



IFR Alfred Jost

XXe Journée Jean-Claude Dreyfus

GENES, OXYGENE ET HYPOXIE **GENES, OXYGEN AND HYPOXIA**

19 Septembre 2003

Faculté de Médecine Cochin Port-Royal

Organisation :

Pr Axel KAHN – Directeur de l'Institut Cochin

Secrétariat-gestion : Odette GODARD-Maryse DERAND

Audiovisuel : Louis LAGOUTTE – Yves MEMASSE-LASNIER

Surveillance-buffet-pauses : assurés par les personnels des services généraux de l'Institut

Inserm
Unité 567

CYRS
UMR 8104

PARIS 5

Résumés des communications orales

1^{ère} Session : ANGIOGÉNÈSE

MOLECULAR BIOLOGY OF OXYGEN-SENSING

Christopher W. PUGH

Henry Wellcome Building for Genomic Medicine, Roosevelt Drive, Headington, Oxford, OX3 7BN.

Studies of erythropoietin gene regulation led to the discovery of hypoxia-inducible factor-1 (HIF), a transcription factor containing a heterodimer of basic helix-loop-helix PAS domain proteins. HIF has subsequently been shown to be a dominant regulator of a number of groups of genes involved in oxygen homeostasis, including those involved in energy metabolism, iron regulation, cell proliferation and angiogenesis. The co-ordinated alteration of patterns of gene expression via HIF occurs in tumours and may underlie the glycolytic and angiogenic phenotypes of cancer. The HIF pathway is conserved in primitive multicellular organisms, including *D. melanogaster* and *C. elegans*, and therefore predates the development of blood and cardiovascular systems.

HIF is predominantly regulated via its alpha subunits. Oxygen levels affect HIF activity by regulating functions including protein stability, nuclear entry and co-activator recruitment. HIF activity can also be induced by iron chelation or treatment with cobaltous ions. Studies of the regulation of protein stability provided the first evidence for the involvement of enzymatic hydroxylation of critical amino acids in this process, and implicated the enzymes involved as cellular oxygen sensors. Normoxic hydroxylation of either of two conserved prolyl residues in the oxygen-dependent degradation domain of HIF alpha chains allows formation of two extra hydrogen bonds, stabilising binding to the von Hippel-Lindau protein (pVHL) / elongin C/ elongin B complex (VCB). VCB is an E3 ligase which then ubiquitylates the HIF alpha chains leading to their rapid proteasomal destruction. In hypoxia hydroxylation is reduced and the HIF alpha chains stabilised. Similarly, in von Hippel-Lindau disease the destruction of HIF alpha sub-units is blocked, thereby explaining at least some aspects of the phenotype. The prolyl hydroxylase enzymes are members of the 2-oxoglutarate and iron dependent dioxygenase family,

sharing a beta barrel jelly roll motif co-ordinating iron (II) at their catalytic centre. Studies in *C. elegans* led to the identification of Egl-9 as the worm HIF prolyl hydroxylase and database searches revealed three human genes encoding HIF prolyl hydroxylases.

Hydroxylation of an asparaginyl residue in the C terminal transactivation domain prevents binding of the p300/CBP co-activator in normoxia, thereby further inhibiting transcriptional activation. Structural predictions suggested that Factor Inhibiting HIF, a protein shown to interact with the C terminus of HIF alpha chains, might be a dioxygenase and subsequent work has demonstrated that it can hydroxylate the asparaginyl residue in the C terminal transactivation domain.

Activity of recombinant prolyl and asparaginyl hydroxylase enzymes is directly affected by oxygen availability, compatible with their role as cellular oxygen sensors. Enzyme activity can also be inhibited by iron chelation or treatment with cobaltous ions thereby explaining the effects of these treatments on HIF activity. The different enzymes have distinct intracellular and tissue distributions, are induced by different stimuli and have varying functional capacities.

Manipulation of this physiological transcriptional master regulator has therapeutic potential. For example, in experimental systems interfering with HIF inactivation is a good route to influencing complex processes such as angiogenesis, producing more mature new vessels than can be induced by individual growth factors. Knowledge of the enzymatic regulation of HIF activity has been used to design small molecules capable of modulating downstream gene expression. One example is oxaloylglycine, an analogue of the co-substrate 2-oxoglutarate, which inhibits the enzymes and activates HIF. When esterified, oxaloylglycine can enter cells and when administered in vivo can induce new blood vessel growth and metabolic adaptation.

HYPOXIA-SIGNALING AND ANGIOGENESIS

Jacques POUYSSEGUR

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

Angiogenic factors modulate basic endothelial cell functions such as migration and proliferation, but how these factors are regulated in response to various nutritional stresses, at a molecular level, is not yet fully understood. A remarkable signaling system devised for rapid adaptation to and survival in a low oxygen environment (hypoxia) has been conserved throughout evolution. The hypoxia inducible transcription factor HIF, found in worms, flies and vertebrates is central to this adaptation and as such, *hif-1* represents a 'master' gene in oxygen homeostasis[1]. HIF-1 is a transcriptional complex that plays a pivotal role in cellular adaptation to low oxygen availability, inducing many genes encoding for VEGF, EPO, GLUT1 and other essential glycolytic enzymes[2, 3]. In the presence of oxygen, the HIF- α subunits are targeted for destruction by proline hydroxylation, a specific modification that provides recognition for the E3 ubiquitin ligase complex containing the von Hippel-Lindau tumour suppressor protein (pVHL)[4]. HIF-1 α degradation takes place equally well in nucleus and cytoplasm, suggesting that proline hydroxylation, pVHL-mediated ubiquitination and proteasomal destruction are competent in both cellular compartments[5]. Three mammalian HIF prolyl-hydroxylases (PHD1, 2, 3), homologous to the HIF prolyl-hydroxylase of *C. elegans* (EGL-9), were recently identified and shown, at least in vitro, to down regulate HIF- α subunits[6-8]. These enzymes, together with the HIF asparaginyl hydroxylase (FIH)[9], which 'represses' the activity of HIF-1 α , belong to a large family of non-haem iron oxygenases that require O₂ and 2-oxoglutarate for their function. In this presentation we will show that specific 'silencing' of HIF prolyl-hydroxylase 2 (PHD2) with short interfering RNAs (siRNA) is sufficient to stabilize and activate HIF-1 α , in normoxia, in all the human cells investigated. A remarkable synergy in the HIF-1 α activation process is observed in normoxia by 'co-silencing' both, PHD2 and FIH. This action measured by a HIF-dependent reporter gene recapitulates a full hypoxic response. Surprisingly, 'silencing' of the other two HIF prolyl-hydroxylases, PHD1 and PHD3, had no effect on the stability of HIF-1 α either in normoxia or upon re-oxygenation of hypoxic cells. We conclude that PHD2, a cytoplasmic enzyme capable of shuttling between cytoplasm and nucleus, is the critical oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1 α , in normoxic conditions. Interestingly, PHD2 is up-regulated by HIF-1 providing an auto-regulatory mechanism driven by the oxygen tension, a retro-control mechanism that we previously proposed [10] [11].

