



HAL
open science

Rôle des protéines de choc thermique dans la régulation du facteur de transcription HIF

Sébastien Maurel

► **To cite this version:**

Sébastien Maurel. Rôle des protéines de choc thermique dans la régulation du facteur de transcription HIF. Sciences agricoles. Université de Bourgogne, 2011. Français. NNT: 2011DIJOS073 . tel-00704624

HAL Id: tel-00704624

<https://theses.hal.science/tel-00704624>

Submitted on 5 Jun 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE DE BOURGOGNE
U.F.R. DE MEDECINE
ECOLE DOCTORALE ENVIRONNEMENT-SANTE-STIC

THESE

Présentée pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE BOURGOGNE
Discipline : Sciences-Vie

Présentée et soutenue publiquement le 15 décembre 2011

par

Sébastien MAUREL

**ROLE DES PROTEINES DE CHOC THERMIQUE DANS
LA REGULATION DU FACTEUR DE TRANSCRIPTION HIF**

Directeur de thèse : Dr Carmen GARRIDO

Membres du jury

| | |
|-----------------------------|--------------------|
| Dr Palma ROCCHI | Rapporteur |
| Dr Valérie LALLEMAND-MEZGER | Rapporteur |
| Dr Gaëtan JEGO | Examineur |
| Dr Salem CHOUAIB | Examineur |
| Pr Luc ROCHETTE | Examineur |
| Dr Carmen GARRIDO | Directeur de Thèse |

“Experience is one thing you can't get for nothing.”

Oscar Wilde

Remerciements

Je tiens en premier lieu à exprimer ma gratitude aux membres du jury qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail, et ce en dépit de leurs obligations professionnelles. Je remercie les Dr. **Valérie Lallemand-Mezger** et **Palma Rocchi** d'avoir accepté d'examiner mon travail en tant que rapporteurs, ainsi que le Dr. **Salem Chouaib** pour avoir accepté d'intégrer mon jury de thèse en qualité d'examineur.

J'adresse ma chaleureuse reconnaissance au Pr. **Luc Rochette**, qui a accepté d'être membre de ce jury et s'est rendu disponible à cette fin. J'avais eu l'occasion d'entrer en contact avec lui il y a déjà dix ans, lors de mon bref passage en faculté de Pharmacie. Etant revenu dans ces lieux pour la thèse, je suis heureux qu'il participe la soutenance. Cela me paraît une belle manière de fermer la boucle. Je me rappelle d'un grand monsieur – qu'il doit toujours être ! - qui m'avait impressionné par son humanisme et sa faculté à susciter de manière amusante la réflexion au-delà du strict contenu de son cours.

Je remercie le Pr. **Eric Solary** pour m'avoir offert la possibilité d'intégrer l'unité Inserm U517, devenue ensuite une composante du Centre de Recherche Inserm 866. Je suis admiratif de l'engagement dont il a fait preuve pour permettre à tous de bénéficier de conditions de travail optimales. Je n'oublie pas le Dr. **Laurent Lagrost**, qui a repris la direction du CRI à la suite de Mr. Solary, et a maintenu un excellent cadre de travail.

Je remercie la **Fondation pour la Recherche Médicale**, pour avoir financé une quatrième année de thèse. J'espère avoir pu contribuer à apporter des pistes de réflexion potentiellement utiles dans la recherche contre le cancer.

J'en viens à remercier le Dr. **Carmen Garrido** pour m'avoir accueilli au sein de son groupe durant ces quatre dernières années. Je regrette vraiment sincèrement de n'avoir pas su/pu rétablir une confiance, et profiter autant que mes collègues de votre dynamisme et de votre enthousiasme. J'aurais réellement aimé pouvoir vous apprécier dans d'autres circonstances. Néanmoins, je vous suis très reconnaissant d'avoir persisté à vouloir me faire bénéficier jusqu'au bout de la présence de la présence d'une personne pour m'encadrer.

A ce propos, je souhaite remercier vivement les Dr. **Aurélie de Thonel**, **Elise Schmitt** et **Gaëtan Jego**, pour m'avoir dirigé à divers moments ces dernières années. Aurélie, j'ai toujours été fasciné par ta capacité à gérer sans faillir quinze mille choses en même temps, et j'en ai souvent été bien jaloux ! Tes longs monologues techniques à la paillasse étaient un élément presque rassurant dans le box, et m'ont bien manqué quand tu as quitté le labo ! Je suis heureux que tu aies enfin ton poste, et te souhaite plein de bonheur avec ton mari et votre enfant à venir, ainsi que de nombreux succès en recherche. Elise, même si nous ne sommes croisés que brièvement, je te suis très reconnaissant de m'avoir écouté exprimer mes doutes, et de m'avoir soutenu pendant quelques mois. J'espère que tout se passe bien et que tu apprécies pleinement la présence de tes enfants. Gaëtan, le dernier dans la chronologie, tu as repris le flambeau, alors qu'entre les cours, la recherche, l'encadrement et l'administratif, tu es débordé. Tu as su toi aussi écouter mes doutes, et trouver les mots pour m'encourager à certains moments où j'en avais réellement besoin. A vous trois, ainsi qu'à Carmen, je souhaite dire, que même si je ne manifeste pas ouvertement mes sentiments de gratitude, cela n'empêche pas que je les ressente, et je sais ce que je dois à chacun. Je remercie également le Pr. **Philippe Bonniaud**, pour sa bonne humeur et ses petits mots de soutien bienvenus, lors de ses passages réguliers dans le bureau.

Je souhaite adresser un grand merci général à tous les membres du département « Mort Cellulaire et Cancer » du CRI, que vous soyez chef, personnel technique ou administratif ou étudiants. Je suis resté relativement discret ces deux dernières années, et je n'ai pas donc pas forcément pu apprendre à tous vous connaître. Des circonstances personnelles sur lesquelles je ne me suis pas épanché m'ont fait oublier mon sourire pendant cette période, mais je sais que vous êtes tous des personnes formidables, et que je retiendrai des souvenirs de chacun d'entre vous. Ce n'est pas parce que je quitterai le labo que je vous oublierai ! Je reviendrai de temps à autres. Une mention spéciale à **Alexandrine Fraichard**, pour son aide précieuse et son engagement impressionnant au quotidien pour nous faciliter le travail, sans se départir de son sourire et de sa très grande gentillesse. Surtout que je t'aurais embêtée jusqu'au bout.

Je ne vais certainement pas oublier les collègues de l'équipe CG. **Kevin**, je te souhaite bon courage pour la thèse et ce nouveau projet. De même pour toi, **Olivier Arlette**, je ne t'ai pas beaucoup connue, un peu plus sur la fin, mais j'ai toujours admiré ta jovialité, ta proximité avec les étudiants, et ton engagement sans faille pour les pots. Tu es une pièce maîtresse dans la vie du labo. **Eric**, j'ai apprécié les petites discussions sur le toit. Je te

souhaite une bonne continuation. Les deux anciens **David** et **Anne-Laure**, j'ai partagé d'excellents moments avec vous, et cette ambiance dans le bureau a beaucoup dû beaucoup à vos délires spontanés ! Je vous remercie pour votre soutien ces derniers temps, et j'espère que le futur vous réserve plein d'agréables événements. Je sais que c'est le cas pour **Anne-Laure**, donc toutes mes félicitations à toi et **Dom** pour cette heureuse surprise ! **Adonis**, tu es toujours quelqu'un d'agréable et marrant, même quand tu t'énerves. Je te souhaite une très bonne continuation à l'étranger pour la suite de ton parcours. **Pierre**, je ne te connais pas beaucoup, même si on partagé quelques soirées avec ton compère **Aymeric**. Tu as l'air très bien parti pour faire une thèse aussi brillante que Guillaume, et je ne doute pas que tu tireras une petite larme à Philippe également. Plein de bonnes choses pour la suite. **Guillaume**, tu es loin d'être le dernier pour mettre l'ambiance, bien aidé de ton skate. J'apprécie beaucoup ton humeur très... polyvalent, on va dire ! Te cotoyer au quotidien est très stimulant, et tu emportes tout le monde dans ton sillage. Les séances d'escalade ont été – et seront – à chaque fois un petit challenge. Même si maintenant tu gères le jaune et que moi je suis retombé au plancher, mais l'll be back. Cette année a été très faste pour toi, tu mérites largement tout ce qui t'arrive. Je vous souhaite plein de bonheur à toi et **Lucie** et au petit Lucas. **Anne Laure**, ni la jurassienne ni la jeune, but the first ! Ça fait un moment qu'on se suit, depuis le master, et nos histoires parallèles nous ont beaucoup rapprochés. Mais tout parallélisme a une fin, et heureusement pour toi ! Je suis ravi d'avoir pu être une oreille attentive pour toi, et sois sûre qu'à l'inverse, je sais avoir pu compter sur toi également sans réserve. Je te remercie énormément pour le très fort soutien que tu m'as témoigné à de nombreuses reprises. Je suis très heureux que tu aies si excellemment soutenu ta thèse, et je te souhaite bon courage pour boucler tes papiers dans un premier temps. Mais ce n'est pas un adieu, loin de là ! Nous nous recroiserons aussi ! En tout cas, je suis ravi de te connaître, tu es une personne extrêmement agréable et chaleureuse, et je te souhaite d'ores et déjà de trouver le bon post-doc au milieu de ta (longue) liste de critères ! Et sinon, une énième explication sur la sélectivité ne sera pas de trop, je reste fasciné par ce concept.

J'ai des pensées pour tous les anciens de la promo de Master qui ont soutenu ou pas encore, et tous ceux de la génération d'avant qui sont tous exilés au Canada, après avoir kidnappé la petite **Chiquette**, en Scandinavie, chez les kangourous, sur les rives du Léman, ou encore ailleurs. Je leur souhaite beaucoup de bonnes choses, ainsi qu'aux générations plus récentes au labo. Pardonnez moi de ne pas tous vous citer !

Je pense aussi à d'autres personnes que je connais depuis longtemps ou depuis mes dernières années sur Dijon, qui m'ont beaucoup encouragé dans des moments difficiles, notamment mon **Fred** (20 ans et quelques déjà !) et les amis de la sphère **Kir**, encore sur Dijon ou suivant leurs voies partout en France. Je ne vous cite pas tous séparément mais je pense bien à vous tous où que vous soyez !

Enfin, un grand merci du fond du cœur à ma famille. Plus spécialement à mes parents pour leur soutien total et leurs encouragements, surtout ces derniers temps. Je ne vous remercierai jamais assez pour l'éducation et le goût de la curiosité que vous nous avez donnés. **Noëlie**, ma soeurette, tu es la personne la plus brillante que je connaisse. Tu sais déjà tout ce que je pourrai écrire ici, donc je m'en abstiendrai. Mais sans toi, je me serais effondré. Si j'ai pu aller jusqu'au bout de ce long et douloureux processus, c'est principalement grâce à toi.

Résumé

HIF1 α et HIF2 α sont des protéines largement impliquées dans le développement de pathologies posant des problèmes majeurs de santé publique, comme le cancer. Leur activité, qui est régulée prioritairement par leur stabilité *via* le système ubiquitine-protéasome, coordonne de nombreux processus cellulaires susceptibles de favoriser le développement de ces maladies. Un enjeu récent de la recherche thérapeutique est d'identifier des partenaires protéiques pouvant réguler les protéines HIF α , afin de mettre au point des thérapies ciblées. Les protéines de choc thermique (HSPs) sont une classe de protéines dont une des fonctions essentielles est de réguler l'homéostasie protéique dans la cellule, en interagissant avec le protéasome. Certaines d'entre elles, HSP27 et HSP90, ont la faculté de pouvoir réguler spécifiquement la stabilité de nombreuses protéines souvent elles-mêmes impliquées dans l'apparition de ces pathologies. L'objectif de ce travail était de savoir si ces deux HSPs peuvent contrôler la stabilité de la protéine HIF2 α . Nos résultats suggèrent qu'HSP27 pourrait stimuler la dégradation de HIF2 α en favorisant son ubiquitination. Ce résultat est surprenant, en raison du rôle connu d'HSP27 dans la progression tumorale. Il est donc nécessaire de le confirmer et d'en préciser les processus biologiques sous-jacents. D'autre part, nos autres résultats semblent confirmer qu'HIF2 α est une protéine cliente d'HSP90. De plus, nous montrons pour la première fois que l'inhibition d'HSP90 par le 17-DMAG diminue la production de VEGF dépendante de HIF2 α . Des travaux récents suggèrent qu'HIF2 α a un rôle prédominant dans la progression tumorale, et peut constituer une cible globale de choix dans plusieurs types de cancer. Il conviendrait d'évaluer la capacité des inhibiteurs d'HSP90 à supprimer des fonctions de HIF2 α nouvellement décrites, comme son rôle dans la maintenance des cellules souches cancéreuses.

Mots-clés : HSP27, HSP90, protéine cliente, ubiquitine, dégradation protéasomale, HIF2 α , inhibiteurs d'HSP90.

Abstract

Both HIF1 α and HIF2 α proteins are highly involved in the development of pathologies, such as cancers, which are prime public health issues. These proteins are primarily controlled at the protein level by ubiquitin-dependant degradation, and regulate numerous cellular processes which are likely to favor the development of these diseases. A recent issue in therapeutic research is to identify partners that might regulate the expression and the activity of the HIF α proteins, with the aim to elaborate targeted therapies. Heat shock proteins (HSPs) form a family of proteins whose main function is to regulate protein homeostasis in cells, which they achieve through interaction with the ubiquitin-proteasome pathway. HSP27 and HSP90 are able to specifically control the stability of certain client proteins involved in those pathologies. In the present work, we sought to determine whether these HSPs could regulate the expression of the HIF2 α protein. Our results suggest that HSP27 may induce ubiquitin and proteasome-dependant degradation of HIF2 α , which is quite intriguing given the well-known role of HSP27 in tumor promotion. This needs to be confirmed and the underlying biological significance of such a regulation remains to be defined. Our results also may confirm that HIF2 α is an HSP90 client protein. Moreover, we show for the first time that inhibition of HSP90 by 17-DMAG decreases the HIF2 α -dependant VEGF production. Recent studies emphasize HIF2 α as a major promoter of tumor progression, and suggest that HIF2 α may constitute an attractive global target in several cancer types. Therefore, the ability of HSP90 inhibitors to disrupt newly described HIF2 α functions, such as cancer stem cell maintenance, should be evaluated.

Keywords : HSP27, HSP90, client protein, ubiquitin, proteasomal degradation, HIF2 α , HSP90 inhibitors.

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|--|----|
| TABLE DES MATIÈRES | 10 |
| INTRODUCTION | 15 |
| PARTIE I. Les protéines de choc thermique | 16 |
| 1. La réponse au stress | 16 |
| 2. Classification et fonctions des HSPs..... | 18 |
| A. La famille HSP70 | 18 |
| a. HSC70 (HSPA8) | 19 |
| b. HSC70t (HSPA1L) | 19 |
| c. HSP70.2 (HSPA2) | 19 |
| d. HSP70 (HSPA1) | 20 |
| B. La famille HSP90 | 21 |
| a. GP96 et TRAP1 | 21 |
| b. HSP90 | 22 |
| c. Fonctions et régulation d'HSP90 | 23 |
| i. Activité de chaperon, les « protéines clientes » | 23 |
| ii. Régulation d'HSP90 par modifications post-traductionnelles | 25 |
| d. Distinction fonctionnelle entre HSP90 α et HSP90 β | 26 |
| e. Inhibition d'HSP90 | 26 |
| C. La famille des petites protéines de stress (small HSPs)..... | 28 |
| a. Généralités | 28 |
| b. HSP27 | 29 |
| i. Caractérisation et structures | 29 |
| ii. Oligomérisation et phosphorylation d'HSP27 | 30 |
| iii. Fonctions cellulaires | 33 |
| PARTIE II. Le système ubiquitine-protéasome..... | 37 |
| 1. L'ubiquitination | 38 |
| A. L'ubiquitine | 38 |
| B. Le mécanisme de l'ubiquitination..... | 38 |
| a. Généralités | 38 |
| b. Le langage de l'ubiquitine | 40 |
| c. Les enzymes de l'ubiquitination | 41 |
| i. E1 : activation de l'ubiquitine | 41 |
| ii. E2 : transfert et conjugaison de l'ubiquitine | 42 |
| iii. E3 : ligation de l'ubiquitine | 42 |
| iv. E4 : élongation de la chaîne d'ubiquitine | 43 |

| | |
|--|----|
| C. Régulation de l'ubiquitination | 43 |
| a. Les domaines UBDs | 43 |
| b. Auto-ubiquitination des E3 | 44 |
| c. Régulation par les déubiquitinases | 44 |
| d. Signaux spécifiques de dégradation | 44 |
| e. Modifications post-traductionnelles | 45 |
| f. Régulation par les protéines « <i>ubiquitin-like</i> » | 46 |
| 2. Le protéasome | 46 |
| A. Structure et composition des protéasomes | 47 |
| a. Le protéasome 20S | 47 |
| i. Structure | 47 |
| ii. Fonction catalytique | 48 |
| b. Le protéasome 26S | 50 |
| C. Implication des HSPs dans la voie ubiquitine-protéasome | 52 |
| D. Pathologies associées au système ubiquitine-protéasome | 53 |
| PARTIE III. Le facteur inductible par l'hypoxie, HIF | 55 |
| 1. Généralités | 55 |
| A. L'homéostasie de l'oxygène | 55 |
| B. L'hypoxie et le cancer | 55 |
| 2. Les facteurs inductibles par l'hypoxie (HIF) | 57 |
| A. Structure des facteurs HIF | 58 |
| a. HIF1 α | 58 |
| b. HIF2 α | 59 |
| c. HIF3 α | 60 |
| B. La régulation de HIF | 60 |
| a. Régulation de la transcription | 60 |
| b. Régulation de la traduction | 61 |
| i. Normoxie | 61 |
| ii. Hypoxie | 62 |
| c. Régulation post-traductionnelle dépendante de l'oxygène | 63 |
| i. L'hydroxylation par les prolyl-hydroxylases | 63 |
| ii. Cas particulier d'un défaut de régulation par VHL | 65 |
| iii. L'hydroxylation par FIH | 66 |
| d. Régulation post-traductionnelle indépendante de l'oxygène et de VHL | 66 |
| e. Régulation par modifications post-traductionnelles autres que l'hydroxylation | 68 |

| | |
|--|-----|
| i. L'acétylation | 68 |
| ii. La phosphorylation | 68 |
| iii. La S-nitrosylation | 68 |
| iv. La sumoylation | 69 |
| C. Les fonctions de HIF | 69 |
| a. L'érythropoïèse | 72 |
| b. Régulation de l'angiogenèse | 72 |
| c. Régulation de la résistance thérapeutique | 74 |
| d. Contrôle du métabolisme cellulaire et du pH intracellulaire | 76 |
| e. Régulation de l'autophagie | 78 |
| f. Régulation de la mort cellulaire | 79 |
| g. La prolifération | 80 |
| OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THÈSE | 83 |
| MATÉRIEL ET MÉTHODES | 84 |
| RÉSULTATS | 89 |
| PARTIE I. Régulation de HIF2 α par HSP27 | 90 |
| PARTIE II. Régulation de HIF2 α par HSP90 | 99 |
| DISCUSSION ET CONCLUSION | 106 |
| RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 117 |
| ANNEXES | 159 |

INTRODUCTION

PARTIE I. Les protéines de choc thermique

1. La réponse au stress

Les cellules de tout organisme vivant doivent respecter des conditions physiologiques au sein de l'organisme, afin de survivre et de remplir leur fonctions biologiques. Elles sont très fréquemment sujettes à une variété de stress dont l'issue peut aller de l'affection de leurs fonctions à la mort cellulaire. Au cours de l'évolution, les cellules ont donc développé un arsenal de stratégies moléculaires pour faire face à des modifications de leur environnement susceptibles de les endommager. Un stress majeur, dont l'effet sur des organismes vivants est étudié depuis presque un siècle, est l'élévation de la température qui constitue une menace significative pour la survie cellulaire. Une augmentation même modérée de la température de quelques degrés au dessus de l'optimum requis déclenche l'activation d'un système moléculaire très conservé, et l'induction transitoire d'une famille spécifique de protéines, les protéines de choc thermique ou Heat Shock Proteins (HSPs).

Des expériences sur les effets de la chaleur ont été réalisées dès les années 1930 chez l'organisme modèle *Drosophila melanogaster*. Plus tard, il fut observé qu'une élévation modérée de la température chez cet organisme induisait l'apparition d'un renflement (« puff ») au niveau des chromosomes géants polytènes des glandes salivaires ; ces renflements furent imputés à une activation locale importante de la synthèse d'ARN messagers (Ritossa *et al.*, 1962 ; Jamrich *et al.*, 1977). L'identification des gènes induits conduisit peu après à la description et au début de la caractérisation d'une nouvelle famille de protéines, les HSPs (Tissières *et al.*, 1974). Par la suite, ce phénomène fut décrit dans d'autres tissus chez les espèces du genre *Drosophila* en réponse à d'autres stress environnementaux (Ashburner, 1970 ; Berendes, 1965), puis observé au sein d'autres organismes autant procaryotes qu'eucaryotes (Kelley & Schlesinger, 1978 ; Lemaux *et al.*, 1978 ; McAlister & Finkelstein, 1980). En 1982, Schlesinger et son équipe ont montré que l'exposition à divers agents chimiques, physiques ou biologiques constitue autant de stress induisant la synthèse des HSPs. Tout cela suggérait l'universalité ainsi que l'ancienneté de la réponse cellulaire au choc thermique, ce qui fut confirmé par la description de protéines similaires chez tous les organismes, depuis les archaebactéries jusqu'à l'être humain. Le séquençage de l'ADN a permis de montrer un degré d'homologie élevé entre les gènes codant pour des HSPs entre diverses branches de l'arbre évolutif. Par exemple, le gène *HSP70* présente plus de 70%

d'identité entre l'homme et la drosophile, et 50% entre l'homme et *Escherichia coli* (Hunt & Morimoto, 1985). Il est établi depuis que la réponse au choc thermique est universelle et repose sur le système génétique le plus conservé du règne vivant (Lindquist, 1986).

Une étude datant de 1982 a mis en évidence un phénomène particulier baptisé thermotolérance (Li & Werb, 1982). Ce fut la première description d'un rôle cytoprotecteur pour les HSPs. En effet, une brève exposition de fibroblastes de hamster à une augmentation de température sublétales, induit une résistance transitoire à un deuxième choc thermique *a priori* létales. Les auteurs ont identifié une correspondance entre les cinétiques d'acquisition de la thermotolérance et de synthèse des HSPs, ce qui suggère fortement l'implication de ces protéines dans ce processus. Ces résultats furent reproduits dans d'autres types cellulaires soumis à d'autres stress (Santoro, 2000). De manière intéressante, l'induction des HSPs par une courte exposition à des températures élevées confère également un effet de protection croisée vis-à-vis d'autres formes de stress (Parsell et Lindquist, 1994).

Les HSPs sont impliqués dans le rétablissement de l'homéostasie protéique au sein de la cellule après un stress. En effet, les processus de repliement et de réparation de protéines partiellement dénaturées requièrent moins d'énergie qu'une destruction systématique de l'ensemble des protéines endommagées, ce qui nécessiterait une synthèse *de novo* des protéines, et ce, à un coût considérable pour la cellule. C'est dans ce contexte qu'interviennent les HSPs, de par une de leurs fonctions principales qui est celle de « chaperon moléculaire ». Cette notion fut introduite après l'observation de la capacité de ces protéines à prévenir des interactions inappropriées entre protéines (Ellis *et al.*, 1989). Les HSPs sont capables d'interagir avec les protéines dénaturées afin de prévenir la formation d'agrégats protéiques, et d'assister des nouvelles protéines dans le recouvrement de leur structure tridimensionnelle native (Burel *et al.*, 1992). Les HSPs sont ubiquitaires ; leur présence est nécessaire pour assister le repliement protéique lors de la synthèse continue des protéines. Néanmoins leur expression doit être massivement augmentée en réponse à un stress, car les HSPs opèrent généralement dans un ratio stœchiométrique pour diminuer le potentiel d'agrégation des protéines (Kiefhaber *et al.*, 1991). La réponse au stress est résolue par l'activation transcriptionnelle des gènes codants pour les formes inductibles des HSPs, ce qui mène à la prise en charge des protéines dénaturées. Lorsque les différentes altérations morphologiques consécutives au stress sont corrigées, les HSPs retrouvent leur niveau d'expression et leur activité de base.

2. Classification et fonctions des HSPs

Chez les mammifères, les HSPs sont regroupées en six familles principales en fonction de leur poids moléculaire – HSP110, HSP90, HSP70, HSP60, HSP47 et la famille des petites protéines de stress (small HSPs – sHSPs). En dépit de leurs propriétés communes, chaque famille présente des particularités se rapportant à leur mécanisme d'action, leur localisation intracellulaire, leur dépendance à l'ATP comme substrat énergétique ou la nature inductible de leur expression. Ainsi, les protéines de la famille HSP60 (chaperons mitochondriaux) sont exprimées constitutivement, alors que HSP70 et HSP27 sont fortement induites lors d'un stress. Les gènes codant pour les HSPs inductibles sont activés transcriptionnellement par une famille de facteurs de transcription, les *Heat Shock Factors* (HSFs). Parmi les trois membres humains de cette famille (HSF1, HSF2 et HSF4), HSF1 est le plus important (Fiorenza *et al.*, 1995). L'inactivation d'HSF1 entraîne une perte de la thermotolérance chez la souris (McMillan *et al.*, 1998). Nous ne développerons ici que les trois familles les mieux caractérisées à ce jour : HSP70, HSP90 et les sHSPs, représentées par HSP27.

A. La famille HSP70

Les HSPs de 70 kDa représentent certainement les HSPs les plus étudiées, les plus abondantes et les plus conservées. Cette famille comprend différents membres présentant un haut degré d'identité de séquence, entre eux ainsi que d'un organisme à l'autre (50% d'homologie entre le gène humain *HSP70* et son homologue *DnaK* chez *E.coli*, et plus de 70% avec celui de la drosophile) (Hunt & Morimoto, 1985). La famille HSP70 est représentée au minimum par cinq protéines chez les mammifères, certaines étant exprimées constitutivement alors que d'autres sont strictement inductibles.

Dans cette large famille, chaque membre a évolué pour remplir des rôles spécifiques dans différents compartiments cellulaires. Tous possèdent une structure commune qui contient deux domaines : une extrémité N-terminale hautement conservée à activité ATPase et une extrémité C-terminale moins conservée liant des peptides. Les protéines de la famille HSP70 partagent également la fonction de chaperon moléculaire, liant transitoirement des protéines immatures ou dénaturées afin d'éviter que ces dernières n'interagissent de manière inappropriée et évitant alors une mauvaise conformation, une agrégation ou une perte de

fonction. Elles peuvent lier, par leur extrémité carboxy-terminale, des segments courts et linéaires de peptides ou de protéines non repliées (Feige & Polla, 1994). Cette fonction s'opère dans un cycle utilisant de l'ATP : les polypeptides interagissent transitoirement avec le domaine de liaison aux peptides de HSP70, ce qui stimule l'hydrolyse de l'ATP et mène à un changement conformationnel de HSP70, augmentant son affinité pour le peptide. Ensuite, le peptide lié est relâché lors de l'échange de l'ADP avec un nouvel ATP (McCarty *et al.*, 1995). Ces interactions sont observées transitoirement de 15 à 30 minutes après la synthèse d'une nouvelle protéine.

a. HSC70 (HSPA8)

C'est l'homologue constitutif de HSP70 (*Cognate HSP70*). Elle est exprimée dans la majorité des tissus de l'organisme, et est présente indifféremment dans le cytosol et le noyau (Feige & Polla, 1994). Son expression est très peu induite par un choc thermique, la différence observée vient probablement d'une stabilisation de son ARN messager. Elle est impliquée dans de nombreux processus cellulaires.

b. HSC70t (HSPA1L)

Egalement appelée HSP70-hom chez l'humain, son expression est quasi strictement restreinte aux cellules germinales au sein des testicules, pendant la phase post-méiotique de la spermatogenèse (Matsumoto & Fujimoto, 1990). Le rôle dans la spermatogenèse de cette protéine non inductible reste obscur, mais le fait que les testicules soient maintenus à une température plus basse que le reste de l'organisme laisse supposer que les cellules testiculaires ont une physiologie particulière nécessitant la présence de ce chaperon spécifique. Le seul autre tissu où l'on peut trouver HSC70t est l'épithélium olfactif murin ou humain (Neuhaus *et al.*, 2006).

c. HSP70.2 (HSPA2)

Cette HSP est exprimée très faiblement et de manière constitutive. Elle est toutefois présente à des taux plus élevés dans les testicules et le cerveau (Son *et al.*, 2000). Sa régulation positive est un événement nécessaire durant la phase méiotique de la spermatogenèse. Il a en effet été montré que l'inactivation de HSP70.2 chez des souris mâles induit leur stérilité en raison d'une apoptose massive des spermatocytes (Dix *et al.*, 1996). Chez l'homme, les individus présentant une spermatogenèse anormale ont un taux d'expression diminué de HSP70.2 (Son *et al.*, 2000).

d. HSP70 (HSPA1)

HSP70 est codée par deux gènes, *hsp70.1 (hspa1a)* et *hsp70.3 (hspa1b)*, voisins et localisés au locus 6p21.3. Ils ne comportent pas d'introns et sont fortement induits en cas de stress dans tous les types cellulaires de tous les mammifères (Gunther & Walter, 1994). Les deux protéines dont ils contrôlent l'expression sont si proches qu'on les regroupe sous l'appellation commune d'HSP70. Dans des conditions physiologiques, HSP70 est faiblement exprimée et se trouve dans le cytosol, où elle exerce sa fonction de chaperon moléculaire pour les protéines en cours de maturation (Feige & Polla, 1994). Lors de l'activation de la réponse au choc thermique, la fraction HSP70 déjà présente dans la cellule subit une relocalisation nucléaire, et la forme induite est exprimée dans le cytoplasme (Velazquez & Lindquist, 1984 ; Welch & Suhan, 1986). Les inducteurs de l'expression d'HSP70 sont de nature variée et incluent évidemment le choc thermique, mais aussi l'ischémie-reperfusion, l'hypoxie, les radicaux libres, la déplétion d'ATP, les métaux lourds, les poisons métaboliques, les radiations et les toxines (Feige & van Eden, 1996). HSP70 est la protéine de choc thermique dont le rôle dans la thermotolérance a été le plus étudié. Elle est nécessaire à la survie et au maintien des fonctions cellulaires lors de l'exposition à différents stress physiques ou biologiques. Le rôle de chaperon moléculaire prend ici toute sa dimension, car les protéines cibles de son action seront les protéines altérées par l'exposition au stress (Nguyen *et al.*, 1989). HSP70 reconnaît et se lie à des séquences hydrophobes exposées chez les protéines dénaturées. Elle prévient de cette manière leur agrégation et peut contribuer à leur repliement adéquat dans un cycle dépendant de l'ATP (Bukau & Horwich, 1998).

La protection qu'offre HSP70 aux cellules ne repose pas seulement sur ses propriétés de chaperon. En effet, il est désormais reconnu le rôle essentiel joué par HSP70 dans l'inhibition du processus de mort cellulaire par apoptose. C'est l'HSP la plus performante dans l'induction de la survie cellulaire. Dans ce cadre, il a été proposé qu'HSP70 agit en interférant physiquement avec le processus de la voie intrinsèque de l'apoptose (Li CY *et al.*, 2000). Un trait caractéristique de l'apoptose est la libération par la mitochondrie du cytochrome c dans le cytosol, où cette protéine recrute Apaf-1 pour constituer l'apoptosome, siège de l'activation de la caspase 9. HSP70 préviendrait l'activation de cette caspase effectrice en empêchant le recrutement de la procaspase 9 par l'apoptosome (Beere *et al.*, 2000). Le mode d'action d'HSP70 dans l'inhibition de l'apoptose reste controversé, car d'autres auteurs ont suggéré qu'elle inhiberait plutôt le relargage du cytochrome c (Steel *et al.*, 2004). HSP70 interagit également avec la voie de l'apoptose indépendante des caspases. Notre équipe a montré

qu'HSP70 peut interagir avec l'Apoptosis Inducing Factor (AIF) pour empêcher sa translocation nucléaire et donc inhiber la condensation chromatinienne (Ravagnan *et al.*, 2001 ; Gurbuxani *et al.*, 2003). D'autres travaux ont mis en évidence le rôle d'HSP70 dans l'inhibition de la perméabilisation de la membrane lysosomale, ce qui constitue un mécanisme supplémentaire de contrôle de l'apoptose (Gyrd-Hansen *et al.*, 2004 ; Nylandsted *et al.*, 2004).

HSP70 est fréquemment surexprimée dans les cellules cancéreuses, qu'elle protège de la mort induite par de nombreux agents anticancéreux, en particulier grâce à sa capacité à prévenir l'apoptose (Garrido *et al.*, 2006). Son expression dans les cancers est associée à un haut degré de malignité et à un faible pronostic (Mosser & Morimoto, 2004). HSP70, à l'instar d'HSP90 et HSP27 joue également un rôle dans les processus de différenciation (Lanneau *et al.*, 2007).

B. La famille HSP90

Les protéines de choc thermique appartenant à cette famille figurent parmi les plus abondamment exprimées constitutivement. Cette famille est composée de quatre membres principaux : HSP90 α , HSP90 β , GP96 et TRAP1.

a. GP96 et TRAP1

GP96 (*Glycoprotein 96*), aussi appelée GRP94, est présente chez les vertébrés et quelques organismes invertébrés tel que *Caenorhabditis elegans*, mais n'existe pas chez les bactéries, les levures ou la drosophile (Arrigo *et al.*, 2005). Cette protéine de 96 kDa est abondante au sein du réticulum endoplasmique, grâce à une séquence de rétention c-terminale (Maki *et al.*, 1990). On la retrouve également exprimée à la surface cellulaire (Robert *et al.*, 1999). Sa distribution est ubiquitaire, mais son expression peut être augmentée suite à un stress réticulaire (Bush *et al.*, 1997). Elle est également exprimée au sein de diverses tumeurs (Reddy *et al.*, 2002), dans lesquelles elle présente un motif de glycosylation différent de celui observé dans des tissus sains (Suriano *et al.*, 2005). GP96 est un chaperon moléculaire impliqué dans la maturation des protéines (Yang & Li, 2005). Dernièrement, de nombreuses études tendent à lui attribuer un rôle dans le système immunitaire. En effet, GP96 semble participer à la présentation des antigènes, et est capable d'activer les réponses immunitaires

innée et adaptative médiées notamment par les cellules présentatrices de l'antigène (Binder *et al.*, 2007 ; Yang *et al.*, 2007)

TRAP1 (*Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Protein 1*) est une protéine dont l'activité dépend de l'ATP, située dans la mitochondrie et dont la fonction reste méconnue. Elle semble avoir des fonctions antioxydante et antiapoptotique (Felts *et al.*, 2000 ; Montesano Gesualdi *et al.*, 2007). Néanmoins, il apparaît que TRAP1 n'interagit pas directement avec des protéines clientes comme sa consœur HSP90, ni avec les co-chaperons classiques de cette dernière (Felts *et al.*, 2000).

b. HSP90

Cette dénomination recouvre les deux isoformes HSP90 α (HSP86, HSP90A) et HSP90 β (HSP84, HSP90B), respectivement codée par les gènes *HSP90AA1* et *HSP90AB1*. Elles sont très probablement issues d'un événement de duplication du gène d'origine au cours de l'évolution (Gupta, 1995). Ces deux protéines présentent 86 % d'homologie entre elles (Hickey *et al.*, 1989). Pendant longtemps, le terme HSP90 a fait référence indistinctement aux deux isoformes (Chen B *et al.*, 2005). Cette HSP est essentielle à la survie des cellules eucaryotes, et est une des protéines les plus abondantes dans la cellule, puisqu'elle représente environ 1 % des protéines totales (Csermely *et al.*, 1998).

Structurellement, HSP90 est une protéine globulaire constituée de trois principaux domaines fonctionnels :

- un domaine N-terminal présentant un haut degré d'homologie entre les membres de la famille HSP90 (Prodromou & Pearl, 2003). Ce domaine comprend la poche de liaison à l'ATP (Prodromou *et al.*, 1997)
- un domaine central impliqué dans la reconnaissance et la liaison avec les protéines clientes
- un domaine C-terminal responsable de la dimérisation de HSP90 (Minami *et al.*, 1994). Il comprend également un deuxième site de fixation de l'ATP qui est révélé par changement conformationnel quand la poche N-terminale est occupée (Soti *et al.*, 2002).

La dimérisation d'HSP90 est requise pour ses différentes fonctions (Minami *et al.*, 1994). HSP90 est active principalement sous la forme d'homodimères α/α ou β/β , mais elle est détectée également sous forme hétérodimérique, voire monomérique (essentiellement la forme β). Les dimères d'HSP90 peuvent s'associer avec d'autres protéines et ainsi participer à leur repliement (Pratt & Toft, 2003).

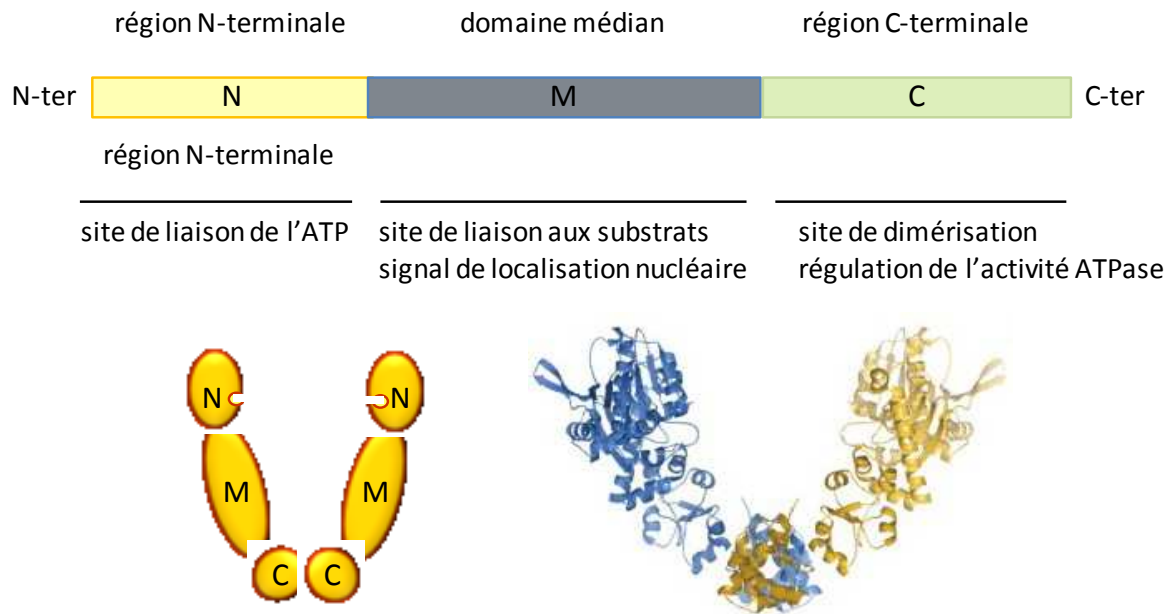


Figure 1. Structure de la protéine HSP90 humaine. Les trois domaines fonctionnels du monomère sont représentés. En bas à gauche figure une représentation schématique du dimère fonctionnel d'HSP90, à droite se trouve la structure cristallographique de ce dimère.

c. Fonctions et régulation d'HSP90

HSP90, à l'instar des autres principales HSPs, remplit de nombreuses fonctions au sein de la cellule. Dans les cellules non stressées, HSP90 contribue à de nombreux processus comme le repliement des protéines, le transport intracellulaire, la signalisation cellulaire.

i. Activité de chaperon, les « protéines clientes »

En conditions physiologiques, HSP90 peut lier de nombreuses protéines, et former avec elles des complexes stables. Ces partenaires d'interaction d'HSP90 sont dénommés « protéines clientes », on en dénombre à l'heure actuelle plus d'une centaine. Certaines de ces protéines sont des acteurs essentiels de la vie cellulaire, ce qui confère à HSP90 un rôle fondamental dans la maintenance protéique. En formant des complexes avec elles, HSP90

préviennent leur agrégation et contrôlent aussi leur activité par séquestration. Les protéines clientes connues sont pour beaucoup d'entre elles impliquées dans la transduction du signal ou la régulation du cycle cellulaire. Ainsi, les facteurs de transcription et les kinases sont les deux classes de protéines les plus représentées parmi les protéines clientes d'HSP90 (Richter & Buchner, 2001). Parmi les kinases ainsi régulées par HSP90, on peut citer la protéine Akt (Sato *et al.*, 2000). Un exemple très documenté est celui des récepteurs aux stéroïdes, illustré par le récepteur aux glucocorticoïdes (RG) (Pratt *et al.*, 2006 ; Grad & Picard, 2007). La séquestration du RG dans le cytosol par HSP90 prévient l'activation inappropriée de ce facteur de transcription en l'absence de signal spécifique. La liaison de l'hormone cortisol à son récepteur induit la translocation nucléaire du complexe, puis son désassemblage, ce qui autorise la dimérisation du récepteur et sa liaison à l'ADN (Pratt *et al.*, 2004). HSP90 est également impliquée dans le fonctionnement correct d'autres récepteurs aux stéroïdes, incluant les récepteurs à l'aldostérone, aux androgènes, à l'œstrogène et à la progestérone. Une autre interaction notable d'HSP90 est celle qu'elle entretient avec le cytosquelette. HSP90 peut en effet se lier avec l'actine et la tubuline ce qui lui permet de contribuer à la préservation de l'intégrité cellulaire et de participer au trafic intracellulaire de protéines (Pratt, 1992 ; Czar *et al.*, 1996).

L'association d'HSP90 avec ses protéines clientes dépend de l'ATP. Il a été montré que des inhibiteurs directs ou allostériques de la liaison à l'ATP ou de son hydrolyse compromettent grandement cette fonction d'HSP90 (Goetz *et al.*, 2003). Le dimère d'HSP90 seul a une conformation dite « ouverte », ce qui expose des résidus hydrophobiques du domaine central, permettant de lier ses substrats. Quand une protéine cible a été chargée par le dimère, la fixation puis l'hydrolyse d'ATP sur le site N-terminal induisent des changements conformationnels assurant la stabilité de la protéine cliente. Le site N-terminal ayant lié l'ATP peut se replier pour former une conformation « fermée », permettant le piégeage du substrat. Ce mode de fonctionnement rappelle l'action d'une pince constituée par les deux monomères d'HSP90 (Pearl & Prodromou, 2006).

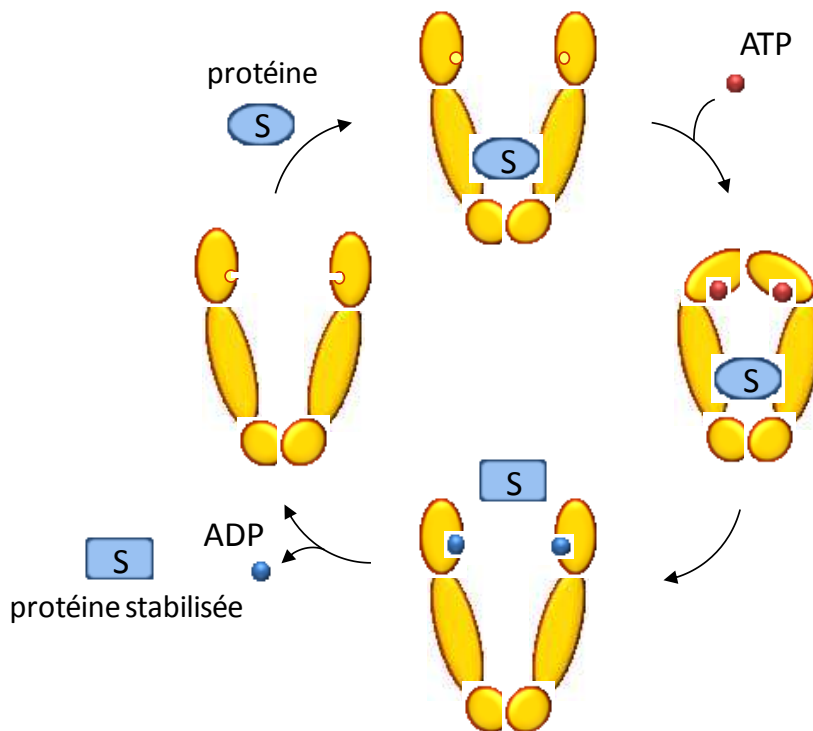


Figure 2. Modèle de l'activité chaperon d'HSP90. Le dimère non lié est en conformation ouverte et peut lier une protéine substrat. La fixation d'ATP par le domaine N-terminal induit des changements conformationnels qui permettent de maintenir et protéger le substrat. L'hydrolyse de l'ATP induit le passage de cette conformation fermée à la conformation initiale, et permet la libération du substrat.

