de la dégradation d'HIF-1 α ([30] et figure 3) analogue à celui rencontré pour le couple p53/MDM2. Dans ce dernier, p53 règle son propre niveau d'expression en induisant l'expression de son régulateur négatif MDM2. HPTF pourrait s'avérer être en réalité le senseur HIF-PH, une hypothèse que nous avons récemment proposée [58]*. De façon intéressante, il a été aussi récemment décrit que p53 peut lui aussi intervenir sur la dégradation de HIF-1 α par le protéasome à la suite d'une ubiquitinylation dirigée par MDM2 [31]. Toutefois, cette notion demande à être confirmée.

Une fois stabilisé, HIF-1 α est transporté dans le noyau. Cette étape est dépendante de son signal de localisation nucléaire sensible à l'hypoxie, situé en position carboxyterminale. Il peut se dimériser dans ce compartiment avec HIF-1 β qui est pour sa part exclusivement nucléaire [32, 33]. 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

(→) m/s
1999, n°8-
9, p. 1008
et n° 11,
p. 1259

* Les références 56, 57 et 58 ont été incluses en toute dernière minute, ce qui explique leur numérotation.

HIF-1 α et d'activer la transactivation [21]. 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 inductible 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 [34].

HIF-1 α interagit encore avec d'autres co-facteurs tels que la protéine chaperon HSP90 [24]. HSP90 est nécessaire à l'activation de HIF-1 en hypoxie. Il permet notamment, en se liant à HIF-1 α en normoxie, que celui-ci adopte une conformation activable par l'hypoxie, un rôle cohérent avec son rôle de protéine chaperon [35, 36]. L'interaction HSP90-HIF-1 α semble liée aux conditions d'oxygénation, HSP90 se dissociant de HIF-1 α en situation d'hypoxie [35]. Par ailleurs, la modification de conformation de HIF-1 α par HIF-1 β dans le noyau n'a pas lieu en l'absence d'une conformation de HIF-1 α dirigée par HSP90 [36].

La présence de partenaires cellulaires spécifiques éventuels peut donner lieu à une réponse à l'hypoxie spécifique de tissu. Ainsi, il est proposé que le récepteur nucléaire hépatique HNF4 participe avec HIF-1 au contrôle de l'expression de l'érythropoïétine [3, 37].

Autres régulations de HIF-1 : induction non hypoxique de HIF-1 / phosphorylation / isoformes

Bien que l'hypoxie soit le facteur majoritaire d'induction de HIF-1 α au niveau des cellules, d'autres stimulus, 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 *vegf*, *glut 1* et 3, *alda*, *pgk*. Dans des cellules musculaires lisses vasculaires (VSMC), HIF-1 α est fortement augmenté en situation 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 [38].

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 sont aussi essentiels pour l'ac-

tivation de gènes nécessaires pour fournir à la cellule l'énergie requise dans des conditions de normoxie [39]. De façon intéressante, l'augmentation de HIF-1 α dans les VSMC est dépendante de la production de ROS. Cette voie, pour l'instant spécifique de ces cellules, pourrait jouer un rôle clé dans la production du VEGF en normoxie et donc induire la perméabilité des vaisseaux en phase d'inflammation [38].

Des modifications par phosphorylation / déphosphorylation ont été proposées comme essentielles dans la voie menant à l'activation de HIF-1 [4]. Notre laboratoire a récemment montré que HIF-1 α était fortement 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 MAPK sont capables de phosphoryler HIF-1 α *in vivo*, de reproduire ce profil électrophorétique et d'augmenter son activité transactivatrice [40].