The stabilisation of HIF-1 α in normoxic cells, however, following PHD2 ablation, is progressively "desensitized" within 4 to 5 days in culture uncovering a more complex mechanism than originally thought. Central to this action appears to be a HIF-1 dependent activation process, implicating an interplay between oxygen sensors PHD2 and PHD1, a model of which will be presented [11].

References

1. Semenza, G. L. (1998) Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O₂ homeostasis, *Curr Opin Genet Dev.* 8, 588-94.
2. Semenza, G. L. (2000) HIF-1: using two hands to flip the angiogenic switch, *Cancer Metastasis Rev.* 19, 59-65.
3. Brahimi-Horn, C., Berra, E. & Pouyssegur, J. (2001) Hypoxia: the tumor's gateway to progression along the angiogenic pathway, *Trends Cell Biol.* 11, S32-6.
4. Cockman, M. E., Masson, N., Mole, D. R., Jaakkola, P., Chang, G. W., Clifford, S. C., Maher, E. R., Pugh, C. W., Ratcliffe, P. J. & Maxwell, P. H. (2000) Hypoxia inducible factor- α binding and ubiquitylation by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein, *J. Biol. Chem.* 275, 25733-41.
5. Berra, E., Roux, D., Richard, D. E. & Pouyssegur, J. (2001) Hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) escapes O₂-driven proteasomal degradation irrespective of its subcellular localization: nucleus or cytoplasm., *Embo Rep.* 7, 615-620.
6. Epstein, A. C., Gleadle, J. M., McNeill, L. A., Hewitson, K. S., O'Rourke, J., Mole, D. R., Mukherji, M., Metzen, E., Wilson, M. I., Dhanda, A., Tian, Y. M., Masson, N., Hamilton, D. L., Jaakkola, P., Barstead, R., Hodgkin, J., Maxwell, P. H., Pugh, C. W., Schofield, C. J. & Ratcliffe, P. J. (2001) C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation, *Cell.* 107, 43-54.
7. Jaakkola, P., Mole, D. R., Tian, Y. M., Wilson, M. I., Gielbert, J., Gaskell, S. J., Kriegsheim, A., Hebestreit, H. F., Mukherji, M., Schofield, C. J., Maxwell, P. H., Pugh, C. W. & Ratcliffe, P. J. (2001) Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation, *Science.* 292, 468-72.
8. Bruick, R. K. & McKnight, S. L. (2001) A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF, *Science.* 294, 1337-40.
9. Lando, D., Peet, D. J., Gorman, J. J., Whelan, D. A., Whitelaw, M. L. & Bruick, R. K. (2002) FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor, *Genes Dev.* 16, 1466-71.
10. Berra, E., Richard, D. E., Gothie, E. & Pouyssegur, J. (2001) HIF-1-dependent transcriptional activity is required for oxygen-mediated HIF-1 α degradation, *FEBS Lett.* 491, 85-90.
11. Berra, E., Benizri, E., Ginouvès, A., Volmat, V., Roux, D. & Pouyssegur, J. (2003) HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1 α in normoxia, *EMBO J.* 22, 4082-4090.

PATHOPHYSIOLOGICAL AND THERAPEUTIC CONSEQUENCES OF TUMOR HYPOXIA

Peter VAUPEL

Institute of Physiology & Pathophysiology, University of Mainz, 55099 Mainz, Germany

Over the last decade, evidence has accumulated showing that 50-60% of locally advanced solid tumors exhibit hypoxic and/or anoxic tissue areas that are heterogeneously distributed within the tumor mass. Pretherapeutic oxygenation status assessed in cancers of the breast, uterine cervix and head and neck are independent of clinical size, stage, histology, grade, nodal status and a series of other tumor characteristics or patient demographics.

Hypoxia is predominantly caused by (a) structural and functional abnormalities of the newly and hastily formed and thus immature tumor microvessels, (b) a disturbed microcirculation, and (c) a tumor-associated (and/or therapy-induced) anemia, which can substantially worsen tumor O₂ depletion preferentially in low-flow tumors or tumor areas. Additional pathogenetic factors leading to hypoxia are enlarged diffusion distances, an adverse diffusion geometry, carboxyhemoglobin (HbCO) formation in heavy smokers ("toxic anemia") and hypoxemia in microvessels arising from the venous site of the vascular network.

Hypoxia is known to directly or indirectly confer resistance to irradiation, some chemotherapeutic drugs and other O₂-dependent therapies (e.g., photodynamic therapy) leading to treatment failure. Sustained tumor hypoxia also gives rise to adaptations which allow cells to survive and even thrive. As a consequence, a more malignant phenotype may develop due to (a) HIF-1 α -mediated mechanisms favouring tumor growth and malignant progression, (b) HIF-1 α -independent up- or downregulation of genes, and (c) effects via genome changes (e.g., resistance to hypoxia-induced apoptosis, and genomic instability leading to clonal heterogeneity and selection of resistant clonal variants).

Due to the association between tumor hypoxia, malignant progression and treatment failure, tumor hypoxia and expression of hypoxia-mediated proteins (e.g., HIF-1 α , VEGF, glucose transporters GLUT 1 and 3, carbonic anhydrases 9 and 12) have proven to be (independent) powerful prognostic factors for local control, overall and disease-free survival. Pretreatment assessment of tumor hypoxia is therefore needed to allow the selection of patients who could benefit from hypoxia-targeting treatment measures. Due to a relatively high risk of relapse, patients with hypoxic tumors should undergo close surveillance. Anemia in cancer patients should be prevented/corrected in order to improve radio-/chemosensitivity and thus to increase cancer cure rates.

References

- Vaupel P *et al.* Oxygenation of human tumors: Evaluation of tissue oxygen distribution in breast cancers by computerized O₂ tension measurements. *Cancer Res* 1991;51:3316-3322.
- Hoekel M *et al.* Oxygenation of carcinomas of the uterine cervix: Evaluation of computerized O₂ tension measurements. *Cancer Res* 1991;51:6098-6102.