L'activité d'HSP90 dépend de la présence d'autres protéines ayant un rôle de co-chaperons. Le domaine C-terminal comporte un motif EEVD, qui est reconnu par le domaine TPR (*Tetratricopeptide repeat*) présent dans la séquence de ces co-chaperons, ce qui permet leur association avec HSP90 (Pearl & Prodromou, 2006). Ainsi, le cofacteur Hop (*HSP70/HSP90 organizing protein*) permet le recrutement d'HSP70 et HSP40 et l'arrimage de la protéine cliente. D'autres cochaperons influent sur l'activité ATPase et la conformation d'HSP90 (Wandinger *et al.*, 2008).

ii. Régulation d'HSP90 par modifications post-traductionnelles

Des modifications post-traductionnelles comme l'acétylation ou la S-nitrosylation régulent l'activité d'HSP90. L'acétylation inhibe son activité chaperon (Bali *et al.*, 2005 ; Murphy *et al.*, 2005). Il a été montré que des inhibiteurs d'histones déacétylases comme la trichostatine A induisent une hyperacétylation d'HSP90, et une diminution de son interaction avec ses cochaperons et certaines de ses protéines clientes, comme cela a été montré pour les récepteurs aux glucocorticoïdes (Kovacs *et al.*, 2005). La S-nitrosylation par l'oxyde nitrique (NO) du résidu Cys597 diminue l'activité ATPase N-terminale (Martinez-Ruiz *et al.*, 2005).

HSP90 est également un modulateur de l'apoptose. En effet, sous certaines conditions et dans certains types cellulaires, HSP90 peut interagir avec la protéine Apaf-1 et inhiber l'assemblage de l'apoptosome, déjà évoqué précédemment (Pandey et al., 2000a). Cette capacité à interférer avec le déroulement de l'apoptose se manifeste aussi par la faculté d'HSP90 d'inhiber le signal de survie cellulaire induit par la voie Akt (Sato *et al.*, 2000).

d. Distinction fonctionnelle entre HSP90 α et HSP90 β

En dépit de leur proximité, HSP90 α et HSP90 β présentent des différences tant dans la nature de leur expression, que de leur implication dans certaines fonctions biologiques, en particulier lors de la différenciation cellulaire et du développement.

L'expression d'HSP90 α est en effet inductible par plusieurs types de stress et constitue la forme minoritaire, alors qu'HSP90 β est exprimée constitutivement et prédomine dans la cellule (Sreedhar *et al.*, 2004). HSP90 β est la forme d'HSP90 principalement impliquée dans les fonctions cellulaires usuelles telles que le maintien de l'architecture cellulaire ou la protection (Sreedhar *et al.*, 2004).

La principale distinction fonctionnelle entre les deux isoformes d'HSP90 semble résider dans leur rôle dans le développement des organismes. Au cours du développement de l'embryon murin, HSP90 β est exprimée à tous les stades dans la plupart des types cellulaires, alors qu'HSP90 α a une distribution plus restreinte. Chez la souris, l'inactivation ciblée du gène codant pour l'isoforme β provoque la mort avant maturation complète, à cause de défauts dans la différenciation trophoblastique, ce phénotype ne peut être restitué par l'expression d'HSP90 α seule (Voss *et al.*, 2000). De manière générale, plusieurs études soulignent qu'HSP90 β est indispensable pour le développement embryonnaire précoce (Gruppi *et al.*, 1991 ; Vanmuylder *et al.*, 2002).

Il semblerait donc que l'isoforme α , de par sa nature fortement inductible, soit plutôt impliquée dans la protection cellulaire, et que l'isoforme β soit davantage impliquée dans le développement et la différenciation (Sreedhar *et al.*, 2004).

e. Inhibition d'HSP90

HSP90 est fréquemment surexprimée dans les cellules cancéreuses, qu'il s'agisse de tumeurs solides ou sanguines. Cela permet le maintien de l'activation dérégulée de nombreuses protéines clientes, ainsi que d'augmenter la capacité des cellules tumorales à réagir aux conditions de stress caractéristiques de leur environnement. La surexpression d'HSP90 est un facteur de mauvais pronostic ; en effet, ses propriétés antiapoptotiques protègent les cellules cancéreuses de la mort induite par des cellules du système immunitaire ou par les agents cytotoxiques. HSP90 facilite également l'acquisition de caractères de croissance autonome, ainsi que le processus d'angiogenèse intratumorale. HSP90 est devenue rapidement une cible thérapeutique de premier ordre, en raison de sa capacité à contrôler la stabilité de nombreuses protéines, dont beaucoup ont des propriétés oncogéniques (Powers *et al.*, 2008). HSP90 représente 4-6% des protéines totales dans les cellules cancéreuses, en contraste avec une proportion de 1-2% dans les cellules saines, ce qui illustre la grande dépendance des cellules tumorales à l'activité de cette HSP (Chiosis & Neckers, 2006).

Le premier inhibiteur d'HSP90 découvert, la geldanamycine est un antibiotique de la famille des benzoquinones (Workman *et al.*, 2007) est le prototype de nombreux inhibiteurs naturels et de leurs dérivés synthétiques possédant un mode d'action similaire. Ces composés sont des inhibiteurs compétitifs de la liaison de l'ATP à HSP90 (Roe *et al.*, 1999). Leur stricte sélectivité vis-à-vis d'HSP90 s'explique par la structure particulière de la poche de liaison à l'ATP d'HSP90 (Kamal *et al.*, 2003). Cette structure appelée « Bergerat fold » est distincte des domaines ATPases classiques, tels que rencontrés dans les kinases ou d'autres HSPs comme HSP70 (Prodromou *et al.*, 1997). En dépit d'une activité antitumorale prometteuse, la geldanamycine s'est avérée avoir un faible potentiel clinique, à cause d'une toxicité élevée. Cela a induit le développement de dérivés synthétiques ayant un profil toxicologique acceptable. Parmi ceux-ci figurent le 17-AAG (17-allylaminogeldanamycine) et le 17-DMAG (17-déméthoxygeldanamycine), un analogue hydrosoluble du 17-AAG (Hollingshead *et al.*, 2005). Ce dernier est actuellement testé en essais cliniques de phases I et II.

Une autre particularité de ces inhibiteurs est leur tropisme pour les cellules cancéreuses. En effet, dans les cellules tumorales, HSP90 a une affinité de liaison pour l'ATP et les mimétiques de l'ATP tels que les inhibiteurs décrits ci-dessus très supérieure à celle qu'elle a dans les cellules saines (Chiosis & Neckers, 2006). L'inhibition d'HSP90 montre déjà des résultats prometteurs en essais cliniques, particulièrement en combinaison avec la chimiothérapie. En effet, la déstabilisation de protéines clientes impliquées dans la résistance

des cellules cancéreuses les sensibilise aux agents cytotoxiques classiques. Ces inhibiteurs présentent toutefois certaines limitations. Leur action induit une réponse de type *heat shock response* qui aboutit notamment à l'induction d'HSP70, ce qui réduit leur efficacité en inhibant l'apoptose (Kaarniranta *et al.*, 2005). C'est pourquoi il est actuellement envisagé d'inhiber conjointement HSP90 et HSP70 (McCollum *et al.*, 2008b ; McCollum *et al.*, 2008a). De manière plus générale, il peut s'avérer aussi intéressant de cibler l'association d'HSP90 avec ses cochaperons ou ses protéines clientes (Li Y *et al.*, 2009).

C. La famille des petites protéines de stress (small HSPs)

a. Généralités

Les protéines de choc thermique de faible masse moléculaire (sHSPs) forment une famille présente dans tous les organismes vivants, dont les représentants et les niveaux d'expression varient selon les organismes. La famille des sHSPs est celle qui présente la plus grande hétérogénéité de structures parmi les différentes classes de HSPs, ce qui est illustré par une plus faible homologie de séquence entre les membres de cette famille (Kappe *et al.*, 2002). Elles sont cependant caractérisées par la présence d'une séquence commune d'une centaine d'acides aminés appelée domaine α -cristallin. Il s'agit d'une séquence initialement observée chez les protéines du cristallin de l'œil des mammifères. En dépit de la haute variabilité tant en taille qu'en séquence des sHSPs, le domaine α -cristallin est très conservé au sein de cette famille (Ingolia & Craig, 1982). Cette caractéristique a permis d'identifier les derniers membres de la famille des sHSPs humaines, qui sont actuellement au nombre de dix.

Les sHSPs partagent deux caractères biochimiques principaux. Elles sont capables de s'oligomériser pour former de larges complexes, dont le poids peut aller jusqu'à 800 kDa. L'interaction entre les domaines α -cristallins de deux unités forme un dimère, qui constitue la structure basique des complexes oligomériques. De plus, elles sont fortement sujettes à une modification post-traductionnelle, la phosphorylation, qui régule leur capacité à s'oligomériser, et par là, leur fonction biologique (Arrigo & Pauli, 1988 ; Bruey *et al.*, 2000b). Les sHSPs contribuent à la résistance au choc thermique (Landry *et al.*, 1989) ainsi qu'à de nombreux autres stress, notamment des agents anticancéreux, jouant ainsi un rôle fondamental dans la survie cellulaire (Garrido *et al.*, 1996 ; Garrido *et al.*, 1997). Elles remplissent également la fonction de chaperon moléculaire, tout comme les autres classes

d'HSP précédemment décrites (Horwitz *et al.*, 1992 ; Jakob *et al.*, 1993). Les sHSPs assemblées en gros complexes de structure glomérulaire peuvent lier les protéines non natives avec une haute affinité et les maintenir dans un état compétent pour le repliement ; il semble que d'autres HSPs interviennent alors afin d'assister le repliement (Ehrnsperger *et al.*, 1997 ; Lee GJ *et al.*, 1997). Contrairement aux autres HSPs, les sHSPs opèrent sans recours direct à l'hydrolyse d'ATP.

b. HSP27

HSP27 est la petite protéine de choc thermique la plus largement décrite dans la littérature. Elle est l'une des HSPs les plus induites en réponse à un stress cellulaire, elle peut alors atteindre 1 % de la quantité totale des protéines cellulaires, et s'accumule selon une cinétique plus lente que celle d'HSP70, ce qui fait d'elle une HSP dite « tardive » (Arrigo & Welch, 1987). HSP27 est présente constitutivement dans de nombreuses lignées cellulaires et dans une large variété de tissus, toutefois son niveau d'expression basal est relativement faible, mais présente une grande variabilité selon le type cellulaire (Waters & Schaal, 1996).

i. Caractérisation et structures

Chez l'humain, la protéine HSP27 est codée par un gène unique dont le locus est 7q12.3. Deux pseudogènes ont été identifiés sur les chromosomes 3 et X (Hickey *et al.*, 1986 ; McGuire *et al.*, 1989).

En réponse à un choc thermique, les facteurs de transcription HSF-1 et HSF-4 (*Heat Shock Factors*) sont activés suite à leur trimérisation et à leur phosphorylation, pour se lier à leurs éléments de réponses spécifiques, les HSE (*Heat Shock Element*) situés dans le promoteur du gène codant pour HSP27. De nombreux agents chimiques (quercétine, thiols, cisplatine...) ainsi que des protéines peuvent moduler l'expression d'HSP27 (Huang LE *et al.*, 1994 ; Gonin *et al.*, 1997). Par ailleurs, son gène contient une séquence Sp1 et un élément palindromique lui permettant d'être régulé par la progestérone et les oestrogènes (Ciocca *et al.*, 1983 ; Porter *et al.*, 1996).

HSP27 est une protéine de 205 acides aminés. Comme toutes les sHSPs, elle comporte un domaine α -cristallin de 81 acides aminés en position C-terminale, qui supporte la fonction d'oligomérisation. Les autres régions remarquables de sa structure secondaire sont la queue

flexible C-terminale de 22 résidus et le motif WDPF hydrophobe situé dans la région N-terminale. Les prédictions de structure secondaire montrent la présence de deux hélices α en C-terminal et de huit feuillets β en N-terminal.

L'acquisition de la structure quaternaire oligomérique nécessaire aux fonctions d'HSP27 dépend de ces différentes régions. A l'instar des autres membres de la famille des sHSPs, HSP27 est active sous la forme de complexes dont la taille varie de 50 à 800 kDa (Arrigo & Ahmad-Zadeh, 1981 ; Arrigo *et al.*, 1985). Il arrive qu'HSP27 forme des hétéro-oligomères plus ou moins stables avec d'autres sHSPs, telles que l' α B-cristallin et HSP22. Le domaine α -cristallin comprend notamment une région située entre les résidus 133 et 144 essentielle au contact entre monomères, au sein de laquelle le résidu Cys¹³⁷ contribue à la stabilité des dimères par formation de ponts disulfures (Zavialov *et al.*, 1998). L'extrémité N-terminale, en particulier le motif WDPF, intervient dans la stabilisation des oligomères (Lambert *et al.*, 1999 ; Liu C & Welsh, 1999). La queue C-terminale permettrait elle aussi de stabiliser les complexes par des interactions polaires dues à ses charges négatives (Boelens *et al.*, 1998).

Dans des conditions physiologiques stables, HSP27 a une distribution cytoplasmique, comme en attestent des observations de microscopie électronique et des expériences de fractionnement cellulaire (Rogalla *et al.*, 1999). Elle semble cependant être majoritairement concentrée dans la région périnucléaire (Garrido *et al.*, 1997). Lors d'un stress, elle peut être transloquée au noyau de manière transitoire (Arrigo *et al.*, 1988a ; Arrigo, 1990).

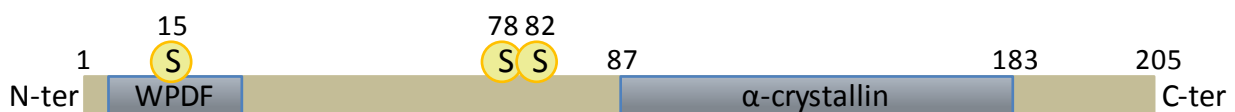


Figure 3. Structure de la protéine monomérique HSP27. Les trois résidus sérine cibles de la phosphorylation sont représentés.

ii. Oligomérisation et phosphorylation d'HSP27

Ces deux phénomènes sont étroitement liés dans la biologie d'HSP27. La protéine HSP27 humaine peut être phosphorylée principalement au niveau de trois résidus sérine distincts dans sa séquence : Ser¹⁵, Ser⁷⁸ et Ser⁸² (Landry *et al.*, 1992). Ces trois sites sont situés dans un motif commun Arg-X-X-Ser. Un autre site mineur de phosphorylation, le résidu Thr¹⁴³ a été également identifié (Butt *et al.*, 2001).

L'oligomérisation d'HSP27 est un processus très dynamique dépendant de plusieurs paramètres physico-chimiques ainsi que biologiques. La phosphorylation d'HSP27 en est le plus connu. Les oligomères d'HSP27 ont une apparence globulaire et sphérique en microscopie électronique, qui refléterait la formation d'un complexe composé de 24 monomères associés entre eux (Arrigo *et al.*, 1988a ; Rogalla *et al.*, 1999). L'influence de la phosphorylation d'HSP27 sur son oligomérisation a été partiellement élucidée par l'utilisation *in vitro* de mutants spécifiques, chez lesquels les résidus sérine cibles sont substitués ponctuellement, permettant ainsi de mimer la forme phosphorylée ou non. Ainsi, lorsque les trois résidus sérine sont remplacés par des résidus aspartate ou glutamate (chargés négativement comme le groupe phosphate), la protéine mutée se comporte comme si elle était constitutivement phosphorylée. A l'inverse, la conversion des résidus sérine en résidus apolaires et de faible encombrement stérique (alanine), produit un mutant qui ne peut être phosphorylé. Ces mutants ont permis d'étudier l'implication du statut d'oligomérisation d'HSP27 dans ses fonctions biologiques.

Il a été ainsi montré que c'est la forme non phosphorylée (mutant HSP27-3A) qui a la faculté de s'oligomériser, alors que la forme hyper-phosphorylée (mutant HSP27-3D) est présente sous forme de dimères et tétramères (Mehlen *et al.*, 1997 ; Bruey *et al.*, 2000b).

La contribution de la phosphorylation de chacun des résidus sérine pris isolément reste encore assez peu connue. Par exemple, l'influence de la phosphorylation du résidu Ser¹⁵ sur l'oligomérisation reste sujet à débat (Rogalla *et al.*, 1999). Cet événement pourrait moduler les interactions qu'HSP27 peut établir avec des partenaires comme la protéine kinase Akt ou le granzyme B (Konishi *et al.*, 1997 ; Beresford *et al.*, 1998). Son rôle dans l'oligomérisation serait alors minoritaire. La phosphorylation du résidu Ser⁸² semble par contre prédominante dans la dissociation des grands oligomères d'HSP27 en structures réduites (Rogalla *et al.*, 1999).

L'exposition à un stress induit une phosphorylation rapide d'HSP27 et des changements dans son état d'oligomérisation. On observe dans ce cas une augmentation transitoire de l'oligomérisation d'HSP27 suivie d'une accumulation de la protéine sous forme de petits oligomères (Mehlen *et al.*, 1995 ; Mehlen *et al.*, 1997). Mais *in vivo*, coexistent des structures oligomériques de diverses tailles, ce qui suggère que d'autres mécanismes pourraient réguler l'oligomérisation d'HSP27 (Ehrnsperger *et al.*, 1997).

La phosphorylation d'HSP27 est assurée principalement par la voie de la p38 MAP kinase. Les trois résidus sérine d'HSP27 peuvent être phosphorylés par les kinases MAPKAP2 et MAPKAP3, elles-mêmes activées par phosphorylation par la p38 MAPK (Landry *et al.*, 1992 ; Stokoe *et al.*, 1992 ; Huot *et al.*, 1995). La phosphorylation d'HSP27 par la voie p38 peut être induite par de nombreux stimuli, dont le stress thermique, des signaux mitogènes ou de différenciation, l'exposition à des agents chimiques. La voie p38 est ainsi activée par de multiples senseurs de stress, conduisant à la phosphorylation d'HSP27 et à la réorganisation de sa structure supramoléculaire (Dorion & Landry, 2002). HSP27 peut être phosphorylée par une voie alternative qui est celle de la PKC δ (*Protein kinase C δ*), en réponse à des agents de différenciation comme les esters de phorbol (Kato *et al.*, 2001).

La phosphorylation est un phénomène réversible. A ce jour, peu de données sont disponibles sur la déphosphorylation d'HSP27. Parmi les quelques phosphatases potentiellement impliquées dans ce processus, la PP2A (*Protein phosphatase 2A*) serait la principale (Cairns J *et al.*, 1994). La PP2A aurait notamment un rôle dans la régulation de l'activité protectrice d'HSP27 vis-à-vis du cytosquelette (Tar *et al.*, 2006). La protéine phosphatase dépendante du calcium et de la calmoduline (PP2B) peut également catalyser la déphosphorylation d'HSP27 (Gaestel *et al.*, 1992).

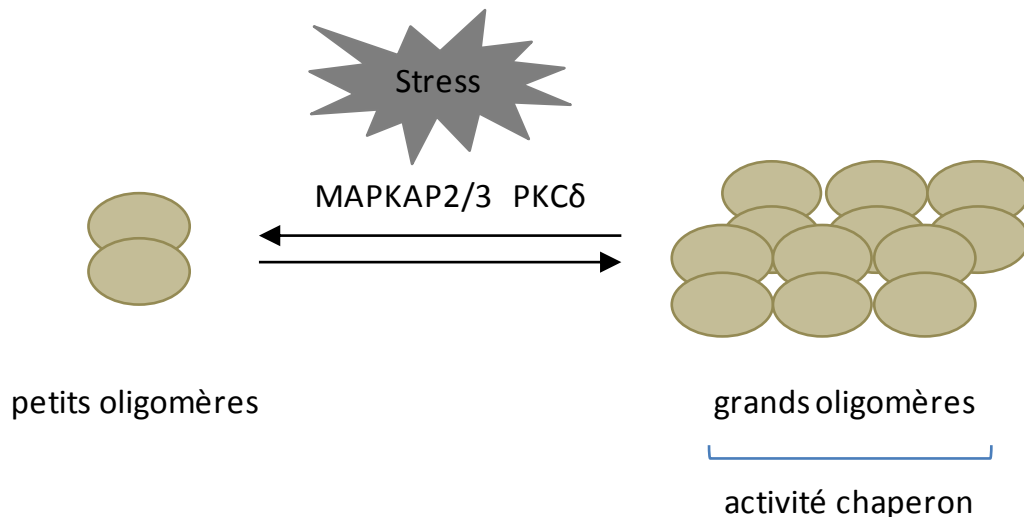


Figure 4. Relation entre la phosphorylation d'HSP27, son statut d'oligomérisation et son activité.

iii. Fonctions cellulaires

La protéine HSP27 est impliquée dans les processus de développement et de différenciation cellulaire. Elle assure par ailleurs un panel d'autres fonctions essentielles au maintien de l'intégrité et de la survie cellulaires.

- Rôle de chaperon moléculaire

HSP27, en agissant de façon coordonnée avec les autres HSPs, facilite indirectement la réparation des protéines endommagées suite à un stress. Son efficacité en tant que chaperon moléculaire réside dans sa faculté de s'oligomériser, ce qui lui permet de lier un grand nombre de protéines dénaturées, et donc de prévenir la toxicité due à la formation d'agrégats protéiques (Rogalla *et al.*, 1999).

L'augmentation de l'expression des HSPs lors d'un stress est souvent associée à diminution de la quantité globale de protéines et à une chute de la production d'ARN messager (Di Domenico *et al.*, 1992). Il a été montré qu'HSP27 pouvait inhiber *in vitro* la synthèse protéique après un choc thermique, en s'associant avec le facteur eIF4G (*Elongation initiation factor 4G*) qui est essentiel au processus de traduction (Cuesta *et al.*, 2000).

- Inhibition de l'apoptose

Il existe une littérature abondante sur la capacité des HSPs à contrôler certaines des étapes de la cascade d'activation des caspases menant à la mort cellulaire par apoptose (Samali *et al.*, 1999 ; Garrido *et al.*, 2001 ; Didelot *et al.*, 2006). A l'instar d'HSP70, HSP27 est un chaperon apte à réguler négativement l'apoptose (Garrido *et al.*, 2006). Plus particulièrement, l'action d'HSP27 serait plus restreinte que celle d'HSP70, car elle aurait pour principales cibles les caspases. Ainsi, la déplétion d'HSP27 dans des cellules de cancer de la prostate induit l'apoptose *via* l'activation de la caspase 3 (Rocchi *et al.*, 2006). De nombreuses études ont montré qu'HSP27 protège les cellules de la mort induite par l'exposition à des agents tels que la staurosporine, l'actinomycine D, le TNF α (*Tumor necrosis factor α*), l'étoposide (Mehlen *et al.*, 1996 ; Garrido *et al.*, 1997 ; Samali & Orrenius, 1998 ; Samali *et al.*, 2001).

De nombreux travaux de notre équipe ont contribué ces dernières années à mettre en lumière les mécanismes moléculaires du rôle antiapoptotique d'HSP27, tant dans la voie intrinsèque que dans la voie extrinsèque. En effet, notre équipe a démontré qu'HSP27 peut se lier au cytochrome c et ainsi bloquer la formation de l'apoptosome, et l'activation subséquente de la caspase 9 (Garrido *et al.*, 1999 ; Bruey *et al.*, 2000a ; Concannon *et al.*, 2001). Une autre étude suggère qu'HSP27 n'agit pas sur la formation de l'apoptosome, mais prévient l'activation protéolytique de la procaspase 3 par la caspase 9 (Pandey *et al.*, 2000b). Le mode d'action d'HSP27 vis-à-vis de cette voie apoptotique reste controversé, puisque des résultats contradictoires montrent que l' α B-crystallin peut interagir avec le cytochrome c, mais pas HSP27 (Kamradt *et al.*, 2001).

Par ailleurs, il a été proposé qu'HSP27 puisse bloquer la voie intrinsèque de l'apoptose en amont de l'activation mitochondriale, c'est-à-dire en prévenant le relargage du cytochrome c dans le cytosol. En effet, HSP27 est présente au niveau des mitochondries de cellules thermotolérantes, et inhibe la libération du cytochrome c suite à un stimulus apoptotique (Samali *et al.*, 2001). Il a été montré par la suite qu'HSP27 prévient la sortie du cytochrome c en empêchant la relocalisation du facteur proapoptotique Bid vers la mitochondrie, grâce à sa fonction de stabilisation du cytosquelette (Paul *et al.*, 2002). HSP27 peut également empêcher le relargage par la mitochondrie des molécules proapoptotiques Smac, qui est un inhibiteur des protéines IAPs (*Inhibitor of apoptosis proteins*) (Chauhan *et al.*, 2003).

HSP27 agit aussi au niveau de la voie extrinsèque de l'apoptose, c'est-à-dire celle qui est activée par la liaison des récepteurs de mort Fas ou DR4/DR5 avec leurs agonistes Fas Ligand (FasL) ou TRAIL. Dans ce mode de déclenchement de l'apoptose qui requiert une stimulation externe, le module de transmission du signal associé à Fas aboutit à l'activation de la caspase 8, qui à son tour active les caspases effectrices. HSP27 inhibe l'apoptose induite par la liaison de FasL à son récepteur (Mehlen *et al.*, 1996). HSP27 peut également s'associer à la protéine Daxx, un médiateur de l'apoptose induite par l'interaction Fas/FasL (Charette & Landry, 2000). L'apoptose induite par Daxx est indépendante des caspases. HSP27 agit en empêchant l'interaction de Daxx avec Fas (Charette *et al.*, 2000). Enfin HSP27 prévient l'activation de Bax, un facteur cytosolique proapoptotique, par interaction avec la voie de la phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) et activation de la kinase Akt (Havasi *et al.*, 2008).

HSP27 bloque également la mort cellulaire par sa fonction antioxydante. Elle est en effet capable de réduire le taux des espèces oxygénées réactives, ou ROS (*Reactive oxygen species*) et de neutraliser les effets toxiques des protéines oxydées suite à un stress oxydant (Garrido *et al.*, 1997 ; Rogalla *et al.*, 1999 ; Arrigo *et al.*, 2005).

- Protection du cytosquelette

HSP27 est reconnue pour exercer une activité protectrice de premier ordre vis-à-vis du cytosquelette, et plus précisément des microfilaments d'actine (During *et al.*, 2007). Plusieurs études ont montré que la surexpression d'HSP27 en conditions de stress telles que l'hyperthermie ou l'exposition à des agents oxydants, conduit à la stabilisation des filaments de F-actine, et donc à la protection de l'architecture cellulaire (Huot *et al.*, 1996 ; Huot *et al.*, 1997 ; Landry & Huot, 1999). Le rôle d'HSP27 sur la dynamique de l'actine repose sur son degré de phosphorylation. L'HSP27 sous forme de petits oligomères s'associe avec la F-actine, pour la stabiliser et prévenir la désagrégation des microfilaments, vraisemblablement en empêchant l'interaction avec des protéines susceptibles de compromettre leur stabilité. HSP27 intervient également sous forme non phosphorylée et monomérique au niveau de l'actine libre en la coiffant pour inhiber sa polymérisation (Mounier & Arrigo, 2002).

- Activation du protéasome

Récemment, notre équipe a publié des travaux démontrant qu'HSP27 est impliquée dans la dégradation des protéines en conditions de stress par un complexe protéique spécifique, le protéasome. Certaines protéines ont été identifiées comme étant des cibles spécifiques d'HSP27 sous des conditions particulières. L'une d'entre elles est la protéine I κ B α , l'inhibiteur du facteur de transcription NF- κ B. La dégradation de I κ B α par le protéasome induit la relocalisation nucléaire de la sous-unité p65, et l'induction des gènes cibles de NF- κ B, qui ont notamment un rôle antiapoptotique (Parcellier et al., 2003). Une autre étude publiée par notre équipe montre qu'HSP27 peut également favoriser l'ubiquitination et la dégradation par le protéasome de la protéine p27^{Kip1}, qui est un inhibiteur de CdK (*Cyclin-dependant Kinase*). Cela stimule la progression à travers le cycle cellulaire, en autorisant le retour des cellules stressées en phase S de division (Parcellier et al., 2006). Nous avons également montré qu'HSP27 est impliquée dans l'ubiquitination et la dégradation protéasomale de la protéine GATA1, un facteur de transcription qui gouverne la différenciation des érythrocytes. HSP27 est exprimée dans les cellules érythroïdes lors de la dernière étape du processus de différenciation, et induit la dégradation de GATA1, ce qui est un événement nécessaire pour la maturation complète des précurseurs (de Thonel et al., 2010). La partie suivante décrit le processus d'ubiquitination et son implication dans la dégradation des protéines par le protéasome.

PARTIE II. Le système ubiquitine-protéasome

A la fin du siècle dernier, la découverte de l'ubiquitine a permis de dépasser le postulat selon lequel la dégradation des protéines au sein de la cellule ne pouvait être un processus actif, ce qui aurait équivalu à un non-sens du point de vue énergétique pour la cellule. Parallèlement au fait que l'attention des chercheurs était concentrée principalement sur la synthèse des protéines, très peu de travaux ont porté sur leur dégradation. Ce processus était considéré comme générateur de déchets métaboliques uniquement, et se déroulait au sein d'un organelle dédié – le lysosome, de manière passive. Ce sont les travaux pionniers d'Aaron Ciechanover et Avram Hershko qui ont mis en évidence l'existence d'une entité protéique impliquée dans un mécanisme de dégradation protéique indépendant du lysosome, actif (c'est-à-dire ayant un coût énergétique) et contrôlé par la cellule (Ciechanover *et al.*, 1982 ; Ciechanover *et al.*, 1984 ; Hershko, 1983 ; Hershko *et al.*, 1984). Cette entité fut par la suite appelée « ubiquitine », et son rôle dans la protéolyse fut rapidement associé à celui d'un complexe protéique cytoplasmique, le « protéasome ». Dans ce système, l'ubiquitine assure le marquage spécifique de protéines dites « cibles » qui sont destinées à être dégradées suivant le contexte cellulaire.

Depuis ces premières études, les bases moléculaires du fonctionnement du système ubiquitine-protéasome ont été élucidées, et il est apparu que ce système régule un large éventail de processus cellulaires tels que le cycle cellulaire, la croissance, la différenciation, le contrôle qualité des protéines. Depuis quelques années, il est devenu évident que des dysfonctionnements du système ubiquitine-protéasome sont impliqués dans la survenue de nombreuses maladies humaines, principalement des cancers, des maladies inflammatoires ainsi que des neurodégénérescences. De très nombreuses études tendent actuellement à manipuler pharmacologiquement ce système afin de cibler spécifiquement la voie de dégradation d'une protéine donnée.

1. L'ubiquitination

A. L'ubiquitine

Il s'agit d'une protéine globulaire de 8,5 kDa pour 76 acides aminés, dont la séquence est extrêmement conservée parmi les organismes eucaryotes. Il n'existe pas chez les procaryotes de protéine fonctionnellement analogue, bien que deux protéines bactériennes (ThiS et MoaD) partagent une structure et une configuration tridimensionnelle proche de l'ubiquitine (Wang C *et al.*, 2001). Chez les organismes eucaryotes, l'ubiquitine appartient à une vaste classe de protéines dénommées « *ubiquitin-like* » (UBL), car elles partagent une forte similarité structurelle. Celles-ci sont subdivisées en deux catégories, selon qu'elles présentent un mécanisme d'action analogue à l'ubiquitine ou non. Le groupe des UBL de type I comporte des membres tels que SUMO et Nedd8, tandis que celui des UBL de type II intègre des protéines telles que BAG1 ou la parkine. Seuls les UBL de type I ont un mécanisme similaire à l'ubiquitine (Walters *et al.*, 2004). Il est notable que l'ubiquitine soit considérée désormais comme appartenant à la famille des protéines de choc thermique, et que son expression est elle aussi modulée lors de stress cellulaires (Bond & Schlesinger, 1985).

La protéine ubiquitine est encodée chez l'humain par quatre gènes différents, et est exprimée sous forme de dimères en tandem ou de fusion avec des riboprotéines. La génération d'ubiquitine monomérique fonctionnelle nécessite le clivage post-traductionnel de ces précurseurs par des protéases spécifiques (Liu CC *et al.*, 1989). L'ubiquitine ainsi libérée constitue une réserve de monomères pouvant être fixés de manière covalente à de très nombreuses protéines par un processus appelé ubiquitination.

B. Le mécanisme de l'ubiquitination

a. Généralités

D'un point de vue général, l'ubiquitination résulte de l'activation concertée de trois principales enzymes qui catalysent les réactions biochimiques nécessaires à la conjugaison de l'ubiquitine à son substrat (Hershko & Ciechanover, 1998).

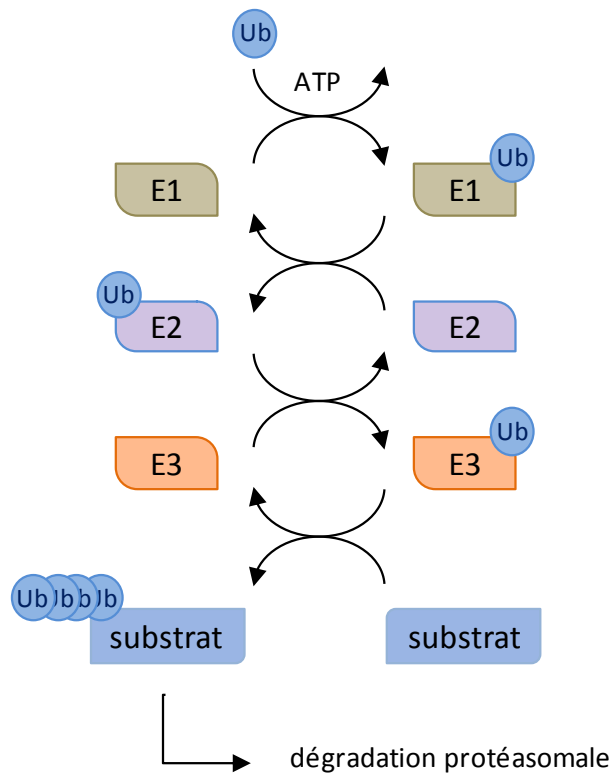


Figure 5. Représentation schématique du mécanisme général du processus d'ubiquitination. Les trois enzymes E1, E2 et E3 interviennent séquentiellement pour lier un monomère d'ubiquitine sur la protéine cible. Selon la classe à laquelle elle appartient, l'E3 peut catalyser directement le transfert de l'ubiquitine à la cible, ou alors elle forme un complexe avec l'E2 (cf. paragraphe *c.iii.* dans cette partie). La répétition de ce processus aboutit à la polyubiquitination de la protéine cible. Une quatrième catégorie d'enzymes, les E4, interviendraient pour allonger la chaîne.

La première étape consiste en l'activation de l'ubiquitine, par la formation d'une liaison thioester riche en énergie entre un résidu cystéine du site actif de l'enzyme d'activation dite E1 et le résidu glycine en C-ter de l'ubiquitine. Le coût en énergie de cette opération est assuré par l'hydrolyse d'ATP. L'ubiquitine ainsi activée est ensuite transférée au site actif de l'enzyme de conjugaison, ou E2, *via* une réaction de transestérification. C'est ensuite l'enzyme de ligation (E3) qui réalise la conjugaison proprement dite de l'ubiquitine à sa protéine cible, par la création d'une liaison isopeptidique entre la glycine C-terminale de l'ubiquitine et le groupe ϵ -NH₂ d'un résidu lysine. La répétition de ce processus aboutit à la formation d'une chaîne de polyubiquitine liée à son substrat, par l'ajout successif de nouveaux monomères d'ubiquitine sur un résidu lysine d'ubiquitine préalablement liée. On parle dans ce cas de polyubiquitination. L'ubiquitine possède elle-même sept résidus lysine au sein de sa séquence, susceptibles eux aussi d'être conjugués à un monomère d'ubiquitine (K6, K11, K27, K29, K33, K48 et K63).

b. Le langage de l'ubiquitine

La manière dont l'ubiquitine est conjuguée à ses substrats constitue un levier de contrôle important dans leur dégradation par la voie ubiquitine-protéasome. Similairement à la phosphorylation, l'ubiquitination est une modification réversible, spécifique et rapide. En plus de son implication historique dans la dégradation dépendante du protéasome, l'ubiquitine participe à un large éventail de fonctions cellulaires. Cette polyvalence repose sur la présence des sept résidus lysine au sein de la séquence de l'ubiquitine, tous potentiellement sites accepteurs. Des expériences de protéomique quantitative chez la levure ont montré l'occurrence de chaînes d'ubiquitine constituées sur ces sept résidus, bien qu'à des degrés divers (Xu P *et al.*, 2009). La multiplicité des combinaisons potentielles de branchements produit des chaînes d'ubiquitine de topologies et de structures quaternaires très diverses (Ikeda & Dikic, 2008). Cette variabilité topologique génère une diversité de surfaces d'interaction avec différentes classes de protéines liant l'ubiquitine (Hicke *et al.*, 2005 ; Raasi *et al.*, 2005 ; Varadan *et al.*, 2005). La machinerie de l'ubiquitination peut produire des chaînes de polyubiquitine autant homogènes qu'hétérogènes, lesquelles peuvent en plus être linéaires ou branchées (Ben-Saadon *et al.*, 2006 ; Kirkpatrick *et al.*, 2006 ; Kim YC & Hummer, 2008). Pour ajouter de la complexité à ce système, les chaînes de polyubiquitine peuvent être de longueur variable, voire unitaires sur un résidu lysine solitaire (monoubiquitination) ou sur plusieurs résidus lysine différents (multimono-ubiquitination).

L'issue de la polyubiquitination d'une protéine dépend de la nature des branchements interubiquitine au sein de la chaîne. Actuellement, si la conséquence physiologique du choix de tel ou tel résidu lysine pour l'élongation de la chaîne de polyubiquitine est relativement bien décrite, le mécanisme par lequel ce choix est effectué reste quant à lui plus obscur. Dans le cas de la dégradation protéasomale, les protéines portant des chaînes d'au moins quatre ubiquitines constituent le substrat de choix pour le protéasome (Hochstrasser, 1996 ; Thrower *et al.*, 2000). Le résidu K48 a été identifié comme le site canonical pour le ciblage des protéines substrats au protéasome, mais il a été montré que des chaînes de type K11 peuvent également servir de signal de dégradation protéasomale pour des protéines régulatrices du cycle cellulaire (Jin *et al.*, 2008) et des substrats du réticulum endoplasmique (Xu P *et al.*, 2009). La polyubiquitination du type K63 affecte généralement des fonctions non relatives à la dégradation protéasomale comme la réparation de l'ADN, le transport des protéines ou l'endocytose, l'activation de voies de signalisation (Kanayama *et al.*, 2004). Les chaînes de

type K6 seraient impliquées dans la réparation de l'ADN (Solomon *et al.*, 2004 ; Simons *et al.*, 2006).

Figure 6. Les multiples fonctions cellulaires associées à la topologie de l'ubiquitination (d'après Wong & Cuervo, 2010).

c. Les enzymes de l'ubiquitination

i. E1 : activation de l'ubiquitine

La première enzyme de la cascade d'ubiquitination appelée enzyme d'activation de l'ubiquitine, E1 ou Uba (*ubiquitin-activating enzyme*) effectue l'activation ATP-dépendante de l'ubiquitine. Cette réaction consomme l'énergie issue de l'hydrolyse de l'ATP, et aboutit à la formation d'un intermédiaire ubiquitine-adénylate par liaison covalente (Fang & Weissman, 2004). La libération de l'AMP permet ensuite la formation d'une liaison riche en énergie entre le groupe carboxyle de la glycine C-terminale de l'ubiquitine et le groupe thiol d'un résidu cystéine conservé appartenant au site actif de l'E1. Chez les mammifères, seules deux enzymes E1 ont été identifiées à l'heure actuelle. La plus connue, appelée UBE1 chez l'être humain, est très conservée au cours de l'évolution. La seconde, appelée UBE1L2 a été identifiée récemment chez les vertébrés. Elle semble être abondamment exprimée dans les testicules, suggérant une fonction spécifique à cet organe (Pelzer *et al.*, 2007).

ii. E2 : transfert et conjugaison de l'ubiquitine

L'intermédiaire thiolester-ubiquitine issu de la réaction d'activation est ensuite transféré au groupe thiol du résidu cystéine active d'une des enzymes dites de conjugaison, les E2 encore appelées Ubc (*ubiquitin-carrier* ou *ubiquitin-conjugating enzyme*). Le transfert est réalisé par réaction de transthioylation mettant en jeu la même glycine C-terminale de l'ubiquitine (Weissman, 2001). Il existe une cinquantaine d'E2 chez les mammifères. Lors de la dernière étape de la cascade réactionnelle, l'E3 interagit avec l'E2 et le substrat. Des données récentes suggèrent que les E3 ne seraient pas restreintes à un rôle d'adaptateur entre l'E2 et la protéine cible, mais pourraient activer de manière allostérique l'E2 (Hochstrasser, 2006).

iii. E3 : ligation de l'ubiquitine

A ce jour, plus d'un millier d'enzymes E3 ubiquitine ligases ont été identifiées chez l'être humain (Ciechanover, 2006). De manière générale, chaque E3 peut cibler différents substrats. A l'inverse, un substrat peut être recruté par plusieurs E3 différentes. Ce sont les E3 qui, étant impliquées dans la reconnaissance du substrat, portent la haute spécificité de la cascade d'ubiquitination. Il semble que ce soit l'interaction entre les E2 et les E3 qui assurent la bonne sélection du substrat dont la dégradation est requise au moment adéquat. Le grand nombre d'E3 recensées témoigne de l'extrême complexité de ce système ainsi que de la finesse de sa régulation, plutôt que d'une redondance. En effet, on estime actuellement que le nombre d'acteurs impliqués dans le système ubiquitine-protéasome équivaldrait au nombre de protéines intervenant au sein du kinome (comprenant les kinases et les phosphatases).

Les E3 constituent une famille très large et hétérogène de protéines utilisant des mécanismes variés et qui diffèrent dans leur interaction avec les E2. Elles peuvent agir sous forme monomérique ou en complexe. On distingue deux principales familles d'enzymes E3 monomériques (Robinson & Ardley, 2004) : les E3 à domaine HECT (*Homologous to E6-AP carboxy terminus*) qui sont pourvues d'une activité catalytique, et les E3 à domaine RING finger (*Really interesting new gene*) qui ne le sont pas. Les protéines E3 à domaine HECT établissent un intermédiaire réactionnel avec l'ubiquitine *via* un résidu cystéine de leur site actif, qu'elles transfèrent sur le substrat (Scheffner *et al.*, 1995). En revanche, les E3 à domaine RING catalysent le transfert de l'ubiquitine liée à E2 directement sur le substrat sans former de liaison thioester avec l'ubiquitine (Petroski & Deshaies, 2005).

iv. E4 : élongation de la chaîne d'ubiquitine

Le mécanisme de conjugaison de l'ubiquitine, quel que soit le type d'E3 qui l'effectue, est difficile à concevoir dans le sens où au cours de l'allongement de la chaîne, la nature du substrat et la configuration spatiale changent. En effet, alors que la première ubiquitine est conjuguée sur une lysine d'un substrat reconnu spécifiquement, la lysine conjuguée lors de l'allongement de la chaîne est une lysine de l'ubiquitine. Ceci nécessite que l'E3 possède une double spécificité, ou qu'elle soit secondée par un facteur capable d'allonger les chaînes de manière non spécifique. D'autre part, si le substrat et l'E2 sont bien positionnés l'un par rapport à l'autre pour la conjugaison de la première ubiquitine, lorsque la chaîne s'allonge, la distance entre l'E2 et la lysine à ubiquitiner augmente dans le cas d'une E3 à domaine RING ; et dans le cas d'une E3 à domaine HECT, c'est la distance entre le site actif de l'E3 et la lysine à ubiquitiner qui augmente (Hoppe, 2005). Ces considérations suggèrent que l'E3 jouerait un rôle dans l'initiation de la chaîne, et que d'autres protéines favorisent l'allongement de la chaîne. Ainsi, il a été montré que la polyubiquitination de la protéine p53 par son partenaire MDM2 requiert l'intervention d'un facteur E4 pour l'allongement de la chaîne (Yang *et al.*, 2004).