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 , HIF-3 α) ou de formes résultant d'un épissage alternatif laisse supposer des phénomènes de compétition entre les différents

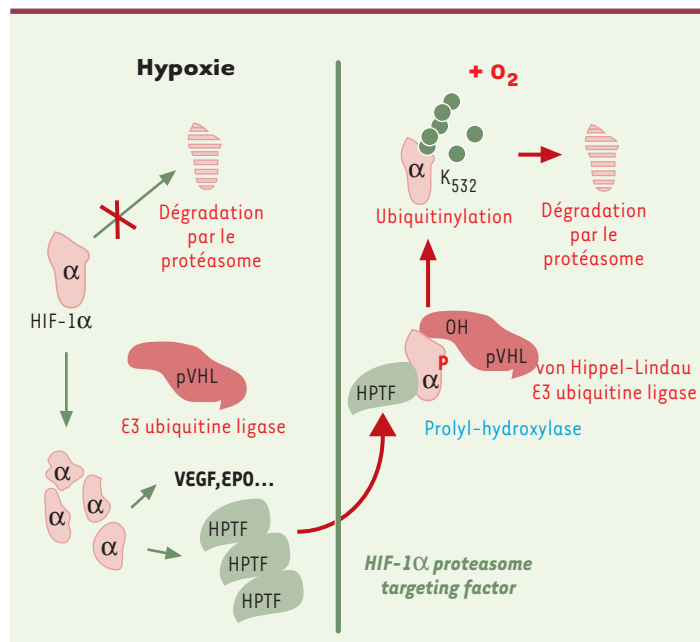


Figure 3. Boucle de régulation de HIF-1 α par HPTF (HIF-1 α proteasome targeting factor). En condition d'hypoxie, le HIF-1 α s'accumule et le complexe HIF-1 entraîne l'expression des gènes cibles spécifiques comme le gène codant pour le VEGF, l'EPO, mais aussi HPTF. Ce facteur s'accumule en hypoxie et participe avec pVHL à la dégradation rapide du HIF-1 α lors du retour en normoxie [30]. HPTF accumulé sous forme "non-activé" en situation d'hypoxie serait une forme inductible de HIF-proline hydroxylase [56-58].

éléments [24]. 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.

HIF-1, régulateur central de l'expression de gènes en hypoxie

Décrit au départ comme le régulateur de l'expression du gène *epo* en 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 [41]. 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 monoxyde d'azote (NO) et monoxyde de carbone (CO) respectivement, la tyrosine hydroxylase (TH) qui est une enzyme clé dans la régulation de la respiration, et la transferrine qui comme l'EPO intervient dans l'érythropoïèse [3, 42]. 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 clé de voûte de l'ensemble de ces réponses physiologiques [3]. Le *tableau 1* présente l'intégralité des gènes actuellement connus réglés par le facteur HIF-1 (d'après [41]).

Implication de HIF-1 dans l'embryogenèse 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 [43] a permis de montrer l'importance du complexe HIF-1. En effet, l'invalidation du gène entraîne un retard du développement, des malformations au niveau du tube neural, de la vésicule vitelline, du placenta, qui conduisent à la mort embryonnaire au jour E 10,5 de la gestation. Dans un second temps, plusieurs équipes indépendantes [44-46] 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 [44]. Des similitudes avec le phénotype d'embryon *VEGF^{+/-}* [47,48] 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

Tableau 1 : Gènes réglés au niveau transcriptionnel par HIF-1.

Métabolisme du glucose

Adénylate kinase 3, aldolase A, aldolase C, énalase 1, glucose transporteur 1, glucose transporteur 3, glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, hexokinase 1, hexokinase 2, lactate déshydrogénase A, NIP3, phosphofructokinase L, phosphoglycérate kinase 1, pyruvate kinase M, triosephosphate isomérase

Prolifération cellulaire / viabilité

Insulin-like growth factor 2, *IGF binding protein 1*, *IGF binding protein 2*, *IGF binding protein 3*, *p21*, *transforming growth factor β 3*

Métabolisme du fer et érythropoïèse

Céruleoplasmine, érythropoïétine, transferrine, récepteur de la transferrine

Développement vasculaire / remodelage et tonus vasomoteur

Récepteur α_{1B} -adrénergique, adrénomédulline, endothéline-1, hème oxygénase-1, *nitric oxide synthase 2*, *plasminogen activator inhibitor 1*, *vascular endothelial growth factor* (VEGF), récepteur du VEGF R1 (FLT1)

Autres

Anhydrase carbonique 9, p35srj, prolyl-4-hydroxylase α (I)

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).

dans le métabolisme glycolytique [44, 45].