Vaupel P & Kelleher DK (eds). Tumor Hypoxia. Pathophysiology, Clinical Significance and Therapeutic Perspectives. Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft 1999.

Vaupel P *et al.* Treatment resistance of solid tumors: Role of hypoxia and anemia. *Med Oncol* 2001;18:243-259.

Hoeckel M & Vaupel P. Prognostic significance of tissue hypoxia in cervical cancer. *CME J Gynecol Oncol* 2001;6:216-225.

Hoeckel M & Vaupel P. Tumor hypoxia: Definitions and current clinical, biologic and molecular aspects. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:266-276.

Vaupel P *et al.* Hypoxia in breast cancer: Pathogenesis, characterization and biologicaltherapeutic implications. *Wien Med Wschr* 2002; 152: 334-342.

Vaupel P & Hoeckel M. Tumor hypoxia and therapeutic resistance. In : *Recombinant Human Erythropoietin (rhEPO) in Clinical Oncology* (Nowrousian MR, ed) pp 127-146, Berlin, Heidelberg, New York, Springer 2002.

Semenza GL. HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. *Trends Mol Med* 2002; 8 : S62-S67.

Harris AL. Hypoxia – a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* 2002; 2 : 38-47.

Evans SM & Koch CJ. Prognostic significance of tumor oxygenation in humans. *Cancer Letters* 2003; 195 : 1-16.

2^e Session : ÉRYTHROPOÏÈSE

THE ROLE OF GATA TRANSCRIPTION FACTORS IN PROLIFERATION AND DIFFERENTIATION OF HAEMATOPOIETIC CELLS

Sjaak PHILIPSEN

Erasmus MC Department of Cell Biology

The GATA family of transcription factors has six members, GATA1-6. Of these proteins, GATA1, -2 and -3 are expressed in the haematopoietic system. These factors are expressed in a developmental hierarchy: GATA2 is required for the proliferation of early precursor cells while GATA1 and GATA3 are involved in the differentiation of the erythroid/megakaryocytic and T-cell lineages respectively. This model of the function of GATA factors in haematopoiesis is largely derived from the analysis of knockout mice 1. Our research is focussed on the GATA1 protein.

GATA1: the devil is in the level

Proerythroblasts of GATA1 knockout mice are developmentally arrested and become apoptotic 1. Unexpectedly, overexpression of GATA1 blocks differentiation of murine erythroleukemia (MEL) cells, a tissue-culture model representing the proerythroblast stage of development. Instead of undergoing G1 arrest associated with terminal differentiation, GATA-1 overexpressing cells keep proliferating 2. We have proposed a model for GATA1 function in erythropoiesis: cells with high levels of GATA1 proliferate, intermediate levels allow terminal differentiation while low levels induce apoptosis (Fig. 1). Biochemical analysis has linked cell cycle regulation by GATA1 to the pRb/E2F pathway. This is interesting because pRb null mice have a severe defect in erythropoiesis 3.

Overexpression of GATA1 in mice indicates a novel signalling pathway in erythropoiesis

To obtain *in vivo* evidence for the role of GATA1 levels in erythroid development, we have made chimaeric mice with ES cells containing the GATA1 overexpression construct. Interestingly, GATA1 overexpressing cells contribute efficiently to the erythroid compartment in the presence of wildtype erythroid cells in chimaeras. Germline transmission was obtained with an X-linked GATA1 transgene. Males of this line (expressing the transgene in all their erythroid cells) die due to a severe defect in erythropoiesis. However, the 50% of erythroid precursors overexpressing GATA1 in female transgenics proliferate and differentiate normally. Thus, the defect in erythropoiesis is cell non-autonomous 4. The GATA1 transgene is expressed in erythroid cells only, and we conclude that terminal differentiation of overexpressing cells is most likely rescued by a signal that is produced by normally differentiating erythroid cells. This differentiation signal, (red cell differentiation signal or REDS) acts to tip the balance from proliferation to terminal differentiation (Fig. 2).

At present, we are further investigating the role of GATA transcription factors in the proliferation and differentiation of haematopoietic cells. We are currently performing a micro array analysis of GATA1

overexpressing mice to identify molecules potentially involved in the REDS signalling pathway. We will analyse the functional significance of differentially expressed growth factors by retroviral or lentiviral rescue of erythroid differentiation in in vitro colony assays and through transgenic rescue of the erythroid defect in GATA1 overexpressing- mice.

References.

1. Orkin SH. Embryonic stem cells and transgenic mice in the study of hematopoiesis. *Int J Dev Biol* 1998; 42:927-34.
2. Whyatt DJ, Karis A, Harkes IC, et al. The level of the tissue-specific factor GATA-1 affects the cell-cycle machinery. *Genes and Function* 1997; 1:11-24.
3. Jacks T, Fazeli A, Schmitt EM, Bronson RT, Goodell MA, Weinberg RA. Effects of an Rb mutation in the mouse. *Nature* 1992; 359:295-300.
4. Whyatt D, Lindeboom F, Karis A, et al. An intrinsic but cell-nonautonomous defect in GATA-1 overexpressing mouse erythroid cells. *Nature* 2000; 406:519-524.