C. Régulation de l'ubiquitination

a. Les domaines UBDs

La multiplicité des interactions nécessaires au bon fonctionnement de la signalisation par l'ubiquitine repose sur l'existence de séquences spécifiques au sein des protéines impliquées. Ces séquences, appelées UBDs (*ubiquitin-binding domains*) sont généralement de petite taille (de 20 à 150 acides aminés), et peuvent interagir directement avec l'ubiquitine libre ou oligomérique. Les UBDs sont présents dans les enzymes catalysant l'ubiquitination et la déubiquitination, ainsi que dans des protéines réceptrices reconnaissant le signal constitué par l'ubiquitination de certaines protéines. Le premier UBD à avoir été caractérisé fut la protéine S5A/RPN10, une sous-unité protéasomale (Hofmann & Falquet, 2001). L'analyse de séquences par bioinformatique, ainsi que par des criblages par double-hybride chez la levure ont permis d'identifier neuf types d'UBD différents. Les deux types d'UBD les plus précocement découverts sont les motifs UBA (*ubiquitin-associated domain*) et UIM (*ubiquitin-interacting motif*). De nombreuses protéines contiennent des UBDs dans leurs

structures, ainsi chez l'homme, environ 200 protéines contenant des motifs UIM ou UBA ont d'ores et déjà été identifiées. Hicke et coll. ont publié un article de synthèse très complet sur la structure des UBDs, leurs caractéristiques biophysiques et leur fonctions physiologiques (Hicke *et al.*, 2005).

b. Auto-ubiquitination des E3

Certaines E3 ligases disposent de la faculté d'induire leur propre ubiquitination cela permet un rétrocontrôle très réactif de leur activité. C'est le cas pour la protéine MDM2, l'E3 ligase responsable de la dégradation de p53, dont l'auto-ubiquitination semble requise pour la stabilisation de p53 (Stommel & Wahl, 2004). Les protéines IAPs (*Inhibitor of Apoptosis Proteins*) sont un autre exemple qui a été décrit de ce phénomène (Varfolomeev *et al.*, 2007).

c. Régulation par les déubiquitinases

L'ubiquitination est un processus dynamique et réversible. Les enzymes de déubiquitination ou DUBs (*Deubiquitinating enzymes*) jouent un rôle important dans la régulation des fonctions liées à l'ubiquitine (Amerik & Hochstrasser, 2004). Ce sont des protéines très actives au sein de la cellule, leur fonction antagoniste du processus d'ubiquitination permet d'affiner encore la régulation de l'étiquetage des protéines par l'ubiquitination. Le devenir du substrat dépend d'une compétition entre ubiquitination, déubiquitination, adressage au protéasome et dégradation (Wilkinson, 2000). On connaît à ce jour cinq sous-familles de DUBs qui ont été caractérisées par homologies de séquences et par leur mécanisme d'action (Amerik & Hochstrasser, 2004). Les deux catégories de DUBs les plus fréquentes et les plus connues sont les UBPs (*Ubiquitin specific processing proteases*) et les UCHs (*Ubiquitin C-terminal Hydrolases*). Les UCHs sont généralement responsables de l'élimination des courtes chaînes d'ubiquitine, tandis que les UBPs sont impliquées dans la dégradation des chaînes plus complexes. Les DUBs agissent à plusieurs niveaux dans la voie ubiquitine-protéasome. Ces enzymes sont responsables de la dégradation des précurseurs multimériques de l'ubiquitine, de l'édition des chaînes d'ubiquitine erronées ou conjuguées à un substrat par erreur, du recyclage de l'ubiquitine par libération des chaînes de polyubiquitine lors de la dégradation du substrat (Chung & Baek, 1999).

d. Signaux spécifiques de dégradation

Les événements impliqués dans la sélection spécifique des protéines à dégrader par la voie ubiquitine-protéasome ne sont pas encore élucidés dans leur intégralité. Divers signaux

résidant dans la séquence des protéines cibles participent à leur adressage correct au protéasome.

Les séquences PEST sont de petits motifs (12 à 60 acides aminés) qui tiennent leur nom de leur richesse en proline, glutamate, sérine et thréonine (PEST). Elles sont typiques de protéines à faible demi-vie, et favorisent l'ubiquitination de ces protéines quand elles sont phosphorylées (Rechsteiner & Rogers, 1996).

La présence d'autres motifs spécifiques dans la séquence des protéines à dégrader joue également un rôle important. C'est le cas de la *D-box* comportant le motif RxxL, et de la *KEN-box* (Yamano *et al.*, 1998).

L'extrémité N-terminale de certaines protéines peut aussi intervenir dans la sélection du substrat. Sont concernées des protéines improprement synthétisées ou ayant une localisation erronée. Ces erreurs produisent des extrémités N-terminales atypiques vis-à-vis des protéines correctement localisées (Varshavsky, 1996). La voie de la *N-end rule* permet d'éliminer ces protéines considérées comme indésirables, dont l'extrémité N-terminale constitue un site de reconnaissance (Varshavsky, 1992). Ce schéma de dégradation n'est toutefois pas restreint à ce type de protéines, mais est également lié à l'élimination des protéines par la voie de l'ubiquitine (Varshavsky, 1996).

e. Modifications post-traductionnelles

Les modifications post-traductionnelles, comme la phosphorylation ou l'oxydation, peuvent être un signal de dégradation (Hochstrasser, 1996). La modification des protéines cibles la plus fréquente est la phosphorylation. Selon les cas, la phosphorylation d'un substrat peut conditionner son interaction avec l'E3 et ainsi favoriser son ubiquitination, ou au contraire affecter sa reconnaissance par l'E3 et induire sa stabilisation. Un très grand nombre de substrats est modifié par phosphorylation avant d'être ubiquitiné. Par exemple, la phosphorylation de p21^{Cip1}, un inhibiteur de CdK, provoque son exportation hors du noyau pour être ubiquitiné dans le cytoplasme (Bornstein *et al.*, 2003). On peut par ailleurs citer le régulateur transcriptionnel I- κ B et le précurseur p105 du facteur de transcription NF- κ B qui doit être phosphorylé avant de subir un clivage dépendant de l'ubiquitination (Lang *et al.*, 2003). D'autres substrats sont stabilisés consécutivement à leur phosphorylation, comme le proto-oncogène c-Jun (Fan *et al.*, 2007).

L'oxydation par hydroxylation est également susceptible d'influencer l'ubiquitination de certaines protéines. L'archétype en est le facteur de transcription HIF, sur lequel nous reviendrons largement dans la prochaine partie.

Une autre modification post-traductionnelle impliquée dans la régulation de l'ubiquitination est l'acétylation. Elle est considérée comme étant stabilisatrice, car elle est en compétition avec l'ubiquitine pour les sites accepteurs. Ainsi, l'acétylation de p53 inhibe son ubiquitination par MDM2 (Li M *et al.*, 2002).

f. Régulation par les protéines « ubiquitin-like »

Ces protéines déjà évoquées précédemment possèdent une grande homologie structurale avec l'ubiquitine, en dépit d'une structure primaire distincte. Les UBLs de type I ont un mode de liaison similaire à celui de l'ubiquitine, bien que les enzymes intervenant dans le processus d'attachement soient différentes de celles de la cascade d'ubiquitination (Hochstrasser, 2000). La fixation d'une UBL peut affecter l'activité ou la stabilité des différents types d'enzymes E1, E2 ou E3. La liaison d'une UBL sur un substrat de la voie ubiquitine-protéasome modifie sa capacité à être dégradé.

Les multiples rôles des protéines UBLs sont toujours en cours de découverte, mais leur importance biologique est déjà reconnue. L'une des UBLs de type I les plus étudiés est la petite protéine SUMO (*Small Ubiquitin-related Modifier*). La sumoylation d'une protéine requiert les mêmes sites accepteurs que l'ubiquitination (résidu lysine), il a donc été proposé un modèle de compétition entre SUMO et l'ubiquitine. Par exemple, la sumoylation de I- κ B α , l'inhibiteur naturel de NF- κ B, empêche sa dégradation dépendante de l'ubiquitine, et prévient l'activation de NF- κ B (Hay *et al.*, 1999).

2. Le protéasome

Le protéasome est l'effecteur de la voie de dégradation des protéines par l'ubiquitine. Il s'agit d'un complexe multienzymatique de haut poids moléculaire auquel sont transférées les protéines ciblées pour élimination par l'ubiquitine. Il fut initialement appelé « protéase alcaline » (Hase *et al.*, 1980) ou « prosome » (Dang & Dang, 1984), il tient son appellation actuelle des travaux d'André-Patrick Arrigo (Arrigo *et al.*, 1988b). On estime qu'une cellule

contient en moyenne un million de protéasomes et qu'elle peut produire jusqu'à un million de peptides par seconde.

Le protéasome permet d'éteindre irréversiblement la fonction d'une protéine en réalisant sa protéolyse de manière définitive. Il régule la majorité des processus biologiques intracellulaires, en assurant la dégradation contrôlée de protéines clés, comme les facteurs de transcription et les cyclines. Son autre fonction est l'élimination des protéines anormales ou dénaturées suite à un stress, dont la structure adéquate n'a pu être rétablie après leur prise en charge par les protéines de choc thermique.

A. Structure et composition des protéasomes

Le protéasome tel qu'il était conçu dans le milieu des années 1980 correspondait à un complexe protéique cylindrique présentant un facteur de sédimentation de 20S et d'un poids moléculaire de 750 kDa. Il fut donc dénommé protéasome 20S. Par la suite, il a été découvert que cette structure était intégrée à un complexe plus large, le protéasome 26S.

a. Le protéasome 20S

i. Structure

Il existe différentes formes de protéasomes dans la cellule. Le protéasome 20S en constitue le cœur catalytique. Sa caractéristique structurale principale est de former un cylindre creux qui comporte plusieurs sites catalytiques dans une cavité interne. Ce complexe de 750 kDa existe sous diverses formes dans tous les organismes vivants, depuis les archaebactéries jusqu'aux eucaryotes les plus évolués. Des formes primitives de complexe analogue au protéasome existent chez les bactéries, mais leur structure diffère de celle des protéasomes eucaryotes. Sa taille s'est assez bien conservée au cours de l'évolution. Le protéasome mesure environ 150 Å de long par 115 Å de diamètre. Les premières structures du protéasome 20S ont été déterminées chez le rat par microscopie électronique (Baumeister *et al.*, 1988), puis chez la levure par cristallographie (Groll *et al.*, 1997). La structure cristallographique du protéasome de mammifère a été établie il y a une décennie seulement (Unno *et al.*, 2002).

Le protéasome 20S représente environ 1 % de la totalité des protéines cellulaires (Burger & Seth, 2004). Chez les eucaryotes, c'est un cylindre composé d'un empilement de quatre anneaux heptamériques identiques deux à deux. Les sous-unités de chaque anneau sont différentes, mais présentent toutefois de fortes homologies de séquence. Ces sous-unités sont divisées en deux groupes : les sous-unités α qui constituent les anneaux externes, et les sous-unités β qui composent les anneaux internes. Les anneaux internes portent les différentes activités catalytiques responsables de la fonction protéolytique. Les quatre anneaux délimitent trois cavités internes d'environ 5 nm de diamètre, séparées par des rétrécissements (Baumeister *et al.*, 1997 ; Zwickl *et al.*, 2001). Les deux cavités les plus extérieures (bordées par un anneau α et un anneau β) sont appelées antichambres. La cavité centrale constituée par les deux anneaux β est la chambre catalytique, siège de l'activité enzymatique du protéasome (Coux *et al.*, 1996 ; Groll *et al.*, 1997 ; Coux, 2002).

La principale distinction entre les deux groupes de sous-unités réside dans l'extrémité N-terminale qui est plus longue chez les sous-unités α , et qui a un rôle actif dans la fermeture des pores d'ouverture du cylindre. Elle régule également l'association du protéasome 20S avec des complexes régulateurs et l'entrée des substrats dans la chambre catalytique. Chez les sous-unités β catalytiques, l'extrémité N-terminale est clivée lors de l'assemblage du protéasome (Seemuller *et al.*, 1996).

ii. Fonction catalytique

Chez les eucaryotes, seules trois des sous-unités β ($\beta 1$, $\beta 2$ et $\beta 5$) possèdent une activité protéolytique (Groll *et al.*, 1997). La chambre catalytique contient donc six sites actifs. Les trois activités enzymatiques exercées par le protéasome ont des spécificités distinctes qui ont été caractérisées grâce à l'utilisation de substrats peptidiques modèles. On distingue ainsi une activité *caspase-like* dite PGHP (peptidylglutamyl-peptide hydrolase) portée par $\beta 1$, une activité trypsine au niveau de $\beta 2$, et une activité chymotrypsine localisée sur $\beta 5$. Ces activités assurent le clivage des ponts peptidiques après les acides aminés acides (glutamate, aspartate) pour l'activité PGHP, basiques (arginine, lysine, histidine) pour l'activité trypsine, et hydrophobes (tyrosine, phénylalanine, leucine, tryptophane) pour l'activité chymotrypsine (Orlowski *et al.*, 1991 ; Orlowski, 1993 ; Cardozo *et al.*, 1995 ; Orlowski *et al.*, 1997). Le site actif de toutes les sous-unités β catalytiques est caractérisé par un résidu thérone libéré par clivage autocatalytique de précurseurs inactifs. Le groupement amine de ce résidu sert de site nucléophile dans la réaction d'hydrolyse des liaisons peptidiques (Seemuller *et al.*, 1995 ;

Kisselev *et al.*, 2000). Ces trois activités enzymatiques sont restreintes à la lumière de la chambre catalytique, ce qui prévient la dégradation non spécifique des protéines cytosoliques (Baumeister *et al.*, 1998). L'activité chymotrypsine semble être la plus importante tant qualitativement que quantitativement, il a en effet été montré que l'inhibition des activités PGHP et trypsine a peu d'incidence sur la capacité du protéasome à dégrader ses substrats. De plus, c'est l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de l'activité chymotrypsine qui a permis d'élucider les rôles biologiques du protéasome. Il est actuellement suggéré que l'activité chymotrypsine n'ait plus un rôle si prépondérant, et que les spécificités de clivage ne soient pas absolues *in vivo* (Kisselev *et al.*, 2006). Le protéasome aurait en réalité une grande flexibilité vis-à-vis des substrats, ce qui lui permet d'assurer la dégradation des protéines cibles quel que soit l'encombrement de la chambre catalytique.

Figure 7. Différentes projections d'un diagramme en ruban du protéasome 20S. A gauche, les quatre anneaux α et β empilés. Les couleurs représente une sous-unité parmi les sept que comporte chacun des anneaux. A droite, vue de dessus d'un anneau externe α et de son vis-à-vis interne β . Les boucles polypeptidiques à l'intérieur délimitent l'antichambre par laquelle transitent les protéines dénaturées avant d'être transférées à la chambre catalytique. La barre d'échelle représente environ 10 nm (d'après Baumeister *et al.*, 1998).

b. Le protéasome 26S

Le protéasome 26S est le complexe résultant de l'association entre le protéasome 20S et deux unités régulatrices, appelées 19S ou PA700 (PA pour *proteasome activator*), sur chacun des deux anneaux externes du cœur catalytique (Glickman *et al.*, 1998). L'ensemble a une masse moléculaire de 2500 kDa. Il existe deux autres unités régulatrices du protéasome 20S : PA28 (ou 11S), présent chez les eucaryotes supérieurs, et PA200. L'expression du PA28 peut être induite en réponse à une stimulation par l'interféron- γ . Il est constitué de sous-unités α , β , et γ , et participe à la genèse de peptides antigéniques qui seront présentés par les molécules de classe I du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH1) (Gileadi *et al.*, 1999 ; Kloetzel, 2004). Son association avec le protéasome 20S permet de former ce qu'on appelle l'immunoprotéasome, qui serait impliqué dans la réponse immunitaire (Cerundolo *et al.*, 1997 ; Valmori *et al.*, 1999 ; Rock *et al.*, 2002).

La présence des unités 19S est indispensable au bon fonctionnement du protéasome 26S. En effet, si les protéasomes 20S purifiés sont capables de cliver de courts peptides, ils sont incapables de reconnaître les protéines polyubiquitinées. Le protéasome 26S canonique

constitué du complexe 20S et de deux particules 19S est considéré comme un acteur majeur de la dégradation des protéines, qu'elles soient ubiquitinées ou non.

Le complexe 19S n'a pas encore pu être cristallisé, seul ou associé avec le complexe 20S. Si sa structure tridimensionnelle exacte n'est pas actuellement connue, des analyses par microscopie électronique et par mutagenèse dirigée chez la levure ont permis de définir sa composition et son agencement général. La particule 19S, d'une masse moléculaire de 700 kDa, est constituée de 17 sous-unités de tailles variables, réparties en deux sous-complexes fonctionnels (Groll & Clausen, 2003).

La « base » est formée de six sous-unités ATPases différentes (Rpt1 à Rpt6) organisées en anneau et appartenant à la famille AAA (*ATPase associated with different cellular activity*), et de trois sous-unités sans activité ATPase (Rpn1, Rpn2 et Rpn10) (Zwickl *et al.*, 1999). L'anneau d'ATPases est en contact avec l'anneau externe du complexe 20S, et contrôle ainsi l'ouverture du pore (Glickman *et al.*, 1999). Les sous-unités ATPasiques sont également capables d'interagir avec les protéines mal repliées et ont une activité de chaperon, puisque leur fonction est de déplier ces protéines, afin de faciliter de manière ATP-dépendante leur translocation vers la chambre catalytique (Braun *et al.*, 1999). Des études suggèrent que la sous-unité Rpn10 peut fixer les chaînes d'ubiquitine, permettant le recrutement des substrats spécifiques du protéasome (Deveraux *et al.*, 1994).

Le « couvercle » est constitué de huit sous-unités sans activité ATPase (Rpn 3,5,6,7,8,10,11 et 12) dont certaines portent des sites de liaison aux chaînes d'ubiquitine. Elles interviennent également dans le recyclage des molécules d'ubiquitine, *via* la présence d'une activité isopeptidase portée par la sous-unité Rpn11 (Verma *et al.*, 2002 ; Guterman & Glickman, 2004).

Le complexe régulateur 19S est donc responsable (i) de la reconnaissance et de la liaison spécifique des protéines cibles portant une chaîne d'ubiquitine, (ii) du clivage de l'ubiquitine afin de la recycler, (iii) de la dénaturation des substrats pour permettre leur pénétration par le pore d'ouverture du complexe 20S, (iv) de l'ouverture de ce pore habituellement obstrué par les extrémités N-terminales des sous-unités α de l'anneau externe, et (v) de la translocation des substrats vers la chambre catalytique (Glickman & Ciechanover, 2002).

Figure 8. Le complexe 26S est constitué par l'assemblage du cœur catalytique 20S et de deux complexes régulateurs 19S (adapté d'après Wang & Maldonado, 2006).

B. Implication des HSPs dans la voie ubiquitine-protéasome

Il a été montré que les HSPs jouent un rôle dans la dégradation des protéines par le protéasome (Glickman & Ciechanover, 2002 ; Garrido & Solary, 2003). Si les structures et la fonction catalytique du protéasome ont été rapidement élucidées, la question se posait de savoir comment les protéines non conformes pouvaient être adressées au protéasome pour être dégradées sélectivement. Les HSPs agissent de façon coordonnée avec le protéasome pour réguler l'homéostasie des protéines. Pour cela, elles sont capables d'interagir directement avec le protéasome (Farras *et al.*, 2005). L'exemple le mieux décrit de la collaboration entre les HSPs et le protéasome est celui de la protéine CHIP (*Carboxy terminus of HSP70-interacting protein*). La protéine CHIP est un cochaperon des HSPs de la famille HSP70 et d'HSP90. Elle a une fonction d'E3 ligase et peut également s'associer avec des enzymes E2 (Farras *et al.*, 2005). Une protéine adaptatrice intervient pour faire la liaison entre ce complexe et la sous-unité 19S du protéasome, il s'agit de Bag1 (*Bcl2-associated athanogene*) (Esser *et al.*, 2004).

C. Pathologies associées au système ubiquitine-protéasome

De nombreux processus physiologiques sont associés au système ubiquitine-protéasome. Par sa fonction de site majeur de protéolyse spécifique, le protéasome est un composant intégral de nombreuses cascades de signalisations cellulaires. Il n'est donc pas étonnant d'observer que des altérations de la machinerie protéolytique soient impliquées dans un large éventail de situations pathologiques. Ainsi, si l'inactivation de l'enzyme E1 est létale, des mutations affectant les E2 et les E3 ont pu être identifiées dans une grande gamme de maladies. Les maladies étudiées incluent parmi d'autres, des neurodégénérescences, des maladies génétiques comme la mucoviscidose, des déficits immunitaires, des désordres hématopoïétiques et les cancers.

Les états pathologiques associés au système ubiquitine-protéasome peuvent être classés en deux groupes :

- ceux qui résultent d'une perte de fonction, conduisant à la stabilisation de protéine cible,
- ceux qui sont issus d'un gain de fonction qui mène à une dégradation accélérée ou anormale de la protéine cible.

De nombreuses protéines connues pour être dérégulées lors du développement d'une tumeur sont des substrats du protéasome. Un très grand nombre d'entre elles ont des propriétés oncogéniques ou oncosuppressives. La transformation cellulaire peut autant être induite par un défaut de dégradation d'une oncoprotéine, que par la dégradation aberrante d'une protéine oncosuppressive.

Un exemple typique est la dégradation de la protéine produite par le gène suppresseur de tumeur p53, le « gardien du génome ». Ses fonctions biologiques sont de prévenir la propagation des altérations de l'ADN génomique, et de contrer la prolifération cellulaire induite par des signaux oncogéniques aberrants. La protéine p53 est un facteur de transcription habituellement ciblé pour dégradation protéasomale par son E3 ligase spécifique, Hdm2. La fonction oncosuppressive de p53 est perdue dans une majorité de cancers humains (Ciechanover & Iwai, 2004).

Un autre cas est celui de l'inhibiteur du cycle cellulaire p27. Cette protéine est abondamment exprimée dans les cellules soumises à des signaux antiprolifératifs. On observe

une expression très faible de p27 dans de nombreuses tumeurs, ce qui est corrélé à un mauvais pronostic (Pagano & Benmaamar, 2003). Cela peut être dû à une augmentation de la dégradation de p27, *via* la surexpression de la protéine Skp2, ou à une localisation anormale dans le cas de la sclérose tubéreuse (Ciechanover & Iwai, 2004).

Un exemple devenu caractéristique d'une protéine dont la dérégulation protéasomale a de lourdes conséquences en termes de pathologies, est la protéine *Hypoxia-Inducible Factor*. Cette protéine a été découverte il y a tout juste vingt ans ; on lui attribue maintenant un rôle fondamental dans le développement de certaines maladies, dont le cancer. Sa structure et ses fonctions sont détaillées dans la partie suivante.

PARTIE III. Le facteur inductible par l'hypoxie, HIF

1. Généralités

A. L'homéostasie de l'oxygène

L'hypoxie désigne une inadéquation entre l'oxygène requis pour le métabolisme cellulaire et l'apport de ce gaz par la circulation sanguine, et qui compromet la fonction des organes, des tissus et des cellules (Hockel & Vaupel, 2001). Alors que la tension en oxygène est de 21% dans l'air ambiant, elle s'établit à 18% dans les poumons et aux alentours de 6% dans les tissus sains (Jiang et al., 1996a). L'hypoxie n'est pas nécessairement une condition néfaste, elle est ainsi rencontrée lors de l'embryogenèse, pendant laquelle elle induit le déclenchement de programmes de différenciation cellulaire nécessaires à la formation des tissus. L'hypoxie non pathologique peut avoir pour cause la haute altitude par exemple. Les organismes sont dotés de divers mécanismes permettant de rétablir un apport correct en oxygène. Au niveau systémique, le phénomène de vasodilatation améliorera la perfusion sanguine au sein de la plupart des organes, alors que l'induction de l'érythropoïèse stimulera la production de globules rouges, les transporteurs de l'oxygène dans le sang. Au niveau cellulaire, l'hypoxie constitue un stress pouvant provoquer la mort de la cellule par apoptose ou nécrose, suivant les autres conditions environnementales. Les réponses systémiques et cellulaires à l'hypoxie sont engagées par un facteur de transcription spécifique, le facteur induit par l'hypoxie, ou HIF (*hypoxia-inducible factor*).

L'hypoxie peut résulter de privation localisée d'oxygène dans des pathologies telles que les ischémies cérébrales ou cardiovasculaires, l'athérosclérose ou le cancer. Il est apparu qu'HIF joue un grand rôle dans ces maladies. HIF est également activé dans de nombreuses conditions physiopathologiques, et des mutations germinales de gènes impliqués dans les voies de régulation de HIF ont été décrites dans des syndromes familiaux prédisposant au développement de tumeurs (Wenger *et al.*, 1995).

B. L'hypoxie et le cancer

L'hypoxie tumorale est un trait commun à toutes les tumeurs, on y rencontre fréquemment des zones hypoxiques où le taux en oxygène est inférieur à 2% (Adam et al., 1999a ; Adam et al., 1999b). Ces zones apparaissent à cause de la croissance rapide des

cellules tumorales, qui forment une masse au sein de laquelle l'oxygène atteint sa limite de diffusion. Ces cellules sont donc soumises à une diminution de la pression interstitielle en oxygène, selon un gradient d'éloignement par rapport au réseau capillaire. Par ailleurs, ces cellules vont synthétiser et sécréter en réponse des facteurs favorisant la néovascularisation des zones hypoxiques à partir de la structure vasculaire préexistante. Le plus puissant de ces facteurs est le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*). L'expression de ces facteurs va déclencher le processus d'angiogenèse au sein de la tumeur, rétablissant ainsi une perfusion permettant aux cellules tumorales de continuer de croître et de produire des métastases (Carmeliet & Jain, 2000 ; Folkman, 2002 ; Moeller *et al.*, 2004). Mais lorsqu'une tumeur atteint un stade de croissance suffisant pour engager le processus hypoxie-angiogenèse, l'hypoxie devient un processus qui s'entretient de lui-même. En effet, le nouveau réseau vasculaire dans la tumeur présente de nombreuses anomalies structurales et fonctionnelles, telles qu'anastomoses multiples et occlusions capillaires, qui le rendent immature et non fonctionnel (Dewhirst *et al.*, 2007 ; Shchors & Evan, 2007 ; Pries *et al.*, 2009). L'architecture déficiente des néocapillaires induit elle aussi l'apparition de zones hypoxiques, contribuant ainsi à la sélection de cellules présentant des caractères de croissance autonome. L'hypoxie intratumorale force l'adaptation des cellules cancéreuses à leur microenvironnement et constitue donc un élément moteur de la sélection clonale, ce qui favorise l'acquisition d'un potentiel invasif et *in fine*, confère un caractère malin à la tumeur (Graeber *et al.*, 1996 ; Semenza, 2000a). Globalement l'hypoxie intratumorale contribue largement à l'établissement d'un phénotype agressif, *via* l'expression de HIF, en favorisant la progression tumorale et l'invasion (Semenza, 2002). De plus, la persistance de zones plus ou moins hypoxiques compromet grandement l'efficacité de la radiothérapie et de la chimiothérapie, et promeut une instabilité génétique chronique qui favorise l'évolution maligne de la tumeur (Huang LE *et al.*, 2007 ; Rohwer & Cramer, 2011). L'hypoxie est ainsi corrélée à des taux plus élevés de récurrences, de persistance de la tumeur, de dissémination par métastases, et donc d'un pronostic vital réduit (Semenza, 2000a).

On distingue l'hypoxie chronique et l'hypoxie intermittente. L'hypoxie chronique a été décrite dès les années cinquante et constitue le modèle classiquement utilisé en laboratoire. Elle se manifeste dans les zones où la prolifération des cellules tumorales est telle que certaines sont situées au-delà de la distance limite de diffusion de l'oxygène. Cependant le concept d'hypoxie chronique n'intègre que la dimension spatiale du réseau vasculaire et néglige la dynamique temporelle de l'évolution de ce réseau. C'est ce que prend en compte le

modèle d'hypoxie intermittente, qui décrit des cycles d'épisodes hypoxiques et d'épisodes de réoxygénation dans des intervalles de temps variant de quelques minutes à quelques jours. L'évolution perpétuelle de la perfusion tumorale, due aux nombreux défauts du réseau néocapillaire, fait que toutes les cellules, y compris les cellules endothéliales, subissent le manque d'oxygène à un moment donné, et maintient une expression élevée de HIF (Dewhirst, 2009). Ces phénomènes augmentent la résistance globale de la tumeur (Eberhard *et al.*, 2000 ; Cairns RA *et al.*, 2001). L'étude plus poussée des relations entre hypoxie intermittente, l'activation de HIF et la progression tumorale garantit l'émergence future de thérapies ciblant la vascularisation tumorale, au-delà de la simple inhibition de l'angiogenèse, et permettant d'optimiser des traitements historiques comme la radiothérapie (Dewhirst, 2007 ; Dewhirst *et al.*, 2008 ; Martinive *et al.*, 2009).

2. Les facteurs inductibles par l'hypoxie (HIF)

Différents facteurs de transcription contrôlent l'adaptation cellulaire à l'hypoxie, parmi lesquels la protéine liant l'élément de réponse à l'AMP cyclique (CREB), et le facteur nucléaire NF-kB (Koong *et al.*, 1994 ; Beitner-Johnson *et al.*, 2000). Mais HIF régule l'activation d'un très grand nombre de gènes et est lui-même directement régulé par l'oxygène, ce qui autorise la mise en place d'une réponse très rapide. Ce facteur de transcription a une activité physiologique essentielle lors de l'embryogenèse et au cours de la vie adulte, notamment en activant l'érythropoïèse. Il a ainsi été initialement caractérisé comme étant le régulateur principal de l'érythropoïétine (EPO), une hormone glycoprotéique essentielle à la synthèse des globules rouges, en réponse à une diminution du taux d'oxygène dans les tissus rénaux (Semenza & Wang, 1992 ; Wang GL & Semenza, 1993).

Depuis la découverte de son rôle dans l'érythropoïèse physiologique, il a été montré la contribution importante de HIF dans la tumorigenèse, pendant laquelle il induit la transcription de nombreux gènes impliqués dans divers processus tels que le métabolisme, la prolifération, la survie cellulaire et l'angiogenèse (Semenza, 1999, 2000b ; Wenger, 2002).

A. Structure des facteurs HIF

HIF appartient à la famille des facteurs de transcription à domaine basique bHLH (*basic Helix-Loop-Helix*). Ils transactivent spécifiquement des gènes dont le promoteur comporte une séquence $5'RCGTG^3'$, appelée élément de réponse à l'hypoxie ou HRE (*Hypoxia Response Element*) (Firth *et al.*, 1994 ; Minchenko *et al.*, 1994 ; Ratcliffe *et al.*, 1995).

HIF est fonctionnel sous la forme d'un hétérodimère obligatoire. Celui-ci est composé d'une sous-unité α (HIF1 α , HIF2 α ou HIF3 α) régulée par l'oxygène et une sous-unité β (HIF1 β) aussi appelée ARNT (*aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*) exprimée constitutivement (Wang GL *et al.*, 1995). Cette dernière peut se lier indifféremment à toutes les sous-unités α , c'est donc la sous-unité α qui supporte la spécificité du dimère actif.

a. HIF1 α

Le gène *HIF1A* est localisé dans la région 14q21-q24 et comporte 15 exons. Il produit après transcription et traduction la protéine HIF1 α (826 acides aminés). C'est la première sous-unité à avoir été caractérisée (Wang GL & Semenza, 1995 ; Wang GL *et al.*, 1995). Celle-ci comporte les différents domaines suivants :

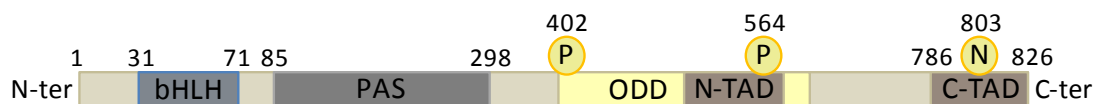
- le domaine bHLH N-terminal de liaison à l'ADN qui supporte également la liaison avec le partenaire ARNT (Jiang *et al.*, 1996b)
- un domaine PAS (PER-ARNT-SIM) avec deux régions hydrophobes qui interviennent aussi dans la dimérisation (Jiang *et al.*, 1996b)
- un domaine ODD spécifique (Oxygen-dependent degradation domain) qui est responsable d'instabilité de HIF α en normoxie. Cette région permet la régulation négative de HIF par le système ubiquitine-protéasome (Huang LE *et al.*, 1998)
- deux domaines de transactivation (TAD) situés dans la région C-terminale qui assurent l'activation des gènes cibles et l'interaction avec les co-activateurs transcriptionnels p300 et CBP (CREB binding protein) (Arany *et al.*, 1996 ; Pugh *et al.*, 1997). Le domaine TAD le plus proche de l'extrémité C-terminale (C-TAD) joue un rôle dans l'activation de la transcription (Lando *et al.*, 2002b).

HIF1 α est l'isoforme dont l'ARN messager est le plus exprimé parmi les trois, il est présent de manière quasi ubiquitaire, bien que l'expression de la protéine soit dépendante du taux d'oxygène (Lee YM *et al.*, 2001).

b. HIF2 α

La sous-unité HIF2 α est codée par le gène *HIF2A* ou *EPAS1* (*Endothelial PAS domain protein 1*), présent sur le locus 2p21-p16 et constitué de 16 exons. Cette protéine de 874 acides aminés présente une homologie de séquence de 48% avec HIF1 α (Wiesener *et al.*, 1998). Elle est également connue sous les noms de HLF (*HIFlike factor*), HRF (*HIFrelated factor*) ou MOP2 (*Member of PAS superfamily 2*). HIF2 α comporte les mêmes domaines fonctionnels qu'HIF1 α , est elle aussi régulée positivement par l'hypoxie et peut s'associer avec ARNT pour induire la transcription de gènes cibles (Tian *et al.*, 1997 ; O'Rourke *et al.*, 1999). Le dimère actif HIF2 se lie également au HRE. HIF2 α a une expression tissulaire plus restreinte que celle de HIF1 α , étant abondamment exprimée dans les cellules endothéliales lors du développement embryonnaire (Ema *et al.*, 1997). Chez l'adulte, HIF2 α est prépondérante dans certains types cellulaires de divers tissus tels que les cellules endothéliales, les cellules gliales, les hépatocytes, les fibroblastes rénaux (Wiesener *et al.*, 2003).

HIF1 α



HIF2 α

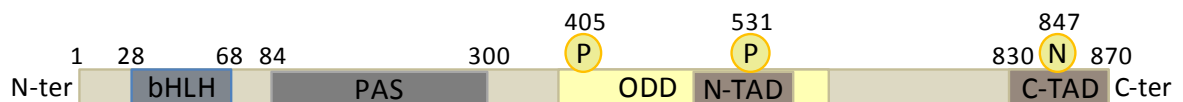


Figure 9. Représentation schématique des deux sous-unités HIF α . Les trois résidus représentés sont les sites d'hydroxylation, qui sont essentiels à la régulation primaire de ces protéines par l'oxygène.

c. HIF3 α

Une troisième sous-unité apparentée à HIF1 α appelée HIF3 α (663 acides aminés) a été caractérisée. HIF3 α est codée par le gène *HIF3A* composé de 19 exons et situé dans la région 19q13.32. Cette protéine est aussi capable de se dimériser avec ARNT et de se fixer au HRE *in vitro*. Le rôle biologique de HIF3 α est encore très peu compris.

De nombreux variants d'épissage de HIF3 α ont déjà été identifiés, dont aucun ne semble contenir de région homologue au C-TAD. En revanche, certains comportent une région similaire au N-TAD (Maynard *et al.*, 2003). Un de ces variants appelé HIF3 α 2 ou IPAS (*Inhibitory domain PAS protein*) a été mieux caractérisé que les autres. Il s'agit d'une forme tronquée ne possédant pas de domaine de transactivation, et qui a donc un effet dominant négatif car il titre la sous-unité HIF1 β , et prévient la formation de dimères fonctionnels (Makino *et al.*, 2001 ; Makino *et al.*, 2002 ; Maynard *et al.*, 2005). Une étude récente propose que IPAS serait induit par HIF1 et aurait un rôle de rétrocontrôle dans la signalisation hypoxique (Makino *et al.*, 2007). De façon similaire, la forme HIF3 α 4 qui possède la même structure qu'HIF3 α 2 s'hétérodimérise avec HIF2 α et inhibe son activité transcriptionnelle (Maynard *et al.*, 2007).

B. La régulation de HIF

Les facteurs de transcription HIF1 et HIF2 sont soumis à de nombreux types de régulation, à toutes les étapes de la synthèse protéique, ainsi que par modifications post-traductionnelles. La découverte des rôles de HIF dans la biologie cancéreuse a été facilitée par l'étude du mécanisme prépondérant dans sa régulation, à savoir son ubiquitination en condition de normoxie, dans le modèle du carcinome rénal à cellules claires, ou ccRCC (*clear-cell renal cell carcinoma*). HIF est par ailleurs très finement régulé au niveau de son activité transcriptionnelle. Beaucoup de voies alternatives de régulation ont été découvertes ces dernières années, la fonction biologique de chacune d'entre elles est donc encore peu claire.

a. Régulation de la transcription

Peu de travaux à l'heure actuelle ont été entrepris sur la régulation de l'expression de HIF au niveau transcriptionnel. La stabilisation post-traductionnelle des sous-unités α et

l'induction de la traduction des ARN messagers codant pour ces sous-unités constituent les voies majeures d'activation de HIF en conditions physiologiques ou physiopathologiques. Il semble donc peu probable qu'une modulation de la synthèse des ARN messagers de HIF joue un rôle dans l'activité générale de ce facteur de transcription. En revanche, on peut supposer qu'une telle régulation soit partie prenante de la spécificité tissulaire de l'expression de HIF1 α ou de HIF2 α sous certaines conditions, notamment lors du développement ou de la différenciation de certains types cellulaires. Ainsi, il a été mis en évidence que les facteurs Sp1 et Sp3 contrôlent l'induction de l'expression du gène *EPAS1*, nécessaire pour la différenciation des préadipocytes (Wada *et al.*, 2006). Très récemment, des auteurs ont montré que le promoteur du gène *HIF1A* comporte des séquences du type HSE qui permettent la fixation des facteurs de transcription HSF2 et HSF4, qui contrôlent donc l'expression de HIF1 α (Chen R *et al.*, 2011).

b. Régulation de la traduction

i. Normoxie

Bien que l'hypoxie soit l'activateur primaire de HIF, de nombreux groupes de recherche ont mis en évidence divers mécanismes d'activation de HIF en condition normale d'oxygénation (normoxie). Plusieurs facteurs de croissance régulent la traduction de l'ARN messager de HIF1 α en normoxie. La signalisation par des récepteurs à tyrosine kinase, tel L'IGFR (*Insulin growth factor receptor*), ou par HER2/Neu induit l'expression de HIF1 de manière indépendante de l'oxygène, en augmentant le taux de synthèse de la protéine HIF1 α (Laughner *et al.*, 2001). Ce processus fait intervenir les voies mTOR (*Rammalian target of rapamycin*) et MAPK.

La protéine mTOR est une kinase située en aval des kinases PI3K et Akt. Après son activation, elle phosphoryle une autre kinase, p70S6K, qui elle-même active par phosphorylation la protéine ribosomale S6. De plus, mTOR peut phosphoryler et inhiber la protéine 4E-BP1 (*eucaryotic translation initiator factor 4E-binding protein 1*), un régulateur négatif du facteur d'initiation de la traduction eIF-4E (*eucaryotic translation initiation factor 4E*). L'inhibition de la liaison de ces deux protéines permet d'activer la traduction dépendante de la coiffe des ARN messagers. L'activation de la voie des MAPK aboutit *via* la cascade RAF-MEK-ERK à l'activation de la kinase MNK (*MAPK-interacting kinase*) qui phosphoryle eIF-4E pour stimuler directement son activité. Ces deux voies de signalisation convergent et fonctionnent en synergie pour augmenter la vitesse d'exécution de la machinerie ribosomale.

L'expression des sous-unités α dépend donc en grande partie des vitesses relatives de leur synthèse et de leur dégradation.

Figure 10. Régulation de la synthèse de la protéine HIF1 α , indépendamment de l'oxygène. Suite à la stimulation par des facteurs de croissance, les voies de transduction du signal MAPK et mTOR induisent l'augmentation du taux de transcription d'un ensemble d'ARNm, dont celui codant pour HIF1 α (d'après Semenza, 2003).

ii. Hypoxie

L'hypoxie induit l'interruption rapide et globale de la traduction des protéines, afin de réduire la consommation en énergie. Cette inhibition de la traduction est régulée par deux voies de signalisation distinctes (Koumenis & Wouters, 2006). La première de ces voies, dite *unfolded protein response* (UPR) est activée rapidement à des taux d'oxygène inférieurs à 1% et stimule la kinase PERK (*endoplasmic reticulum kinase PKR-like ER kinase*) qui phosphoryle eIF2 α , un composant essentiel de l'initiation de la traduction (Koumenis *et al.*,

2002). La deuxième voie est sous la dépendance de mTOR et est activée par l'hypoxie prolongée et inhibe la traduction en perturbant le complexe eIF-4F (Koritzinsky *et al.*, 2006). En cas de stress hypoxique ou énergétique, mTOR est inhibée par la protéine REDD1 (*Regulated in development and DNA damage response*) et le complexe TSC1/TSC2. Cela induit la dissociation du complexe eIF-4F par hypophosphorylation de 4E-BP1. Il faut faire attention à ne pas confondre ce mécanisme de régulation d'ordre général qui induit l'arrêt de la traduction de la plupart des protéines avec ce qui a été décrit au paragraphe précédent, qui concerne l'activation spécifique de la traduction de l'ARN messager codant pour HIF1 α en réponse à des facteurs de croissance, sous certaines conditions.