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 [49]. 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 clé dans le développement tumoral par son action angiogénique *via* le contrôle de l'expression du VEGF.

Perspectives dans la détermination de la signalisation en amont de HIF-1

La découverte de l'implication de plusieurs HIF-proline hydroxylases est une avancée majeure dans les mécanismes "senseur" d'oxygène de la signalisation hypoxique. Les futures investigations devront révéler les étapes qui contrôlent l'activité de ces enzymes, leur inductibilité, notamment par l'hypoxie (voir HPTF et auto-contrôle), leur distribution et localisation subcellulaire. 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 proline hydroxylase, 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 engendrant être d'autres senseurs d'oxygène cellulaires. Par exemple, une oxydase NAD(P)H et la superoxyde-dismutase peuvent respectivement produire des anions superoxyde (O₂⁻) et de l'eau oxygénée (H₂O₂). Dans ce sens, une oxydoréductase NAD(P)H de type cytochrome b a été identifiée chez les mammifères et proposée comme senseur d'oxygène [50]. La diminution de la formation de ces espèces oxygénées réactives en hypoxie pourrait être le déclencheur de la signalisation d'HIF-1 [51]. 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 du modèle précédent. Néanmoins, diverses expériences ont donné des résultats en faveur de l'un ou l'autre des modèles, et restent ainsi insuffisantes pour trancher le débat [51]. 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 [52]. 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 fondée cette fois sur une sélection négative. L'objectif est de faire exprimer dans des lignées cellulaires des constructions cyostatiques ou cytotoxiques sous la 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 des éléments de régulation de 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 réglée par l'hypoxie d'une protéine toxique (protéine apoptotique Bax sous la 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 [53].

Le rôle essentiel du facteur HIF-1 au cours du développement, dans la physiologie ou au niveau pathologique, fait de la découverte des mécanismes clés de son activation un véritable challenge. Les découvertes à venir sur cette voie de signalisation permettront sans aucun doute de nouvelles approches thérapeutiques 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 [54]. ♦

REMERCIEMENTS

Nous remercions vivement Edurne Berra, Christiane Brahimi-Horn 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) et la Ligue Nationale pour la Recherche contre le Cancer (Équipe labellisée).

SUMMARY

HIF-1 : a central regulator of hypoxia

Animal species have evolved an ingenious and conserved mechanism for rapid and durable adaptation to a severe reduction in oxygen concentrations. The hypoxic

stress is controlled by the stabilisation and activation of the HIF-1 α subunit of the HIF-1 transcription factor. This transcriptional factor co-ordinates the induction of several genes and physiological units (as for example: stimulation of angiogenesis, erythropoiesis, and anaerobic glycolysis) which contribute to counteract low oxygen levels. The crucial role that HIF-1 plays in the control of expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) and tumour angiogenesis has aroused the interest for HIF-1 and "oxygen-sensing" mechanisms. This review analyses the most recent features of the hypoxic signaling pathway with a special focus on the mechanism of HIF-1 regulation. ♦