ROLE DES CASPASES DANS LA DIFFERENCIATION ERYTHROBLASTIQUE

Olivier HERMINE

CNRS FRE 2444 et service d'hématologie, Hôpital Necker, Paris

L'érythropoïèse est le processus de formation des érythrocytes. Pour assurer une bonne oxygénation des tissus périphériques de l'organisme et ne pas entraîner d'hyperviscosité, le taux de globules rouges (ou érythrocytes) dans le sang doit rester constant. Les érythrocytes sont formés dans la moelle osseuse à partir de cellules souches. Celles-ci vont subir une succession d'étapes de prolifération et de maturation, donnant d'abord naissance à des progéniteurs puis à des précurseurs érythroblastiques de plus en plus différenciés (érythroblastes basophiles, polychromatophiles, acidophiles) avant d'aboutir à la formation des érythrocytes. Les globules rouges sont produits au sein d'îlots érythroblastiques où sont présents des macrophages et des érythroblastes à tous les stades de maturation. Il est bien établi que l'érythropoïétine (Epo) et le facteur de transcription GATA-1 sont indispensables à la formation des érythrocytes. Ils permettent la survie et la maturation des précurseurs érythroblastiques en agissant en synergie pour induire l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-xL. Récemment, il a été mis en évidence un mécanisme de rétrocontrôle négatif qui permettrait l'arrêt de la production des érythrocytes lorsque le nombre d'érythroblastes différenciés formés est suffisant. Au sein des îlots érythroblastiques, le ligand de Fas (Fas-L) est exprimé à la surface des érythroblastes les plus matures (acidophiles). Fas-L, en se liant à Fas (exprimé au sein des précurseurs érythroblastiques les plus immatures), provoque l'apoptose et l'arrêt de la maturation érythroïde. A l'échelon moléculaire, la liaison de Fas-L à Fas induit l'activation des caspases, protéases communément impliquées dans l'apoptose, par la voie des récepteurs de mort. Cette activation des caspases par Fas/Fas-L induit le clivage de GATA-1 conduisant ainsi à l'arrêt de la maturation érythroblastique au stade d'érythroblaste immatures (basophile). Selon la quantité de Fas-L ajouté il y aurait apoptose ou pas en présence d'Epo. Cette apoptose reste modérée même à de fortes doses de Fas-L. Ainsi l'arrêt de prolifération et de différenciation des érythroblastes immatures survenant lorsque la quantité d'epo circulante est insuffisante est aussi due à une protéolyse de GATA-1 par la caspase 8. Un mécanisme commun de protéolyse par les caspases du facteur de transcription GATA-1 serait donc le mode d'action de plusieurs signaux de la régulation négative de l'érythropoïèse. Ainsi les caspases exerceraient un rôle central dans la régulation négative de l'érythropoïèse en induisant l'apoptose et/ou l'arrêt de la maturation érythroïde. Nous avons décrit un nouveau rôle des caspases en mettant en évidence qu'elles sont aussi impliquées dans les modifications morphologiques survenant au cours de la différenciation terminale érythroïde. En effet les caspases sont transitoirement activées à la fois dans le cytoplasme et le noyau des cellules érythroblastiques au moment où le noyau et la chromatine se condensent. Cette activation se fait essentiellement après dépolarisation de la mitochondrie avec activation de la caspase 9. Au cours de la différenciation les caspases clivent des protéines comme acinus et la lamine B, responsables de la condensation du noyau et de la chromatine, au cours de la maturation terminale. Au cours de ce processus, aucune apoptose des cellules n'est observée. Contrairement à ce qui est observé au cours de l'apoptose, l'activation des caspases n'induit ni clivage de ICAD, responsable de la fragmentation

de la chromatine, ni la protéolyse du facteur de transcription érythroïde GATA-1, indispensable à la survie et à la différenciation des érythroblastes. Il existe donc, au cours de la différenciation érythroïde terminale, des mécanismes protégeant ces protéines contre l'action des caspases. Il a récemment été mis en évidence que Hsp70, protéine chaperonne connue pour inhiber la formation de l'apoptosome et l'activation des caspases, pourrait aussi, dans certains modèles cellulaires, agir en aval de l'activation de la caspase-3 et inhiber son action proapoptotique. Nous avons donc émis l'hypothèse que Hsp70 pourrait protéger certains substrats comme le facteur de transcription GATA-1 du clivage par les caspases activées au cours de la maturation érythroïde terminale. Hsp70 est exprimée de façon constitutive au sein des compartiments nucléaires et cytoplasmiques lors de la maturation des érythroblastes. Lors de l'apoptose par privation des cellules en Epo, la quantité de caspase-3 activée est augmentée alors que la quantité de Hsp70 présente dans le compartiment nucléaire est diminuée. Par contre, la quantité de HSP70 est constante voire augmentée au cours de la différenciation érythroïde, au moment de l'activation des caspases. Ainsi, le ratio Hsp70/caspase-3 activée pourrait alors orienter le destin des cellules vers la mort ou vers la différenciation. De plus, si l'export nucléocytoplasmique de HSP70 est bloqué par la leptomycine B, lorsque les cellules sont privées d'Epo, GATA-1 n'est plus protéolysée en dépit d'une forte quantité de caspases nucléaires. Nous avons de plus mis en évidence qu'il existe au niveau nucléaire une interaction entre GATA-1 et HSP70. Ces résultats suggèrent que Hsp70 pourrait protéger GATA-1 de l'action des caspases. Afin de démontrer cette nouvelle fonction chaperonne de Hsp70, nous étudierons la protéolyse in vitro de GATA-1 par la caspase-3, en présence ou non de Hsp70. Nos résultats pourraient permettre d'expliquer certaines pathologies érythroblastiques comme les poyglobulies où l'hyper-expression des Hsp70 pourrait conduire à une diminution de l'apoptose. A l'inverse leur déficit par exemple dans les myélodysplasies pourrait conduire à l'apoptose des érythroblastes.

ROLE, STRUCTURE ET MECANISME D'ACTION DU RECEPTEUR DE L'ERYTHROPOÏÉTINE

Patrick MAYEUX

*Institut Cochin, INSERM U567, CNRS UMR 8104
Hôpital Cochin, 27 rue du Faubourg Saint-Jacques, 75014 Paris*

L'érythropoïétine (Epo) est une hormone glycoprotéique principalement produite par le rein indispensable à la formation des érythrocytes. Les principales cibles de l'Epo sont des cellules déjà engagées dans la voie de différenciation érythroïde mais n'ayant pas encore débuté la réalisation du programme de différenciation terminale (progéniteurs « tardifs » de type CFU-E et « jeunes » précurseurs de type pro-érythroblaste). En absence d'érythropoïétine, ces cellules réalisent un programme apoptotique alors qu'en présence d'Epo ce programme est inhibé, les cellules prolifèrent, terminent leur programme de différenciation et sont libérées dans la circulation. Au cours des dernières années, l'action de l'Epo a été précisée. L'Epo n'est pas nécessaire à l'engagement des progéniteurs multipotents dans la voie de différenciation érythroïde. De plus, le récepteur de l'Epo ne semble transmettre aucun signal intracellulaire spécifique nécessaire à la différenciation terminale des CFU-E. La spécificité apparente de l'hormone semble uniquement due à l'absence d'expression d'autres récepteurs de facteurs de croissance sur les CFU-E et l'expression ectopique de différents récepteurs de facteurs de croissance dans ces cellules permet leur différenciation terminale en réponse aux ligands de ces récepteurs.