HIF1 α fait partie des quelques protéines cruciales qui continuent à être traduites en hypoxie. Le mécanisme précis du maintien de la traduction de ces protéines n'est pas clairement établi. Il semblerait néanmoins que dans le cas de HIF1 α , la présence d'un IRES (*Internal ribosome entry site*) dans sa partie 5'-UTR puisse jouer ce rôle (Schepens *et al.*, 2005). L'implication de la séquence IRES dans la régulation de la transcription de HIF1 α en hypoxie a toutefois été contestée (Young *et al.*, 2008).

c. Régulation post-traductionnelle dépendante de l'oxygène

i. L'hydroxylation par les prolyl-hydroxylases

L'activation de HIF en hypoxie repose principalement sur la stabilisation de la sous-unité α qui est très labile. La demi-vie des sous-unités α est très courte, étant inférieure à une minute (Yu *et al.*, 1998). En condition de normoxie, une classe d'enzymes appelées prolyl-hydroxylases (PHDs pour protéines à *prolyl-hydroxylase domain*) réalisent l'hydroxylation de deux résidus proline (Pro⁴⁰²/Pro⁵⁶⁴ pour HIF1 α et Pro⁴⁰⁵/Pro⁵³¹ pour HIF2 α) situés dans le domaine ODD de la sous-unité α (Epstein *et al.*, 2001 ; Jaakkola *et al.*, 2001 ; Masson & Ratcliffe, 2003). Les résidus proline impliqués appartiennent au motif consensus LXXLAP (Masson *et al.*, 2001). Les PHDs (PHD1, PHD2, PHD3 et PHD4) sont des dioxygénases dont l'activité dépend de plusieurs facteurs comme le Fer(II), l'oxoglutarate. Mais ces enzymes utilisent comme substrat principal l'oxygène moléculaire pour assurer la réaction d'hydroxylation. La modification de ces résidus favorise l'interaction de la sous-unité α avec la protéine produit du gène suppresseur de tumeur *VHL* (Von-Hippel Lindau, du nom des deux médecins qui ont caractérisé diverses pathologies associées à la perte de fonction de ce gène, Eugen von Hippel et Arvid Vilhelm Lindau) (Maxwell *et al.*, 1999 ; Ivan *et al.*, 2001). La protéine VHL est le composant permettant la reconnaissance de la sous-unité HIF α en

normoxie, et l'assemblage d'un complexe E3, par recrutement de l'élongine C, l'élongine B, Rbx1 et la culline 2 (Min *et al.*, 2002). Cela induit la polyubiquitination de HIF α sur plusieurs résidus lysine conservés entre HIF1 α et HIF2 α (Lys⁵³²/Lys⁵³⁸/Lys⁵⁴⁷) et sa dégradation très rapide par le protéasome 26S (Kamura *et al.*, 2000 ; Ohh *et al.*, 2000 ; Paltoglou & Roberts, 2007).

En condition d'hypoxie, les PHDs, étant très sensible à des variations même modérées du taux d'oxygène intracellulaire, perdent leur fonctionnalité, ce qui induit la stabilisation de la sous-unité α . Il en résulte la formation des dimères actifs $\alpha\beta$ dans le noyau et la transcription des gènes cibles des facteurs HIF. Les PHDs impliquées dans la régulation des protéines HIF α n'ont pas toute la même affinité pour les différentes sous-unités. PHD2 hydroxyle préférentiellement HIF1 α , alors que l'hydroxylation de HIF2 α est assurée plutôt par PHD1 et PHD3 (Appelhoff *et al.*, 2004). Les différentes PHDs et VHL constituent ainsi un module senseur de l'oxygène qui permet d'activer très rapidement la réponse à l'hypoxie *via* la stabilisation des protéines HIF α (Kaelin, 2005). Ce rôle crucial de VHL dans la régulation directe de HIF donne au gène *VHL* un rôle de suppresseur de tumeur (Kondo & Kaelin, 2001 ; Kim WY & Kaelin, 2004).

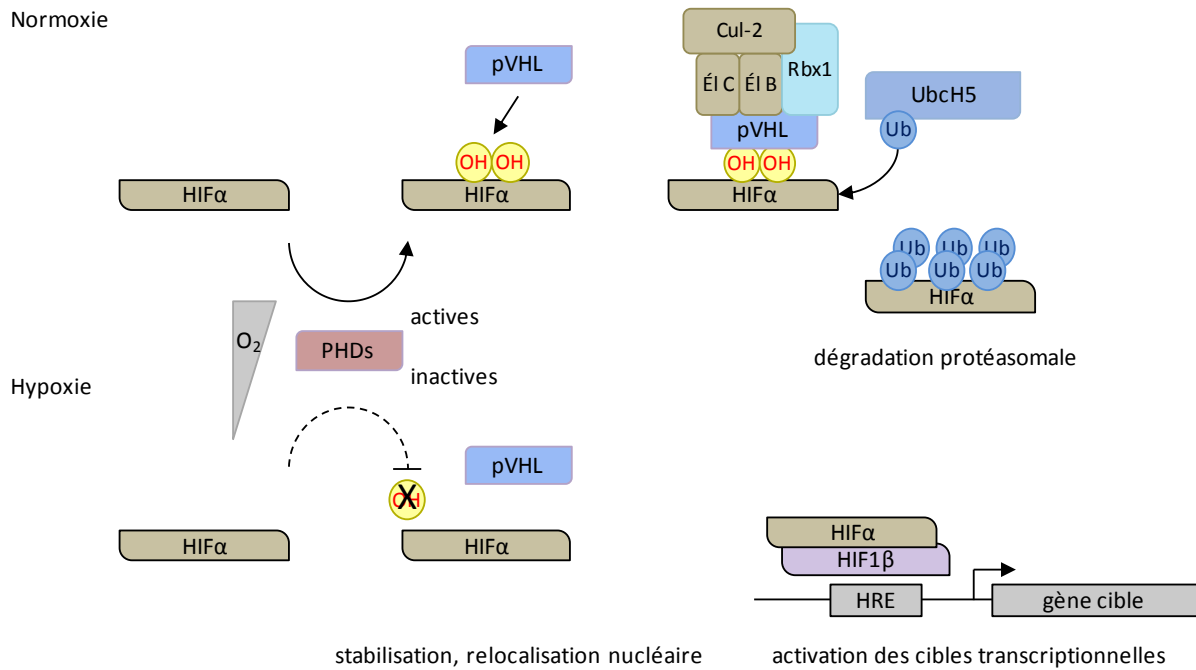


Figure 11. Régulation canonique de la stabilité de HIF α par l'oxygène et VHL. En normoxie, les PHDs actives hydroxylent les deux résidus proline cibles de la sous-unité α . Cette modification permet l'association avec VHL, qui supporte l'assemblage du complexe de ligation de l'ubiquitine. L'ubiquitine transférée est fournie par l'E2 UbcH5. HIF α est multiubiquitiné et dégradé par le protéasome. En hypoxie, les PHDs qui n'ont plus d'affinité assez forte pour l'oxygène sont inactivées. HIF α peut alors être transloquée au noyau et s'associer avec son partenaire HIF1 β pour induire la transcription des gènes cibles.

ii. Cas particulier d'un défaut de régulation par VHL

La perte fonctionnelle de VHL est un cas très bien documenté d'inactivation génétique conduisant à la stabilisation et l'activation de HIF en condition de normoxie. Il existe de multiples mutations pouvant affecter la fonction du gène *VHL* (plus de 150 répertoriées à ce jour, distribuées sur toute la séquence codante). Ces mutations sont portées le plus souvent dans des cellules germinales chez des patients atteints du syndrome de von Hippel-Lindau, condition héréditaire qui se manifeste sous la forme de diverses tumeurs (rétinoblastomes, hémangioblastomes, carcinomes rénaux à cellules claires et phéochromocytomes). Ces tumeurs sont en général très vascularisées, à cause du défaut de régulation de HIF par VHL, qui produit un phénotype proangiogénique très marqué. Les maladies associées au syndrome VHL se manifestent suite à la perte ou l'inactivation somatique du deuxième allèle sauvage, selon le modèle de *double hit* de Knudson. L'inactivation bi-allélique de *VHL* se rencontre

aussi dans des formes sporadiques de carcinome de cellules rénales (CCR), pour lesquelles on observe une fréquence de mutation du gène *VHL* supérieure à 75%. Cela souligne l'importance de l'activation de HIF dans ce type de tumeur (Rathmell & Chen, 2008).

iii. L'hydroxylation par FIH

Il existe un autre résidu dans la séquence de HIF α qui peut être hydroxylé, par une asparagine hydroxylase appelée FIH (Factor inhibiting HIF). Ce résidu asparagine est situé dans la région correspondant au C-TAD, pour HIF1 α comme pour HIF2 α . En normoxie, FIH réalise l'hydroxylation du résidu Asn⁸⁰³ (Asn⁸⁵¹ pour HIF2 α), ce qui empêche la liaison des coactivateurs transcriptionnels et inhibe l'activité transcriptionnelle de HIF (Mahon et al., 2001 ; Lando et al., 2002a). Il a été suggéré que FIH puisse interagir avec VHL (Lee C *et al.*, 2003). Cette collaboration assurerait un contrôle strict de l'activité de HIF selon les conditions d'oxygénation (Mahon *et al.*, 2001). Il y a une différence entre les constantes de liaison pour l'oxygène entre FIH et les PHDs, qui fait que FIH aurait une affinité supérieure à celle des PHDs pour l'oxygène, et que les PHDs seraient inactivées plus précocément que FIH lors de l'hypoxie (Stolze *et al.*, 2004). Le domaine C-TAD de HIF2 α serait moins sensible à l'action de FIH que celui de HIF1 α (Bracken *et al.*, 2006).

d. Régulation post-traductionnelle indépendante de l'oxygène et de VHL

La stabilité de la protéine HIF1 α peut être régulée par des mécanismes de dégradation indépendants de l'oxygène, dont beaucoup ont été mis en évidence ces dernières années, ajoutant à la grande complexité de la régulation de HIF. Il est remarquable que beaucoup de ces mécanismes impliquent les HSPs.

Tout d'abord, HIF1 α est une protéine cliente de la protéine HSP90. Il a été montré que HSP90 interagit avec le domaine PAS de HIF1 α et assure ainsi sa stabilisation (Isaacs *et al.*, 2004 ; Katschinski *et al.*, 2004). Par la suite, des travaux ont mis en évidence l'intervention d'une autre protéine dans ce mode de régulation. La protéine RACK1 (*Receptor of activated protein kinase C*) entre en compétition avec HSP90 pour se lier à HIF1 α . La liaison de RACK1 à HIF1 α permet la dimérisation de RACK1 et le recrutement du complexe ubiquitine ligase, qui provoque l'ubiquitination et la dégradation protéasomale de HIF1 α . Ainsi, l'utilisation d'inhibiteurs d'HSP90 comme la geldanamycine ou le 17-AAG (17-allylamino-

17-déméthoxygeldanamycine) lève l'interaction avec HSP90 et favorise la liaison de RACK1, entraînant la dégradation de HIF1 α (Isaacs et al., 2002 ; Liu YV et al., 2007a ; Liu YV & Semenza, 2007). La liaison de RACK1 dépend de la présence de SSAT1 (*Spermidin/spermin-N1-acetyltransferase 1*) qui stabilise cette interaction (Baek *et al.*, 2007). Cette voie de dégradation peut être contrée par déphosphorylation de RACK1 par la calcineurine A, qui induirait la stabilisation de HIF1 α (Liu YV et al., 2007b). Ces résultats suggèrent que la concentration intracellulaire en calcium pourrait réguler la stabilité de HIF1 α . Tout récemment, un autre acteur a été impliqué dans ce module de régulation de HIF1 α . Il s'agit de SEPT9_v1, un membre de la famille des septines, qui sont des protéines associées au cytosquelette et liant le GTP. SEPT9_v1 a des propriétés oncogéniques, en partie expliquées par sa capacité à prévenir l'interaction de HIF1 α avec RACK1 (Amir *et al.*, 2009).

Un autre mécanisme de dégradation indépendant de l'oxygène fait intervenir la protéine COMMD1 (*Copper metabolism MURR1 domain containing 1*) qui peut aussi entrer en compétition avec HSP90 pour lier HIF1 α et coopérer avec HSP70 pour faciliter la dégradation protéasomale de HIF1 α indépendamment de l'ubiquitine (van de Sluis *et al.*, 2009).

L'hémine, une porphyrine liant le fer, a des propriétés anti-inflammatoires et anticancéreuses. Il a été proposé par des auteurs que cela serait dû à sa faculté d'inhiber HSP90 et donc d'induire la dégradation HIF1 α (Lee JM *et al.*, 2011). La protéine antiapoptotique Bcl-2 peut également former un complexe tripartite avec HIF1 α et HSP90 dans des cellules hypoxiques de mélanome, contribuant ainsi à la stabilisation de HIF1 α et à l'induction de l'expression de gènes cibles comme le gène *VEGF*, indépendamment de sa propre fonction dans la survie cellulaire (Trisciuglio *et al.*, 2010 ; Trisciuglio *et al.*, 2011).

Enfin, une étude récente montre que la régulation de HIF1 α dépendante du couple HSP90/HSP70 est contrôlée par la kinase JNK1 (*c-Jun N-terminal kinase 1*). L'exposition de cellules tumorales au nickel, un stress mimant l'hypoxie, induit la stabilisation de HIF1 α via l'activation de JNK1. Cet effet s'explique en partie par le fait que JNK1 peut induire l'expression de l'histone déacétylase HDAC6, dont l'activité favorise la fonction de chaperon d'HSP90 (Zhang D *et al.*, 2010).

e. Régulation par modifications post-traductionnelles autres que l'hydroxylation

i. L'acétylation

L'acétylation de HIF1 α au niveau du résidu Lys⁵³² dans le domaine ODD par la N-acétyltransférase ARD1 (*Arrest defective 1*) a été décrite comme favorisant l'interaction entre HIF1 α et VHL en normoxie (Jeong *et al.*, 2002). Cependant, l'effet de l'acétylation a été contesté ensuite par le fait que moduler l'expression de ARD1 n'a pas d'influence sur la stabilité de HIF1 α et HIF2 α (Arnesen *et al.*, 2005 ; Bilton *et al.*, 2005).

ii. La phosphorylation

Différents groupes scientifiques ont imputé en particulier aux kinases de la famille des MAPK la faculté de phosphoryler HIF1 α (Richard *et al.*, 1999 ; Minet *et al.*, 2001). Ainsi, l'inhibition de la p42 MAPK réduit l'activité transcriptionnelle de HIF1 α (Hur *et al.*, 2001). Les résidus ciblés ont été identifiés (Ser⁶⁴¹ et Ser⁶⁴³) et ont permis de mieux caractériser l'effet de la phosphorylation de HIF1 α (Mylonis *et al.*, 2006). L'utilisation de mutants pour ces résidus a conduit à montrer que la phosphorylation de HIF1 α dépendante des MAPK est nécessaire pour la rétention de HIF1 α dans le noyau (Mylonis *et al.*, 2008).

Un troisième résidu dans la séquence de HIF1 α peut être phosphorylé, il s'agit du résidu Thr⁷⁹⁶. La kinase impliquée serait la caséine kinase 2, et cette modification augmenterait l'activité transcriptionnelle de HIF1 α en favorisant l'interaction avec CBP/P300 (Gradin *et al.*, 2002 ; Mottet *et al.*, 2005). La modification de ce résidu empêcherait l'hydroxylation du résidu Asn⁸⁰³ voisin par FIH, ce qui contribuerait également à stimuler l'activité transcriptionnelle de HIF1 α (Lancaster *et al.*, 2004).

La glycogène synthase kinase 3 (GSK3) est elle une kinase jouant un rôle dans la régulation négative de HIF1 α . La phosphorylation du domaine ODD par GSK3 peut entraîner la dégradation par le protéasome, mais de manière indépendante de VHL et des PHDs (Flugel *et al.*, 2007).

iii. La S-nitrosylation

Cette modification peut moduler la stabilité de la protéine HIF1 α et l'activité transcriptionnelle de HIF1. Le monoxyde d'azote influence la stabilité de HIF1 α , par l'intermédiaire des PHDs (Wang F *et al.*, 2002 ; Hagen *et al.*, 2003). Il a été montré qu'HIF1 α

peut être nitrosylé sur le résidu Cys⁸⁰⁰, et que cela renforce son interaction avec ses différents cofacteurs et augmente son activité transcriptionnelle (Yasinska & Sumbayev, 2003). Là encore, le rôle de cette modification n'est pas clairement établi, puisque d'autres travaux contradictoires ont fait état d'une inhibition de la liaison avec CBP/P300 par la nitrosylation (Cho *et al.*, 2007).

iv. La sumoylation

Nous avons déjà évoqué cette modification post-traductionnelle dans la partie précédente. Quelques études montrent qu'HIF1 α peut être sumoylé, mais le rôle biologique de cette modification demeure très peu connu. Il a été montré que les deux sous-unités des hétérodimères HIF peuvent être sumoylées. La protéine HIF1 β est sumoylée sur le résidu Lys²⁴⁵ situé dans son domaine PAS ce qui influencerait négativement l'activité transcriptionnelle du dimère (Tojo *et al.*, 2002). Parmi les trois résidus cibles putatifs présents dans la séquence de HIF1 α (Lys³⁹¹, Lys⁴⁷⁷ et Lys⁵³²), il a été montré que la sumoylation des résidus Lys³⁹¹ et Lys⁴⁷⁷ augmenterait l'activité transcriptionnelle de HIF1 (Bae *et al.*, 2004 ; Carbia-Nagashima *et al.*, 2007). Le rôle de la sumoylation de HIF reste controversé, d'autres auteurs ayant proposé qu'à l'inverse, la sumoylation de HIF1 α réduit son activité transcriptionnelle (Berta *et al.*, 2007). La sumoylation peut aussi influencer l'activité de HIF1 de manière indirecte. Ainsi, une équipe a montré que la désomoylation de p300, un des principaux coactivateurs transcriptionnels de HIF1 α , augmente l'affinité de ces deux partenaires en hypoxie modérée et induit l'activité transcriptionnelle (Huang C *et al.*, 2009). Il semble que la régulation de la sumoylation de HIF soit un élément important dans l'établissement d'un phénotype angiogénique (Xu Y *et al.*, 2010). De manière particulièrement intéressante, il a été montré qu'HIF2 α est aussi régulée par sumoylation, et que cela influe sur sa dégradation par VHL (van Hagen *et al.*, 2010).

C. Les fonctions de HIF

Depuis la découverte du rôle de HIF dans la synthèse de l'EPO par Semenza et son équipe, et plus généralement dans la régulation de l'expression génique en réponse à l'hypoxie, un nombre grandissant de cibles transcriptionnelles des facteurs HIF1 et HIF2 ont été découvertes. Il est très rapidement apparu qu'au-delà d'un rôle physiologique unique, les

nombreux gènes contrôlés par HIF en font un régulateur central, à la croisée de multiples voies de signalisation et processus cellulaires, tant d'un point de vue physiologique que d'un point de vue physiopathologique. En effet, il semble qu'HIF soit hautement impliqué dans diverses pathologies comme les maladies cardiovasculaires, l'hypertension pulmonaire, les ischémies cérébrales, et des maladies inflammatoires (Semenza *et al.*, 2000 ; Nizet & Johnson, 2009).

C'est toutefois dans le domaine de l'oncologie que la progression a le plus avancé dans l'élucidation des rôles des facteurs HIF. Dans le contexte du cancer, HIF semble constituer un « *hub* » intégrateur global, qui reçoit et interprète des signaux d'origines diverses (dialogue avec d'autres éléments « centraux » comme p53, signalisation oncogénique paracrine ou autocrine, métabolisme) et de natures variées (modifications post-traductionnelles, activation génique, métabolites divers), et favorise en retour la prolifération et l'autonomisation des cellules tumorales. Très globalement, HIF joue un rôle d'activateur dans tous les processus considérés comme étant les traits caractéristiques d'une tumeur (Hanahan & Weinberg, 2011). Cependant, le rôle de HIF s'avère n'être pas aussi monolithique que ses multiples fonctions le laissent supposer. En effet, une distinction commence à être opérée entre les rôles respectifs des deux isoformes HIF1 et HIF2, notamment en ce qui concerne leur communication vis-à-vis d'autres facteurs de transcription ayant un rôle notoire dans la tumorigenèse (p53, c-Myc). Les groupes de gènes activés par HIF1 ou HIF2 ne se recouvrent que partiellement, ce qui transparaît dans leurs rôles biologiques. Selon le contexte et/ou le type cellulaire, les isoformes de HIF peuvent avoir des effets non synergiques, voire antagonistes. La découverte progressive des fonctions biologiques de HIF a induit la mise au point de nouvelles modalités thérapeutiques, pour le cancer et d'autres maladies. De manière emblématique, la découverte de la signalisation VHL/HIF/VEGF a permis le développement de plusieurs générations de thérapies moléculaires ciblées à divers niveaux de la signalisation dépendante de HIF, dans le but de contrer l'angiogenèse intratumorale (Semenza *et al.*, 2000).

Figure 12. Représentation de gènes cibles de HIF1, par association avec les processus biologiques qu'ils gouvernent (d'après Semenza, 2003).

a. L'érythropoïèse

L'hypoxie est le stimulus primaire pour la production d'EPO, l'hormone glycoprotéique de 30 kDa responsable du processus de synthèse des globules rouges en réponse à une diminution du contenu en oxygène du compartiment vasculaire (d'origine anémique ou hypoxique). L'EPO agit en induisant la survie et la prolifération des précurseurs érythroblastiques dans la moelle osseuse. Le rein a été identifié comme étant le principal site de synthèse de l'EPO (Jacobson *et al.*, 2000).

Chez l'adulte, l'isoforme HIF2 semble être l'inducteur principal de l'expression du gène *EPO* (Scortegagna *et al.*, 2005 ; Rankin *et al.*, 2007) au sein du foie et majoritairement du rein. Le gène *EPO* est exprimé dans d'autres tissus chez l'humain adulte comme le cerveau, la rate et le cœur, mais dans ces organes, la production d'EPO ne semble pas liée à sa fonction hématopoïétique (Jelkmann, 2007).

b. Régulation de l'angiogenèse

Dans une tumeur, le processus d'angiogenèse se met en place en réponse à l'hypoxie induite par la prolifération cellulaire. En effet, la croissance tumorale représente une augmentation considérable de biomasse, qui requiert un apport soutenu de nutriments et d'oxygène. L'angiogenèse tumorale est donc une condition essentielle pour la croissance ainsi que pour la progression tumorale, c'est pourquoi ce processus a été inclus dans le groupe des traits caractéristiques tumoraux (Hanahan & Weinberg, 2000, 2011). Un effort intense a été produit par la communauté scientifique dans la dernière décennie pour décrypter les mécanismes moléculaires impliqués. L'angiogenèse est un phénomène complexe qui se déroule en plusieurs étapes aboutissant à l'activation, la prolifération et la migration de cellules endothéliales vers le site requis, afin de former un réseau capillaire par protrusion à partir du réseau vasculaire préexistant (« *sprouting* »).

De nombreuses molécules biologiques produites par les cellules elles-mêmes sont capables de stimuler l'angiogenèse, de même que d'autres inhibent ce processus. C'est la balance résultant de l'intégration des divers signaux pro- et antiangiogéniques qui détermine la réponse des cellules endothéliales. Au sein des tumeurs solides, les cellules cancéreuses émettent en quantité importante des signaux proangiogéniques, notamment en réponse à l'hypoxie. L'équilibre est alors déplacé vers l'activation de l'angiogenèse ; ce phénomène est décrit comme le « switch angiogénique » (Bergers & Benjamin, 2003). Les facteurs HIF

activent l'expression de nombreux facteurs proangiogéniques tels que le VEGF, ses récepteurs VEGFR1 et VEGFR2, les angiopoïétines 1 et 2, le récepteur aux angiopoïétines Tie2, le PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*) et le bFGF (*basic Fibroblast Growth Factor*). Ces facteurs pléiotropiques aux fonctions partiellement redondantes induisent la survie, la prolifération et la migration des cellules endothéliales, constituant ainsi un réseau de signalisation complexe (Bergers & Benjamin, 2003).

Le VEGF mentionné précédemment appartient à une famille de facteurs de croissance qui inclue le VEGF-A, le VEGF-B, le VEGF-C, le VEGF-D, le VEGF-E et le PlGF (*Placenta growth factor*) (Ferrara, 2004). Le VEGF-A, qui est la forme la plus commune du VEGF, fut le premier facteur de croissance sécrété découvert à présenter des effets mitogènes spécifiques des cellules endothéliales. Le VEGF-A augmente la perméabilité vasculaire et stimule la prolifération et la migration des cellules endothéliales (Ferrara, 2004). Le VEGF-A comporte cinq isoformes produites par épissage alternatif : le VEGF₁₂₁, le VEGF₁₄₅, le VEGF₁₆₅, le VEGF₁₈₉ et le VEGF₂₀₆ (Ferrara, 2004). Le VEGF est un des facteurs proangiogéniques les plus puissants, et exerce son influence à diverses étapes du processus angiogénique. Les facteurs HIF sont capables à eux seuls d'induire l'établissement d'une boucle paracrine stimulant l'angiogenèse. En effet, dans les cellules non endothéliales, l'activation de HIF1 ou HIF2 stimule la production et la sécrétion du VEGF-A (Hu *et al.*, 2003 ; Manalo *et al.*, 2005). HIF2, dont les cellules endothéliales constituent un site d'expression privilégié, induit l'expression en surface membranaire des récepteurs au VEGF (Skuli & Simon, 2009). L'activation de HIF1 dans les cellules endothéliales promeut une boucle autocrine impliquant le VEGF et son récepteur VEGFR2 (Tang *et al.*, 2004).

Figure 13. Le “switch angiogénique” dans une tumeur en progression. Cet événement peut prendre place à des niveaux de progression différents suivant le type de tumeur et le microenvironnement. La tumeur initialement dormante (a) atteint un équilibre en croissance cellulaire et apoptose. L’initiation de l’angiogenèse est requise pour que la tumeur puisse continuer de croître. Cela se manifeste tout d’abord par une déstabilisation du réseau vasculaire local (b), qui permet la croissance de néocapillaires par protrusion (c). L’angiogenèse est un phénomène qui perdurera ensuite tout au long de la croissance tumorale, permettant de perfuser en continu la masse tumorale croissante (d,e). Le réseau vasculaire intratumoral contribue par sa structure à l’acquisition de résistances diverses par les cellules tumorales, et permet la dissémination dans la circulation sanguine de cellules cancéreuses, qui produiront des métastases. L’angiogenèse est donc une étape essentielle dans la progression tumorale (d’après Bergers & Benjamin, 2003).

c. Régulation de la résistance thérapeutique

Récemment, de nombreuses études ont permis de mettre en lumière et de caractériser la contribution de HIF1 aux phénomènes de résistance des tumeurs à un large panel d’agents chimiothérapeutiques, au sein d’un spectre étendu de tumeurs (Rohwer & Cramer, 2011). Il a

été observé que l'effet antiprolifératif de composés tels que le carboplatine et l'étoposide était significativement augmenté après inactivation de HIF1 (Unruh *et al.*, 2003). Cette équipe a proposé un rôle fonctionnel de HIF1 dans la résistance tumorale dans des conditions normoxique et hypoxique. Par la suite, de nombreux auteurs se sont penchés sur le rôle de HIF1 dans la résistance induite par l'hypoxie seulement, et ont montré la réversibilité de l'induction de la résistance par HIF1 par des études de perte de fonction (Brown *et al.*, 2006 ; Song *et al.*, 2006 ; Hao *et al.*, 2008 ; Liu F *et al.*, 2008). Les données sur l'influence de HIF1 sur la sensibilité des cellules cancéreuses en normoxie sont contradictoires. Certains auteurs n'ont pu démontrer que l'inactivation de HIF1 en présence d'oxygène ait un effet, par exemple dans le neuroblastome (Hussein *et al.*, 2006). A l'inverse, il a été montré que l'inhibition de HIF1 augmente considérablement la sensibilité aux agents chimiothérapeutiques en normoxie dans les cancers du sein et de l'estomac (Li J *et al.*, 2006 ; Rohwer *et al.*, 2010). Ces observations permettent de conclure globalement à un rôle de HIF1 dans la modulation de la sensibilité des cellules cancéreuses à la chimiothérapie.

Au niveau moléculaire, la contribution de HIF1 à la résistance est complexe et dépend du type de tumeur. Un des premiers mécanismes moléculaires expliquant ce phénomène est le fait qu'HIF1 est capable d'activer directement le gène *MDR1* (*Multidrug resistance 1*) en réponse à l'hypoxie (Comerford *et al.*, 2002). *MDR1* code pour une glycoprotéine membranaire (P-gp) appartenant à la famille des transporteurs à cassette liant l'ATP (transporteurs ABC). Cette protéine a une fonction de pompe à efflux, lui permettant de diminuer la concentration intracellulaire de nombreux agents comme les analogues de la vincristine, les anthracyclines et le paclitaxel (Gottesman *et al.*, 2002). *MDR1* a été décrit comme étant un gène cible de HIF1 dans plusieurs types cellulaires cancéreux comme les cancers du sein, de l'estomac et du colon (Zhu *et al.*, 2005 ; Li J *et al.*, 2006 ; Liu L *et al.*, 2008 ; Nardinocchi *et al.*, 2009). Très récemment, il a été montré une corrélation significative entre le niveau d'expression de HIF1 et l'expression de Pgp dans le cancer du colon (Ding *et al.*). Un autre transporteur ABC, la protéine *MRP1* (*Multidrug resistance-associated protein 1*), semble être impliqué dans la résistance induite par l'hypoxie et dépendante de HIF (Liu L *et al.*, 2008 ; Chen L *et al.*, 2009).

En contraste avec les données disponibles pour HIF1, la relevance fonctionnelle de HIF2 dans la thérapie anticancéreuse a été très peu étudiée jusqu'à maintenant. Il a été montré

que l'expression de HIF2 α était associée à une réponse chimiothérapeutique incomplète dans le cancer de cellules squameuses de la tête et de la nuque (Koukourakis *et al.*, 2002).

d. Contrôle du métabolisme cellulaire et du pH intracellulaire

La demande cellulaire en énergie est habituellement comblée par les voies conventionnelles de phosphorylation oxydative, l'oxygène étant l'accepteur final d'électrons. Dans le cas de cellules transformées, la prolifération tumorale induit une consommation accrue en énergie et nutriments. La prolifération éloigne les cellules du flux sanguin, et celles-ci se retrouvent en détresse énergétique, devant reprogrammer leur métabolisme. Un « *switch* » a lieu afin de faire assurer la production d'énergie par la voie de la glycolyse anaérobie. L'activation des gènes codant pour les enzymes et transporteurs nécessaires à cet effet dépend de HIF1. Parmi les différents gènes induits figurent ceux codant pour la phosphoglycérate kinase 1 (PGK1), la plupart des enzymes de la voie de la glycolyse, les transporteurs de glucose GLUT1 et GLUT3 (Semenza *et al.*, 1994). HIF1 active également la lactate déshydrogénase A (LDH-A) qui permet la conversion du pyruvate en lactate (Fantin *et al.*, 2006).

Néanmoins, cette dérive vers la glycolyse anaérobie occasionne une forte diminution du pH intracellulaire, à cause de la production d'acide lactique et de CO₂ qui n'est plus éliminé efficacement. HIF1 intervient dans le rétablissement de la balance entre le pH intra et extracellulaire, en induisant l'expression des anhydrases carboniques 9 et 12 (Chiche *et al.*, 2009). HIF1 active également les gènes codant pour des transporteurs évacuant l'acide lactique produit par la glycolyse anaérobie et les protons. Il s'agit respectivement du transporteur MCT4 (*Monocarboxylate transporter 4*) et de l'échangeur NHE (*Na⁺/H⁺ exchanger*) (Counillon & Pouyssegur, 2000 ; Ullah *et al.*, 2006). Une part du programme génétique déclenché par l'hypoxie permet donc d'adapter, *via* HIF1, le métabolisme énergétique des cellules tumorales, ainsi que d'en corriger l'acidose résultante, potentiellement néfaste (Vander Heiden *et al.*, 2009).

Un intérêt croissant est porté sur le lien entre HIF1 et l'activité mitochondriale. Les mitochondries sont un élément important dans la décision du destin cellulaire. Tout en étant le siège principal de la génération d'énergie et de pouvoir réducteur pour la cellule, par l'intermédiaire du cycle des acides tricarboxyliques (CAT) et de la chaîne de transport d'électrons, elles constituent aussi un centre de décision dans le déclenchement de la voie intrinsèque de l'apoptose (Galluzzi & Kroemer, 2008 ; Galluzzi *et al.*, 2008). Il est donc peu

surprenant que l'activité mitochondriale soit fortement altérée dans les cellules cancéreuses (Fulda *et al.*, 2010). Il a été démontré qu'HIF1 est capable de supprimer le CAT *via* l'activation du gène *PDK1*, qui code pour l'enzyme pyruvate déshydrogénase kinase 1 (PDK1). Il en résulte une inhibition de la pyruvate déshydrogénase (PDH) par phosphorylation, qui assure habituellement la conversion du pyruvate issu de la glycolyse en acétyl-CoA, combustible essentiel du CAT (Kim JW *et al.*, 2006 ; Papandreou *et al.*, 2006). La privation du CAT de son substrat entraîne son inactivation, ce qui réduit la dépendance cellulaire à la disponibilité en oxygène. Il est notable que des intermédiaires du CAT soient eux-mêmes capables de moduler l'activité de HIF (Hewitson *et al.*, 2007). Par exemple, des mutations dans les gènes codant pour la succinate déshydrogénase et la fumarate hydratase induisent l'accumulation de succinate et de fumarate qui inhibe les PHDs et stabilise HIF (MacKenzie *et al.*, 2007 ; Pollard *et al.*, 2007).

Par ailleurs, des auteurs ont récemment rapporté un rôle de HIF1 dans la régulation de la biogenèse mitochondriale. Dans des cellules de cancer rénal dépourvues de la protéine VHL, HIF1 peut induire la suppression de l'activité du facteur de transcription C-Myc, qui est entre autres fonctions un régulateur positif de la biogenèse mitochondriale (Li F *et al.*, 2005 ; Zhang H *et al.*, 2007). Ces études décrivent un contrôle à plusieurs facettes de l'activité mitochondriale par HIF1, qui participe à la résistance générale induite par l'hypoxie (Tormos & Chandel, 2010).

De plus, les mitochondries sont le principal site générateur d'espèces réactives de l'oxygène au sein de la cellule, ce qui représente une autre voie d'induction de la mort cellulaire. Différentes stratégies d'inhibition fonctionnelle de HIF1 dans divers types cellulaires ont résulté en une élévation de la concentration intracellulaire en ROS (Rohwer *et al.*, 2010). Ces résultats suggèrent fortement qu'HIF1 stimule également la résistance à la chimiothérapie *via* l'inhibition de la production mitochondriale de ROS (Rohwer & Cramer, 2011).

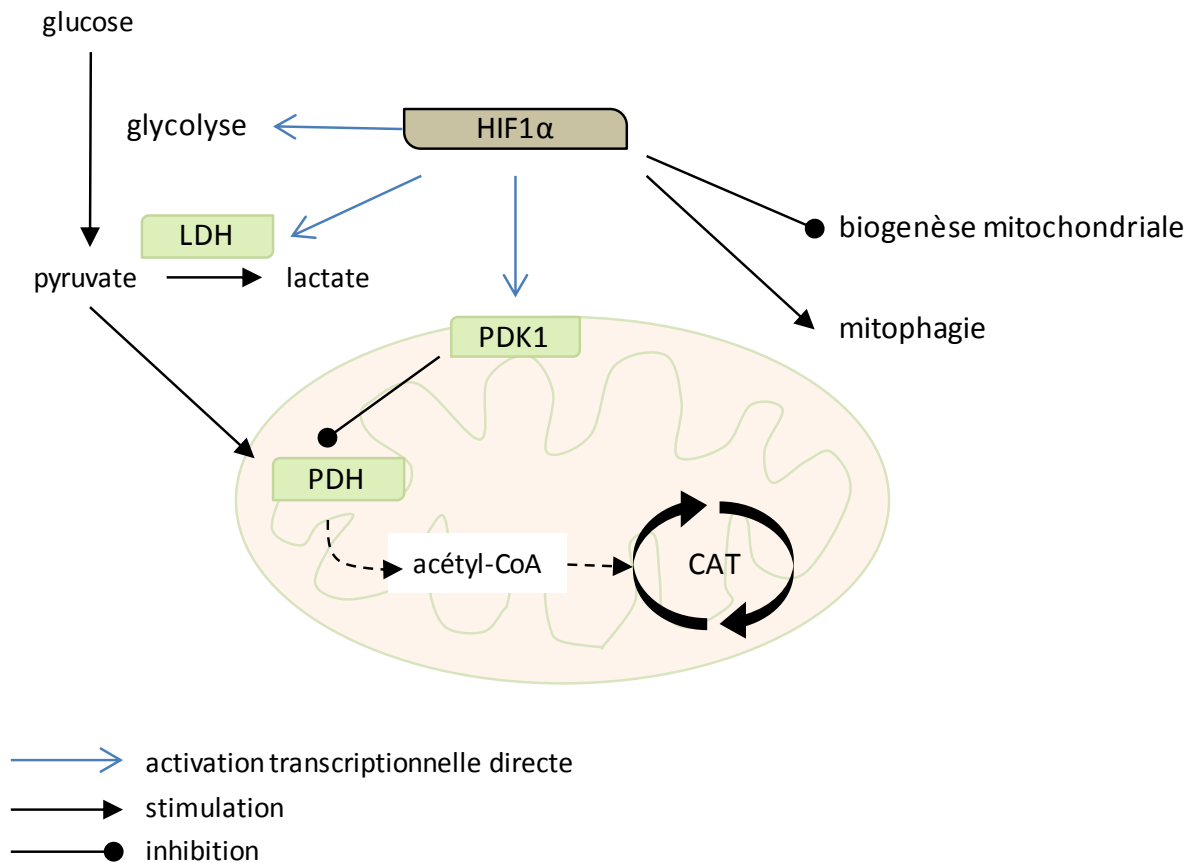


Figure 14. Aperçu schématique du rôle inhibiteur de HIF1 α sur l'activité mitochondriale. HIF1 α détourne la production d'énergie vers la voie de la glycolyse anaérobie dans les cellules cancéreuses en induisant l'expression de nombreux gènes codant pour des enzymes de la glycolyse, et active les enzymes LDH-A et PDK1 qui privent la mitochondrie de pyruvate (adapté d'après Rohwer & Cramer, 2011).

e. Régulation de l'autophagie

L'autophagie est un processus qui joue également un grand rôle dans la viabilité cellulaire. Il s'agit d'un phénomène d'autodigestion qui a lieu en réponse à un stress métabolique ou à une baisse de la disponibilité en nutriments. L'autophagie permet alors à la cellule de produire de l'énergie, ainsi que divers précurseurs métaboliques d'importance, à partir de sources intracellulaires, et contribue à la survie cellulaire. C'est un processus maintenant l'homéostasie métabolique, dans le sens où il lève de manière transitoire la dépendance de la cellule à des sources d'énergie externes (Mizushima *et al.*, 2008).

Le rôle définitif de l'autophagie dans les cellules cancéreuses est toujours discuté et semble dépendre des contextes cellulaire et environnemental, mais il a été montré que l'état de quiescence associé à l'autophagie confère une résistance aux traitements antiprolifératifs (Chen S *et al.*, 2010). L'inactivation fonctionnelle de l'autophagie augmente l'efficacité d'agents chimiothérapeutiques comme le 5-fluorouracile ou le cisplatine contre des cellules de cancer du colon et de l'œsophage, respectivement (Li J *et al.*, 2010 ; Liu D *et al.*, 2011). Plus précisément, HIF1 a été décrit comme un régulateur positif de la mitophagie, l'autophagie spécifique des mitochondries (Zhang H *et al.*, 2008). Cette régulation contribue à l'adaptation du métabolisme respiratoire induite par l'hypoxie, ce qui constitue une autre stratégie cellulaire de survie. Il a été montré que la mitophagie induite par l'hypoxie dépend de l'expression des protéines Bcl2/E1B 19 kDa-interacting protein 3 (BNIP3) et BNIP3-like (BNIP3L), dont les gènes sont des cibles transcriptionnelles directes de HIF1 (Bellot *et al.*, 2009 ; Mazure & Pouyssegur, 2010). Ces protéines à domaine BH3-only appartiennent à la famille des protéines Bcl-2 et sont capables de contrer l'activité des protéines antiapoptotiques Bcl-2 et Bcl-X_L (Boyd *et al.*, 1994). Récemment, il a été montré que l'autophagie induite par l'hypoxie et HIF1 peut induire l'échec d'un traitement cytotoxique (Liu XW *et al.*, 2010).

f. Régulation de la mort cellulaire

Il serait intuitif de penser que l'hypoxie diminue la prolifération des cellules, ainsi que leur survie. Mais paradoxalement, l'hypoxie n'induit pas forcément la mort cellulaire. Un schéma global de l'intégration des multiples signaux commandant la mort ou la survie des cellules cancéreuses en hypoxie émerge à peine, mais il semble qu'HIF1 soit un des pivots moléculaires dans la décision de la survie cellulaire. Ainsi, lors d'une exposition à une baisse trop brutale du taux d'oxygène, les cellules primaires répondront en induisant l'arrêt du cycle cellulaire de manière dépendante de HIF1 ; si l'hypoxie persiste ou empire, HIF1 peut induire la mort (Greijer & van der Wall, 2004). En revanche, dans la majorité des cellules transformées, HIF1 exerce une fonction de suppression de l'apoptose, voir le paragraphe « régulation de la résistance thérapeutique » pour de plus amples détails.

Un mécanisme moléculaire par lequel les facteurs HIF peuvent réguler l'apoptose est leur interaction avec p53. Divers auteurs ont proposé des résultats contradictoires à ce sujet, mais un consensus semble apparaître. Ainsi, la liaison de HIF1 α avec p53 résulte en la stabilisation de p53 et une induction de l'apoptose dépendante de l'hypoxie (An *et al.*, 1998 ;

Moeller *et al.*, 2005). A l'inverse, HIF2 α semble supprimer l'activité de p53 et donc augmenter la survie des cellules cancéreuses (Bertout *et al.*, 2009 ; Roberts *et al.*, 2009). HIF et p53 peuvent avoir des effets antagonistes ou synergiques vis-à-vis de l'apoptose dans les cellules tumorales. Il semble alors que la sévérité de l'hypoxie soit un déterminant important dans la survie cellulaire. Cela est vraisemblablement dû à des différences dans les gènes induits lors d'une hypoxie modérée ou sévère (Sermeus & Michiels, 2011). L'hypoxie exercerait une pression de sélection sur les cellules tumorales selon leur statut p53. Les cellules ayant un p53 non muté seraient éliminées par apoptose, ce qui permet à la tumeur de sélectionner les cellules mutées pour p53 (Sermeus & Michiels, 2011). Un groupe a récemment proposé qu'HIF1 inhibe l'apoptose induite par p53 par un processus cellulaire non autonome (Sendoel *et al.*, 2010). Ces auteurs proposent que la stabilisation de HIF1 dans des zones tumorales hypoxiques pourrait moduler l'apoptose induite dans d'autres cellules. La relation entre HIF et p53 suscite un grand intérêt actuellement, et la complexité de cette relation garantit de nombreuses possibilités d'étude.

HIF2 α peut également interférer avec l'apoptose induite par les ROS. En effet, l'enzyme antioxydante SOD2 (*Superoxyde dismutase 2*) est une cible transcriptionnelle préférentielle de HIF2 α (Nanduri *et al.*, 2009). Il a été récemment montré qu'HIF2 α a une fonction similaire dans des cellules cancéreuses rénales. La déplétion de HIF2 α dans ces cellules, induit une diminution de l'expression d'enzymes antioxydantes comme l'hème oxygénase 1, ce qui mène à une augmentation du taux intracellulaire de ROS, à l'activation de l'apoptose dépendante de p53 (Bertout *et al.*, 2009).

g. La prolifération

Les rôles imputables à HIF1 et HIF2 dans la croissance tumorale sont encore peu définis au niveau des voies moléculaires qui seraient induites par l'une ou l'autre forme. Ces dernières années, différentes études tendent à attribuer à HIF2 α un rôle majeur dans la promotion de la croissance des tumeurs, par rapport à HIF1 α . Il a été démontré dans un modèle de xénogreffes murines de cellules de carcinome rénal *VHL*^{-/-}, qu'HIF2 α est à la fois nécessaire et suffisant pour la prolifération des cellules tumorales (Kondo *et al.*, 2002 ; Kondo *et al.*, 2003). Lorsque ces expériences furent répétées en surexprimant HIF1 α de manière stable, il a été observé un fort ralentissement de la croissance tumorale (Raval *et al.*, 2005).