RÉFÉRENCES

- Goldberg MA, Schneider TJ. Similarities between the oxygen-sensing mechanisms regulating the expression of vascular endothelial growth factor and erythropoietin. *J Biol Chem* 1994 ; 269 : 4355-9.
- Jiang BH, Rue E, Wang GL, Roe R, Semenza GL. Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 1996 ; 271 : 17771-8.
- Guillemin K, Krasnow MA. The hypoxic response: huffing and HIFing. *Cell* 1997 ; 89 : 9-12.
- Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O₂ homeostasis. *Curr Opin Genet Dev* 1998 ; 8 : 588-94.
- Semenza GL, Nejfelt MK, Chi SM, Antonarakis SE. Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991 ; 88 : 5680-4.
- Wang GL, Jiang BH, Rue EA, 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 : 5510-4.
- Wang GL, Semenza GL. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 1995 ; 270 : 1230-7.
- Wenger RH, Rolfs A, Kvietikova I, Spielmann P, Zimmermann DR, Gassmann M. The mouse gene for hypoxia-inducible factor-1 α -genomic organization, expression and characterization of an alternative first exon and 5' flanking sequence. *Eur J Biochem* 1997 ; 246 : 155-65.
- Luo G, Gu YZ, Jain S, Chan WK, Carr KM, Hogenesch JB, Bradfield CA. Molecular characterization of the murine Hif-1 alpha locus. *Gene Expr* 1997 ; 6 : 287-99.
- Gothie E, Richard DE, Berra E, Pages G, Pouyssegur J. Identification of alternative spliced variants of human hypoxia-inducible factor-1 α . *J Biol Chem* 2000 ; 275 : 6922-7.
- Wiener CM, Booth G, Semenza GL. *In vivo* expression of mRNAs encoding hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Biophys Res Commun* 1996 ; 225 : 485-8.
- Wenger RH, Rolfs A, Marti HH, Guenet JL, Gassmann M. Nucleotide sequence, chromosomal assignment and mRNA expression of mouse hypoxia-inducible factor-1 α . *Biochem Biophys Res Commun* 1996 ; 223 : 54-9.
- Hirose K, Morita M, Ema M, et al. 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.
- Drutel G, Kathmann M, Heron A, Schwartz JC, Arrang JM. 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.
- Jiang BH, Zheng JZ, Leung SW, Roe R, Semenza G. L. Transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor 1 α . Modulation of transcriptional activity by oxygen tension. *J Biol Chem* 1997 ; 272 : 19253-60.
- Pugh CW, O'Rourke JF, Nagao M, Gleadle JM, Ratcliffe PJ. Activation of hypoxia-inducible factor-1; definition of regulatory domains within the alpha subunit. *J Biol Chem* 1997 ; 272 : 11205-14.
- O'Rourke JF, Tian YM, Ratcliffe PJ, Pugh CW. Oxygen-regulated and transactivating domains in endothelial PAS protein 1: comparison with hypoxia-inducible factor-1 α . *J Biol Chem* 1999 ; 274 : 2060-71.
- Salceda S, Caro J. Hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) 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.
- Huang LE, Gu J, Schau M, Bunn HF. 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 : 7987-92.
- Srinivas V, Zhang LP, Zhu XH, 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.
- Kallio PJ, Okamoto K, O'Brien S, et al. 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 : 6573-86.
- Jaakkola P, Mole DR, Tian Y, et al. Targeting of HIF-1 α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 2001 ; 292 : 468-72.
- Ivan M, Kondo K, Yang H, et al. HIF-1 α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: Implications for O₂ sensing.