Comme toutes les hormones peptidiques, l'Epo interagit avec ses cellules cibles par le biais d'un récepteur membranaire. Le récepteur de l'Epo appartient à la famille des récepteurs de cytokines. Ces récepteurs sont dépourvus d'activité enzymatique mais sont couplés à des tyrosines kinases intracellulaires de la famille Jak. La forme membranaire du récepteur de l'Epo est un tétramère constitué de deux molécules de récepteur au sens strict, chacune de ces molécules étant associée à une molécule de la tyrosine kinase Jak2. L'association récepteur de l'Epo/Jak2 semble réalisée très tôt au cours du processus de maturation du récepteur et pourrait être nécessaire au transport des récepteurs à la surface cellulaire. Ces étapes de maturation et de transport des récepteurs à la surface des cellules sont étroitement contrôlées dans les cellules au repos et au cours de la stimulation par l'hormone. Les mécanismes de contrôle sont au moins en partie différents dans les deux cas mais l'expression membranaire des récepteurs de l'Epo est toujours largement indépendante du taux d'ARN messagers et du niveau de synthèse du précurseur protéique.

La fixation de l'hormone modifie l'organisation du complexe et rapproche les tyrosine-kinases qui s'activent par transphosphorylation. Les kinases activées phosphorylent alors de nombreux substrats intracellulaires dont le récepteur lui-même. L'ensemble de ce processus aboutit à l'activation de plusieurs relais intracellulaires comme les facteurs de transcription STAT5, la phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-kinase) ou la voie Ras/MAP kinases. Les mécanismes conduisant à l'activation de ces relais seront présentés.

Parmi les relais activés, la voie PI 3 kinase semble jouer un rôle particulièrement important. Le blocage de cette voie dans des progéniteurs érythroïdes stimulés par l'Epo inhibe totalement la prolifération et diminue la survie cellulaire. De plus, cette voie pourrait moduler le processus de différenciation terminale en modifiant l'activité du facteur de transcription GATA-1. Dans les cellules érythroïdes, la production de l'inhibiteur de métallo protéases TIMP-1, qui possède aussi une activité potentialisante de celle de l'Epo, est régulée par l'Epo. Cette régulation est réalisée au niveau de la transcription du gène TIMP-1 et implique d'une part la voie PI 3 kinase et d'autre part le facteur de transcription GATA-1. Nous avons montré que GATA-1 est une cible directe de la sérine thréonine kinase Akt, un des effecteurs majeurs de la voie PI 3 kinase. Un mutant non phosphorylable de GATA-1 ne permet pas la production de TIMP-1, même lorsque la voie PI 3 kinase est activée alors qu'un mutant de GATA-1 dont la mutation mime la phosphorylation par Akt permet une production de TIMP-1 en absence d'activation de la voie PI 3 kinase. L'effet de ces mutants sur l'érythropoïèse de la souris est en cours d'étude.

L'activation du récepteur au cours d'une stimulation est très transitoire. Des mécanismes conduisant à l'arrêt du processus de signalisation intracellulaire sont activés lors de la stimulation du récepteur. La tyrosine phosphatase SHP-1 se fixe au récepteur et à Jak2 et déphosphoryle ces deux molécules. Le récepteur activé est rapidement polyubiquitiné, internalisé et dégradé. L'ubiquitination et la dégradation du récepteur nécessitent l'activation de la kinase Jak-2 alors que l'internalisation ne requiert que la fixation du ligand. Contrairement aux récepteurs à activité tyrosine kinase intrinsèque comme c-Kit ou le récepteur de l'EGF qui continuent à transmettre un signal après internalisation, les récepteurs de l'Epo internalisés sont inactifs en terme de signalisation, probablement par défaut de couplage à la tyrosine kinase Jak-2. Le récepteur et l'hormone sont principalement dégradés par les lysosomes bien que le protéasome semble contribuer à la dégradation de la partie intracellulaire du récepteur. Enfin, au cours de la stimulation des cellules, la mise en place des récepteurs néosynthétisés dans la membrane plasmique est bloquée par un mécanisme impliquant le protéasome, créant une période de faible sensibilité à l'hormone.

3^e Session : HOMÉOSTASIE DU FER

ANOMALIES GENETIQUES DU METABOLISME DU FER

Bernard GRANCHAMP

*INSERM U409 et Hôpital Bichat CHU Xavier Bichat Paris 18ème, France
Tel 01 44 85 63 41 – Fax 01 42 26 46 24
bgrandch@bichat.inserm.fr*

L'hémochromatose génétique a longtemps été considérée comme une maladie homogène sur le plan génétique transmise sur le mode autosomique récessif et conduisant inéluctablement, en l'absence de traitement, à une surcharge en fer responsable des signes cliniques. Cependant, comme cela est souvent le cas en médecine, la situation est plus complexe : si la forme familiale la plus habituelle de la maladie se développe en général chez des sujets homozygotes pour une mutation majoritaire du gène HFE, C282Y, une minorité de patients présentent un génotype d'hétérozygote composite C282Y/H63D. Les estimations de la pénétrance clinique varient selon les études entre 50% et seulement 1%. De telles différences sont étonnantes et peuvent sans doute tenir à plusieurs facteurs relatifs à la définition du phénotype et au recrutement des sujets étudiés. Il est néanmoins vraisemblable que seulement une partie des sujets homozygotes C282Y développera un jour une surcharge en fer à l'origine de signes cliniques. Cette pénétrance incomplète suggère que d'autres facteurs influencent le phénotype chez les sujets présentant un génotype à risque : il peut s'agir d'autres facteurs génétiques et l'étude des modèles murins d'hémochromatose par inactivation du gène hfe sont en faveur d'une telle hypothèse mais également de facteurs nutritionnels ou environnementaux. Le génotype hétérozygote composite C282Y/H63D a une pénétrance clinique encore beaucoup plus faible, de l'ordre de 1/100 à 1/1000.

Très récemment, d'autres gènes intervenant dans le métabolisme du fer, ont été incriminés à l'origine d'hémochromatose génétique dans un petit nombre de familles : il s'agit des gènes codant pour un second récepteur de la transferrine (TFR2) d'expression spécifiquement hépatique et pour un transporteur du fer (ferroportine ou IREG-1) impliqué, dans la sortie du fer intracellulaire, en particulier lors du recyclage macrophagique du fer. Dans l'hémochromatose juvénile, une forme rare mais particulièrement sévère d'hémochromatose, pour laquelle une localisation de gène sur le chromosome 1 avait été postulée il y a quelques années, des mutations inactivatrices du gène HAMP codant pour l'hepcidine et localisé sur le chromosome 19, ont été récemment identifiées dans plusieurs familles. Ceci confirme le rôle majeur de l'hepcidine, chez l'homme, dans la régulation de l'homéostasie du fer et démontre l'hétérogénéité génétique de l'hémochromatose juvénile. De manière intéressante, deux groupes ont récemment postulé que certaines formes d'hémochromatose pouvaient avoir une origine

digénique associant chez un même patient une mutation du gène HFE et une mutation du gène HAMP. Enfin, la surcharge en fer «Africaine » offre un exemple d'interaction entre des facteurs génétiques et des facteurs d'environnement : initialement, la surcharge en fer observée dans les populations sub-sahariennes avec une fréquence assez importante avait été exclusivement attribuée à l'ingestion d'une bière artisanale contenant de grandes quantités de fer. Cependant, les études plus récentes indiquent l'existence d'un facteur génétique qui module les effets de la surcharge alimentaire : les études de ségrégation dans les familles suggèrent que l'hétérozygotie pour un gène, à ce jour encore inconnu, joue un rôle déterminant.