Une explication moléculaire à cette distinction fonctionnelle entre les HIF commence à être entrevue. En effet, des données récentes présentent HIF1 α comme étant un inhibiteur du

facteur de transcription c-Myc (Koshiji *et al.*, 2004 ; Koshiji *et al.*, 2005). C-Myc favorise la prolifération en stimulant la progression à travers le cycle cellulaire, *via* l'activation de l'expression de la cycline D2 et du facteur de transcription E2F1, et en inhibant l'expression des inhibiteurs de cycline p21 et p27 (Coller *et al.*, 2000 ; Fernandez *et al.*, 2003). Plus récemment, il a été proposé qu'HIF2 α ait une action antagoniste et favorise l'interaction de c-Myc avec ses partenaires Sp1, Miz1 et Max (Gordan *et al.*, 2007a). Cet antagonisme *a priori* paradoxal entre l'influence de HIF1 α et HIF2 α sur la prolifération cellulaire reflète l'extrême complexité du dialogue qui s'instaure entre les deux isoformes (Gordan *et al.*, 2007b).

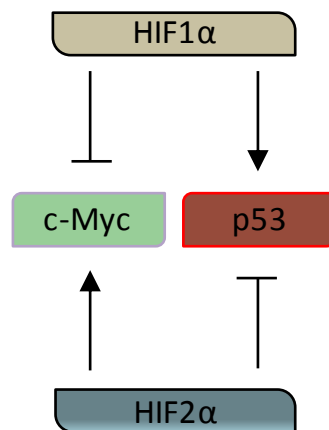


Figure 15. Représentation schématique de rôles antagonistes de HIF1 α et HIF2 α dans la prolifération des cellules cancéreuses. Les rôles de chacune des deux isoformes sur la régulation de l'activité des deux facteurs de transcription c-Myc et p53 sont opposés. Par exemple, HIF2 α favorise la prolifération cellulaire (par activation de c-Myc) et augmente la survie cellulaire (par inhibition de p53).

Les facteurs HIF peuvent également induire transcriptionnellement de puissants facteurs mitogènes tels que l'IGF (*Insulin growth factor*) et le TGF α (*Transforming growth factor*) (Feldser *et al.*, 1999 ; Krishnamachary *et al.*, 2003). Ces facteurs de croissance, en se liant à leurs récepteurs respectifs, stimulent la synthèse des protéines HIF α par l'intermédiaire des voies PI3K/Akt/mTOR et MAPK (Semenza, 2003). Cette augmentation de l'expression de HIF ne dépend pas d'une inhibition de la dégradation post-traductionnelle classique, mais bien d'une élévation de la transcription. Ces facteurs de croissance induisent l'expression de HIF, participant à l'établissement de boucles positives autocrines, comme cela a été montré dans le cas de l'IGF2 (Carroll & Ashcroft, 2006 ; Catrina *et al.*, 2006). L'expression de HIF dans des cellules cancéreuses, en activant la sécrétion de nombreuses cytokines au fort pouvoir mitogène, est un promoteur majeur de l'acquisition du caractère de croissance

autonome. Ainsi, il a été montré récemment que l'activation de HIF2 pourrait induire la surexpression de l'EGFR (*Epidermal growth factor receptor*) dans de nombreuses tumeurs, en augmentant le taux de traduction de son ARN messenger par un mécanisme encore inconnu (Franovic *et al.*, 2007).

Figure 16. Rôle de HIF1 dans la signalisation autocrine impliquant les facteurs de croissance. La boucle positive est initiée par l'hypoxie ou une stimulation externe par l'IGF2 ou le TGF α . Une fois stabilisé, HIF1 induit l'expression de ces facteurs de croissance et entretient la boucle, ce qui induit la prolifération des cellules tumorales (d'après Semenza, 2003).

OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THÈSE

Parmi les mécanismes alternatifs de régulation de HIF ne dépendant pas de la protéine VHL, quelques uns font intervenir les HSPs, en particulier HSP90. Cependant, la quasi-totalité des études publiées dans ce contexte ne concernent qu'HIF1 α . Cela peut provenir du fait que l'étude n'a pas inclus HIF2 α , mais aussi du fait que ces travaux ont montré clairement que le mécanisme mis en évidence ne régule qu'HIF1 α .

Il existe très peu de publications décrivant des liens éventuels entre HSP27 et les facteurs HIF, en regard de l'abondante littérature concernant HSP90. Compte tenu du rôle décrit auparavant pour HSP27 dans la dégradation spécifique de certaines protéines cibles, nous avons souhaité déterminer si cette petite protéine de choc thermique pouvait influencer sur la dégradation protéasomale de HIF.

Il est établi depuis quelques années qu'HIF1 α est une protéine cliente d'HSP90. Il a également été montré que l'utilisation d'inhibiteurs d'HSP90, en déstabilisant HIF1 α , a des effets antitumorigènes et antiangiogéniques. Pour autant, il semble que la protéine HIF2 α soit appelée à constituer une cible thérapeutique de premier ordre, étant donnée sa prédominance dans un certain nombre de processus cellulaires favorisant la progression tumorale (Qing & Simon, 2009). Le statut de protéine cliente d'HSP90 a été suggéré pour HIF2 α (Isaacs *et al.*, 2004 ; Katschinski *et al.*, 2004). Nous avons donc également voulu déterminer plus précisément les effets de l'inhibition d'HSP90 sur la fonction de HIF2 α .

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Culture cellulaire, hypoxie et réactifs

Les lignées de carcinome rénal humain RCC4^{vh1+/+} et RCC4^{vh1-/-} ont été commandées auprès de l'European Collection of Cell Cultures (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Les cellules de cancer du col de l'utérus humain HeLa et les lignées RCC4^{vh1+/+} et RCC4^{vh1-/-} ont été cultivées dans du milieu DMEM à 4,5g.L⁻¹ de glucose (BioWhittaker, Fontenay-sous-Bois, France) supplémenté avec 10% de SVF (BioWhittaker) dans un incubateur à 37°C (5% de CO₂). Pour l'hypoxie, les cellules ont été placées dans un incubateur hypoxique (AES Chemunex, Bruz, France) dans une atmosphère contrôlée à 1% d'oxygène et 5% de CO₂ pendant des intervalles de temps de 4 heures à 16 heures. Le MG132 a été commandé chez Calbiochem (Mercks Chemicals, Nottingham, UK). La staurosporine a été commandée chez Sigma. Le 17-DMAG (17-(Diméthylaminoéthylamino)-17-déméthoxygeldanamycine) est un don du Dr Jégo (Dijon, France).

Transfection transitoire et interférence à ARN

Les séquences codant pour HIF2 α , HA-HSP27, HA-HSP90, HA-HSP90 α et HA-HSP90 β sont situées dans le vecteur d'expression pcDNA3. Le vecteur d'expression pcDNA3 sans insert a été utilisé comme contrôle et pour normaliser les quantités de plasmide transfecté entre échantillons d'une même expérience. Plusieurs types de flasques ou boîtes de Petri adaptées à la culture cellulaire ont été testés pour les expériences de transfection transitoire. Les cellules ont été transfectées lorsque leur confluence était entre 60 et 80%, à l'aide du kit JetPRIMETM, selon les instructions du fabricant (Ozyme, Illkirch, France). Les cellules ont été placées à l'étuve pendant 24h, et éventuellement soumises à un traitement particulier.

Un siRNA dirigé contre HIF2 α (brin sens 5'-UCACAGAACUGAUUGGUUAdTdT-3' et brin antisens 5'-UAACCAAUCAGUUCUGUGAdTdT-3') et un siRNA scramble ont également été commandés auprès d'Ambion (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Les siRNA ont été transfectés avec le kit JetPRIMETM, selon les instructions du fabricant (Ozyme). Les cellules ont été lysées après 48 heures pour analyse.

Extraction protéique

Les extraits protéiques totaux ont été réalisés après deux lavages des cellules par du PBS 1X froid. Les cellules ont été collectées par centrifugation (1200 rpm, 5 minutes), puis lysées dans un tampon RIPA modifié (150 mM NaCl, 50 mM HCL pH 7,2, 10 mM NaF, 1 mM DTT, 1% NP40 et cocktail d'inhibiteur de protéases) sur la glace pendant 30 minutes. Après centrifugation (15000g, 10 minutes, 4°C), la concentration protéique dans les surnageants a été évaluée par le kit de dosage *DC protein* (Biorad, Marnes-la-coquette, France).

Co-immunoprécipitation

Les cellules ont été lysées dans un tampon faiblement stringent (150mM NaCl, 50 mM HCL pH 7,2, 10mM NaF, 1mM DTT, 0,2% NP40 et cocktail d'inhibiteur de protéases) à 4°C pendant 30 minutes. Après centrifugation (15000g, 10 minutes, 4°C), la concentration protéique a été évaluée (voir ci-dessus), et 500µg d'extrait protéique ont été incubés avec 1,5 µg de l'anticorps désiré en agitation constante à 4°C. Les complexes immuns ont été précipités par de la résine d'agarose-protéine A/G (GE Healthcare, Orsay, France). Après cinq lavages dans le même tampon, les protéines précipitées ont été analysées par SDS-PAGE.

Immuno-empreinte

Après préparation d'extraits protéiques totaux ou co-immunoprécipitation, les protéines ont été séparées en SDS-PAGE et transférées sur des membranes de PVDF (Millipore, Saint-Quentin en Yvelines, France). La détection des protéines a été réalisée par chimioluminescence avec le réactif Pierce ECL Plus (Pierce, Thermo Fisher Scientific, Brebières, France). La protéine HSC70 a été utilisée comme contrôle de charge. Les anticorps primaires suivants ont été utilisés : anti-HA monoclonal (Covance, Princeton, New Jersey, USA), anti-ubiquitine, anti-HSC70 et anti-HIF2α monoclonaux de Santa Cruz (Tebu-Bio, Le Perray en Yvelines, France).

Essai d'ubiquitination *in vitro*

La synthèse de la protéine HIF2 α a été réalisée avec le kit TnT® Quick Coupled Reticulocyte Lysate Systems, selon les instructions du fabricant (Promega, Charbonnières, France). 1 μ g du plasmide pcDNA3-HIF2 α a été ajouté au Master Mix pour un volume final de 50 μ l. La réaction a été incubée pendant 90 minutes à 30°C dans un thermocycleur. La production protéique a été testée par SDS-PAGE, avec un volume de 5 μ l de l'échantillon. Un volume identique provenant d'une réaction sans plasmide a été utilisé comme contrôle. Les lysats ont été congelés à -80°C avant utilisation dans l'essai décrit ci-après.

Pour l'essai d'ubiquitination, nous avons utilisé le kit Ubiquitin Conjugation Kit de Boston Biochem (R&D Systems Europe, Abington, UK). Ce kit est fourni avec deux fractions protéiques différentes. La fraction A contient un cocktail d'enzymes de type E1, E2 et E3, tandis que la fraction B est dépourvue d'activité E3. Les autres composants du kit sont des solutions d'ubiquitine et de régénération de l'énergie. Une solution d'ubiquitine aldéhyde, un inhibiteur de déubiquitines du type hydrolases C-terminales, a été commandée chez Boston Biochem. Les réactions ont été préparées selon les instructions du fabricant, en ajoutant 25 μ l de lysat, du MG132 (2 μ M) et de l'ubiquitine aldéhyde (2 μ M) pour un volume final de 50 μ l. Les réactions ont été réalisées à température ambiante pendant 45 minutes, avant d'être stoppées par addition de tampon de charge. Les échantillons ont été analysés par SDS-PAGE.

Test ELISA

La concentration en VEGF a été déterminée dans les surnageant à l'aide du kit Human VEGF Quantikine ELISA Kit selon les instructions du fabricant (R&D Systems).

RÉSULTATS

PARTIE I. Régulation de HIF2 α par HSP27

HSP27 induit une diminution de l'expression de HIF2 α .

Notre première approche a consisté à comparer l'effet de la surexpression d'HSP27 et d'HSP90 sur l'expression de HIF2 α dans des cellules HeLa. Pour cela, nous avons transfecté des cellules HeLa avec un vecteur vide ou codant pour HSP27 ou HSP90 α , puis cultivé les cellules en condition normale d'oxygénation (normoxie) puis analysé l'expression de HIF2 α . Les cellules ont été placées en incubateur hypoxique 4 heures avant la lyse quand indiqué (figure 17).

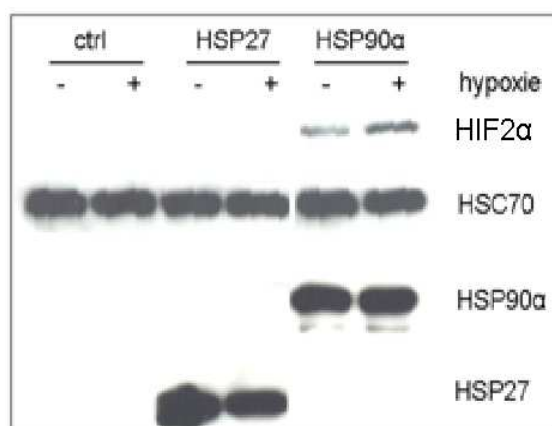


Figure 17. Effet de la surexpression de HSP27 et HSP90 α sur l'expression basale de HIF2 α dans les cellules HeLa. Les cellules sont cultivées en normoxie ou soumises à 4h d'hypoxie avant la lyse. Les cellules ont été lysées 24 h post-transfection et les protéines détectées par SDS-PAGE. HSC70 sert de contrôle de charge.

On observe que l'expression d'HSP90 α stabilise HIF2 α (pistes 5-6). Ce résultat confirme qu'HSP90 est bien capable de stabiliser HIF2 α , en accord avec une étude décrivant HIF2 α comme une protéine cliente d'HSP90 (Katchinski *et al.*, 2004). Nous constatons qu'HSP27 n'induit pas de stabilisation de l'expression de HIF2 α . Nous avons donc ensuite déterminé si HSP27 pouvait induire une diminution de cette expression.

Etant donné que l'expression basale de HIF2 α dans les cellules HeLa est nulle, nous avons surexprimé HIF2 α afin d'évaluer un éventuel effet inhibiteur d'HSP27. Pour cela, nous avons réalisé des cotransfections de vecteurs codant HIF2 α et HA-HSP27, puis cultivé les

cellules en normoxie ou en hypoxie. L'expression de HIF2 α a été évaluée par SDS-PAGE (figure 18).

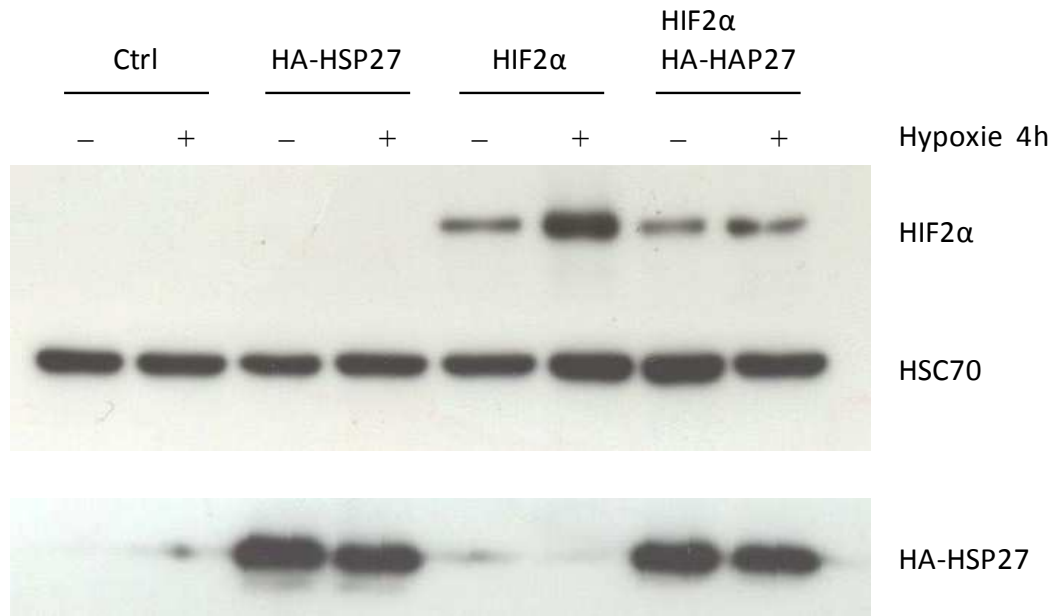


Figure 18. Effet de la surexpression de HSP27 sur l'expression de HIF2 α . Les cellules HeLa ont été transfectées avec les plasmides contrôles, HSP27 et/ou HIF2 α . Les cellules sont cultivées en normoxie puis soumises ou non à 4h d'hypoxie avant la lyse. Les cellules ont été lysées 24 h post-transfection et les protéines détectées par SDS-PAGE. HSC70 sert de contrôle de charge.

On constate qu'HIF2 α est stabilisée dans les cellules hypoxiques (piste 6). Lorsqu'HSP27 est surexprimée, on observe une diminution niveau d'expression de HIF2 α en condition d'hypoxie (piste 8 *versus* piste 6). En revanche, cette dégradation n'est pas observée en condition de normoxie (piste 7). Cela suggère que la régulation par HSP27 dépendrait en partie de l'absence d'hydroxylation de HIF2 α par les PHDs. Il faudrait confirmer ceci en inhibant l'action des PHDs dans des cellules hypoxiques ou normoxiques, en les traitant avec du chlorure de cobalt ou la diméthylalylglycine, et en comparer le résultat.

HSP27 induit l'ubiquitination et la dégradation de HIF2 α par le protéasome.

Nous avons ensuite cherché à déterminer si la dégradation induite par HSP27 impliquait le protéasome. Les cellules HeLa ont été transfectées pour surexprimer HIF2 α ou HIF2 α et

HSP27, puis cultivées en normoxie. Après 20 heures, traitées par du MG132 (20 μ M) pendant 4 heures. Celles-ci ont été ensuite concentrées par immunoprécipitation et nous avons déterminé la présence de HIF2 α parmi les protéines co-immunoprécipitées (figure 19).

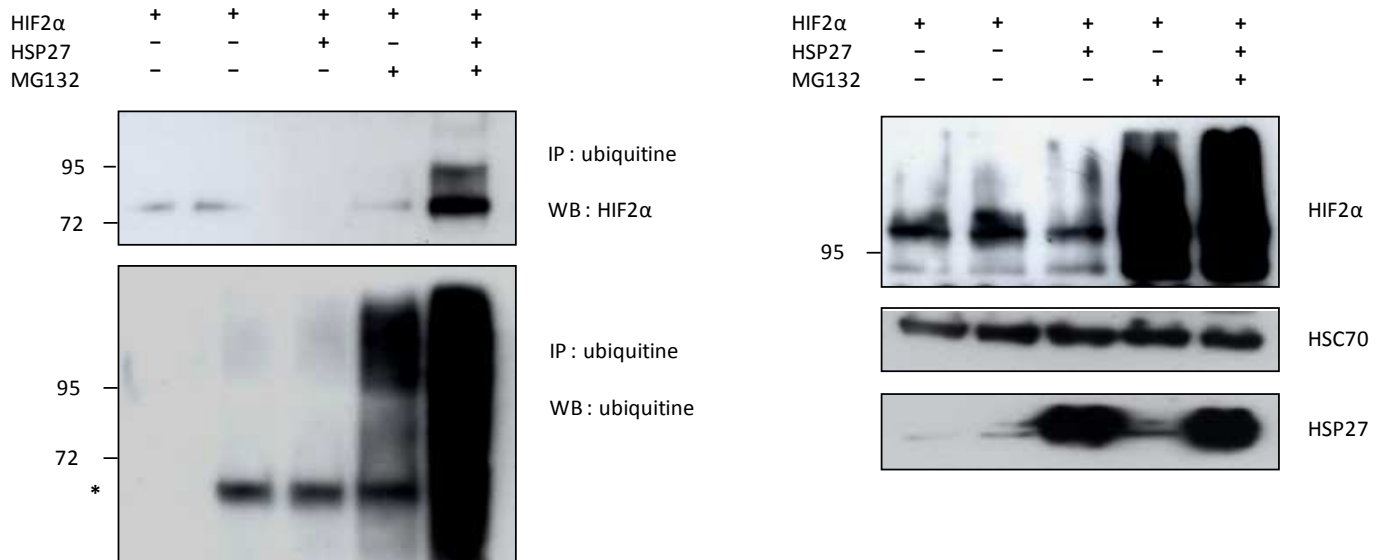


Figure 19. La dégradation de HIF2 α induite par HSP27 dépend du protéasome. Les cellules HeLa surexprimant HIF2 α ou HIF2 α et HA-HSP27 ont été cultivées en normoxie puis traitées par le MG132 (20 μ M). Dans 1g d'extrait protéique total, les protéines ubiquitinées ont été précipitées par un anticorps spécifique. Après résolution des échantillons sur SDS-PAGE, l'expression des protéines ubiquitinées totales et de HIF2 α a été analysée (panneau gauche). Le panneau droit présente l'expression d'HA-HSP27 et HIF2 α dans les mêmes échantillons, analysée par SDS-PAGE.

Lorsque HSP27 est surexprimée dans des cellules surexprimant HIF2 α , on observe une diminution de l'expression de HIF2 α (piste 3, panneau droit). On constate une forte augmentation du profil d'espèces ubiquitinées lorsque le protéasome est inhibé (piste 4, panneau gauche), et une augmentation encore plus forte quand HSP27 est surexprimée (piste 5, panneau gauche), ce qui est en accord avec nos travaux précédemment publiés (Parcellier *et al.*, 2003). Le traitement des cellules surexprimant HSP27 par le MG132 permet de recouvrer la bande correspondant à HIF2 α (piste 5 contre piste 2). Cette bande a une plus forte intensité, ce qui indique que l'inhibition du protéasome a induit une accumulation de la protéine HIF2 α au sein des cellules. Ce résultat suggère que la dégradation de HIF2 α induite par HSP27 semble dépendante du protéasome.

Pour confirmer ceci, nous avons aussi réalisé un essai *in vitro* basé sur des extraits protéiques de lysats de réticulocytes de lapin. Pour cet essai, nous avons utilisé un kit de conjugaison de l'ubiquitine *in vitro* de Boston Biochem. Ce kit est fourni avec deux fractions protéiques différentes. La fraction A contient un cocktail d'enzymes de type E1, E2 et E3, tandis que la fraction B est dépourvue d'activité E3. La protéine HIF2 α a été produite en lysat de réticulocytes de lapin. La production de protéine a été testée par Western Blot sur une fraction du lysat en fin de réaction avant la réalisation de l'essai en lui-même.

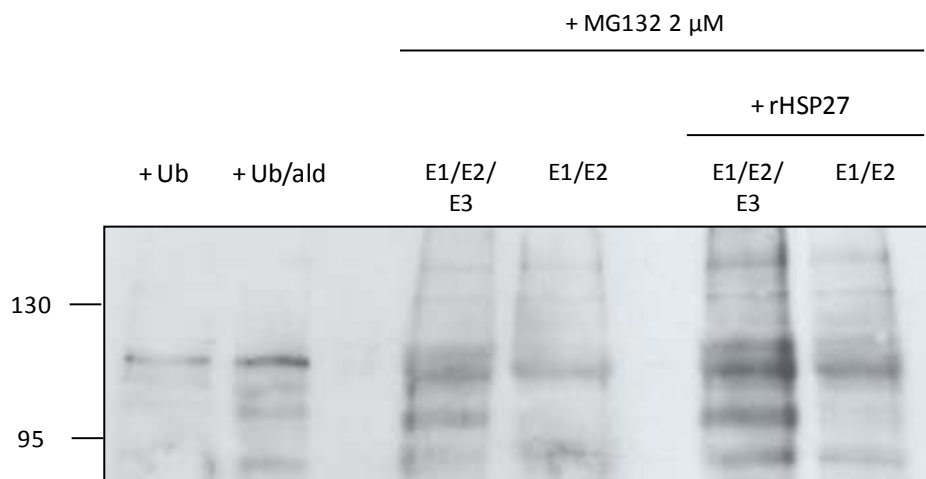


Figure 20. HSP27 stimule la polyubiquitination *in vitro* de HIF2 α . Tous les échantillons contiennent la protéine HIF2 α produite avec le kit TnT®. L'ubiquitine aldéhyde (ald) a été ajouté dans tous les échantillons résolus sur les pistes 2 à 6. Les fractions A ou B ont été rajoutées, avec ou sans la protéine HSP27 recombinante (rHSP27, 20 nM), et en présence de MG132 (2 μ M). La réaction a été incubée pendant 3 heures à 30°C avant d'être stoppée par ajout de tampon de charge.

Nous observons ici que l'inhibition du protéasome par le MG132 induit une légère augmentation de la bande correspondant à HIF2 α en présence d'E3 (piste 3). Quand on ajoute de la protéine HSP27 recombinante, on observe une augmentation de l'intensité de l'expression de HIF2 α , en présence d'E3 (piste 5). On constate également une légère augmentation de la bande en absence d'E3 (piste 6). La fraction A du kit est spécifiée contenir une majorité d'enzymes de type E3, nous ne savons pas si la ligase VHL en fait partie. Ce résultat confirme l'implication d'HSP27 dans l'ubiquitination de HIF2 α . Il suggère qu'HSP27 n'agirait pas en tant qu'E3 dans ce contexte, mais plutôt comme une E4 puisque l'augmentation du profil d'ubiquitination est observée en présence d'enzymes E3 (piste 5

versus piste 6). Cependant, il ne permet pas de conclure quant au mode d'action d'HSP27 vis-à-vis de VHL.

Les travaux précédemment publiés au sein de notre équipe ont montré qu'HSP27 pouvait s'associer avec les protéines dont elle favorisait l'ubiquitination, $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ et p27. Nous avons donc voulu vérifier si HSP27 était également capable d'interagir avec HIF2 α . Pour cela, nous avons réalisé des expériences de co-immunoprécipitation dans des cellules HeLa. Les cellules ont été transfectées pour surexprimer HIF2 α ou HIF2 α et HSP27. Après extraction des protéines totales, nous avons précipité la protéine HIF2 α . Les échantillons séparés par SDS-PAGE ont été testés pour l'expression d'HA-HSP27.

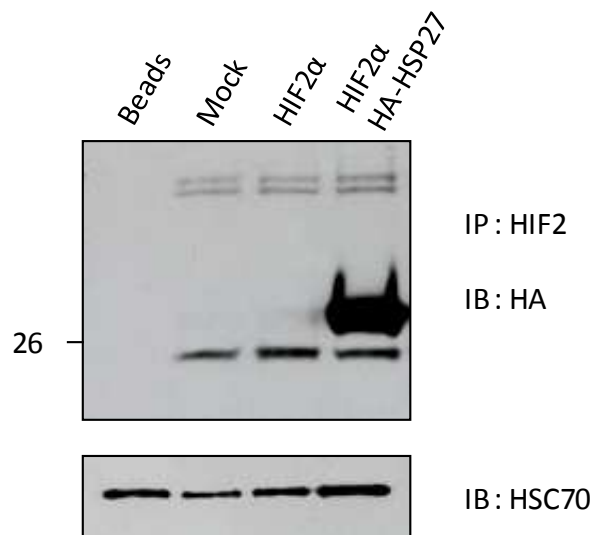


Figure 21. HSP27 interagit avec HIF2 α dans les cellules HeLa. Les cellules ont été lysées 24 h post-transfection. 600 μg d'extrait protéique total ont été incubés avec un anticorps reconnaissant HIF2 α . Après résolution des échantillons sur SDS-PAGE, l'expression de HIF2 α a été analysée.

La forte bande de cette figure indique que la protéine HIF2 α a été co-immunoprécipitée avec HSP27 lorsque les deux protéines étaient surexprimées (piste 4). Il manque à cette figure le contrôle d'immunoprécipitation de HIF2 α , ainsi que les contrôles d'expression de HIF2 α et HA-HSP27. Cette expérience a été tentée à de nombreuses reprises, en reprenant les mêmes conditions ou en introduisant des variations (extraction protéique 24h ou 48h post-

transfection, pondération des quantités de vecteurs codant pour chacune des deux protéines, traitement des cellules au MG132), mais nous n'avons pas encore répété ce résultat en ayant les contrôles requis.

HSP27 induit la dégradation de HIF2 α en l'absence de son E3 ligase VHL.

Nous avons vu que dans les cellules HeLa, l'effet d'HSP27 sur l'expression de HIF2 α a hypoxie seulement. Sachant que la protéine VHL est le régulateur primaire de HIF2 α , nous avons souhaité confirmer qu'HSP27 exerce cette modulation de HIF2 α de manière indépendante de VHL. Pour cela, nous avons répété les expériences avec des lignées dérivées de carcinome rénal humain à cellules claires, les lignées RCC4^{vhl^{-/-}} et RCC4^{vhl^{+/+}}. La lignée sauvage RCC4^{vhl^{-/-}} a été isolée chez un patient atteint de carcinome rénal à cellules claires, elle est déficiente pour le gène *VHL* et exprime donc constitutivement les sous-unités HIF α . La lignée RCC4^{vhl^{+/+}} est VHL fonctionnelle, le gène ayant été réintroduit par transfection stable. Ce choix nous permet d'étudier les effets de la surexpression d'HSP27 sur la protéine HIF2 α exprimée de manière endogène. Nous avons eu beaucoup de difficultés pour observer l'expression de HIF2 α par Western Blot. Nous avons testé plusieurs anticorps, dont la performance était la plupart du temps très peu reproductible. Nous avons donc essayé de renforcer l'expression endogène de HIF2 α en utilisant du chlorure de cobalt (CoCl₂). Cette espèce chimique est un agent chélateur du Fer(II), qui permet d'inhiber les PHDs qui nécessitent cet élément pour être actives, et induit un état dit pseudo-hypoxique. L'inhibition par le CoCl₂ présente aussi l'avantage d'induire directement la stabilisation des sous-unités HIF α , ce qui permet de se passer des autres événements intracellulaires induits par l'hypoxie. Là aussi, nous avons eu des difficultés pour obtenir l'effet recherché. La concentration habituellement utilisée dans la littérature se situe entre 100 μ M et 200 μ M. Nous avons testé une gamme allant de 50 μ M à 350 μ M et nous nous sommes heurtés à des problèmes de reproductibilité des résultats, en passant d'une expérience pour établir la meilleure concentration de CoCl₂ à utiliser aux expériences proprement dites. Nous avons alors choisi d'utiliser un incubateur hypoxique, permettant de cultiver les cellules et de réaliser les expériences dans une atmosphère dont on peut contrôler le taux d'oxygène. Nous avons réalisé des transfections pour surexprimer HSP27 dans les deux lignées RCC4^{vhl^{+/+}} et RCC4^{vhl^{-/-}} en condition de normoxie ou d'hypoxie. Les cellules contrôles ou surexprimant

HSP27 ont été placées pendant 4 heures en hypoxie à 1% d'oxygène ou conservées en normoxie.

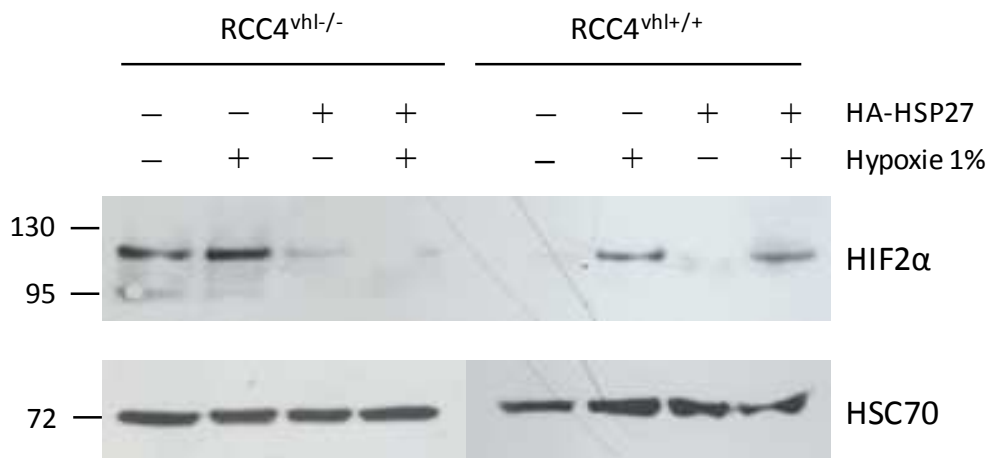


Figure 22. HSP27 induit la dégradation de HIF2α en l'absence de VHL. Les deux lignées RCC4^{vhl+/+} et RCC4^{vhl-/-} ont été transfectées avec un vecteur vide ou codant pour HA-HSP27. Les cellules sont cultivées en normoxie ou soumises à 4h d'hypoxie avant la lyse. Les cellules ont été lysées 24 h post-transfection et les protéines séparées par SDS-PAGE. HSC70 sert de contrôle de charge.

Nous observons bien l'expression endogène de HIF2α dans la lignée RCC4^{vhl-/-}, ce qui était attendu (pistes 1-2). Les cellules RCC4^{vhl+/+} ne présentent pas d'expression visible de HIF2α en normoxie (piste 5). La bande correspondant à HIF2α réapparaît lorsque ces cellules ont été incubées en hypoxie (piste 6). Nous constatons que la surexpression d'HSP27 dans la lignée RCC4^{vhl-/-} induit la disparition de l'expression de HIF2α en normoxie et en hypoxie (pistes 3-4). En revanche dans des cellules RCC4^{vhl+/+} surexprimant HSP27, nous n'observons plus d'effet sur la stabilité de HIF2α, (pistes 7-8 *versus* pistes 5-6). Il semble que dans ce cas-là, la dégradation de HIF2α induite par la surexpression d'HSP27 ne soit pas liée au taux d'oxygène auquel sont exposées les cellules, mais plutôt à la présence de VHL ou non.

Dans cette figure, il manque le contrôle de la surexpression d'HSP27. Un des principaux obstacles dans les expériences que nous avons menées est la différence de poids moléculaires entre HIF2α (environ 115 kDa) et HSP27 (27 kDa). Ceci nous obligeait à réaliser systématiquement deux gels de résolutions différentes, afin de pouvoir visualiser correctement chacune des deux protéines, les bandes de poids moléculaires correspondant à HIF2α étant en général très fines. En effet, pour pouvoir évaluer des différences d'expression de HIF2α, nous avons dû réaliser des gels avec un faible pourcentage d'acrylamide (moins de

7%). HIF2 α peut être détectée avec un gel d'une résolution inférieure pour les hauts poids moléculaires, mais les bandes sont trop « écrasées » pour pouvoir distinguer des variations. En dépit de l'optimisation réalisée pour favoriser une expression maximale de HIF2 α , nous avons dû souvent déposer sur gel des quantités de protéines très élevées (jusqu'à 150 μ g) de protéines pour détecter HIF2 α . Il nous a donc fallu répéter de très nombreuses fois les expériences pour arriver à visualiser HIF2 α , tout en ayant assez d'échantillons restants pour le contrôle d'expression d'HSP27. Nous n'avons pas réussi à détecter les deux protéines à partir de la même série d'échantillons.

Nous avons montré qu'HSP27 pourrait s'associer avec HIF2 α dans les cellules HeLa. Nous avons voulu déterminer si cela était aussi le cas dans les cellules RCC4^{vhl^{-/-}}. Il était d'autant plus intéressant de vérifier une éventuelle interaction d'HSP27 avec HIF2 α dans ce modèle, étant donné que nos données suggéraient qu'HSP27 induit la dégradation de HIF2 α dans les cellules RCC4^{vhl^{-/-}} en l'absence de VHL. Nous avons donc répété des expériences de co-immunoprécipitation dans ces cellules, là encore en testant plusieurs conditions d'expérimentation. Nous avons pu observer l'interaction entre les protéines endogènes HSP27 et HIF2 α , dans les cellules RCC4^{vhl^{-/-}} non transfectées et non traitées.



Figure 23. Les protéines endogènes HSP27 et HIF2 α s'associent dans les cellules RCC4^{vhl^{-/-}}. Les cellules ont été cultivées pendant 24 h en normoxie avant d'être lysées. 600 μ g d'extrait protéique total ont été incubés avec un anticorps reconnaissant HIF2 α . Après résolution des échantillons sur SDS-PAGE, l'expression de HIF2 α a été analysée.

Ici aussi, la figure est incomplète, malgré de nombreuses tentatives de répétition, à cause des problèmes techniques déjà décrits. La protéine HSP27 est bien précipitée (piste 2). La bande de la piste 3 indique qu'HSP27 est présente parmi les protéines qui ont été coimmunoprécipitées avec HIF2 α .

Les modalités de la dégradation induite par HSP27 semblent différentes entre les deux modèles que nous avons utilisés. Dans le cas des cellules HeLa, HSP27 semble induire la dégradation de HIF2 α uniquement en condition d'hypoxie. En revanche, dans notre modèle de cellules de carcinome rénal, HSP27 diminue le niveau d'expression de HIF2 α dans les cellules dépourvues de la protéine VHL. A ce niveau, nous ne pouvons pas conclure quant à cette différence. Il faudrait répéter les expériences dans les cellules HeLa en modulant l'expression de VHL, pour vérifier si ce paramètre a la même influence que dans les cellules RCC4vhl^{-/-}. Par ailleurs, il serait important également de déterminer le statut d'oligomérisation d'HSP27 dans ces deux modèles cellulaires, et selon les conditions d'oxygénation expérimentées, et d'évaluer son influence sur cet effet d'HSP27.

PARTIE II. Régulation de HIF2 α par HSP90

Dans la deuxième partie de ce travail de thèse, nous nous sommes ensuite intéressés au rôle d'HSP90 dans la régulation de HIF2 α .

HSP90 α et HSP90 β stabilisent HIF2 α dans les cellules HeLa.

Nous avons montré précédemment que la surexpression d'HSP90 α induit la stabilisation de HIF2 α . HSP90 possède deux isoformes HSP90 α et HSP90 β dont la distinction fonctionnelle est mal connue. Nous avons déterminé leur capacité respective à réguler l'expression de HIF2 α . Pour cela, nous avons transfecté des doses croissantes de vecteurs codant pour chacune des isoformes, ainsi que le vecteur codant pour HIF2 α dans des cellules HeLa. et déterminé l'expression de HIF2 α 24 heures post-transfection.

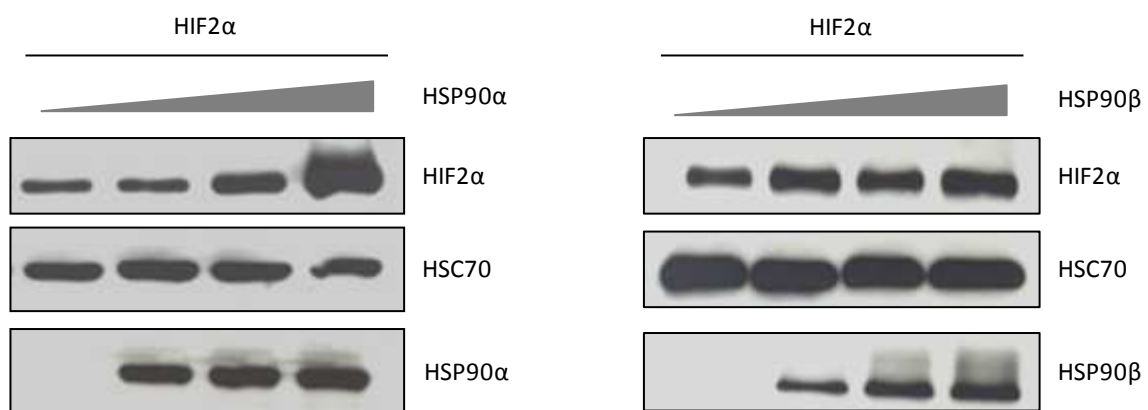


Figure 24. Effet stabilisateur d'HSP90 α et HSP90 β sur l'expression de HIF2 α . Les cellules HeLa ont été transfectées pour exprimer HIF2 α et une dose croissante de chacune des isoformes d'HSP90. Les cellules sont cultivées en normoxie puis soumises à 4h d'hypoxie juste avant la lyse. Les cellules ont été lysées 24 h post-transfection et les protéines séparées par SDS-PAGE. HSC70 sert de contrôle de charge.

Nous observons que l'expression de HIF2 α augmente en présence d'une quantité croissante d'HSP90, quelle que soit l'isoforme. HSP90 α a un effet stabilisateur sur HIF2 α nettement plus prononcé qu'HSP90 β . Nous avons ensuite vérifié que cette augmentation se produisait également sur la protéine HIF2 α endogène. Etant donné que l'effet le plus fort observé précédemment avec HSP90 a été obtenu à la plus forte concentration testée, nous avons augmenté les doses afin de déterminer le plateau maximum de l'effet.

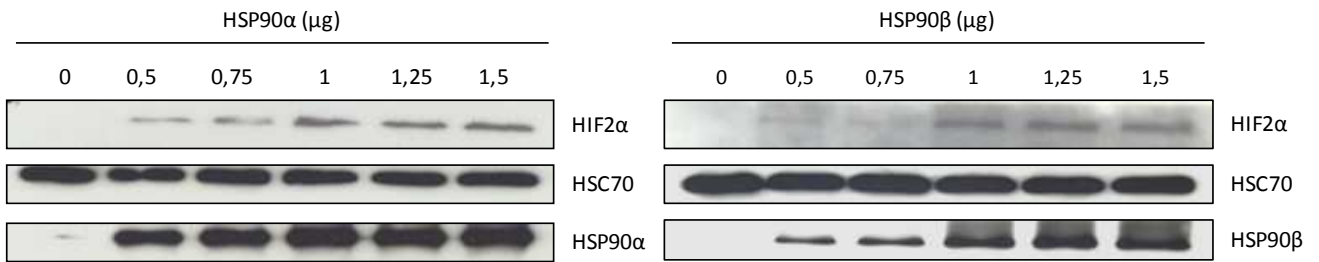


Figure 25. Effet stabilisateur d’HSP90 α et HSP90 β sur l’expression endogène de HIF2 α . Les cellules ont été transfectées pour exprimer des doses croissantes de chacune des isoformes d’HSP90. Les cellules sont cultivées en normoxie puis soumises à 4h d’hypoxie avant la lyse. Les cellules ont été lysées 24 h post-transfection et les protéines séparées par SDS-PAGE. HSC70 sert de contrôle de charge.

Nous observons une augmentation de l’expression de HIF2 α à partir de 0,5 μ g d’HSP90 α . L’effet stabilisateur d’HSP90 β semble plus faible. Nous constatons donc qu’HSP90 est capable de stabiliser la protéine HIF2 α , qu’elle soit d’origine endogène ou exogène. Ceci est en accord avec un article décrivant qu’HIF2 α est une protéine cliente d’HSP90, à l’instar de HIF1 α . L’isoforme HSP90 α semble cependant plus efficace, c’est pourquoi nous l’utiliserons préférentiellement par la suite.

L’inhibition d’HSP90 par le 17-DMAG déstabilise HIF2 α .

Afin de confirmer la capacité de HSP90 à stabiliser HIF2 α , nous avons utilisé un inhibiteur de HSP90, le 17-DMAG. Ce dérivé de l’inhibiteur naturel geldanamyine est une molécule actuellement en essais cliniques de phases I et II comme traitement anticancéreux.

Le 17-DMAG a tout d’abord été testé sur les cellules HeLa cotransfectées pour surexprimer HIF2 α et HSP90 α . Les cellules ont été traitées avec du 17-DMAG à une concentration sublétales de 250nM en accord avec la littérature et nous avons analysé l’expression de HIF2 α en réponse à ce traitement.