- Science* 2001 ; 292 : 464-8.
24. Gradin K, McGuire J, Wenger RH, *et al.* Functional interference between hypoxia and dioxin signal transduction pathways: competition for recruitment of the Arnt transcription factor. *Mol Cell Biol* 1996 ; 16 : 5221-31.
 25. Kallio PJ, Wilson WJ, O'Brien S, Makino Y, Poellinger L. Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1alpha by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem* 1999 ; 274 : 6519-25.
 26. Sutter CH, Laughner E, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1alpha protein expression is controlled by oxygen-regulated ubiquitination that is disrupted by deletions and missense mutations. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000 ; 97 : 4748-53.
 27. Tanimoto K, Makino Y, Pereira T, 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.
 28. Cockman ME, Masson N, Mole DR, *et al.* Hypoxia inducible factor-alpha binding and ubiquitination by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *J Biol Chem* 2000 ; 275 : 25733-41.
 29. Ohh M, Park CW, Ivan M, *et al.* 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.
 30. Berra E, Richard DE, Gothie E, Pouyssegur J. HIF-1-dependent transcriptional activity is required for oxygen-mediated HIF-1alpha degradation. *FEBS Lett* 2001 ; 491 : 85-90.
 31. Ravi R, Mookerjee B, Bhujwala ZM, *et al.* Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Genes Dev* 2000 ; 14 : 34-44.
 32. Pollenz RS, Sattler CA, 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.
 33. Eguchi H, Ikuta T, Tachibana T, Yoneda Y, 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.
 34. Carrero P, Okamoto K, Coumailleau P, O'Brien S, Tanaka H, 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.
 35. Minet E, Mottet D, Michel G, *et al.* Hypoxia-induced activation of HIF-1: role of HIF-1alpha-Hsp90 interaction. *FEBS Lett* 1999 ; 460 : 251-6.
 36. Kallio PJ, Pongratz I, Gradin K, McGuire J, Poellinger L. Activation of hypoxia-inducible factor 1alpha: post-transcriptional regulation and conformational change by recruitment of the Arnt transcription factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997 ; 94 : 5667-72.
 37. Galson DL, Tsuchiya T, Tendler DS, *et al.* 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.
 38. Richard DE, Berra E, Pouyssegur J. Nonhypoxic pathway mediates the induction of hypoxia-inducible factor 1alpha in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2000 ; 275 : 26765-71.
 39. Zelzer E, Levy Y, Kahana C, Shilo BZ, Rubinstein M, Cohen B. Insulin induces transcription of target genes through the hypoxia-inducible factor HIF-1alpha/ARNT. *EMBO J* 1998 ; 17 : 5085-94.
 40. Richard DE, Berra E, Gothie E, Roux D, 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.
 41. Semenza GL. Hypoxia-Inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology. *Trends Mol Med* 2002 (sous presse).
 42. Bianchi L, Tacchini L, Cairo G. HIF-1-mediated activation of transferrin receptor gene transcription by iron chelation. *Nucleic Acids Res* 1999 ; 27 : 4223-7.
 43. Maltepe E, Schmidt JV, Baunoch D, Bradfield CA, Simon MC. Abnormal angiogenesis and responses to glucose and oxygen deprivation in mice lacking the protein ARNT. *Nature* 1997 ; 386 : 403-7.
 44. Iyer NV, Kotch LE, Agani F, *et al.* Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes Dev* 1998 ; 12 : 149-62.
 45. Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM, *et al.* Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature* 1998 ; 394 : 485-90.
 46. Ryan HE, Lo J, Johnson RS. HIF-1 alpha is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *EMBO J* 1998 ; 17 : 3005-15.
 47. Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, *et al.* Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 1996 ; 380 : 435-9.
 48. Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, *et al.* Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 1996 ; 380 : 439-42.
 49. Maxwell PH, Dachs GU, Gleadle JM, *et al.* Hypoxia-inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997 ; 94 : 8104-9.
 50. Zhu H, Qiu H, Yoon HW, Huang S, Bunn HF. Identification of a cytochrome b-type NAD(P)H oxidoreductase ubiquitously expressed in human cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999 ; 96 : 14742-7.
 51. Semenza GL. Perspectives on oxygen sensing. *Cell* 1999 ; 98 : 281-4.
 52. Wood SM, Wiesener MS, Yeates KM, *et al.* 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.
 53. Ruan H, Wang J, Hu L, Lin CS, Lamborn KR, Deen DF. Killing of brain tumor cells by hypoxia-responsive element mediated expression of BAX. *Neoplasia* 1999 ; 1 : 431-7.
 54. Li J, Post M, Volk R, *et al.* PR39, a peptide regulator of angiogenesis. *Nat Med* 2000 ; 6 : 49-55.
 55. Berra E, Roux D, Richard DE, Pouyssegur J. Hypoxia-inducible factor -1alpha (HIF-1alpha) escapes O₂-driven proteosomal degradation irrespectively of its subcellular localization. *EMBO Rep* 2001 ; 2 : 615-20.
 56. Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, *et al.* *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* 2001 ; 107 : 43-54.
 57. Bruck RK, McKnight SL. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science* 2001 ; 294 : 1337-40.
 58. Brahimi-Horn C, Berra E, Pouyssegur J. Hypoxia: the tumor's gateway to progression along the angiogenic pathway. *Trends Cell Biol* 2001 ; 11 : S32-6.

TIRÉS À PART

J. Pouyssegur