En dehors des hémochromatoses génétiques « primitives », il existe de nombreux cas de surcharge en fer plus ou moins marquée pour lesquels un facteur prédisposant, génétique ou non génétique, peut être retrouvé : anémies hémolytiques chroniques, hépatopathies d'origine virale ou alcoolique, syndrome dysmétabolique par exemple. Plusieurs arguments suggèrent que les mutations hétérozygotes du gène HFE puissent contribuer à ces surcharges a priori « secondaires » : la prévalence des mutations C282Y et H63D, en dehors même de l'homozygotie C282Y est plus élevée chez des patients explorés pour une surcharge en fer que dans la population générale. Par ailleurs des études de population montrent une association entre la saturation de la transferrine et les mutations C282Y et H63D. Il est donc raisonnable de penser que les mutations du gène HFE et probablement aussi certains allèles d'autres gènes impliqués dans le métabolisme du fer contribuent aux surcharges en fer en dehors de l'hémochromatose « classique ».

L'objectif de cet exposé est de présenter ces données récentes qui, si elles compliquent un peu l'exploration moléculaire des hémochromatoses, apportent un éclairage nouveau sur le métabolisme du fer.

L'HEPCIDINE, UN REGULATEUR CLE DE L'HOMÉOSTASIE DU FER

Gaël NICOLAS¹
Axel KAHN et Sophie VAULONT²

¹ Gaël NICOLAS : U409 INSERM – Faculté de médecine Xavier Bichat – 16 rue Henri Huchard – BP 416 – 75870 Paris cedex 18 – Tel : 01 44 85 63 45 – nicolas@bichat.inserm.fr

² Axel KAHN et Sophie VAULONT : Institut Cochin (INSERM, CNRS, Faculté de médecine René Descartes) - Faculté de médecine Cochin Port Royal – 24 rue du faubourg Saint Jacques - 75014 Paris – Tel : 01 40 51 64 57 - kahn@cochin.inserm.fr - vaulont@cochin.inserm.fr

Le fer est un élément indispensable à la vie de toutes les cellules. Fixé à l'hémoglobine, il permet surtout de transporter l'oxygène vers les différents tissus. Sa carence entraîne une anémie avec ses conséquences liées à une oxygénation insuffisante des tissus. À l'inverse, un excès de fer est toxique pour l'organisme, car il entraîne la production de radicaux libres lésant les tissus.

L'homéostasie du fer au niveau de l'organisme repose sur une régulation fine de son absorption intestinale par les entérocytes mûres situés au sommet de la villosité duodénale [1]. Un grand nombre de protéines, incluant des réductases, des oxydases et des transporteurs membranaires, est impliqué dans ce mécanisme. La proportion du fer alimentaire absorbé est réglée en fonction, soit du niveau des réserves en fer tissulaires (on parle du « régulateur des réserves »), soit de l'activité érythropoïétique de la moelle osseuse (on parle du « régulateur érythroïde »). Nous avons établi que l'hepcidine, une protéine synthétisée dans le foie sous la forme d'un pré-propeptide et excrétée dans la circulation sous la forme d'un peptide mature de 25 amino-acides, constitue l'hormone majeure de la régulation de l'homéostasie du fer.

Des souris nourries avec un régime riche en fer surexpriment l'hepcidine [2]. Cette expérience a constitué la première relation entre l'hepcidine, décrit alors comme un peptide bactéricide, et la surcharge en fer. Notre laboratoire, en collaboration avec l'unité 409 de l'INSERM, a montré que ce peptide est, en fait, un inhibiteur de l'absorption intestinale de fer et de son relargage par les macrophages. En effet, une lignée de souris qui ne fabrique plus d'hepcidine accumule un excès de fer dans ses organes, principalement le foie et le pancréas [3] et mime le phénotype des sujets ou des souris atteints d'hémochromatose génétique liée à une altération du gène Hfe. Le rôle de l'hepcidine a ensuite été confirmé par la démonstration que des souris transgéniques surexprimant le messageur de l'hormone dans le foie ont une anémie par carence en fer [4]. Récemment, il a été montré que des personnes homozygotes pour une mutation du gène de l'hepcidine développent une hémochromatose dès l'adolescence, ce qui confirme l'importance de cette hormone chez l'homme [5]. L'hepcidine intervient aussi en réponse à tout type d'anémie et d'hypooxygénation des tissus. Son expression est en effet alors complètement réprimée, ce qui permet de lever l'action négative qu'exerce physiologiquement l'hepcidine sur l'absorption de fer, et donc de fournir à l'organisme suffisamment de fer pour faire face à la production accrue des globules rouges nécessaire à la réparation de l'anémie [6].

Les maladies inflammatoires, telles que les rhumatismes, les infections chroniques et les cancers sont fréquemment compliquées d'anémies, parfois graves, altérant toujours l'état général. Un des mécanismes de ces anémies pourrait être une hyperproduction d'hepcidine en réponse à l'inflammation, aboutissant à un blocage du relargage du fer par les macrophages et de son absorption par l'intestin. De fait, la diminution de la concentration en fer sérique en réponse à une inflammation expérimentale n'est plus observée chez les souris qui ne fabriquent plus d'hepcidine [6]. Des patients porteurs d'un adénome hépatique exprimant une quantité importante d'hepcidine, développent une anémie de type inflammatoire, qui régresse avec l'ablation de l'adénome [7].