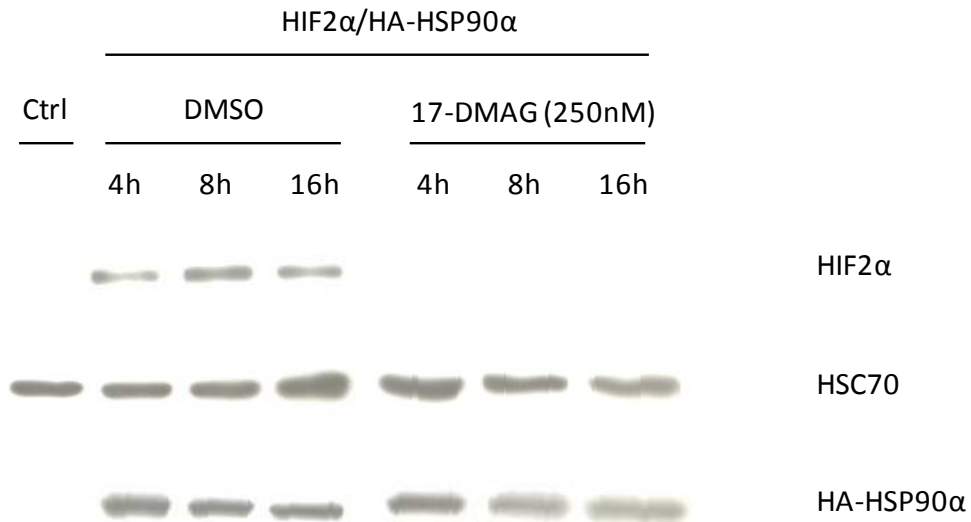


Figure 26. Effet du 17-DMAG sur l'expression de HIF2 α dans les cellules HeLa. Les cellules ont été cotransfectées pour exprimer HSP90 α et HIF2 α , et traitées ou non avec du 17-DMAG (250nM) pendant 4h, 8h, ou 16h. Les cellules ont été lysées 24 h post-transfection et les protéines détectées par SDS-PAGE. HSC70 sert de contrôle de charge.

Nous observons une déstabilisation complète de HIF2 α avec 250 nM de 17-DMAG. Nous avons ensuite voulu déterminer si HSP90 est également impliquée dans la stabilisation de HIF2 α dans l'autre modèle cellulaire que nous avons utilisé précédemment, la lignée RCC4^{vh1-/-}. Nous avons transfectées ces cellules pour qu'elles expriment HSP90 α et réalisé une gamme de doses croissantes de 17-DMAG, puis analysé l'expression de HIF2 α (figure 27).

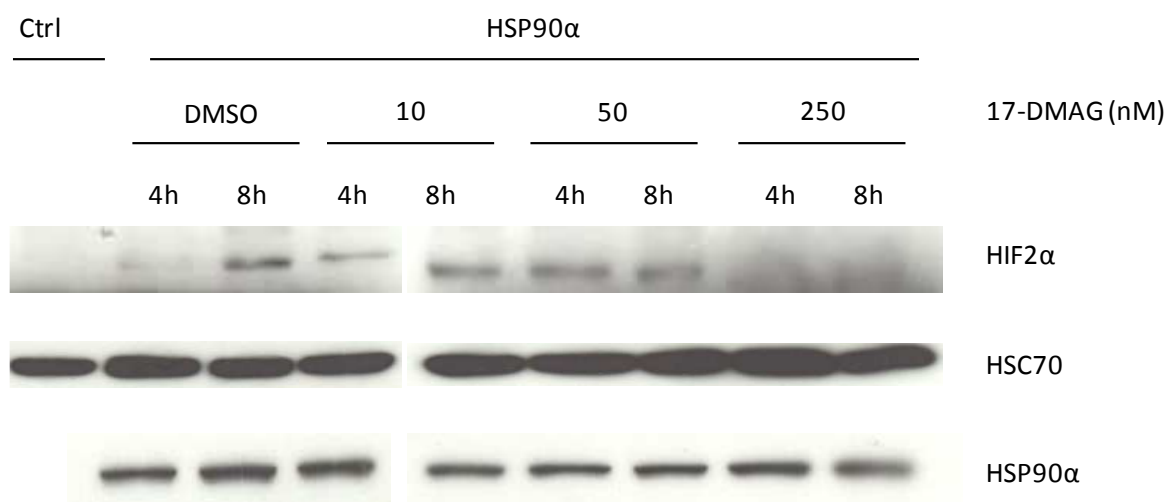


Figure 27. Effet du 17-DMAG sur l'expression de HIF2α dans les cellules RCC4^{vhl-/-}. Les cellules ont été transfectées pour exprimer HSP90α. Les cellules ont été traitées par le 17-DMAG à des concentrations de 10, 50 ou 250 nM pendant 4h ou 8h, les cellules sont ensuite lysées.

Nous observons qu'HSP90α stabilise bien l'expression de HIF2α, comme montré précédemment. Lorsque les cellules ont été traitées par le 17-DMAG à une concentration, nous observons une diminution de l'expression de HIF2α à la dose de 17-DMAG de 250nM (piste 8-9), comme cela avait été observé dans les cellules HeLa.

Effets du 17-DMAG sur la synthèse de VEGF

La synthèse du facteur proangiogénique VEGF est sous la dépendance de HIF2α dans les cellules de carcinome rénal RCC4^{vhl-/-}. La stabilisation de HIF2α par HSP90 pourrait donc avoir un effet sur la production de VEGF. Afin de tester cette hypothèse, nous avons étudié par des expériences de test ELISA l'effet du traitement par le 17-DMAG sur la production de VEGF par les cellules RCC4^{vhl-/-} en présence ou absence de surexpression de HIF2α.

Nous avons premièrement vérifié que la synthèse de VEGF dépend bien de l'expression de HIF2α dans notre modèle. Pour cela, nous avons déplété la protéine HIF2α par un siRNA spécifique (figure 28).

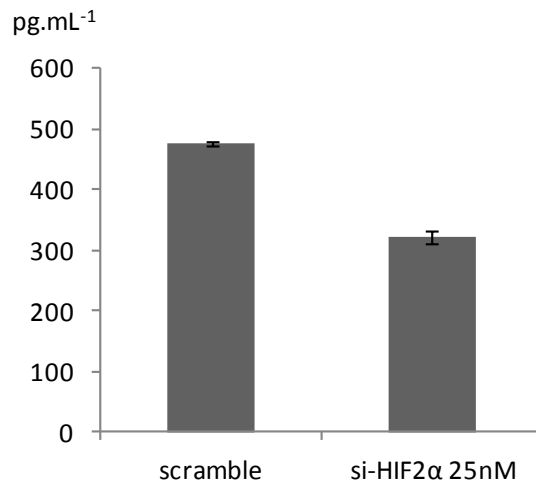


Figure 28. Effet de la déplétion de HIF2 α sur la sécrétion de VEGF par les cellules RCC4^{vh1/-}. Les cellules ont été transfectées par un siRNA contrôle (scramble) ou si-HIF2 α (25nM). Les milieux de culture ont été récupérés après 24h et la concentration en VEGF déterminée par ELISA.

Nous constatons que la déplétion de HIF2 α par interférence ARN induit une réduction de la concentration en VEGF dans le milieu de culture de l'ordre de 33%. Il manque ici une image de gel montrant que l'expression de HIF2 α a bien été déplétée par la transfection du siRNA. Nous avons ensuite testé l'effet du 17-DMAG sur la production de VEGF par les cellules RCC4^{vh1/-} ayant été transfectées pour surexprimer l'isoforme HSP90 α (figure 29).

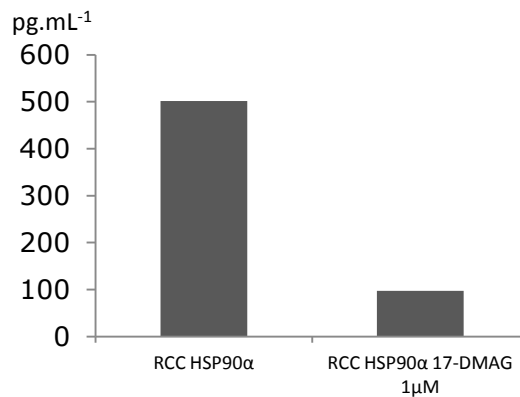


Figure 29. Effet du 17-DMAG sur la sécrétion de VEGF par les cellules RCC4^{vh1/-}. Les cellules ont été transfectées pour exprimer HSP90 α . Le lendemain, le milieu est remplacé par du milieu sans sérum avec ou sans 17-DMAG (1 μ M). Le milieu a été changé au bout de 8 h par du milieu frais sans sérum contenant du 17-DMAG (1 μ M). Les milieux de culture ont été récupérés après 24h et la concentration en VEGF déterminée par ELISA.

Le 17-DMAG induit une forte diminution (80%) de la concentration en VEGF dans le milieu de culture. Cet effet est nettement plus marqué que dans l'expérience précédente où HIF2 α était déplétée. Nous ne pouvons pas réellement conclure à partir de cette figure que le 17-DMAG induit une diminution de la sécrétion du VEGF seulement par la déstabilisation de HIF2 α . En effet, l'état actuel de ces données ne nous permet pas d'estimer l'effet du siRNA ou du traitement par le 17-DMAG sur le niveau d'expression de HIF2 α . Nous avons par la suite vérifié l'effet du 17-DMAG sur la sécrétion de VEGF par des cellules RCC4^{vhl-/-} ne surexprimant pas HSP90 α .

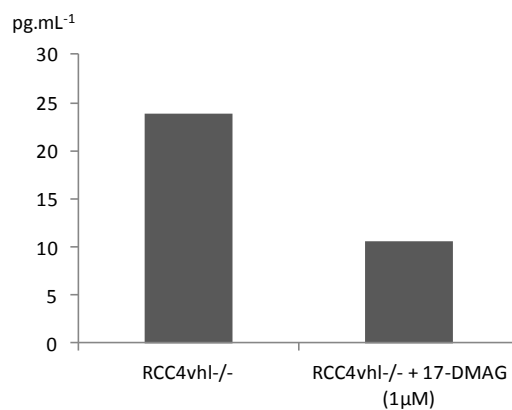


Figure 30. Effet du 17-DMAG sur la sécrétion de VEGF par les cellules RCC4^{vhl-/-} ayant une expression basale d'HSP90. Après 24 h de culture, le milieu est remplacé par du milieu sans sérum avec ou sans 17-DMAG (1μM). Le milieu a été changé au bout de 8 h par du milieu frais sans sérum contenant du 17-DMAG (1μM). Les milieux de culture ont été récupérés après 24h et la concentration en VEGF déterminée par ELISA.

Nous observons tout d'abord une plus faible concentration de VEGF dans le milieu de culture des cellules RCC4^{vhl-/-} non transfectées et non traitées, par rapport à l'expérience précédente où ces cellules surexprimaient HSP90 α . Cela était attendu, les protéines HIF α étant précédemment plus stables à cause de la surexpression de HSP90 α . Nous constatons que l'inhibition de l'HSP90 strictement endogène induit toujours une diminution de la concentration en VEGF dans le milieu de culture. Cette diminution (\approx 50%) est toutefois moins marquée que dans l'expérience précédente. Les niveaux de concentration du VEGF dans le milieu extracellulaire sont toutefois beaucoup plus faibles que dans l'expérience précédente, ce qui peut difficilement s'expliquer seulement par l'effet stabilisateur de la transfection d'HSP90 α , comparé à l'effet stabilisateur des protéines HSP90 endogènes seules. Comme le 17-DMAG inhibe indifféremment les deux isoformes d'HSP90, il aurait fallu évaluer

l'expression totale d'HSP90 dans les deux cas. Par ailleurs, il serait judicieux, pour évaluer la contribution réelle de HIF2 α dans la production de VEGF, et donc l'effet d'HSP27 sur ce phénomène, de répéter ces expériences en comparant ce qui se passe entre la lignée RCC4^{-/-} et une lignée de cellules de carcinome rénal n'exprimant que HIF2 α , comme la lignée 786-0.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Régulation de HIF2 α par HSP27

Dans le premier volet de ce travail, nous avons étudié le rôle éventuel d'HSP27 dans la régulation de la protéine HIF2 α . Nos premiers résultats montrent que la surexpression d'HSP27 et d'HIF2 α par cotransfection transitoire dans des cellules HeLa induit une diminution de l'expression de la protéine HIF2 α (figure 15). En introduisant dans le même processus expérimental une condition d'oxygénation (normoxie ou hypoxie à 1% d'oxygène), nous avons constaté que la surexpression d'HSP27 induit là aussi une baisse dans le niveau d'expression protéique de HIF2 α , mais uniquement dans le cas des cellules placées en hypoxie (figure 16). Les cellules HeLa normoxiques coexprimant HSP27 et HIF2 α présentent un niveau d'expression de HIF2 α comparable à celui retrouvé dans les cellules normoxiques qui ne surexpriment qu'HIF2 α (figure 16). Ceci suggère que l'effet observé d'HSP27 sur l'expression de HIF2 α dépend de l'inactivité des PHDs, ou de l'absence d'interaction entre HIF2 α et VHL.

Par la suite, nous avons voulu déterminer si cet effet sur l'expression de HIF2 α dépendait du protéasome. Nous avons réalisé un essai de co-immunoprécipitation de l'ubiquitine et de HIF2 α dans les cellules HeLa transfectées ou non pour surexprimer HSP27. Nous avons observé là encore que la cotransfection d'HSP27 induit la diminution de l'expression de HIF2 α . L'inhibition du protéasome par son inhibiteur MG132 induit une forte augmentation des espèces ubiquitinées, et notamment provoque la réapparition d'une bande assez forte correspondant à HIF2 α (figure 17). Dans un autre essai *in vitro* basé sur des lysats de réticulocytes de lapin, nous avons également observé suite à l'inhibition protéasomale une augmentation des bandes correspondant à des formes ubiquitinées de HIF2 α (figure 18). Ces deux résultats montrent que la baisse d'expression de HIF2 α induite par HSP27 dépend du protéasome, comme cela avait été montré pour les protéines p27 et I κ B α .

Comme nous avons montré que cet effet d'HSP27 avait lieu en hypoxie, et que VHL est le régulateur primaire de HIF2 α , nous avons souhaité confirmer qu'HSP27 exerce cette modulation de HIF2 α de manière indépendante de VHL. Pour cela, nous avons répété les expériences avec les lignées RCC4^{vhl+/+} et RCC4^{vhl-/-} dérivées de carcinome rénal humain à cellules claires. La lignée RCC4^{vhl-/-} est déficiente pour le gène *VHL* et exprime donc

constitutivement les protéines HIF. La lignée correspondante RCC4^{vhl^{+/+}} est quant à elle VHL fonctionnelle, le gène ayant été réintroduit de manière stable. Cela avait un double avantage : pouvoir comparer l'effet d'HSP27 sur l'expression de HIF2 α en fonction de la présence de VHL et se placer dans un contexte plus proche de conditions biologiques en évitant d'avoir à surexprimer HIF2 α en plus d'HSP27. Nous avons constaté que la surexpression d'HSP27 dans la lignée RCC4^{vhl^{-/-}} induit la disparition de l'expression de HIF2 α en normoxie et en hypoxie. En revanche dans des cellules RCC4^{vhl^{+/+}} surexprimant HSP27, nous n'observons plus d'effet sur la stabilité de HIF2 α (figure 20). Il semble que dans ce cas-là, la dégradation de HIF2 α induite par la surexpression d'HSP27 ne soit pas liée au taux d'oxygène auquel sont exposées les cellules, mais plutôt à la présence ou non de VHL. Dans les cellules HeLa, nous avons observé que c'était l'hypoxie qui déterminait la dégradation de HIF2 α induite par HSP27. Pour résoudre cette contradiction, nous avons essayé d'éteindre la fonction VHL dans les cellules HeLa, en transfectant transitoirement un plasmide codant pour une protéine VHL mutée sur un résidu critique permettant l'interaction avec les sous-unités HIF α . Nous avons eu malheureusement beaucoup de difficultés à visualiser la protéine VHL avec les anticorps testés. Un autre moyen de déterminer si HSP27 peut favoriser l'ubiquitination de HIF2 α indépendamment de VHL, serait de faire d'autres essais *in vitro* avec les enzymes E1 et E2 requises, en présence ou non de VHL recombinante. Nous avons par ailleurs réalisé des tests ELISA pour évaluer la production de VEGF dans nos modèles cellulaires, suivant le niveau d'expression d'HSP27, sans réussir à observer de variation significative.

D'un point de vue mécaniste, il reste à déterminer si HSP27 peut agir comme une E3 (ligase de l'ubiquitine) ou comme une E4 qui faciliterait l'allongement de la chaîne d'ubiquitine. Il avait été observé qu'HSP27 contribue à la monoubiquitination de p27^{Kip1} (Parcellier *et al.*, 2006). Il serait intéressant de déterminer si HSP27 peut également faciliter l'amorçage de la chaîne d'ubiquitine sur HIF2 α , ou si elle intervient plutôt dans l'élongation de la chaîne. Déterminer sous quelle forme HSP27 peut favoriser la dégradation de HIF2 α pourrait indiquer si HSP27 stimule directement l'ubiquitination, ou indirectement (*via* la sumoylation). En effet, en conditions de stress, HSP27 active de manière générale le protéasome sous la forme de petits oligomères (Parcellier *et al.*, 2006), alors qu'elle stimule la sumoylation du facteur HSF1 sous la forme de grands oligomères (Brunet Simioni *et al.*, 2009). Pour cela, nous pouvons utiliser les mutants de phosphorylation d'HSP27, le mutant

non phosphorylable HSP27-3A et le mutant phosphomimétique HSP27-3D, et étudier de quelle manière leur transfection affecte l'expression et l'activité de HIF2 α .

On peut envisager qu'HSP27 stimule la dégradation de HIF2 α indirectement. En effet, des travaux de notre équipe ont montré qu'HSP27 peut se lier à HSF1 pour stimuler sa sumoylation par SUMO2 (Brunet Simioni et al., 2009). Or, une étude récente indique qu'HIF2 α est une cible pour la sumoylation et que la conjugaison de SUMO2 à HIF2 α facilite sa dégradation par VHL (van Hagen *et al.*, 2010). Comme nos résultats laissent supposer qu'HSP27 peut se lier à HIF2 α (figures 19 et 21), il est envisageable qu'HSP27 puisse intervenir dans la régulation par sumoylation de HIF2 α . Cependant, ces auteurs ont montré que la liaison de SUMO2 à HIF2 α a lieu en hypoxie. Dans un cadre de rétrocontrôle de la réponse hypoxique, cela serait en accord avec un rôle éventuel pour HSP27 dans la régulation de la sumoylation de HIF2 α . Nous avons montré que la surexpression d'HSP27 induit la dégradation de HIF dans les cellules HeLa hypoxiques. Il serait intéressant d'étudier si HSP27 peut induire la sumoylation de HIF2 α dans ce modèle, et si cela affecte l'ubiquitination de HIF2 α . Il faudrait pour cela utiliser des mutants de HIF2 α , dans lesquels les résidus lysine cibles de la sumoylation sont modifiés, et vérifier l'influence de ces modifications sur l'ubiquitination de HIF2 α induite par HSP27.

Ces résultats concernant l'effet d'HSP27 amènent plusieurs commentaires. Il est tentant de penser que cet effet d'HSP27 sur l'expression de HIF2 α pourrait être exploité à vue thérapeutique dans le traitement du cancer. Il me semble important de rappeler ici le fait que nous avons utilisé les lignées RCC4^{vhl+/+} et RCC4^{vhl-/-} pour faciliter notre étude, étant donné leur expression endogène des protéines HIF α . Ce choix n'a pas été initialement fait pour étudier spécifiquement le rôle d'HSP27 dans ce type de tumeur. Nos résultats ne nous permettent pas de conclure quant à un effet antitumorigène d'HSP27 qui serait médié par la dégradation de HIF2 α . Ceci serait par ailleurs en contradiction avec ce qui est connu de l'activité d'HSP27 au sein des cellules cancéreuses. En effet, HSP27 est connue pour ses propriétés protumorigènes. De manière générale, il paraît donc contre-intuitif qu'HSP27 puisse réguler négativement une protéine telle qu'HIF2 α jouant un rôle important dans la progression tumorale (Qing & Simon, 2009). Il faudrait répéter ces expériences dans d'autres

lignées cancéreuses, afin de déterminer si cet effet peut être étendu à des types de cancers autres que le carcinome rénal, ou s'il est spécifique de ces tumeurs. Nous avons voulu confirmer cet effet d'HSP27 dans un modèle *in vivo* de souris *nude*, dans lesquelles nous aurions réalisé des xénogreffes de cellules RCC4^{vhl+/+} ou RCC4^{vhl-/-} surexprimant ou non HSP27. L'idée était de voir si le fait de surexprimer HSP27 influencerait la croissance tumorale et sa vascularisation (le VEGF étant une cible de HIF2 α dans ces tumeurs). Nous n'avons pas réussi à obtenir des tumeurs ayant une croissance correcte dans le laps de temps qu'il nous restait. Par exemple, des souris contrôles ayant reçu une injection de cellules RCC4^{vhl-/-} sauvages présentaient une régression spontanée rapide de la tumeur très rapidement après la prise. Lors d'une autre tentative de greffe, les tumeurs n'ont commencé à apparaître qu'au bout de six semaines chez une ou deux souris dans chaque groupe, pour croître très peu ensuite, ce qui ne nous a pas permis d'observer de différences significatives dans la croissance tumorale. Par ailleurs, compte tenu du fait que moins de la moitié des souris dans chaque groupe présentaient une (faible) pousse de tumeur, le résultat obtenu n'aurait pas été significatif. Il est important de répéter ces expériences *in vivo*, ce qui permettrait de confirmer ou non les résultats obtenus lors de nos travaux sur des modèles cellulaires.

On peut émettre l'hypothèse qu'HSP27 participerait au rétrocontrôle de HIF2 α suite à un stress hypoxique, à l'image de la régulation qu'elle exerce sur l'activité transcriptionnelle du facteur de transcription HSF1 (Brunet Simioni *et al.*, 2009). Dans le contexte de HIF, l'implication d'HSP27 dans ce rétrocontrôle se ferait par régulation de la stabilité protéique. Cependant, un certain nombre de mécanismes de rétrocontrôle de l'expression et/ou de l'activité de HIF sont déjà connus. Par exemple, le variant HIF3 α 2 (IPAS) aurait un rôle dans le rétrocontrôle de la réponse cellulaire à l'hypoxie, étant lui-même induit par HIF1 (Maynard *et al.*, 2005). Toutefois, au niveau de la régulation de la stabilité des protéines HIF, un rétrocontrôle est assuré par les PHDs. En effet, les gènes *PHD2* et *PHD3* sont induits par l'hypoxie (Fong & Takeda, 2008). Il est possible que d'autres mécanismes existent pour que la cellule puisse contrôler finement l'expression des HIF. Cependant, il est probable que leur implication reste marginale. Le modèle des lignées de carcinome rénal n'est plus idéalement adapté pour répondre à cette question. En effet, il s'agit de cellules issues d'une tumeur avancée, dans laquelle différents mécanismes se sont mis en place pour favoriser l'expression des HIFs, indépendamment du défaut de régulation par VHL. Pour vérifier l'hypothèse

qu'HSP27 serait impliquée dans le rétrocontrôle de la réponse hypoxique, il faudrait par exemple réaliser des cinétiques d'expression dans des lignées cellulaires non transformées, et comparer les profils d'expression d'HSP27 et de HIF2 α après divers temps d'hypoxie et de réoxygénation. La transfection d'une construction plasmidique codant pour l'expression d'HSP27 sous le contrôle d'un promoteur de type HRE, dans des cellules dépourvues d'expression endogène d'HSP27 et placées en hypoxie pendant divers intervalles de temps, permettrait d'évaluer directement si l'HSP27 induite par l'hypoxie aurait un effet inhibiteur sur l'expression de HIF à un moment donné de la réponse hypoxique.

Régulation de HIF2 α par HSP90

Dans la deuxième partie de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés au rôle d'HSP90 dans la régulation de la protéine HIF2 α . L'inhibition de l'angiogenèse est un des grands chantiers actuels dans la recherche de traitements anticancéreux, ce domaine s'est considérablement développé depuis l'élucidation des rôles biologiques de HIF. Le développement de molécules ciblant très spécifiquement des acteurs du processus de l'angiogenèse, en particulier dirigé contre le VEGF, a connu un rapide essor. Cependant, en dépit de résultats précliniques prometteurs, le bénéfice clinique des premières générations d'agents antiangiogéniques spécifiques s'est révélé décevant. En effet, malgré une réponse initiale satisfaisante, il apparaît rapidement au sein des tumeurs des mécanismes de résistance adaptative (Martinive & Coucke, 2010). Cette résistance peut s'expliquer en grande partie par la résilience du réseau de signalisation angiogénique, due à la multiplicité des cytokines impliquées, qui rend inefficace l'inhibition spécifique d'une seule cible. C'est pourquoi l'utilisation d'agents chimiothérapeutiques inhibant HSP90 a récemment attiré l'attention. En effet, la geldanamycine (GA), inhibiteur prototypique d'HSP90, exerce des effets autant antitumorigènes qu'antiangiogéniques (Neckers, 2006 ; Sanderson *et al.*, 2006). L'attractibilité d'HSP90 en tant que cible thérapeutique est due au fait que l'inhibition de cette seule protéine permet de réguler l'activité des très nombreuses cibles dont elle contrôle l'activité.

Nous avons déjà souligné l'existence de travaux concernant le rôle de HSP90 dans la régulation de HIF1 α . S'il est connu qu'HIF1 α est une protéine cliente d'HSP90 et qu'HSP90 interagit également avec HIF2 α (Minet *et al.*, 1999 ; Isaacs *et al.*, 2002 ; Katschinski *et al.*,

2004), il n'existait pas à notre connaissance de travaux publiés décrivant expressément l'effet de l'inhibition d'HSP90 sur la stabilité et l'activité de HIF2 α . Il a déjà été mentionné qu'HSP90 interagit avec HIF1 α mais aussi avec HIF2 α , ce qui suggère un rôle général d'HSP90 dans la régulation de HIF (Katschinski *et al.*, 2004). Ces auteurs montrent que dans un modèle de cellules souches embryonnaires ES déficientes pour l'isoforme HSP90 β , l'accumulation nucléaire de HIF1 α est retardée en hypoxie. Ils n'ont en revanche pas montré que cela était aussi le cas pour HIF2 α . Nous montrons qu'HSP90 stabilise l'expression de HIF2 α (figures 22 et 23). L'inhibition d'HSP90 par le 17-DMAG induit la déstabilisation de HIF2 α (figures 24 et 25). Nos résultats suggèrent que l'isoforme HSP90 α aurait un effet stabilisateur plus important que celui de l'isoforme HSP90 β (figure 22). Cela est intéressant car l'isoforme HSP90 α est surexprimée dans les cellules cancéreuses, et l'activation de nombreuses protéines clientes d'HSP90 est plus efficace quand elle est réalisée par HSP90 α plutôt que par HSP90 β (Millson *et al.*, 2007). La connaissance des fonctions spécifiques à chaque isoforme reste faible (Sreedhar *et al.*, 2004 ; Bohonowych *et al.*, 2010) et les inhibiteurs actuels d'HSP90 ne permettent pas de discriminer l'une ou l'autre des deux isoformes. Le développement d'inhibiteurs d'HSP90 permettant de sélectionner l'isoforme HSP90 α pourrait s'avérer utile pour inhiber HIF, parmi d'autres cibles d'intérêt.

Les effets obtenus sur la synthèse de VEGF par le traitement des cellules RCC4 avec le 17-DMAG (figures 26 à 28) suggèrent que les inhibiteurs d'HSP90 pourraient s'avérer intéressants dans le cas des tumeurs dont la progression est étroitement corrélée à l'expression de HIF2 α et non HIF1 α . C'est le cas du carcinome rénal à cellules claires, pour lequel il a été clairement établi qu'HIF2 α est nécessaire et suffisant pour l'induction de l'angiogenèse. Une corrélation a aussi été établie entre l'expression de HIF2 α et un mauvais pronostic dans d'autres types de tumeur comme les cancers du poumon à non-petites cellules (NSCLC, *non small cell lung cancer*) et les neuroblastomes (Qing & Simon, 2009).

Cependant, certains auteurs ont émis récemment l'hypothèse qu'HIF2 α peut être de manière générale un déterminant de la progression tumorale, au-delà de son rôle certain dans l'angiogenèse. Franovic *et coll.* démontrent que dans des tumeurs d'origines génétiques diverses (c'est-à-dire arborant des mutations de différents oncogènes ou gènes suppresseurs de tumeurs), HIF2 α confère aux cellules tumorales des propriétés de croissance autonome *via* l'activation des récepteurs à tyrosine kinases comme l'EGFR et l'IGFR1 (Franovic *et al.*, 2009). Ils proposent que dans la majorité des tumeurs solides, des événements génétiques

(mutations) ainsi que le microenvironnement tumoral contribuent à la stabilisation de HIF2 α , qui maintient alors un phénotype prolifératif persistant. Dans ce cadre là, HIF2 α peut être initialement activé par des événements distincts (incluant la perte fonctionnelle du gène *VHL*), mais son activation est amplifiée pendant la progression, par exemple par l'hypoxie intratumorale (Franovic & Lee, 2010). Il a également été montré par des expériences d'ingénierie génétique, que des cellules ES ayant un fond génétique nul pour *HIF1A* et dans lesquelles le gène *EPAS1* a été introduit au locus *HIF1A* (« knock-in »), génèrent des tératomes plus prolifératifs et vascularisés que des cellules ES contrôles non modifiées (Covello *et al.*, 2005). D'autres auteurs se sont intéressés aux causes pouvant expliquer les différences de régulation en hypoxie entre HIF1 α et HIF2 α précédemment montrées par d'autres groupes de recherche (Uchida *et al.*, 2004 ; Holmquist *et al.*, 2006). Leurs résultats suggèrent qu'HIF2 α serait responsable de l'adaptation cellulaire à une hypoxie chronique telle que celle qui s'installe au sein des tumeurs solides (Lin *et al.*, 2011).

Un autre groupe a découvert récemment un mécanisme supplémentaire de régulation des protéines HIF, qui supporte cette idée qu'HIF2 α est le promoteur majeur de la progression tumorale. Koh et coll. ont montré que la protéine HAF (*Hypoxia-associated factor*), qui est surexprimée dans divers types tumoraux, a une fonction d'E3 ligase capable de lier et ubiquitiner HIF1 α (Koh *et al.*, 2008). Ils ont par la suite démontré que HAF est également capable d'interagir avec HIF2 α , mais que cette interaction augmente l'activité transcriptionnelle de HIF2 α . Ces résultats suggèrent que HAF serait un élément essentiel dans l'établissement d'un autre switch tumoral (en plus du switch angiogénique déjà décrit), par lequel la tumeur acquerrait un phénotype beaucoup plus agressif, à cause d'une transition de l'expression de HIF1 α vers l'expression de HIF2 α (Koh *et al.*, 2011).

Il est intéressant de signaler ici le fait qu'HSP70 est impliquée dans la dégradation de HIF1 α , mais qu'elle n'a aucun rôle dans la régulation de HIF2 α (Luo *et al.*, 2010). Ceci est d'ailleurs à l'image du volume de publications traitant de la découverte de protéines régulant HIF, qui est très largement en faveur de HIF1 α . Cela peut s'expliquer par le fait qu'historiquement, HIF1 α a été la première isoforme découverte et étudiée, il est néanmoins frappant de constater le déséquilibre actuel dans le nombre de protéines régulant HIF1 α par rapport à HIF2 α . Vu l'intérêt suscité depuis quelques années par HIF2 α au sein de la communauté scientifique, on peut estimer qu'une partie de ce fossé aurait été comblée. On

peut donc supposer que cet écart bibliométrique n'est pas anodin, et pourrait refléter cette « passation de pouvoir » de HIF1 α à HIF2 α au sein des cellules tumorales.

L'hypothèse des cellules souches cancéreuses (CSC) propose que les tumeurs sont originaires de et maintenues par une sous-population de cellules cancéreuses indifférenciées ayant des propriétés d'autorenouvellement et de pluripotence (Lapidot *et al.*, 1994 ; Gustafsson *et al.*, 2005 ; Holmquist *et al.*, 2006 ; Cobaleda *et al.*, 2008). La majorité des cellules d'une masse cancéreuse sont issues de ces CSC par des processus de redifférenciation (Gonzalez-Sarmiento & Perez-Losada, 2008). Il est supposé que l'hypoxie fluctuante dans les tumeurs stabilise préférentiellement HIF2 α , qui promeut l'établissement d'un phénotype de type cellule souche chez les cellules tumorales (Heddleston *et al.*, 2010 ; Mathieu *et al.*, 2011). En particulier, le facteur de transcription Oct4, qui est un important régulateur de la maintenance des cellules souches, peut être exprimé dans les cellules cancéreuses et leur conférer un caractère de cellule souche. Il a été montré que le gène *POU5F1* qui encode la protéine Oct4 est une cible directe et exclusive de HIF2 α (Covello *et al.*, 2006).

Il y a donc un ensemble d'études indiquant qu'HIF2 α est, parmi les deux isoformes, celle qui exerce le rôle le plus important dans la progression tumorale. Sa stabilisation par différents facteurs moléculaires et environnementaux liés à la biologie tumorale serait la marque de l'acquisition d'un phénotype malin. De nombreuses tumeurs sont relativement bien prises en charge à un stade précoce. Lorsqu'elles deviennent malignes, *via* l'activation des processus d'angiogenèse, puis de dissémination métastatique, leur traitement devient plus délicat. La chirurgie s'avère insuffisante, l'hypoxie intratumorale induit une résistance à la chimiothérapie et à la radiothérapie, les thérapies ciblées antiangiogéniques actuelles se heurtent à la redondance des voies de signalisation. Certains auteurs proposent donc de cibler HIF2 α , ce qui permettrait de circonvier une large part des mécanismes moléculaires entraînant la prolifération et la progression.

Dans ce contexte, nous avons montré que l'inhibition d'HSP90 dans la lignée RCC4^{vhl-/-} par le 17-DMAG induit la déstabilisation de HIF2 α , et provoque une diminution de la sécrétion du VEGF. Cela validerait l'utilisation des inhibiteurs d'HSP90 dérivés de la geldanamycine dans le traitement de tumeurs dépendantes de l'expression de HIF2 α , comme les carcinomes rénaux à cellules claires ou les neuroblastomes. De plus, étant donné le rôle majeur attribué à HIF2 α dans la progression d'une grande diversité de tumeurs, ce résultat

supporte également le traitement de tumeurs pour lesquelles les facteurs HIF sont activés par l'hypoxie et non par un défaut génétique.

Il est intéressant de noter que l'inhibition d'HSP90 affecte la viabilité des CSC et/ou leur capacité à produire de nouvelles cellules cancéreuses filles (Li Y *et al.*, 2009). Considérant le rôle important supposé HIF2 α dans l'acquisition et le maintien d'un phénotype de cellule souche, on peut supposer que l'interaction entre HSP90 et HIF2 α serait déterminante pour cette fonction de HIF2 α . On peut donc envisager qu'inhiber HSP90 de manière spécifique dans les CSC puisse perturber cette sous-population de cellules tumorales et prévenir les capacités de renouvellement d'une tumeur.

Conclusion générale

Les sous-unités HIF1 α et HIF2 α sont des protéines largement impliquées dans la genèse et le développement de pathologies qui posent des problèmes majeurs de santé publique, comme le cancer. Leur activité, qui est régulée prioritairement par leur stabilité *via* le système ubiquitine-protéasome, coordonne de nombreux processus cellulaires susceptibles de favoriser le développement de ces maladies. Un des enjeux récents de la recherche thérapeutique est d'identifier des partenaires et des mécanismes pouvant réguler l'expression et/ou l'activité des protéines HIF α , afin de mettre au point des thérapies ciblées. Les HSPs sont une classe de protéines dont une des fonctions essentielles est de réguler l'homéostasie protéique dans la cellule, en interagissant avec le protéasome. Certaines d'entre elles, HSP27 et HSP90, ont la faculté de pouvoir réguler spécifiquement la stabilité de nombreuses protéines souvent elles-mêmes impliquées dans l'apparition de ces pathologies. Notre objectif était de savoir si ces deux HSPs pouvaient contrôler la stabilité de la sous-unité HIF2 α . Nos résultats suggèrent qu'HSP27 pourrait stimuler la dégradation de HIF2 α par le protéasome en favorisant son ubiquitination. Il reste à déterminer le mécanisme moléculaire de ce processus. Ce résultat est surprenant, en raison du rôle connu d'HSP27 dans la progression tumorale. Il faut le confirmer par des expériences plus poussées, notamment dans un modèle *in vivo*, et en préciser la signification biologique. D'autre part, nous confirmons qu'HIF2 α est une protéine cliente d'HSP90. De plus, nous montrons pour la première fois que l'inhibition d'HSP90 par une molécule actuellement en essais cliniques, le 17-DMAG, diminue la production de VEGF dépendante de HIF2 α dans des cellules de carcinome rénal. Cela conforte l'utilisation des inhibiteurs d'HSP90 dans la thérapie anticancéreuse, notamment dans le cas des carcinomes rénaux. Des études récentes suggèrent qu'HIF2 α a un rôle prédominant par rapport à HIF1 α

dans la progression tumorale, et peut constituer une cible globale. Il conviendrait d'évaluer la capacité des inhibiteurs actuels d'HSP90 à perturber des fonctions de HIF2 α nouvellement décrites, tel que son rôle dans la maintenance des cellules souches cancéreuses.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

Adam MF, Dorie MJ, & Brown JM. (1999a). Oxygen tension measurements of tumors growing in mice. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 45(1), 171-180.

Adam MF, Gabalski EC, Bloch DA, Oehlert JW, Brown JM, Elsaid AA, et al. (1999b). Tissue oxygen distribution in head and neck cancer patients. *Head Neck*, 21(2), 146-153.

Amerik AY, & Hochstrasser M. (2004). Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochim Biophys Acta*, 1695(1-3), 189-207.

Amir S, Wang R, Simons JW, & Mabeesh NJ. (2009). SEPT9_v1 up-regulates hypoxia-inducible factor 1 by preventing its RACK1-mediated degradation. *J Biol Chem*, 284(17), 11142-11151.

An WG, Kanekal M, Simon MC, Maltepe E, Blagosklonny MV, & Neckers LM. (1998). Stabilization of wild-type p53 by hypoxia-inducible factor 1alpha. *Nature*, 392(6674), 405-408.

Appelhoff RJ, Tian YM, Raval RR, Turley H, Harris AL, Pugh CW, et al. (2004). Differential function of the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3 in the regulation of hypoxia-inducible factor. *J Biol Chem*, 279(37), 38458-38465.

Arany Z, Huang LE, Eckner R, Bhattacharya S, Jiang C, Goldberg MA, et al. (1996). An essential role for p300/CBP in the cellular response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(23), 12969-12973.

Arnesen T, Kong X, Evjenth R, Gromyko D, Varhaug JE, Lin Z, et al. (2005). Interaction between HIF-1 alpha (ODD) and hARD1 does not induce acetylation and destabilization of HIF-1 alpha. *FEBS Lett*, 579(28), 6428-6432.

Arrigo AP, & Ahmad-Zadeh C. (1981). Immunofluorescence localization of a small heat shock protein (hsp 23) in salivary gland cells of *Drosophila melanogaster*. *Mol Gen Genet*, 184(1), 73-79.

Arrigo AP, Darlix JL, Khandjian EW, Simon M, & Spahr PF. (1985). Characterization of the prosome from *Drosophila* and its similarity to the cytoplasmic structures formed by the low molecular weight heat-shock proteins. *Embo J*, 4(2), 399-406.

Arrigo AP, & Welch WJ. (1987). Characterization and purification of the small 28,000-dalton mammalian heat shock protein. *J Biol Chem*, 262(32), 15359-15369.

Arrigo AP, Suhan JP, & Welch WJ. (1988a). Dynamic changes in the structure and intracellular locale of the mammalian low-molecular-weight heat shock protein. *Mol Cell Biol*, 8(12), 5059-5071.

Arrigo AP, & Pauli D. (1988). Characterization of HSP27 and three immunologically related polypeptides during *Drosophila* development. *Exp Cell Res*, 175(1), 169-183.

Arrigo AP, Tanaka K, Goldberg AL, & Welch WJ. (1988b). Identity of the 19S 'prosome' particle with the large multifunctional protease complex of mammalian cells (the proteasome). *Nature*, 331(6152), 192-194.

Arrigo AP. (1990). The monovalent ionophore monensin maintains the nuclear localization of the human stress protein hsp28 during heat shock recovery. *J Cell Sci*, 96 (Pt 3), 419-427.

Arrigo AP, Virost S, Chaufour S, Firdaus W, Kretz-Remy C, & Diaz-Latoud C. (2005). Hsp27 consolidates intracellular redox homeostasis by upholding glutathione in its reduced form and by decreasing iron intracellular levels. *Antioxid Redox Signal*, 7(3-4), 414-422.

B

Bae SH, Jeong JW, Park JA, Kim SH, Bae MK, Choi SJ, et al. (2004). Sumoylation increases HIF-1alpha stability and its transcriptional activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 324(1), 394-400.

Baek JH, Liu YV, McDonald KR, Wesley JB, Zhang H, & Semenza GL. (2007). Spermidine/spermine N(1)-acetyltransferase-1 binds to hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) and RACK1 and promotes ubiquitination and degradation of HIF-1alpha. *J Biol Chem*, 282(46), 33358-33366.

Bali P, Pranpat M, Bradner J, Balasis M, Fiskus W, Guo F, et al. (2005). Inhibition of histone deacetylase 6 acetylates and disrupts the chaperone function of heat shock protein 90: a novel basis for antileukemia activity of histone deacetylase inhibitors. *J Biol Chem*, 280(29), 26729-26734.

Baumeister W, Dahlmann B, Hegerl R, Kopp F, Kuehn L, & Pfeifer G. (1988). Electron microscopy and image analysis of the multicatalytic proteinase. *FEBS Lett*, 241(1-2), 239-245.

Baumeister W, Cejka Z, Kania M, & Seemuller E. (1997). The proteasome: a macromolecular assembly designed to confine proteolysis to a nanocompartment. *Biol Chem*, 378(3-4), 121-130.

Baumeister W, Walz J, Zuhl F, & Seemuller E. (1998). The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell*, 92(3), 367-380.

Beere HM, Wolf BB, Cain K, Mosser DD, Mahboubi A, Kuwana T, et al. (2000). Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol*, 2(8), 469-475.

- Beitner-Johnson D, Rust RT, Hsieh T, & Millhorn DE. (2000). Regulation of CREB by moderate hypoxia in PC12 cells. *Adv Exp Med Biol*, 475, 143-152.
- Bellot G, Garcia-Medina R, Gounon P, Chiche J, Roux D, Pouyssegur J, et al. (2009). Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains. *Mol Cell Biol*, 29(10), 2570-2581.
- Ben-Saadon R, Zaaroor D, Ziv T, & Ciechanover A. (2006). The polycomb protein Ring1B generates self atypical mixed ubiquitin chains required for its in vitro histone H2A ligase activity. *Mol Cell*, 24(5), 701-711.
- Beresford PJ, Jaju M, Friedman RS, Yoon MJ, & Lieberman J. (1998). A role for heat shock protein 27 in CTL-mediated cell death. *J Immunol*, 161(1), 161-167.
- Bergers G, & Benjamin LE. (2003). Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer*, 3(6), 401-410.
- Berta MA, Mazure N, Hattab M, Pouyssegur J, & Brahimi-Horn MC. (2007). SUMOylation of hypoxia-inducible factor-1alpha reduces its transcriptional activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 360(3), 646-652.
- Bertout JA, Majmundar AJ, Gordan JD, Lam JC, Ditsworth D, Keith B, et al. (2009). HIF2alpha inhibition promotes p53 pathway activity, tumor cell death, and radiation responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(34), 14391-14396.
- Bilton R, Mazure N, Trottier E, Hattab M, Dery MA, Richard DE, et al. (2005). Arrest-defective-1 protein, an acetyltransferase, does not alter stability of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and is not induced by hypoxia or HIF. *J Biol Chem*, 280(35), 31132-31140.
- Binder RJ, Kelly JB, 3rd, Vatner RE, & Srivastava PK. (2007). Specific immunogenicity of heat shock protein gp96 derives from chaperoned antigenic peptides and not from contaminating proteins. *J Immunol*, 179(11), 7254-7261.
- Boelens WC, Croes Y, de Ruwe M, de Reu L, & de Jong WW. (1998). Negative charges in the C-terminal domain stabilize the alphaB-crystallin complex. *J Biol Chem*, 273(43), 28085-28090.
- Bohonowych JE, Gopal U, & Isaacs JS. (2010). Hsp90 as a gatekeeper of tumor angiogenesis: clinical promise and potential pitfalls. *J Oncol*, 2010, 412985.
- Bond U, & Schlesinger MJ. (1985). Ubiquitin is a heat shock protein in chicken embryo fibroblasts. *Mol Cell Biol*, 5(5), 949-956.