Et qu'en est-il du rôle de l'hepcidine dans la forme la plus fréquente d'hémochromatose héréditaire liée à une mutation du gène Hfe ? Cette anomalie génétique est transmise par près de 10% de la population d'origine européenne et se retrouve à l'état homozygote chez 1 personne sur 200 à 300. Non diagnostiquée, la maladie entraîne une cirrhose du foie, parfois compliquée de carcinome hépato-cellulaire, un diabète, des douleurs articulaires, une insuffisance sexuelle, des troubles cardiaques ...etc. Le seul traitement disponible à ce jour repose sur les saignées. La similitude du tableau clinique des souris déficientes en hepcidine et de celles dont les deux copies du gène Hfe a été inactivé laissait supposer que Hfe et l'hepcidine participaient à la même voie de régulation de l'absorption du fer. Cela est maintenant confirmé par plusieurs travaux. Chez l'homme comme chez la souris, le déficit entraîne une insuffisance de production de l'hepcidine [7,8]. Le rétablissement de la production de l'hormone permet d'éviter la surcharge en fer de souris dont les gènes Hfe ont été inactivés [8]. L'hémochromatose héréditaire doit donc être considérée comme une maladie endocrinienne ou l'insuffisance de production d'hepcidine par le foie entraîne une hyperabsorption chronique de fer par le duodénum, et donc une surcharge en fer. Cette maladie peut être secondaire à une mutation du gène Hfe ou, plus rarement, due à l'atteinte du gène de l'hepcidine lui-même [5].

L'hepcidine est donc la véritable clé de voûte des mécanismes de régulation de l'homéostasie du fer dans l'organisme et est impliquée dans ses désordres pathologiques. Cet exposé fera le point sur les connaissances concernant l'hepcidine.

Bibliographie

Fleming RE et Sly WS (2002) *Annu. Rev. Physiol.*, 64, 663-680

Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B, Leroyer P, Turlin P, Brissot P et Loréal O (2001)

J. Biol Chem 276,7811-7819

Nicolas G, Bennoun M, Devaux I, Beaumont C, Grandchamp N, Kahn A et Vaulont S (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 98, 8780-8785

Nicolas G, Bennoun M, Porteu A, Mativet S, Beaumont C, Grandchamp B, Sirito M, Sawadogo M, Kahn A et Vaulont S (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 99, 4596-4601

Roetto A, Papanikolaou G, Politou M, Alberti F, Girelli D, Christakis J, Loukopoulos D et Camaschella C (2003) *Nat. Genet.*, 33, 21-22

Nicolas G, Chauvet C, Viatte L, Danan JL, Bigard X, Devaux I, Beaumont C, Kahn A et Vaulont S (2002) *J. Clin. Invest.* 110, 1037-1044

Weinstein DA, Roy CN, Fleming MD, Loda MF, Wolfsdorf JI et Andrews NC (2002) *Blood*, 100, 3776-3781

Bridle KR, Frazer DM, Wilkins SJ, Dixon JL, Purdie DM, Crawford DHG, Subramaniam VN, Powell LW, Anderson GJ et Ramm GA (2003) *The Lancet.*, 361, 669-673

Nicolas G, Viatte L, Lou DQ, Bennoun M, Beaumont C, Kahn A, Andrews NC et Vaulont S (2003) *Nat. Genet. Online* 21 April 2003 ;doi :10.1038/ng1150

GENES ENCODING HEPCIDIN AND DUODENAL IRON TRANSPORT PROTEINS ARE REGULATED DIFFERENTLY IN HFE HEMOCHROMATOSIS AND SECONDARY IRON OVERLOAD

Martina MUCKENTHALER¹

Cindy N. ROY², Ángel O. CUSTODIO², Belén MIÑANA¹, Jos DEGRAAF¹,
Lynne K. MONTROSS², Nancy C. ANDREWS² and Matthias W. HENTZE¹

¹ *European Molecular Biology Laboratory, Germany*

² *Children's Hospital, Harvard Medical School and Howard Hughes Medical Institute, Boston, MA*

Hereditary hemochromatosis (HH) is a common genetic disorder of iron metabolism caused by a mutation in the HFE gene, which encodes a MHC I like protein. Patients develop systemic iron overload as a result of increased iron uptake in the duodenum. It was previously hypothesized that this regulatory defect was associated with depletion of iron in maturing enterocytes, and consequent induction of duodenal iron transporter gene expression. That model did not incorporate a role for hepcidin, a putative peptide hormone that appears to play an important part in regulating iron homeostasis.

To gain insight into the pathogenesis of hemochromatosis we analyzed the gene expression profiles of the duodenum and the liver of mice with Hfe defects on a specialized microarray platform, the 'IronChip'. Approximately 350 murine cDNAs were strategically selected to represent genes involved either in iron metabolism directly or in interlinked pathways (e.g. oxidative stress, NO metabolism or copper metabolism).

In our study we asked two questions: (1) is the pattern of liver hepcidin expression similar in genetic (primary) and induced (secondary) iron overload and (2) does the hemochromatosis enterocyte have a pattern of transporter expression similar to that seen in iron deficiency?

We studied mice homozygous for either null (Hfe^{-/-}) or missense (Hfe C282Y) mutations in the murine Hfe gene. In contrast to mice loaded parenterally with iron, neither mutant strain induced hepcidin expression in response to increased iron stores. Furthermore, both homozygous mutants failed to increase hepcidin expression when additional iron was administered parenterally. This suggests that regulation of hepcidin expression is defective when Hfe is not active.

We further observed, that Hfe knock-out and C282Y knock-in mice do not display features of iron deficiency in the duodenum, hallmarked by an increase in mRNA levels of the duodenal iron transporters. Previous studies have shown that duodenal expression of Dmt1 (Nramp2, DCT-1), Fpn (ferroportin, Ireg1, MTP1) and Dcytb mRNAs is substantially increased in iron deficient mice. In contrast, we found that levels of Dmt1 mRNA were not increased and levels of Fpn mRNA were

decreased in Hfe mutant mice, similar to the pattern we detected in animals with secondary iron overload. Only Dcytb mRNA was differentially expressed – it was increased in Hfe mutant mice but unaffected in mice with secondary iron overload.

Our data indicate that the primary sensing defect in HH does not reside in the duodenum. Rather, the inappropriate low expression of the iron-regulatory hormone hepcidin by the liver represents a central regulatory defect in hemochromatosis.

4^e Session : OXYGÈNE, MÉTABOLISME ET DÉVELOPPEMENT

PHYSIOLOGICAL HYPOXIA AND PLACENTAL DEVELOPMENT

Jean-Claude CHALLIER

*Physiopathologie de l'Implantation et du Développement
Faculté de Médecine St Antoine PARIS*

Recent investigations in the first trimester of pregnancy give rise to a new concept of “physiological hypoxia” which appears to be a major determinant of placental development, i.e. onset of maternal circulation, trophoblast invasion and remodeling of the uterine vessels.