- Boyd JM, Malstrom S, Subramanian T, Venkatesh LK, Schaeper U, Elangovan B, et al. (1994). Adenovirus E1B 19 kDa and Bcl-2 proteins interact with a common set of cellular proteins. *Cell*, 79(2), 341-351.
- Bracken CP, Fedele AO, Linke S, Balrak W, Lisy K, Whitelaw ML, et al. (2006). Cell-specific regulation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha stabilization and transactivation in a graded oxygen environment. *J Biol Chem*, 281(32), 22575-22585.
- Braun BC, Glickman M, Kraft R, Dahlmann B, Kloetzel PM, Finley D, et al. (1999). The base of the proteasome regulatory particle exhibits chaperone-like activity. *Nat Cell Biol*, 1(4), 221-226.
- Brown LM, Cowen RL, Debray C, Eustace A, Erler JT, Sheppard FC, et al. (2006). Reversing hypoxic cell chemoresistance in vitro using genetic and small molecule approaches targeting hypoxia inducible factor-1. *Mol Pharmacol*, 69(2), 411-418.
- Bruey JM, Ducasse C, Bonniaud P, Ravagnan L, Susin SA, Diaz-Latoud C, et al. (2000a). Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. *Nat Cell Biol*, 2(9), 645-652.
- Bruey JM, Paul C, Fromentin A, Hilpert S, Arrigo AP, Solary E, et al. (2000b). Differential regulation of HSP27 oligomerization in tumor cells grown in vitro and in vivo. *Oncogene*, 19(42), 4855-4863.
- Brunet Simioni M, De Thonel A, Hammann A, Joly AL, Bossis G, Fourmaux E, et al. (2009). Heat shock protein 27 is involved in SUMO-2/3 modification of heat shock factor 1 and thereby modulates the transcription factor activity. *Oncogene*, 28(37), 3332-3344.
- Bukau B, & Horwich AL. (1998). The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell*, 92(3), 351-366.
- Burger AM, & Seth AK. (2004). The ubiquitin-mediated protein degradation pathway in cancer: therapeutic implications. *Eur J Cancer*, 40(15), 2217-2229.
- Bush KT, Goldberg AL, & Nigam SK. (1997). Proteasome inhibition leads to a heat-shock response, induction of endoplasmic reticulum chaperones, and thermotolerance. *J Biol Chem*, 272(14), 9086-9092.
- Butt E, Immler D, Meyer HE, Kotlyarov A, Laass K, & Gaestel M. (2001). Heat shock protein 27 is a substrate of cGMP-dependent protein kinase in intact human platelets: phosphorylation-induced actin polymerization caused by HSP27 mutants. *J Biol Chem*, 276(10), 7108-7113.

C

Cairns J, Qin S, Philp R, Tan YH, & Guy GR. (1994). Dephosphorylation of the small heat shock protein Hsp27 in vivo by protein phosphatase 2A. *J Biol Chem*, 269(12), 9176-9183.

Cairns RA, Kalliomaki T, & Hill RP. (2001). Acute (cyclic) hypoxia enhances spontaneous metastasis of KHT murine tumors. *Cancer Res*, 61(24), 8903-8908.

Carbia-Nagashima A, Gerez J, Perez-Castro C, Paez-Pereda M, Silberstein S, Stalla GK, et al. (2007). RSUME, a small RWD-containing protein, enhances SUMO conjugation and stabilizes HIF-1alpha during hypoxia. *Cell*, 131(2), 309-323.

Cardozo C, Eleuteri AM, & Orlowski M. (1995). Differences in catalytic activities and subunit pattern of multicatalytic proteinase complexes (proteasomes) isolated from bovine pituitary, lung, and liver. Changes in LMP7 and the component necessary for expression of the chymotrypsin-like activity. *J Biol Chem*, 270(38), 22645-22651.

Carmeliet P, & Jain RK. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, 407(6801), 249-257.

Carroll VA, & Ashcroft M. (2006). Role of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha versus HIF-2alpha in the regulation of HIF target genes in response to hypoxia, insulin-like growth factor-I, or loss of von Hippel-Lindau function: implications for targeting the HIF pathway. *Cancer Res*, 66(12), 6264-6270.

Catrina SB, Botusan IR, Rantanen A, Catrina AI, Pyakurel P, Savu O, et al. (2006). Hypoxia-inducible factor-1alpha and hypoxia-inducible factor-2alpha are expressed in kaposi sarcoma and modulated by insulin-like growth factor-I. *Clin Cancer Res*, 12(15), 4506-4514.

Cerundolo V, Benham A, Braud V, Mukherjee S, Gould K, Macino B, et al. (1997). The proteasome-specific inhibitor lactacystin blocks presentation of cytotoxic T lymphocyte epitopes in human and murine cells. *Eur J Immunol*, 27(1), 336-341.

Charette SJ, Lavoie JN, Lambert H, & Landry J. (2000). Inhibition of Daxx-mediated apoptosis by heat shock protein 27. *Mol Cell Biol*, 20(20), 7602-7612.

Charette SJ, & Landry J. (2000). The interaction of HSP27 with Daxx identifies a potential regulatory role of HSP27 in Fas-induced apoptosis. *Ann N Y Acad Sci*, 926, 126-131.

- Chauhan D, Li G, Hideshima T, Podar K, Mitsiades C, Mitsiades N, et al. (2003). Hsp27 inhibits release of mitochondrial protein Smac in multiple myeloma cells and confers dexamethasone resistance. *Blood*, 102(9), 3379-3386.
- Chen B, Piel WH, Gui L, Bruford E, & Monteiro A. (2005). The HSP90 family of genes in the human genome: insights into their divergence and evolution. *Genomics*, 86(6), 627-637.
- Chen L, Feng P, Li S, Long D, Cheng J, Lu Y, et al. (2009). Effect of hypoxia-inducible factor-1alpha silencing on the sensitivity of human brain glioma cells to doxorubicin and etoposide. *Neurochem Res*, 34(5), 984-990.
- Chen R, Liliental JE, Kowalski PE, Lu Q, & Cohen SN. (2011). Regulation of transcription of hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) by heat shock factors HSF2 and HSF4. *Oncogene*, 30(22), 2570-2580.
- Chen S, Rehman SK, Zhang W, Wen A, Yao L, & Zhang J. (2010). Autophagy is a therapeutic target in anticancer drug resistance. *Biochim Biophys Acta*, 1806(2), 220-229.
- Chiche J, Ilc K, Laferriere J, Trottier E, Dayan F, Mazure NM, et al. (2009). Hypoxia-inducible carbonic anhydrase IX and XII promote tumor cell growth by counteracting acidosis through the regulation of the intracellular pH. *Cancer Res*, 69(1), 358-368.
- Chiosis G, & Neckers L. (2006). Tumor selectivity of Hsp90 inhibitors: the explanation remains elusive. *ACS Chem Biol*, 1(5), 279-284.
- Cho H, Ahn DR, Park H, & Yang EG. (2007). Modulation of p300 binding by posttranslational modifications of the C-terminal activation domain of hypoxia-inducible factor-1alpha. *FEBS Lett*, 581(8), 1542-1548.
- Chung CH, & Baek SH. (1999). Deubiquitinating enzymes: their diversity and emerging roles. *Biochem Biophys Res Commun*, 266(3), 633-640.
- Ciechanover A, & Iwai K. (2004). The ubiquitin system: from basic mechanisms to the patient bed. *IUBMB Life*, 56(4), 193-201.
- Ciechanover A. (2006). The ubiquitin proteolytic system: from a vague idea, through basic mechanisms, and onto human diseases and drug targeting. *Neurology*, 66(2 Suppl 1), S7-19.
- Ciocca DR, Adams DJ, Edwards DP, Bjercke RJ, & McGuire WL. (1983). Distribution of an estrogen-induced protein with a molecular weight of 24,000 in normal and malignant human tissues and cells. *Cancer Res*, 43(3), 1204-1210.

- Cobaleda C, Cruz JJ, Gonzalez-Sarmiento R, Sanchez-Garcia I, & Perez-Losada J. (2008). The Emerging Picture of Human Breast Cancer as a Stem Cell-based Disease. *Stem Cell Rev*, 4(2), 67-79.
- Coller HA, Grandori C, Tamayo P, Colbert T, Lander ES, Eisenman RN, et al. (2000). Expression analysis with oligonucleotide microarrays reveals that MYC regulates genes involved in growth, cell cycle, signaling, and adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(7), 3260-3265.
- Comerford KM, Wallace TJ, Karhausen J, Louis NA, Montalto MC, & Colgan SP. (2002). Hypoxia-inducible factor-1-dependent regulation of the multidrug resistance (MDR1) gene. *Cancer Res*, 62(12), 3387-3394.
- Concannon CG, Orrenius S, & Samali A. (2001). Hsp27 inhibits cytochrome c-mediated caspase activation by sequestering both pro-caspase-3 and cytochrome c. *Gene Expr*, 9(4-5), 195-201.
- Counillon L, & Pouyssegur J. (2000). The expanding family of eucaryotic Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchangers. *J Biol Chem*, 275(1), 1-4.
- Coux O, Tanaka K, & Goldberg AL. (1996). Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu Rev Biochem*, 65, 801-847.
- Coux O. (2002). The 26S proteasome. *Prog Mol Subcell Biol*, 29, 85-107.
- Covello KL, Simon MC, & Keith B. (2005). Targeted replacement of hypoxia-inducible factor-1alpha by a hypoxia-inducible factor-2alpha knock-in allele promotes tumor growth. *Cancer Res*, 65(6), 2277-2286.
- Covello KL, Kehler J, Yu H, Gordan JD, Arsham AM, Hu CJ, et al. (2006). HIF-2alpha regulates Oct-4: effects of hypoxia on stem cell function, embryonic development, and tumor growth. *Genes Dev*, 20(5), 557-570.
- Csermely P, Schnaider T, Soti C, Prohaszka Z, & Nardai G. (1998). The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review. *Pharmacol Ther*, 79(2), 129-168.
- Cuesta R, Laroia G, & Schneider RJ. (2000). Chaperone hsp27 inhibits translation during heat shock by binding eIF4G and facilitating dissociation of cap-initiation complexes. *Genes Dev*, 14(12), 1460-1470.
- Czar MJ, Welsh MJ, & Pratt WB. (1996). Immunofluorescence localization of the 90-kDa heat-shock protein to cytoskeleton. *Eur J Cell Biol*, 70(4), 322-330.

D

Dang CV, & Dang CV. (1984). Structural organization of high-Mr mammalian aminoacyl-tRNA synthetases. Comparison of multi-enzyme complexes from different sources. *Mol Cell Biochem*, 63(2), 131-136.

de Thonel A, Vandekerckhove J, Lanneau D, Selvakumar S, Courtois G, Hazoume A, et al. (2010). HSP27 controls GATA-1 protein level during erythroid cell differentiation. *Blood*, 116(1), 85-96.

Deveraux Q, Ustrell V, Pickart C, & Rechsteiner M. (1994). A 26 S protease subunit that binds ubiquitin conjugates. *J Biol Chem*, 269(10), 7059-7061.

Dewhirst MW. (2007). Intermittent hypoxia furthers the rationale for hypoxia-inducible factor-1 targeting. *Cancer Res*, 67(3), 854-855.

Dewhirst MW, Navia IC, Brizel DM, Willett C, & Secomb TW. (2007). Multiple etiologies of tumor hypoxia require multifaceted solutions. *Clin Cancer Res*, 13(2 Pt 1), 375-377.

Dewhirst MW, Cao Y, & Moeller B. (2008). Cycling hypoxia and free radicals regulate angiogenesis and radiotherapy response. *Nat Rev Cancer*, 8(6), 425-437.

Dewhirst MW. (2009). Relationships between cycling hypoxia, HIF-1, angiogenesis and oxidative stress. *Radiat Res*, 172(6), 653-665.

Di Domenico BJ, Lupisella J, Sandbaken M, & Chakraborty K. (1992). Isolation and sequence analysis of the gene encoding translation elongation factor 3 from *Candida albicans*. *Yeast*, 8(5), 337-352.

Didelot C, Schmitt E, Brunet M, Maingret L, Parcellier A, & Garrido C. (2006). Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. *Handb Exp Pharmacol*(172), 171-198.

Ding Z, Yang L, Xie X, Xie F, Pan F, Li J, et al. Expression and significance of hypoxia-inducible factor-1 alpha and MDR1/P-glycoprotein in human colon carcinoma tissue and cells. *J Cancer Res Clin Oncol*, 136(11), 1697-1707.

Dix DJ, Allen JW, Collins BW, Mori C, Nakamura N, Poorman-Allen P, et al. (1996). Targeted gene disruption of Hsp70-2 results in failed meiosis, germ cell apoptosis, and male infertility. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(8), 3264-3268.

Dorion S, & Landry J. (2002). Activation of the mitogen-activated protein kinase pathways by heat shock. *Cell Stress Chaperones*, 7(2), 200-206.

During RL, Gibson BG, Li W, Bishai EA, Sidhu GS, Landry J, et al. (2007). Anthrax lethal toxin paralyzes actin-based motility by blocking Hsp27 phosphorylation. *Embo J*, 26(9), 2240-2250.

E

Eberhard A, Kahlert S, Goede V, Hemmerlein B, Plate KH, & Augustin HG. (2000). Heterogeneity of angiogenesis and blood vessel maturation in human tumors: implications for antiangiogenic tumor therapies. *Cancer Res*, 60(5), 1388-1393.

Ehrnsperger M, Graber S, Gaestel M, & Buchner J. (1997). Binding of non-native protein to Hsp25 during heat shock creates a reservoir of folding intermediates for reactivation. *Embo J*, 16(2), 221-229.

Ema M, Taya S, Yokotani N, Sogawa K, Matsuda Y, & 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(9), 4273-4278.

Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR, et al. (2001). C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell*, 107(1), 43-54.

Esser C, Alberti S, & Hohfeld J. (2004). Cooperation of molecular chaperones with the ubiquitin/proteasome system. *Biochim Biophys Acta*, 1695(1-3), 171-188.

F

Fan Y, Chen H, Qiao B, Liu Z, Luo L, Wu Y, et al. (2007). c-Jun NH2-terminal kinase decreases ubiquitination and promotes stabilization of p21(WAF1/CIP1) in K562 cell. *Biochem Biophys Res Commun*, 355(1), 263-268.

Fang S, & Weissman AM. (2004). A field guide to ubiquitylation. *Cell Mol Life Sci*, 61(13), 1546-1561.

Fantin VR, St-Pierre J, & Leder P. (2006). Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. *Cancer Cell*, 9(6), 425-434.

- Farras R, Bossis G, Andermarcher E, Jariel-Encontre I, & Piechaczyk M. (2005). Mechanisms of delivery of ubiquitylated proteins to the proteasome: new target for anti-cancer therapy? *Crit Rev Oncol Hematol*, 54(1), 31-51.
- Feige U, & Polla BS. (1994). Hsp70--a multi-gene, multi-structure, multi-function family with potential clinical applications. *Experientia*, 50(11-12), 979-986.
- Feige U, & van Eden W. (1996). Infection, autoimmunity and autoimmune disease. *Exs*, 77, 359-373.
- Feldser D, Agani F, Iyer NV, Pak B, Ferreira G, & Semenza GL. (1999). Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha and insulin-like growth factor 2. *Cancer Res*, 59(16), 3915-3918.
- Felts SJ, Owen BA, Nguyen P, Trepel J, Donner DB, & Toft DO. (2000). The hsp90-related protein TRAP1 is a mitochondrial protein with distinct functional properties. *J Biol Chem*, 275(5), 3305-3312.
- Fernandez PC, Frank SR, Wang L, Schroeder M, Liu S, Greene J, et al. (2003). Genomic targets of the human c-Myc protein. *Genes Dev*, 17(9), 1115-1129.
- Ferrara N. (2004). Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev*, 25(4), 581-611.
- Fiorenza MT, Farkas T, Dissing M, Kolding D, & Zimarino V. (1995). Complex expression of murine heat shock transcription factors. *Nucleic Acids Res*, 23(3), 467-474.
- Firth JD, Ebert BL, Pugh CW, & Ratcliffe PJ. (1994). Oxygen-regulated control elements in the phosphoglycerate kinase 1 and lactate dehydrogenase A genes: similarities with the erythropoietin 3' enhancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(14), 6496-6500.
- Flugel D, Gorchach A, Michiels C, & Kietzmann T. (2007). Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates hypoxia-inducible factor 1alpha and mediates its destabilization in a VHL-independent manner. *Mol Cell Biol*, 27(9), 3253-3265.
- Folkman J. (2002). Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol*, 29(6 Suppl 16), 15-18.
- Fong GH, & Takeda K. (2008). Role and regulation of prolyl hydroxylase domain proteins. *Cell Death Differ*, 15(4), 635-641.

Franovic A, Gunaratnam L, Smith K, Robert I, Patten D, & Lee S. (2007). Translational up-regulation of the EGFR by tumor hypoxia provides a nonmutational explanation for its overexpression in human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(32), 13092-13097.

Franovic A, Holterman CE, Payette J, & Lee S. (2009). Human cancers converge at the HIF-2alpha oncogenic axis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(50), 21306-21311.

Franovic A, & Lee S. (2010). HIF-2alpha: many cancers, one engine? *Cell Cycle*, 9(5), 859-860.

Fulda S, Galluzzi L, & Kroemer G. (2010). Targeting mitochondria for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov*, 9(6), 447-464.

G

Gaestel M, Benndorf R, Hayess K, Priemer E, & Engel K. (1992). Dephosphorylation of the small heat shock protein hsp25 by calcium/calmodulin-dependent (type 2B) protein phosphatase. *J Biol Chem*, 267(30), 21607-21611.

Galluzzi L, & Kroemer G. (2008). Necroptosis: a specialized pathway of programmed necrosis. *Cell*, 135(7), 1161-1163.

Galluzzi L, Brenner C, Morselli E, Touat Z, & Kroemer G. (2008). Viral control of mitochondrial apoptosis. *PLoS Pathog*, 4(5), e1000018.

Garrido C, Mehlen P, Fromentin A, Hammann A, Assem M, Arrigo AP, et al. (1996). Inconstant association between 27-kDa heat-shock protein (Hsp27) content and doxorubicin resistance in human colon cancer cells. The doxorubicin-protecting effect of Hsp27. *Eur J Biochem*, 237(3), 653-659.

Garrido C, Ottavi P, Fromentin A, Hammann A, Arrigo AP, Chauffert B, et al. (1997). HSP27 as a mediator of confluence-dependent resistance to cell death induced by anticancer drugs. *Cancer Res*, 57(13), 2661-2667.

Garrido C, Bruey JM, Fromentin A, Hammann A, Arrigo AP, & Solary E. (1999). HSP27 inhibits cytochrome c-dependent activation of procaspase-9. *Faseb J*, 13(14), 2061-2070.

Garrido C, Gurbuxani S, Ravagnan L, & Kroemer G. (2001). Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. *Biochem Biophys Res Commun*, 286(3), 433-442.

- Garrido C, & Solary E. (2003). A role of HSPs in apoptosis through "protein triage"? *Cell Death Differ*, 10(6), 619-620.
- Garrido C, Brunet M, Didelot C, Zermati Y, Schmitt E, & Kroemer G. (2006). Heat shock proteins 27 and 70: anti-apoptotic proteins with tumorigenic properties. *Cell Cycle*, 5(22), 2592-2601.
- Gileadi U, Moins-Teisserenc HT, Correa I, Booth BL, Jr., Dunbar PR, Sewell AK, et al. (1999). Generation of an immunodominant CTL epitope is affected by proteasome subunit composition and stability of the antigenic protein. *J Immunol*, 163(11), 6045-6052.
- Glickman MH, Rubin DM, Coux O, Wefes I, Pfeifer G, Cjeka Z, et al. (1998). A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3. *Cell*, 94(5), 615-623.
- Glickman MH, Rubin DM, Fu H, Larsen CN, Coux O, Wefes I, et al. (1999). Functional analysis of the proteasome regulatory particle. *Mol Biol Rep*, 26(1-2), 21-28.
- Glickman MH, & Ciechanover A. (2002). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev*, 82(2), 373-428.
- Goetz MP, Toft DO, Ames MM, & Erlichman C. (2003). The Hsp90 chaperone complex as a novel target for cancer therapy. *Ann Oncol*, 14(8), 1169-1176.
- Gonin S, Fabre-Jonca N, Diaz-Latoud C, Rouault JP, & Arrigo AP. (1997). Transformation by T-antigen and other oncogenes delays Hsp25 accumulation in heat shocked NIH 3T3 fibroblasts. *Cell Stress Chaperones*, 2(4), 238-251.
- Gonzalez-Sarmiento R, & Perez-Losada J. (2008). Breast cancer, a stem cell disease. *Curr Stem Cell Res Ther*, 3(1), 55-65.
- Gordan JD, Bertout JA, Hu CJ, Diehl JA, & Simon MC. (2007a). HIF-2alpha promotes hypoxic cell proliferation by enhancing c-myc transcriptional activity. *Cancer Cell*, 11(4), 335-347.
- Gordan JD, Thompson CB, & Simon MC. (2007b). HIF and c-Myc: sibling rivals for control of cancer cell metabolism and proliferation. *Cancer Cell*, 12(2), 108-113.
- Gottesman MM, Fojo T, & Bates SE. (2002). Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer*, 2(1), 48-58.
- Grad I, & Picard D. (2007). The glucocorticoid responses are shaped by molecular chaperones. *Mol Cell Endocrinol*, 275(1-2), 2-12.

- Gradin K, Takasaki C, Fujii-Kuriyama Y, & Sogawa K. (2002). The transcriptional activation function of the HIF-like factor requires phosphorylation at a conserved threonine. *J Biol Chem*, 277(26), 23508-23514.
- Graeber TG, Osmanian C, Jacks T, Housman DE, Koch CJ, Lowe SW, et al. (1996). Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature*, 379(6560), 88-91.
- Greijer AE, & van der Wall E. (2004). The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis. *J Clin Pathol*, 57(10), 1009-1014.
- Groll M, Ditzel L, Lowe J, Stock D, Bochtler M, Bartunik HD, et al. (1997). Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature*, 386(6624), 463-471.
- Gruppi CM, Zakeri ZF, & Wolgemuth DJ. (1991). Stage and lineage-regulated expression of two hsp90 transcripts during mouse germ cell differentiation and embryogenesis. *Mol Reprod Dev*, 28(3), 209-217.
- Gunther E, & Walter L. (1994). Genetic aspects of the hsp70 multigene family in vertebrates. *Experientia*, 50(11-12), 987-1001.
- Gupta RS. (1995). Phylogenetic analysis of the 90 kD heat shock family of protein sequences and an examination of the relationship among animals, plants, and fungi species. *Mol Biol Evol*, 12(6), 1063-1073.
- Gurbuxani S, Schmitt E, Cande C, Parcellier A, Hammann A, Daugas E, et al. (2003). Heat shock protein 70 binding inhibits the nuclear import of apoptosis-inducing factor. *Oncogene*, 22(43), 6669-6678.
- Gustafsson MV, Zheng X, Pereira T, Gradin K, Jin S, Lundkvist J, et al. (2005). Hypoxia requires notch signaling to maintain the undifferentiated cell state. *Dev Cell*, 9(5), 617-628.
- Guterman A, & Glickman MH. (2004). Complementary roles for Rpn11 and Ubp6 in deubiquitination and proteolysis by the proteasome. *J Biol Chem*, 279(3), 1729-1738.
- Gyrd-Hansen M, Nylandsted J, & Jaattela M. (2004). Heat shock protein 70 promotes cancer cell viability by safeguarding lysosomal integrity. *Cell Cycle*, 3(12), 1484-1485.

H

Hagen T, Taylor CT, Lam F, & Moncada S. (2003). Redistribution of intracellular oxygen in hypoxia by nitric oxide: effect on HIF1alpha. *Science*, 302(5652), 1975-1978.

Hanahan D, & Weinberg RA. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57-70.

Hanahan D, & Weinberg RA. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674.

Hao J, Song X, Song B, Liu Y, Wei L, Wang X, et al. (2008). Effects of lentivirus-mediated HIF-1alpha knockdown on hypoxia-related cisplatin resistance and their dependence on p53 status in fibrosarcoma cells. *Cancer Gene Ther*, 15(7), 449-455.

Hase J, Kobashi K, Nakai N, Mitsui K, Iwata K, & Takadera T. (1980). The quaternary structure of carp muscle alkaline protease. *Biochim Biophys Acta*, 611(1), 205-213.

Havasi A, Li Z, Wang Z, Martin JL, Botla V, Ruchalski K, et al. (2008). Hsp27 inhibits Bax activation and apoptosis via a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanism. *J Biol Chem*, 283(18), 12305-12313.

Hay RT, Vuillard L, Desterro JM, & Rodriguez MS. (1999). Control of NF-kappa B transcriptional activation by signal induced proteolysis of I kappa B alpha. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 354(1389), 1601-1609.

Heddleston JM, Li Z, Lathia JD, Bao S, Hjelmeland AB, & Rich JN. (2010). Hypoxia inducible factors in cancer stem cells. *Br J Cancer*, 102(5), 789-795.

Hershko A, & Ciechanover A. (1998). The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem*, 67, 425-479.

Hewitson KS, Lienard BM, McDonough MA, Clifton IJ, Butler D, Soares AS, et al. (2007). Structural and mechanistic studies on the inhibition of the hypoxia-inducible transcription factor hydroxylases by tricarboxylic acid cycle intermediates. *J Biol Chem*, 282(5), 3293-3301.

Hicke L, Schubert HL, & Hill CP. (2005). Ubiquitin-binding domains. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6(8), 610-621.

Hickey E, Brandon SE, Potter R, Stein G, Stein J, & Weber LA. (1986). Sequence and organization of genes encoding the human 27 kDa heat shock protein. *Nucleic Acids Res*, 14(10), 4127-4145.

Hickey E, Brandon SE, Smale G, Lloyd D, & Weber LA. (1989). Sequence and regulation of a gene encoding a human 89-kilodalton heat shock protein. *Mol Cell Biol*, 9(6), 2615-2626.

- Hochstrasser M. (1996). Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu Rev Genet*, 30, 405-439.
- Hochstrasser M. (2000). Evolution and function of ubiquitin-like protein-conjugation systems. *Nat Cell Biol*, 2(8), E153-157.
- Hochstrasser M. (2006). Lingering mysteries of ubiquitin-chain assembly. *Cell*, 124(1), 27-34.
- Hockel M, & Vaupel P. (2001). Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J Natl Cancer Inst*, 93(4), 266-276.
- Hofmann K, & Falquet L. (2001). A ubiquitin-interacting motif conserved in components of the proteasomal and lysosomal protein degradation systems. *Trends Biochem Sci*, 26(6), 347-350.
- Hollingshead M, Alley M, Burger AM, Borgel S, Pacula-Cox C, Fiebig HH, et al. (2005). In vivo antitumor efficacy of 17-DMAG (17-dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin hydrochloride), a water-soluble geldanamycin derivative. *Cancer Chemother Pharmacol*, 56(2), 115-125.
- Holmquist L, Lofstedt T, & Pahlman S. (2006). Effect of hypoxia on the tumor phenotype: the neuroblastoma and breast cancer models. *Adv Exp Med Biol*, 587, 179-193.
- Hoppe T. (2005). Multiubiquitylation by E4 enzymes: 'one size' doesn't fit all. *Trends Biochem Sci*, 30(4), 183-187.
- Horwitz J, Emmons T, & Takemoto L. (1992). The ability of lens alpha crystallin to protect against heat-induced aggregation is age-dependent. *Curr Eye Res*, 11(8), 817-822.
- Hu CJ, Wang LY, Chodosh LA, Keith B, & Simon MC. (2003). Differential roles of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and HIF-2alpha in hypoxic gene regulation. *Mol Cell Biol*, 23(24), 9361-9374.
- Huang C, Han Y, Wang Y, Sun X, Yan S, Yeh ET, et al. (2009). SENP3 is responsible for HIF-1 transactivation under mild oxidative stress via p300 de-SUMOylation. *Embo J*, 28(18), 2748-2762.
- Huang LE, Zhang H, Bae SW, & Liu AY. (1994). Thiol reducing reagents inhibit the heat shock response. Involvement of a redox mechanism in the heat shock signal transduction pathway. *J Biol Chem*, 269(48), 30718-30725.
- Huang LE, Gu J, Schau M, & Bunn HF. (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(14), 7987-7992.

Huang LE, Bindra RS, Glazer PM, & Harris AL. (2007). Hypoxia-induced genetic instability--a calculated mechanism underlying tumor progression. *J Mol Med (Berl)*, 85(2), 139-148.

Hunt C, & Morimoto RI. (1985). Conserved features of eukaryotic hsp70 genes revealed by comparison with the nucleotide sequence of human hsp70. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82(19), 6455-6459.

Huot J, Lambert H, Lavoie JN, Guimond A, Houle F, & Landry J. (1995). Characterization of 45-kDa/54-kDa HSP27 kinase, a stress-sensitive kinase which may activate the phosphorylation-dependent protective function of mammalian 27-kDa heat-shock protein HSP27. *Eur J Biochem*, 227(1-2), 416-427.

Huot J, Houle F, Spitz DR, & Landry J. (1996). HSP27 phosphorylation-mediated resistance against actin fragmentation and cell death induced by oxidative stress. *Cancer Res*, 56(2), 273-279.

Huot J, Houle F, Marceau F, & Landry J. (1997). Oxidative stress-induced actin reorganization mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase/heat shock protein 27 pathway in vascular endothelial cells. *Circ Res*, 80(3), 383-392.

Hur E, Chang KY, Lee E, Lee SK, & Park H. (2001). Mitogen-activated protein kinase kinase inhibitor PD98059 blocks the trans-activation but not the stabilization or DNA binding ability of hypoxia-inducible factor-1alpha. *Mol Pharmacol*, 59(5), 1216-1224.

Hussein D, Estlin EJ, Dive C, & Makin GW. (2006). Chronic hypoxia promotes hypoxia-inducible factor-1alpha-dependent resistance to etoposide and vincristine in neuroblastoma cells. *Mol Cancer Ther*, 5(9), 2241-2250.

I

Ikeda F, & Dikic I. (2008). Atypical ubiquitin chains: new molecular signals. 'Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects' review series. *EMBO Rep*, 9(6), 536-542.

Ingolia TD, & Craig EA. (1982). Four small *Drosophila* heat shock proteins are related to each other and to mammalian alpha-crystallin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 79(7), 2360-2364.

Isaacs JS, Jung YJ, Mimnaugh EG, Martinez A, Cuttitta F, & Neckers LM. (2002). Hsp90 regulates a von Hippel Lindau-independent hypoxia-inducible factor-1 alpha-degradative pathway. *J Biol Chem*, 277(33), 29936-29944.

Isaacs JS, Jung YJ, & Neckers L. (2004). Aryl hydrocarbon nuclear translocator (ARNT) promotes oxygen-independent stabilization of hypoxia-inducible factor-1alpha by modulating an Hsp90-dependent regulatory pathway. *J Biol Chem*, 279(16), 16128-16135.

Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, et al. (2001). HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O2 sensing. *Science*, 292(5516), 464-468.

J

Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, et al. (2001). Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation. *Science*, 292(5516), 468-472.

Jacobson LO, Goldwasser E, Fried W, & Plzak L. (2000). Role of the kidney in erythropoiesis. 1957. *J Am Soc Nephrol*, 11(3), 589-590; discussion 589-591.

Jakob U, Gaestel M, Engel K, & Buchner J. (1993). Small heat shock proteins are molecular chaperones. *J Biol Chem*, 268(3), 1517-1520.

Jelkmann W. (2007). Erythropoietin after a century of research: younger than ever. *Eur J Haematol*, 78(3), 183-205.

Jeong JW, Bae MK, Ahn MY, Kim SH, Sohn TK, Bae MH, et al. (2002). Regulation and destabilization of HIF-1alpha by ARD1-mediated acetylation. *Cell*, 111(5), 709-720.

Jiang BH, Semenza GL, Bauer C, & Marti HH. (1996a). Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O2 tension. *Am J Physiol*, 271(4 Pt 1), C1172-1180.

Jiang BH, Rue E, Wang GL, Roe R, & Semenza GL. (1996b). Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem*, 271(30), 17771-17778.

Jin L, Williamson A, Banerjee S, Philipp I, & Rape M. (2008). Mechanism of ubiquitin-chain formation by the human anaphase-promoting complex. *Cell*, 133(4), 653-665.

K

- Kaarniranta K, Ryhanen T, Sironen RK, Suuronen T, Elo MA, Karjalainen HM, et al. (2005). Geldanamycin activates Hsp70 response and attenuates okadaic acid-induced cytotoxicity in human retinal pigment epithelial cells. *Brain Res Mol Brain Res*, 137(1-2), 126-131.
- Kaelin WG, Jr. (2005). The von Hippel-Lindau protein, HIF hydroxylation, and oxygen sensing. *Biochem Biophys Res Commun*, 338(1), 627-638.
- Kamal A, Thao L, Sensintaffar J, Zhang L, Boehm MF, Fritz LC, et al. (2003). A high-affinity conformation of Hsp90 confers tumour selectivity on Hsp90 inhibitors. *Nature*, 425(6956), 407-410.
- Kamradt MC, Chen F, & Cryns VL. (2001). The small heat shock protein alpha B-crystallin negatively regulates cytochrome c- and caspase-8-dependent activation of caspase-3 by inhibiting its autoproteolytic maturation. *J Biol Chem*, 276(19), 16059-16063.
- Kamura T, Sato S, Iwai K, Czyzyk-Krzeska M, Conaway RC, & Conaway JW. (2000). Activation of HIF1alpha ubiquitination by a reconstituted von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(19), 10430-10435.
- Kanayama A, Seth RB, Sun L, Ea CK, Hong M, Shaito A, et al. (2004). TAB2 and TAB3 activate the NF-kappaB pathway through binding to polyubiquitin chains. *Mol Cell*, 15(4), 535-548.
- Kappe G, Leunissen JA, & de Jong WW. (2002). Evolution and diversity of prokaryotic small heat shock proteins. *Prog Mol Subcell Biol*, 28, 1-17.
- Kato K, Ito H, Iwamoto I, Lida K, & Inaguma Y. (2001). Protein kinase inhibitors can suppress stress-induced dissociation of Hsp27. *Cell Stress Chaperones*, 6(1), 16-20.
- Katschinski DM, Le L, Schindler SG, Thomas T, Voss AK, & Wenger RH. (2004). Interaction of the PAS B domain with HSP90 accelerates hypoxia-inducible factor-1alpha stabilization. *Cell Physiol Biochem*, 14(4-6), 351-360.
- Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL, & Dang CV. (2006). HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab*, 3(3), 177-185.
- Kim WY, & Kaelin WG. (2004). Role of VHL gene mutation in human cancer. *J Clin Oncol*, 22(24), 4991-5004.

- Kim YC, & Hummer G. (2008). Coarse-grained models for simulations of multiprotein complexes: application to ubiquitin binding. *J Mol Biol*, 375(5), 1416-1433.
- Kirkpatrick DS, Hathaway NA, Hanna J, Elsasser S, Rush J, Finley D, et al. (2006). Quantitative analysis of in vitro ubiquitinated cyclin B1 reveals complex chain topology. *Nat Cell Biol*, 8(7), 700-710.
- Kisselev AF, Songyang Z, & Goldberg AL. (2000). Why does threonine, and not serine, function as the active site nucleophile in proteasomes? *J Biol Chem*, 275(20), 14831-14837.
- Kisselev AF, Callard A, & Goldberg AL. (2006). Importance of the different proteolytic sites of the proteasome and the efficacy of inhibitors varies with the protein substrate. *J Biol Chem*, 281(13), 8582-8590.
- Kloetzel PM. (2004). The proteasome and MHC class I antigen processing. *Biochim Biophys Acta*, 1695(1-3), 225-233.
- Koh MY, Darnay BG, & Powis G. (2008). Hypoxia-associated factor, a novel E3-ubiquitin ligase, binds and ubiquitinates hypoxia-inducible factor 1alpha, leading to its oxygen-independent degradation. *Mol Cell Biol*, 28(23), 7081-7095.
- Koh MY, Lemos R, Jr., Liu X, & Powis G. (2011). The hypoxia-associated factor switches cells from HIF-1alpha- to HIF-2alpha-dependent signaling promoting stem cell characteristics, aggressive tumor growth and invasion. *Cancer Res*, 71(11), 4015-4027.
- Kondo K, & Kaelin WG, Jr. (2001). The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene. *Exp Cell Res*, 264(1), 117-125.
- Kondo K, Klco J, Nakamura E, Lechpammer M, & Kaelin WG, Jr. (2002). Inhibition of HIF is necessary for tumor suppression by the von Hippel-Lindau protein. *Cancer Cell*, 1(3), 237-246.
- Kondo K, Kim WY, Lechpammer M, & Kaelin WG, Jr. (2003). Inhibition of HIF2alpha is sufficient to suppress pVHL-defective tumor growth. *PLoS Biol*, 1(3), E83.
- Konishi H, Matsuzaki H, Tanaka M, Takemura Y, Kuroda S, Ono Y, et al. (1997). Activation of protein kinase B (Akt/RAC-protein kinase) by cellular stress and its association with heat shock protein Hsp27. *FEBS Lett*, 410(2-3), 493-498.
- Koong AC, Chen EY, Mivechi NF, Denko NC, Stambrook P, & Giaccia AJ. (1994). Hypoxic activation of nuclear factor-kappa B is mediated by a Ras and Raf signaling pathway and does not involve MAP kinase (ERK1 or ERK2). *Cancer Res*, 54(20), 5273-5279.

Koritzinsky M, Magagnin MG, van den Beucken T, Seigneuric R, Savelkoul K, Dostie J, et al. (2006). Gene expression during acute and prolonged hypoxia is regulated by distinct mechanisms of translational control. *Embo J*, 25(5), 1114-1125.

Koshiji M, Kageyama Y, Pete EA, Horikawa I, Barrett JC, & Huang LE. (2004). HIF-1alpha induces cell cycle arrest by functionally counteracting Myc. *Embo J*, 23(9), 1949-1956.

Koshiji M, To KK, Hammer S, Kumamoto K, Harris AL, Modrich P, et al. (2005). HIF-1alpha induces genetic instability by transcriptionally downregulating MutSalpha expression. *Mol Cell*, 17(6), 793-803.

Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, Simopoulos C, Turley H, Talks K, et al. (2002). Hypoxia-inducible factor (HIF1A and HIF2A), angiogenesis, and chemoradiotherapy outcome of squamous cell head-and-neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 53(5), 1192-1202.

Koumenis C, Naczki C, Koritzinsky M, Rastani S, Diehl A, Sonenberg N, et al. (2002). Regulation of protein synthesis by hypoxia via activation of the endoplasmic reticulum kinase PERK and phosphorylation of the translation initiation factor eIF2alpha. *Mol Cell Biol*, 22(21), 7405-7416.

Koumenis C, & Wouters BG. (2006). "Translating" tumor hypoxia: unfolded protein response (UPR)-dependent and UPR-independent pathways. *Mol Cancer Res*, 4(7), 423-436.

Kovacs JJ, Murphy PJ, Gaillard S, Zhao X, Wu JT, Nicchitta CV, et al. (2005). HDAC6 regulates Hsp90 acetylation and chaperone-dependent activation of glucocorticoid receptor. *Mol Cell*, 18(5), 601-607.

Krishnamachary B, Berg-Dixon S, Kelly B, Agani F, Feldser D, Ferreira G, et al. (2003). Regulation of colon carcinoma cell invasion by hypoxia-inducible factor 1. *Cancer Res*, 63(5), 1138-1143.

L

Lambert H, Charette SJ, Bernier AF, Guimond A, & Landry J. (1999). HSP27 multimerization mediated by phosphorylation-sensitive intermolecular interactions at the amino terminus. *J Biol Chem*, 274(14), 9378-9385.

Lancaster DE, McNeill LA, McDonough MA, Aplin RT, Hewitson KS, Pugh CW, et al. (2004). Disruption of dimerization and substrate phosphorylation inhibit factor inhibiting hypoxia-inducible factor (FIH) activity. *Biochem J*, 383(Pt. 3), 429-437.

- Lando D, Peet DJ, Gorman JJ, Whelan DA, Whitelaw ML, & Bruick RK. (2002a). FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev*, 16(12), 1466-1471.
- Lando D, Peet DJ, Whelan DA, Gorman JJ, & Whitelaw ML. (2002b). Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science*, 295(5556), 858-861.
- Landry J, Chretien P, Lambert H, Hickey E, & Weber LA. (1989). Heat shock resistance conferred by expression of the human HSP27 gene in rodent cells. *J Cell Biol*, 109(1), 7-15.
- Landry J, Lambert H, Zhou M, Lavoie JN, Hickey E, Weber LA, et al. (1992). Human HSP27 is phosphorylated at serines 78 and 82 by heat shock and mitogen-activated kinases that recognize the same amino acid motif as S6 kinase II. *J Biol Chem*, 267(2), 794-803.
- Landry J, & Huot J. (1999). Regulation of actin dynamics by stress-activated protein kinase 2 (SAPK2)-dependent phosphorylation of heat-shock protein of 27 kDa (Hsp27). *Biochem Soc Symp*, 64, 79-89.
- Lang V, Janzen J, Fischer GZ, Soneji Y, Beinke S, Salmeron A, et al. (2003). betaTrCP-mediated proteolysis of NF-kappaB1 p105 requires phosphorylation of p105 serines 927 and 932. *Mol Cell Biol*, 23(1), 402-413.
- Lanneau D, de Thonel A, Maurel S, Didelot C, & Garrido C. (2007). Apoptosis versus cell differentiation: role of heat shock proteins HSP90, HSP70 and HSP27. *Prion*, 1(1), 53-60.
- Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, et al. (1994). A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*, 367(6464), 645-648.
- Laughner E, Taghavi P, Chiles K, Mahon PC, & Semenza GL. (2001). HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. *Mol Cell Biol*, 21(12), 3995-4004.
- Lee C, Kim SJ, Jeong DG, Lee SM, & Ryu SE. (2003). Structure of human FIH-1 reveals a unique active site pocket and interaction sites for HIF-1 and von Hippel-Lindau. *J Biol Chem*, 278(9), 7558-7563.
- Lee GJ, Roseman AM, Saibil HR, & Vierling E. (1997). A small heat shock protein stably binds heat-denatured model substrates and can maintain a substrate in a folding-competent state. *Embo J*, 16(3), 659-671.

- Lee JM, Lee WH, Kay HY, Kim ES, Moon A, & Kim SG. (2011). Hemin, an iron-binding porphyrin, inhibits HIF-1 α induction through its binding with heat shock protein 90. *Int J Cancer*.
- Lee YM, Jeong CH, Koo SY, Son MJ, Song HS, Bae SK, et al. (2001). Determination of hypoxic region by hypoxia marker in developing mouse embryos in vivo: a possible signal for vessel development. *Dev Dyn*, 220(2), 175-186.
- Li CY, Lee JS, Ko YG, Kim JI, & Seo JS. (2000). Heat shock protein 70 inhibits apoptosis downstream of cytochrome c release and upstream of caspase-3 activation. *J Biol Chem*, 275(33), 25665-25671.
- Li F, Wang Y, Zeller KI, Potter JJ, Wonsey DR, O'Donnell KA, et al. (2005). Myc stimulates nuclearly encoded mitochondrial genes and mitochondrial biogenesis. *Mol Cell Biol*, 25(14), 6225-6234.
- Li J, Shi M, Cao Y, Yuan W, Pang T, Li B, et al. (2006). Knockdown of hypoxia-inducible factor-1 α in breast carcinoma MCF-7 cells results in reduced tumor growth and increased sensitivity to methotrexate. *Biochem Biophys Res Commun*, 342(4), 1341-1351.
- Li J, Hou N, Faried A, Tsutsumi S, & Kuwano H. (2010). Inhibition of autophagy augments 5-fluorouracil chemotherapy in human colon cancer in vitro and in vivo model. *Eur J Cancer*, 46(10), 1900-1909.
- Li M, Luo J, Brooks CL, & Gu W. (2002). Acetylation of p53 inhibits its ubiquitination by Mdm2. *J Biol Chem*, 277(52), 50607-50611.
- Li Y, Zhang T, Schwartz SJ, & Sun D. (2009). New developments in Hsp90 inhibitors as anti-cancer therapeutics: mechanisms, clinical perspective and more potential. *Drug Resist Updat*, 12(1-2), 17-27.
- Lin Q, Cong X, & Yun Z. (2011). Differential hypoxic regulation of hypoxia-inducible factors 1 α and 2 α . *Mol Cancer Res*, 9(6), 757-765.
- Lindquist S. (1986). The heat-shock response. *Annu Rev Biochem*, 55, 1151-1191.
- Liu C, & Welsh MJ. (1999). Identification of a site of Hsp27 binding with Hsp27 and alpha B-crystallin as indicated by the yeast two-hybrid system. *Biochem Biophys Res Commun*, 255(2), 256-261.
- Liu CC, Miller HI, Kohr WJ, & Silber JI. (1989). Purification of a ubiquitin protein peptidase from yeast with efficient in vitro assays. *J Biol Chem*, 264(34), 20331-20338.

Liu D, Yang Y, Liu Q, & Wang J. (2011). Inhibition of autophagy by 3-MA potentiates cisplatin-induced apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma cells. *Med Oncol*, 28(1), 105-111.

Liu F, Wang P, Jiang X, Tan G, Qiao H, Jiang H, et al. (2008). Antisense hypoxia-inducible factor 1alpha gene therapy enhances the therapeutic efficacy of doxorubicin to combat hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci*, 99(10), 2055-2061.

Liu L, Ning X, Sun L, Zhang H, Shi Y, Guo C, et al. (2008). Hypoxia-inducible factor-1 alpha contributes to hypoxia-induced chemoresistance in gastric cancer. *Cancer Sci*, 99(1), 121-128.

Liu XW, Su Y, Zhu H, Cao J, Ding WJ, Zhao YC, et al. (2010). HIF-1alpha-dependent autophagy protects HeLa cells from fenretinide (4-HPR)-induced apoptosis in hypoxia. *Pharmacol Res*, 62(5), 416-425.

Liu YV, Baek JH, Zhang H, Diez R, Cole RN, & Semenza GL. (2007a). RACK1 competes with HSP90 for binding to HIF-1alpha and is required for O(2)-independent and HSP90 inhibitor-induced degradation of HIF-1alpha. *Mol Cell*, 25(2), 207-217.

Liu YV, & Semenza GL. (2007). RACK1 vs. HSP90: competition for HIF-1 alpha degradation vs. stabilization. *Cell Cycle*, 6(6), 656-659.

Liu YV, Hubbi ME, Pan F, McDonald KR, Mansharamani M, Cole RN, et al. (2007b). Calcineurin promotes hypoxia-inducible factor 1alpha expression by dephosphorylating RACK1 and blocking RACK1 dimerization. *J Biol Chem*, 282(51), 37064-37073.

Luo W, Zhong J, Chang R, Hu H, Pandey A, & Semenza GL. (2010). Hsp70 and CHIP selectively mediate ubiquitination and degradation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha but Not HIF-2alpha. *J Biol Chem*, 285(6), 3651-3663.

M

MacKenzie ED, Selak MA, Tennant DA, Payne LJ, Crosby S, Frederiksen CM, et al. (2007). Cell-permeating alpha-ketoglutarate derivatives alleviate pseudohypoxia in succinate dehydrogenase-deficient cells. *Mol Cell Biol*, 27(9), 3282-3289.

Mahon PC, Hirota K, & Semenza GL. (2001). FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1alpha and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes Dev*, 15(20), 2675-2686.

- Maki RG, Old LJ, & Srivastava PK. (1990). Human homologue of murine tumor rejection antigen gp96: 5'-regulatory and coding regions and relationship to stress-induced proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(15), 5658-5662.
- Makino Y, Cao R, Svensson K, Bertilsson G, Asman M, Tanaka H, et al. (2001). Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression. *Nature*, 414(6863), 550-554.
- Makino Y, Kanopka A, Wilson WJ, Tanaka H, & Poellinger L. (2002). Inhibitory PAS domain protein (IPAS) is a hypoxia-inducible splicing variant of the hypoxia-inducible factor-3alpha locus. *J Biol Chem*, 277(36), 32405-32408.
- Makino Y, Uenishi R, Okamoto K, Isoe T, Hosono O, Tanaka H, et al. (2007). Transcriptional up-regulation of inhibitory PAS domain protein gene expression by hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1): a negative feedback regulatory circuit in HIF-1-mediated signaling in hypoxic cells. *J Biol Chem*, 282(19), 14073-14082.
- Manalo DJ, Rowan A, Lavoie T, Natarajan L, Kelly BD, Ye SQ, et al. (2005). Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Blood*, 105(2), 659-669.
- Martinez-Ruiz A, Villanueva L, Gonzalez de Orduna C, Lopez-Ferrer D, Higuera MA, Tarin C, et al. (2005). S-nitrosylation of Hsp90 promotes the inhibition of its ATPase and endothelial nitric oxide synthase regulatory activities. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(24), 8525-8530.
- Martinive P, Defresne F, Quaghebeur E, Daneau G, Crockart N, Gregoire V, et al. (2009). Impact of cyclic hypoxia on HIF-1alpha regulation in endothelial cells--new insights for anti-tumor treatments. *Febs J*, 276(2), 509-518.
- Martinive P, & Coucke PA. (2010). [Vascular perfusion as the origin of neoplasm resistance to radio- and chemotherapy]. *Rev Med Liege*, 65(3), 133-139.
- Masson N, Willam C, Maxwell PH, Pugh CW, & Ratcliffe PJ. (2001). Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor-alpha chains activated by prolyl hydroxylation. *Embo J*, 20(18), 5197-5206.
- Masson N, & Ratcliffe PJ. (2003). HIF prolyl and asparaginyl hydroxylases in the biological response to intracellular O(2) levels. *J Cell Sci*, 116(Pt 15), 3041-3049.
- Mathieu J, Zhang Z, Zhou W, Wang AJ, Heddleston JM, Pinna CM, et al. (2011). HIF induces human embryonic stem cell markers in cancer cells. *Cancer Res*, 71(13), 4640-4652.

- Matsumoto M, & Fujimoto H. (1990). Cloning of a hsp70-related gene expressed in mouse spermatids. *Biochem Biophys Res Commun*, 166(1), 43-49.
- Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, et al. (1999). The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*, 399(6733), 271-275.
- Maynard MA, Qi H, Chung J, Lee EH, Kondo Y, Hara S, et al. (2003). Multiple splice variants of the human HIF-3 alpha locus are targets of the von Hippel-Lindau E3 ubiquitin ligase complex. *J Biol Chem*, 278(13), 11032-11040.
- Maynard MA, Evans AJ, Hosomi T, Hara S, Jewett MA, & Ohh M. (2005). Human HIF-3alpha4 is a dominant-negative regulator of HIF-1 and is down-regulated in renal cell carcinoma. *Faseb J*, 19(11), 1396-1406.
- Maynard MA, Evans AJ, Shi W, Kim WY, Liu FF, & Ohh M. (2007). Dominant-negative HIF-3 alpha 4 suppresses VHL-null renal cell carcinoma progression. *Cell Cycle*, 6(22), 2810-2816.
- Mazure NM, & Pouyssegur J. (2010). Hypoxia-induced autophagy: cell death or cell survival? *Curr Opin Cell Biol*, 22(2), 177-180.
- McCarty JS, Buchberger A, Reinstein J, & Bukau B. (1995). The role of ATP in the functional cycle of the DnaK chaperone system. *J Mol Biol*, 249(1), 126-137.
- McCollum AK, TenEyck CJ, Stensgard B, Morlan BW, Ballman KV, Jenkins RB, et al. (2008a). P-Glycoprotein-mediated resistance to Hsp90-directed therapy is eclipsed by the heat shock response. *Cancer Res*, 68(18), 7419-7427.
- McCollum AK, Lukasiewicz KB, Teneyck CJ, Lingle WL, Toft DO, & Erlichman C. (2008b). Cisplatin abrogates the geldanamycin-induced heat shock response. *Mol Cancer Ther*, 7(10), 3256-3264.
- McGuire SE, Fuqua SA, Naylor SL, Helin-Davis DA, & McGuire WL. (1989). Chromosomal assignments of human 27-kDa heat shock protein gene family. *Somat Cell Mol Genet*, 15(2), 167-171.
- McMillan DR, Xiao X, Shao L, Graves K, & Benjamin IJ. (1998). Targeted disruption of heat shock transcription factor 1 abolishes thermotolerance and protection against heat-inducible apoptosis. *J Biol Chem*, 273(13), 7523-7528.

- Mehlen P, Kretz-Remy C, Briolay J, Fostan P, Mirault ME, & Arrigo AP. (1995). Intracellular reactive oxygen species as apparent modulators of heat-shock protein 27 (hsp27) structural organization and phosphorylation in basal and tumour necrosis factor alpha-treated T47D human carcinoma cells. *Biochem J*, 312 (Pt 2), 367-375.
- Mehlen P, Schulze-Osthoff K, & Arrigo AP. (1996). Small stress proteins as novel regulators of apoptosis. Heat shock protein 27 blocks Fas/APO-1- and staurosporine-induced cell death. *J Biol Chem*, 271(28), 16510-16514.
- Mehlen P, Hickey E, Weber LA, & Arrigo AP. (1997). Large unphosphorylated aggregates as the active form of hsp27 which controls intracellular reactive oxygen species and glutathione levels and generates a protection against TNFalpha in NIH-3T3-ras cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 241(1), 187-192.
- Millson SH, Truman AW, Racz A, Hu B, Panaretou B, Nuttall J, et al. (2007). Expressed as the sole Hsp90 of yeast, the alpha and beta isoforms of human Hsp90 differ with regard to their capacities for activation of certain client proteins, whereas only Hsp90beta generates sensitivity to the Hsp90 inhibitor radicicol. *FEBS J*, 274(17), 4453-4463.
- Min JH, Yang H, Ivan M, Gertler F, Kaelin WG, Jr., & Pavletich NP. (2002). Structure of an HIF-1alpha -pVHL complex: hydroxyproline recognition in signaling. *Science*, 296(5574), 1886-1889.
- Minami Y, Kimura Y, Kawasaki H, Suzuki K, & Yahara I. (1994). The carboxy-terminal region of mammalian HSP90 is required for its dimerization and function in vivo. *Mol Cell Biol*, 14(2), 1459-1464.
- Minchenko A, Salceda S, Bauer T, & Caro J. (1994). Hypoxia regulatory elements of the human vascular endothelial growth factor gene. *Cell Mol Biol Res*, 40(1), 35-39.
- Minet E, Mottet D, Michel G, Roland I, Raes M, Remacle J, et al. (1999). Hypoxia-induced activation of HIF-1: role of HIF-1alpha-Hsp90 interaction. *FEBS Lett*, 460(2), 251-256.
- Minet E, Michel G, Mottet D, Raes M, & Michiels C. (2001). Transduction pathways involved in Hypoxia-Inducible Factor-1 phosphorylation and activation. *Free Radic Biol Med*, 31(7), 847-855.
- Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, & Klionsky DJ. (2008). Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*, 451(7182), 1069-1075.
- Moeller BJ, Cao Y, Vujaskovic Z, Li CY, Haroon ZA, & Dewhirst MW. (2004). The relationship between hypoxia and angiogenesis. *Semin Radiat Oncol*, 14(3), 215-221.

Moeller BJ, Dreher MR, Rabbani ZN, Schroeder T, Cao Y, Li CY, et al. (2005). Pleiotropic effects of HIF-1 blockade on tumor radiosensitivity. *Cancer Cell*, 8(2), 99-110.

Montesano Gesualdi N, Chirico G, Pirozzi G, Costantino E, Landriscina M, & Esposito F. (2007). Tumor necrosis factor-associated protein 1 (TRAP-1) protects cells from oxidative stress and apoptosis. *Stress*, 10(4), 342-350.

Mosser DD, & Morimoto RI. (2004). Molecular chaperones and the stress of oncogenesis. *Oncogene*, 23(16), 2907-2918.

Mottet D, Ruys SP, Demazy C, Raes M, & Michiels C. (2005). Role for casein kinase 2 in the regulation of HIF-1 activity. *Int J Cancer*, 117(5), 764-774.

Mounier N, & Arrigo AP. (2002). Actin cytoskeleton and small heat shock proteins: how do they interact? *Cell Stress Chaperones*, 7(2), 167-176.

Murphy PJ, Morishima Y, Kovacs JJ, Yao TP, & Pratt WB. (2005). Regulation of the dynamics of hsp90 action on the glucocorticoid receptor by acetylation/deacetylation of the chaperone. *J Biol Chem*, 280(40), 33792-33799.

Mylonis I, Chachami G, Samiotaki M, Panayotou G, Paraskeva E, Kalousi A, et al. (2006). Identification of MAPK phosphorylation sites and their role in the localization and activity of hypoxia-inducible factor-1alpha. *J Biol Chem*, 281(44), 33095-33106.

Mylonis I, Chachami G, Paraskeva E, & Simos G. (2008). Atypical CRM1-dependent nuclear export signal mediates regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by MAPK. *J Biol Chem*, 283(41), 27620-27627.

N

Nanduri J, Wang N, Yuan G, Khan SA, Souvannakitti D, Peng YJ, et al. (2009). Intermittent hypoxia degrades HIF-2alpha via calpains resulting in oxidative stress: implications for recurrent apnea-induced morbidities. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(4), 1199-1204.

Nardinocchi L, Puca R, Sacchi A, & D'Orazi G. (2009). Inhibition of HIF-1alpha activity by homeodomain-interacting protein kinase-2 correlates with sensitization of chemoresistant cells to undergo apoptosis. *Mol Cancer*, 8, 1.

Neckers L. (2006). Using natural product inhibitors to validate Hsp90 as a molecular target in cancer. *Curr Top Med Chem*, 6(11), 1163-1171.

Neuhaus EM, Mashukova A, Zhang W, Barbour J, & Hatt H. (2006). A specific heat shock protein enhances the expression of mammalian olfactory receptor proteins. *Chem Senses*, 31(5), 445-452.

Nguyen VT, Morange M, & Bensaude O. (1989). Protein denaturation during heat shock and related stress. Escherichia coli beta-galactosidase and Photinus pyralis luciferase inactivation in mouse cells. *J Biol Chem*, 264(18), 10487-10492.

Nizet V, & Johnson RS. (2009). Interdependence of hypoxic and innate immune responses. *Nat Rev Immunol*, 9(9), 609-617.

Nylandsted J, Gyrd-Hansen M, Danielewicz A, Fehrenbacher N, Lademann U, Hoyer-Hansen M, et al. (2004). Heat shock protein 70 promotes cell survival by inhibiting lysosomal membrane permeabilization. *J Exp Med*, 200(4), 425-435.

O

O'Rourke JF, Tian YM, Ratcliffe PJ, & Pugh CW. (1999). Oxygen-regulated and transactivating domains in endothelial PAS protein 1: comparison with hypoxia-inducible factor-1alpha. *J Biol Chem*, 274(4), 2060-2071.

Ohh M, Park CW, Ivan M, Hoffman MA, Kim TY, Huang LE, et al. (2000). Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the beta-domain of the von Hippel-Lindau protein. *Nat Cell Biol*, 2(7), 423-427.

Orlowski M, Cardozo C, Hidalgo MC, & Michaud C. (1991). Regulation of the peptidylglutamyl-peptide hydrolyzing activity of the pituitary multicatalytic proteinase complex. *Biochemistry*, 30(24), 5999-6005.

Orlowski M. (1993). The multicatalytic proteinase complex (proteasome) and intracellular protein degradation: diverse functions of an intracellular particle. *J Lab Clin Med*, 121(2), 187-189.

Orlowski M, Cardozo C, Eleuteri AM, Kohanski R, Kam CM, & Powers JC. (1997). Reactions of [14C]-3,4-dichloroisocoumarin with subunits of pituitary and spleen multicatalytic proteinase complexes (proteasomes). *Biochemistry*, 36(45), 13946-13953.

P

Pagano M, & Benmaamar R. (2003). When protein destruction runs amok, malignancy is on the loose. *Cancer Cell*, 4(4), 251-256.

Paltoglou S, & Roberts BJ. (2007). HIF-1alpha and EPAS ubiquitination mediated by the VHL tumour suppressor involves flexibility in the ubiquitination mechanism, similar to other RING E3 ligases. *Oncogene*, 26(4), 604-609.

Pandey P, Saleh A, Nakazawa A, Kumar S, Srinivasula SM, Kumar V, et al. (2000a). Negative regulation of cytochrome c-mediated oligomerization of Apaf-1 and activation of procaspase-9 by heat shock protein 90. *Embo J*, 19(16), 4310-4322.

Pandey P, Farber R, Nakazawa A, Kumar S, Bharti A, Nalin C, et al. (2000b). Hsp27 functions as a negative regulator of cytochrome c-dependent activation of procaspase-3. *Oncogene*, 19(16), 1975-1981.

Papandreou I, Cairns RA, Fontana L, Lim AL, & Denko NC. (2006). HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab*, 3(3), 187-197.

Parcellier A, Schmitt E, Gurbuxani S, Seigneurin-Berny D, Pance A, Chantome A, et al. (2003). HSP27 is a ubiquitin-binding protein involved in I-kappaBalpha proteasomal degradation. *Mol Cell Biol*, 23(16), 5790-5802.

Parcellier A, Brunet M, Schmitt E, Col E, Didelot C, Hammann A, et al. (2006). HSP27 favors ubiquitination and proteasomal degradation of p27Kip1 and helps S-phase re-entry in stressed cells. *Faseb J*, 20(8), 1179-1181.

Paul C, Manero F, Gonin S, Kretz-Remy C, Viot S, & Arrigo AP. (2002). Hsp27 as a negative regulator of cytochrome C release. *Mol Cell Biol*, 22(3), 816-834.

Pearl LH, & Prodromou C. (2006). Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery. *Annu Rev Biochem*, 75, 271-294.

Pelzer C, Kassner I, Matentzoglou K, Singh RK, Wollscheid HP, Scheffner M, et al. (2007). UBE1L2, a novel E1 enzyme specific for ubiquitin. *J Biol Chem*, 282(32), 23010-23014.

Petroski MD, & Deshaies RJ. (2005). Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6(1), 9-20.

- Pollard PJ, Spencer-Dene B, Shukla D, Howarth K, Nye E, El-Bahrawy M, et al. (2007). Targeted inactivation of fh1 causes proliferative renal cyst development and activation of the hypoxia pathway. *Cancer Cell*, 11(4), 311-319.
- Porter W, Wang F, Wang W, Duan R, & Safe S. (1996). Role of estrogen receptor/Sp1 complexes in estrogen-induced heat shock protein 27 gene expression. *Mol Endocrinol*, 10(11), 1371-1378.
- Powers MV, Clarke PA, & Workman P. (2008). Dual targeting of HSC70 and HSP72 inhibits HSP90 function and induces tumor-specific apoptosis. *Cancer Cell*, 14(3), 250-262.
- Pratt WB. (1992). Control of steroid receptor function and cytoplasmic-nuclear transport by heat shock proteins. *Bioessays*, 14(12), 841-848.
- Pratt WB, & Toft DO. (2003). Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. *Exp Biol Med (Maywood)*, 228(2), 111-133.
- Pratt WB, Galigniana MD, Morishima Y, & Murphy PJ. (2004). Role of molecular chaperones in steroid receptor action. *Essays Biochem*, 40, 41-58.
- Pratt WB, Morishima Y, Murphy M, & Harrell M. (2006). Chaperoning of glucocorticoid receptors. *Handb Exp Pharmacol*(172), 111-138.
- Pries AR, Cornelissen AJ, Sloot AA, Hinkeldey M, Dreher MR, Hopfner M, et al. (2009). Structural adaptation and heterogeneity of normal and tumor microvascular networks. *PLoS Comput Biol*, 5(5), e1000394.
- Prodromou C, Roe SM, O'Brien R, Ladbury JE, Piper PW, & Pearl LH. (1997). Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in the Hsp90 molecular chaperone. *Cell*, 90(1), 65-75.
- Prodromou C, & Pearl LH. (2003). Structure and functional relationships of Hsp90. *Curr Cancer Drug Targets*, 3(5), 301-323.
- Pugh CW, O'Rourke JF, Nagao M, Gleadle JM, & Ratcliffe PJ. (1997). Activation of hypoxia-inducible factor-1; definition of regulatory domains within the alpha subunit. *J Biol Chem*, 272(17), 11205-11214.

Q

Qing G, & Simon MC. (2009). Hypoxia inducible factor-2alpha: a critical mediator of aggressive tumor phenotypes. *Curr Opin Genet Dev*, 19(1), 60-66.

R

Raasi S, Varadan R, Fushman D, & Pickart CM. (2005). Diverse polyubiquitin interaction properties of ubiquitin-associated domains. *Nat Struct Mol Biol*, 12(8), 708-714.

Rankin EB, Biju MP, Liu Q, Unger TL, Rha J, Johnson RS, et al. (2007). Hypoxia-inducible factor-2 (HIF-2) regulates hepatic erythropoietin in vivo. *J Clin Invest*, 117(4), 1068-1077.

Ratcliffe PJ, Ebert BL, Ferguson DJ, Firth JD, Gleagle JM, Maxwell PH, et al. (1995). Regulation of the erythropoietin gene. *Nephrol Dial Transplant*, 10 Suppl 2, 18-27.

Rathmell WK, & Chen S. (2008). VHL inactivation in renal cell carcinoma: implications for diagnosis, prognosis and treatment. *Expert Rev Anticancer Ther*, 8(1), 63-73.

Ravagnan L, Gurbuxani S, Susin SA, Maise C, Daugas E, Zamzami N, et al. (2001). Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. *Nat Cell Biol*, 3(9), 839-843.

Raval RR, Lau KW, Tran MG, Sowter HM, Mandriota SJ, Li JL, et al. (2005). Contrasting properties of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in von Hippel-Lindau-associated renal cell carcinoma. *Mol Cell Biol*, 25(13), 5675-5686.

Rechsteiner M, & Rogers SW. (1996). PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci*, 21(7), 267-271.

Reddy RK, Dubeau L, Kleiner H, Parr T, Nichols P, Ko B, et al. (2002). Cancer-inducible transgene expression by the Grp94 promoter: spontaneous activation in tumors of various origins and cancer-associated macrophages. *Cancer Res*, 62(24), 7207-7212.

Richard DE, Berra E, Gothie E, Roux D, & 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(46), 32631-32637.

Richter K, & Buchner J. (2001). Hsp90: chaperoning signal transduction. *J Cell Physiol*, 188(3), 281-290.

Robert J, Menoret A, & Cohen N. (1999). Cell surface expression of the endoplasmic reticular heat shock protein gp96 is phylogenetically conserved. *J Immunol*, 163(8), 4133-4139.

Roberts AM, Watson IR, Evans AJ, Foster DA, Irwin MS, & Ohh M. (2009). Suppression of hypoxia-inducible factor 2alpha restores p53 activity via Hdm2 and reverses chemoresistance of renal carcinoma cells. *Cancer Res*, 69(23), 9056-9064.

Robinson PA, & Ardley HC. (2004). Ubiquitin-protein ligases. *J Cell Sci*, 117(Pt 22), 5191-5194.

Rocchi P, Jugpal P, So A, Sinneman S, Ettinger S, Fazli L, et al. (2006). Small interference RNA targeting heat-shock protein 27 inhibits the growth of prostatic cell lines and induces apoptosis via caspase-3 activation in vitro. *BJU Int*, 98(5), 1082-1089.

Rock KL, York IA, Saric T, & Goldberg AL. (2002). Protein degradation and the generation of MHC class I-presented peptides. *Adv Immunol*, 80, 1-70.

Roe SM, Prodromou C, O'Brien R, Ladbury JE, Piper PW, & Pearl LH. (1999). Structural basis for inhibition of the Hsp90 molecular chaperone by the antitumor antibiotics radicicol and geldanamycin. *J Med Chem*, 42(2), 260-266.

Rogalla T, Ehrnsperger M, Preville X, Kotlyarov A, Lutsch G, Ducasse C, et al. (1999). Regulation of Hsp27 oligomerization, chaperone function, and protective activity against oxidative stress/tumor necrosis factor alpha by phosphorylation. *J Biol Chem*, 274(27), 18947-18956.

Rohwer N, Dame C, Haugstetter A, Wiedenmann B, Detjen K, Schmitt CA, et al. (2010). Hypoxia-inducible factor 1alpha determines gastric cancer chemosensitivity via modulation of p53 and NF-kappaB. *PLoS One*, 5(8), e12038.

Rohwer N, & Cramer T. (2011). Hypoxia-mediated drug resistance: novel insights on the functional interaction of HIFs and cell death pathways. *Drug Resist Updat*, 14(3), 191-201.

S

Samali A, & Orrenius S. (1998). Heat shock proteins: regulators of stress response and apoptosis. *Cell Stress Chaperones*, 3(4), 228-236.

Samali A, Holmberg CI, Sistonen L, & Orrenius S. (1999). Thermotolerance and cell death are distinct cellular responses to stress: dependence on heat shock proteins. *FEBS Lett*, 461(3), 306-310.

- Samali A, Robertson JD, Peterson E, Manero F, van Zeijl L, Paul C, et al. (2001). Hsp27 protects mitochondria of thermotolerant cells against apoptotic stimuli. *Cell Stress Chaperones*, 6(1), 49-58.
- Sanderson S, Valenti M, Gowan S, Patterson L, Ahmad Z, Workman P, et al. (2006). Benzoquinone ansamycin heat shock protein 90 inhibitors modulate multiple functions required for tumor angiogenesis. *Mol Cancer Ther*, 5(3), 522-532.
- Sato S, Fujita N, & Tsuruo T. (2000). Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(20), 10832-10837.
- Scheffner M, Nuber U, & Huibregtse JM. (1995). Protein ubiquitination involving an E1-E2-E3 enzyme ubiquitin thioester cascade. *Nature*, 373(6509), 81-83.
- Schepens B, Tinton SA, Bruynooghe Y, Beyaert R, & Cornelis S. (2005). The polypyrimidine tract-binding protein stimulates HIF-1alpha IRES-mediated translation during hypoxia. *Nucleic Acids Res*, 33(21), 6884-6894.
- Scortegagna M, Ding K, Zhang Q, Oktay Y, Bennett MJ, Bennett M, et al. (2005). HIF-2alpha regulates murine hematopoietic development in an erythropoietin-dependent manner. *Blood*, 105(8), 3133-3140.
- Seemuller E, Lupas A, Stock D, Lowe J, Huber R, & Baumeister W. (1995). Proteasome from *Thermoplasma acidophilum*: a threonine protease. *Science*, 268(5210), 579-582.
- Seemuller E, Lupas A, & Baumeister W. (1996). Autocatalytic processing of the 20S proteasome. *Nature*, 382(6590), 468-471.
- Semenza GL, & Wang GL. (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(12), 5447-5454.
- Semenza GL, Roth PH, Fang HM, & Wang GL. (1994). Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem*, 269(38), 23757-23763.
- Semenza GL. (1999). Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 15, 551-578.
- Semenza GL. (2000a). Hypoxia, clonal selection, and the role of HIF-1 in tumor progression. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 35(2), 71-103.

- Semenza GL, Agani F, Feldser D, Iyer N, Kotch L, Laughner E, et al. (2000). Hypoxia, HIF-1, and the pathophysiology of common human diseases. *Adv Exp Med Biol*, 475, 123-130.
- Semenza GL. (2000b). HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol*, 88(4), 1474-1480.
- Semenza GL. (2002). HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. *Trends Mol Med*, 8(4 Suppl), S62-67.
- Semenza GL. (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 3(10), 721-732.
- Sendoel A, Kohler I, Fellmann C, Lowe SW, & Hengartner MO. (2010). HIF-1 antagonizes p53-mediated apoptosis through a secreted neuronal tyrosinase. *Nature*, 465(7298), 577-583.
- Sermeus A, & Michiels C. (2011). Reciprocal influence of the p53 and the hypoxic pathways. *Cell Death Dis*, 2, e164.
- Shchors K, & Evan G. (2007). Tumor angiogenesis: cause or consequence of cancer? *Cancer Res*, 67(15), 7059-7061.
- Simons AM, Horwitz AA, Starita LM, Griffin K, Williams RS, Glover JN, et al. (2006). BRCA1 DNA-binding activity is stimulated by BARD1. *Cancer Res*, 66(4), 2012-2018.
- Skuli N, & Simon MC. (2009). HIF-1alpha versus HIF-2alpha in endothelial cells and vascular functions: is there a master in angiogenesis regulation? *Cell Cycle*, 8(20), 3252-3253.
- Solomon DA, Cardoso MC, & Knudsen ES. (2004). Dynamic targeting of the replication machinery to sites of DNA damage. *J Cell Biol*, 166(4), 455-463.
- Son WY, Han CT, Hwang SH, Lee JH, Kim S, & Kim YC. (2000). Repression of hspA2 messenger RNA in human testes with abnormal spermatogenesis. *Fertil Steril*, 73(6), 1138-1144.
- Song X, Liu X, Chi W, Liu Y, Wei L, Wang X, et al. (2006). Hypoxia-induced resistance to cisplatin and doxorubicin in non-small cell lung cancer is inhibited by silencing of HIF-1alpha gene. *Cancer Chemother Pharmacol*, 58(6), 776-784.
- Soti C, Racz A, & Csermely P. (2002). A Nucleotide-dependent molecular switch controls ATP binding at the C-terminal domain of Hsp90. N-terminal nucleotide binding unmask a C-terminal binding pocket. *J Biol Chem*, 277(9), 7066-7075.
- Sreedhar AS, Kalmar E, Csermely P, & Shen YF. (2004). Hsp90 isoforms: functions, expression and clinical importance. *FEBS Lett*, 562(1-3), 11-15.

Steel R, Doherty JP, Buzzard K, Clemons N, Hawkins CJ, & Anderson RL. (2004). Hsp72 inhibits apoptosis upstream of the mitochondria and not through interactions with Apaf-1. *J Biol Chem*, 279(49), 51490-51499.

Stokoe D, Engel K, Campbell DG, Cohen P, & Gaestel M. (1992). Identification of MAPKAP kinase 2 as a major enzyme responsible for the phosphorylation of the small mammalian heat shock proteins. *FEBS Lett*, 313(3), 307-313.

Stolze IP, Tian YM, Appelhoff RJ, Turley H, Wykoff CC, Gleadle JM, et al. (2004). Genetic analysis of the role of the asparaginyl hydroxylase factor inhibiting hypoxia-inducible factor (FIH) in regulating hypoxia-inducible factor (HIF) transcriptional target genes [corrected]. *J Biol Chem*, 279(41), 42719-42725.

Stommel JM, & Wahl GM. (2004). Accelerated MDM2 auto-degradation induced by DNA-damage kinases is required for p53 activation. *Embo J*, 23(7), 1547-1556.

Suriano R, Ghosh SK, Ashok BT, Mittelman A, Chen Y, Banerjee A, et al. (2005). Differences in glycosylation patterns of heat shock protein, gp96: implications for prostate cancer prevention. *Cancer Res*, 65(14), 6466-6475.

T

Tang N, Wang L, Esko J, Giordano FJ, Huang Y, Gerber HP, et al. (2004). Loss of HIF-1alpha in endothelial cells disrupts a hypoxia-driven VEGF autocrine loop necessary for tumorigenesis. *Cancer Cell*, 6(5), 485-495.

Tar K, Csontos C, Czikora I, Olah G, Ma SF, Wadgaonkar R, et al. (2006). Role of protein phosphatase 2A in the regulation of endothelial cell cytoskeleton structure. *J Cell Biochem*, 98(4), 931-953.

Thrower JS, Hoffman L, Rechsteiner M, & Pickart CM. (2000). Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *Embo J*, 19(1), 94-102.

Tian H, McKnight SL, & Russell DW. (1997). Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev*, 11(1), 72-82.

Tojo M, Matsuzaki K, Minami T, Honda Y, Yasuda H, Chiba T, et al. (2002). The aryl hydrocarbon receptor nuclear transporter is modulated by the SUMO-1 conjugation system. *J Biol Chem*, 277(48), 46576-46585.

Tormos KV, & Chandel NS. (2010). Inter-connection between mitochondria and HIFs. *J Cell Mol Med*, 14(4), 795-804.

Trisciuglio D, Gabellini C, Desideri M, Ziparo E, Zupi G, & Del Bufalo D. (2010). Bcl-2 regulates HIF-1alpha protein stabilization in hypoxic melanoma cells via the molecular chaperone HSP90. *PLoS One*, 5(7), e11772.

Trisciuglio D, Gabellini C, Desideri M, Ragazzoni Y, De Luca T, Ziparo E, et al. (2011). Involvement of BH4 domain of bcl-2 in the regulation of HIF-1-mediated VEGF expression in hypoxic tumor cells. *Cell Death Differ*, 18(6), 1024-1035.

U

Uchida T, Rossignol F, Matthay MA, Mounier R, Couette S, Clottes E, et al. (2004). Prolonged hypoxia differentially regulates hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha expression in lung epithelial cells: implication of natural antisense HIF-1alpha. *J Biol Chem*, 279(15), 14871-14878.

Ullah MS, Davies AJ, & Halestrap AP. (2006). The plasma membrane lactate transporter MCT4, but not MCT1, is up-regulated by hypoxia through a HIF-1alpha-dependent mechanism. *J Biol Chem*, 281(14), 9030-9037.

Unno M, Mizushima T, Morimoto Y, Tomisugi Y, Tanaka K, Yasuoka N, et al. (2002). Structure determination of the constitutive 20S proteasome from bovine liver at 2.75 Å resolution. *J Biochem*, 131(2), 171-173.

Unruh A, Ressel A, Mohamed HG, Johnson RS, Nadrowitz R, Richter E, et al. (2003). The hypoxia-inducible factor-1 alpha is a negative factor for tumor therapy. *Oncogene*, 22(21), 3213-3220.

V

Valmori D, Gileadi U, Servis C, Dunbar PR, Cerottini JC, Romero P, et al. (1999). Modulation of proteasomal activity required for the generation of a cytotoxic T lymphocyte-defined peptide derived from the tumor antigen MAGE-3. *J Exp Med*, 189(6), 895-906.

van de Sluis B, Groot AJ, Vermeulen J, van der Wall E, van Diest PJ, Wijnenga C, et al. (2009). COMMD1 Promotes pVHL and O₂-Independent Proteolysis of HIF-1alpha via HSP90/70. *PLoS One*, 4(10), e7332.

van Hagen M, Overmeer RM, Abolvardi SS, & Vertegaal AC. (2010). RNF4 and VHL regulate the proteasomal degradation of SUMO-conjugated Hypoxia-Inducible Factor-2alpha. *Nucleic Acids Res*, 38(6), 1922-1931.

Vander Heiden MG, Cantley LC, & Thompson CB. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*, 324(5930), 1029-1033.

Vanmuylder N, Werry-Huet A, Rooze M, & Louryan S. (2002). Heat shock protein HSP86 expression during mouse embryo development, especially in the germ-line. *Anat Embryol (Berl)*, 205(4), 301-306.

Varadan R, Assfalg M, Raasi S, Pickart C, & Fushman D. (2005). Structural determinants for selective recognition of a Lys48-linked polyubiquitin chain by a UBA domain. *Mol Cell*, 18(6), 687-698.

Varfolomeev E, Blankenship JW, Wayson SM, Fedorova AV, Kayagaki N, Garg P, et al. (2007). IAP antagonists induce autoubiquitination of c-IAPs, NF-kappaB activation, and TNFalpha-dependent apoptosis. *Cell*, 131(4), 669-681.

Varshavsky A. (1992). The N-end rule. *Cell*, 69(5), 725-735.

Varshavsky A. (1996). The N-end rule: functions, mysteries, uses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(22), 12142-12149.

Velazquez JM, & Lindquist S. (1984). hsp70: nuclear concentration during environmental stress and cytoplasmic storage during recovery. *Cell*, 36(3), 655-662.

Verma R, Aravind L, Oania R, McDonald WH, Yates JR, 3rd, Koonin EV, et al. (2002). Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Science*, 298(5593), 611-615.

Voss AK, Thomas T, & Gruss P. (2000). Mice lacking HSP90beta fail to develop a placental labyrinth. *Development*, 127(1), 1-11.

W

Wada T, Shimba S, & Tezuka M. (2006). Transcriptional regulation of the hypoxia inducible factor-2alpha (HIF-2alpha) gene during adipose differentiation in 3T3-L1 cells. *Biol Pharm Bull*, 29(1), 49-54.

Walters KJ, Goh AM, Wang Q, Wagner G, & Howley PM. (2004). Ubiquitin family proteins and their relationship to the proteasome: a structural perspective. *Biochim Biophys Acta*, 1695(1-3), 73-87.

Wandinger SK, Richter K, & Buchner J. (2008). The Hsp90 chaperone machinery. *J Biol Chem*, 283(27), 18473-18477.

Wang C, Xi J, Begley TP, & Nicholson LK. (2001). Solution structure of ThiS and implications for the evolutionary roots of ubiquitin. *Nat Struct Biol*, 8(1), 47-51.

Wang F, Sekine H, Kikuchi Y, Takasaki C, Miura C, Heiwa O, et al. (2002). HIF-1alpha-prolyl hydroxylase: molecular target of nitric oxide in the hypoxic signal transduction pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, 295(3), 657-662.

Wang GL, & Semenza GL. (1993). Desferrioxamine induces erythropoietin gene expression and hypoxia-inducible factor 1 DNA-binding activity: implications for models of hypoxia signal transduction. *Blood*, 82(12), 3610-3615.

Wang GL, Jiang BH, Rue EA, & Semenza GL. (1995). 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(12), 5510-5514.

Wang GL, & Semenza GL. (1995). Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem*, 270(3), 1230-1237.

Wang J, & Maldonado MA. (2006). The ubiquitin-proteasome system and its role in inflammatory and autoimmune diseases. *Cell Mol Immunol*, 3(4), 255-261.

Weissman AM. (2001). Themes and variations on ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2(3), 169-178.

Welch WJ, & Suhan JP. (1986). Cellular and biochemical events in mammalian cells during and after recovery from physiological stress. *J Cell Biol*, 103(5), 2035-2052.

Wenger RH, Rolfs A, Marti HH, Bauer C, & Gassmann M. (1995). Hypoxia, a novel inducer of acute phase gene expression in a human hepatoma cell line. *J Biol Chem*, 270(46), 27865-27870.

Wenger RH. (2002). Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *Faseb J*, 16(10), 1151-1162.

Wiesener MS, Turley H, Allen WE, Willam C, Eckardt KU, Talks KL, et al. (1998). Induction of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia: characterization and comparison with hypoxia-inducible factor-1alpha. *Blood*, 92(7), 2260-2268.

Wiesener MS, Jurgensen JS, Rosenberger C, Scholze CK, Horstrup JH, Warnecke C, et al. (2003). Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2alpha in distinct cell populations of different organs. *Faseb J*, 17(2), 271-273.

Wilkinson KD. (2000). Ubiquitination and deubiquitination: targeting of proteins for degradation by the proteasome. *Semin Cell Dev Biol*, 11(3), 141-148.

Wong E, & Cuervo AM. (2010). Integration of clearance mechanisms: the proteasome and autophagy. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2(12), a006734.

Workman P, Burrows F, Neckers L, & Rosen N. (2007). Drugging the cancer chaperone HSP90: combinatorial therapeutic exploitation of oncogene addiction and tumor stress. *Ann N Y Acad Sci*, 1113, 202-216.

X

Xu P, Duong DM, Seyfried NT, Cheng D, Xie Y, Robert J, et al. (2009). Quantitative proteomics reveals the function of unconventional ubiquitin chains in proteasomal degradation. *Cell*, 137(1), 133-145.

Xu Y, Zuo Y, Zhang H, Kang X, Yue F, Yi Z, et al. (2010). Induction of SENP1 in endothelial cells contributes to hypoxia-driven VEGF expression and angiogenesis. *J Biol Chem*, 285(47), 36682-36688.

Y

Yamano H, Tsurumi C, Gannon J, & Hunt T. (1998). The role of the destruction box and its neighbouring lysine residues in cyclin B for anaphase ubiquitin-dependent proteolysis in fission yeast: defining the D-box receptor. *Embo J*, 17(19), 5670-5678.

Yang Y, Li CC, & Weissman AM. (2004). Regulating the p53 system through ubiquitination. *Oncogene*, 23(11), 2096-2106.

Yang Y, & Li Z. (2005). Roles of heat shock protein gp96 in the ER quality control: redundant or unique function? *Mol Cells*, 20(2), 173-182.

Yang Y, Liu B, Dai J, Srivastava PK, Zammit DJ, Lefrancois L, et al. (2007). Heat shock protein gp96 is a master chaperone for toll-like receptors and is important in the innate function of macrophages. *Immunity*, 26(2), 215-226.

Yasinska IM, & Sumbayev VV. (2003). S-nitrosation of Cys-800 of HIF-1alpha protein activates its interaction with p300 and stimulates its transcriptional activity. *FEBS Lett*, 549(1-3), 105-109.

Young RM, Wang SJ, Gordan JD, Ji X, Liebhaber SA, & Simon MC. (2008). Hypoxia-mediated selective mRNA translation by an internal ribosome entry site-independent mechanism. *J Biol Chem*, 283(24), 16309-16319.

Yu AY, Frid MG, Shimoda LA, Wiener CM, Stenmark K, & Semenza GL. (1998). Temporal, spatial, and oxygen-regulated expression of hypoxia-inducible factor-1 in the lung. *Am J Physiol*, 275(4 Pt 1), L818-826.

Z

Zavialov A, Benndorf R, Ehrnsperger M, Zav'yalov V, Dudich I, Buchner J, et al. (1998). The effect of the intersubunit disulfide bond on the structural and functional properties of the small heat shock protein Hsp25. *Int J Biol Macromol*, 22(3-4), 163-173.

Zhang D, Li J, Costa M, Gao J, & Huang C. (2010). JNK1 mediates degradation HIF-1alpha by a VHL-independent mechanism that involves the chaperones Hsp90/Hsp70. *Cancer Res*, 70(2), 813-823.

Zhang H, Gao P, Fukuda R, Kumar G, Krishnamachary B, Zeller KI, et al. (2007). HIF-1 inhibits mitochondrial biogenesis and cellular respiration in VHL-deficient renal cell carcinoma by repression of C-MYC activity. *Cancer Cell*, 11(5), 407-420.

Zhang H, Bosch-Marce M, Shimoda LA, Tan YS, Baek JH, Wesley JB, et al. (2008). Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia. *J Biol Chem*, 283(16), 10892-10903.

Zhu H, Chen XP, Luo SF, Guan J, Zhang WG, & Zhang BX. (2005). Involvement of hypoxia-inducible factor-1-alpha in multidrug resistance induced by hypoxia in HepG2 cells. *J Exp Clin Cancer Res*, 24(4), 565-574.

Zwickl P, Voges D, & Baumeister W. (1999). The proteasome: a macromolecular assembly designed for controlled proteolysis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 354(1389), 1501-1511.

Zwickl P, Seemuller E, Kapelari B, & Baumeister W. (2001). The proteasome: a supramolecular assembly designed for controlled proteolysis. *Adv Protein Chem*, 59, 187-222.

ANNEXES

LISTE DES PUBLICATIONS PERSONNELLES

de Thonel A, Vandekerckhove J, Lanneau D, Selvakumar S, Courtois G, Hazoume A, Brunet M, Maurel S, Hammann A, Ribeil JA, Zermati Y, Gabet AS, Boyes J, Solary E, Hermine O, Garrido C (2010). HSP27 controls GATA-1 protein level during erythroid cell differentiation. *Blood*, 116(1), 85-96.

Lanneau D, de Thonel A, Maurel S, Didelot C, & Garrido C (2007). Apoptosis versus cell differentiation: role of heat shock proteins HSP90, HSP70 and HSP27. *Prion*, 1(1), 53-60.