First, the primary circulation of the human placenta has been revisited. Several investigations including color Doppler show that the maternal intervillous spaces are perfused by a blood poor in erythrocytes with a velocity profile of venous-type until about 8th weeks of pregnancy. From 8th to 12th week, whole blood enters these spaces and an arterial velocity profile is apparent. These changes can be explained by the presence of filtering trophoblastic plugs that disappear at 12th week. Measurements of oxygen partial pressure (p_{O_2}) in these spaces indicated very low values pointing to a situation of hypoxia before 8th week. An increase in p_{O_2} is noted after 12th week.

Second, histological observations on trophoblast development reveal an active proliferation of trophoblast located at the basis of villi anchored into the uterus wall. This proliferation is followed by a cell migration into the deepness of the uterus with foci of cells around and inside the vessels. This process of cell migration is accompanied by a cell differentiation with transcription of new genes implicated in cellular cytoskeleton, adhesion, proteolysis, signaling, immunotolerance and endothelial functions.

Third, experiments using explants of anchoring villi cultured in various oxygen environment demonstrated the effects O_2 on cell proliferation and differentiation. Villi subjected to 3% O_2 exhibit outgrowth associated with trophoblast proliferation whereas in using 20% O_2 such outgrowth was absent. Various markers of cell proliferation were positive in this outgrowth. Hypoxia inducible factor (HIF-1 α) and transforming growth factor (TGF β -3) were upregulated in trophoblast under conditions of hypoxia and expressed in situ in the proliferative zone of anchoring villi. These factors were downregulated in normoxia or absent from the migrating trophoblast. The O_2 sensor triggering these changes has not been identified. Thus, hypoxia followed by normoxia, by occurring sequentially in the

proliferation and differentiation of trophoblast regulated the deepness of trophoblastic invasion and the vascular remodeling of the uterine tissues.

This concept might be also of value to explain adaptations or pathological development of the human placenta: it includes arterial-type of velocity profiles which have been detected in maternal intervillous space before early abortion, hyperbranching of villi which usually occurs in pregnancy in altitude and shallow trophoblastic invasion with persistent hypoxia leading to the maternal disorders observed in preeclampsia.

LE RECEPTEUR NUCLEAIRE ROR ALPHA EST-IL IMPLIQUE DANS LA REPONSE AU STRESS HYPOXIQUE ?

Jean-Louis DANAN
Caroline CHAUVET et Brigitte BOIS-JOYEUX

CNRS-UPR 9078, Faculté de Médecine Necker, 156 rue de Vaugirard, 75730, PARIS

Les récepteurs nucléaires jouent des rôles clé dans le développement, la cancérogenèse et la réponse hormonale. Au nombre de 49 chez l'homme, ils représentent une famille de facteurs de transcription dont l'action est très souvent, mais pas toujours, dépendante d'un ligand.

Le récepteur nucléaire Retinoic acid receptor-related Orphan Receptor α (ROR α) a été cloné grâce à son homologie de séquence avec le domaine de liaison à l'ADN du Récepteur à l'Acide Rétinoïque. Contrairement à la plupart des membres de cette famille qui se fixent à l'ADN sous forme d'homodimères ou d'hétérodimères, ROR α a la particularité de se fixer à l'ADN sous forme de monomère sur le motif (A/T)₆-AGGTCA. Rora peut être exprimé sous forme de 4 isoformes dont la proportion relative dépend du type cellulaire. Il est impliqué dans de nombreuses fonctions physiologiques au sein de plusieurs organes et types cellulaires. Il a notamment un effet anti-inflammatoire et protecteur contre l'athérosclérose, il participe au contrôle de l'angiogénèse...Plusieurs de ses propriétés ont pu être mises en évidence in vivo grâce à l'existence d'un mutant naturel de souris (souris staggerer) dans lesquelles le domaine de liaison au ligand de ROR α est invalidé (pour revue : *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2002,186,1-5). Peu de choses sont cependant connues sur la régulation de l'expression de ce facteur de transcription.

Notre intérêt pour ROR α vient de nos travaux sur l'enhancer lointain du gène alpha-fœtoprotéine, un gène hépatique possédant un profil d'expression extrêmement contrôlé au cours du développement et de la cancérogenèse. Nous avons en effet montré que ce récepteur nucléaire, en se fixant sur une région critique pour le fonctionnement in vivo de cet enhancer dans le foie est capable de stimuler l'activité transcriptionnelle. De plus, dans ce contexte, il agit en synergie avec le facteur Hepatocyte Nuclear Factor 6 qui se situe très haut dans la hiérarchie des facteurs de transcription « hépatosécifiques ». Ces travaux, associés à ceux de l'équipe de B. Staels sur le promoteur du gène de l'apoptéine CIII, indiquent que le récepteur nucléaire ROR α participe au contrôle de l'expression dans le foie.

Dans le but de mieux comprendre la fonction de ce récepteur dans cet organe, nous avons entrepris une série d'approches complémentaires.

Le but du présent travail est de préciser quelles sont les isoformes du récepteur nucléaire ROR α , exprimées dans le foie et de tester la réponse de ce facteur de transcription à l'hypoxie. Ce stress joue en effet un rôle majeur dans la zonation métabolique dans le foie et dans des processus physiopathologiques comme le cancer.

Nous montrons, par analyse en RT-PCR, que l'isoforme ROR α 4 est prépondérante dans le foie tandis que l'isoforme ROR α 1 est beaucoup moins représentée. Les isoformes ROR α 2 et 3 n'y sont pas détectables. L'analyse électrophorétique d'extraits nucléaires de foie de souris confirme ce résultat au niveau protéique et démontre que les protéines ROR α 1 et 4 sont, au moins en partie, localisées dans le noyau.

Nous montrons en outre que, dans les hépatocytes de rat en culture et dans les cellules d'hépatome humain HepG2, l'hypoxie entraîne une augmentation de l'expression du gène Rora. Le traitement de ces cellules par le chlorure de cobalt (CoCl₂) ou la desferrioxamine (DFO), qui miment souvent les effets de l'hypoxie, conduit aussi à une augmentation de l'expression du gène Rora. L'activité transcriptionnelle ROR α , mesurée par des expériences d'expression transitoire, est augmentée dans les cellules HepG2 cultivées sous hypoxie ou soumises aux traitements par le CoCl₂ ou la DFO.

Il est donc raisonnable de penser que ROR α joue un rôle dans la réponse au stress hypoxique au sein de la cellule hépatique.

Ces résultats ont une portée beaucoup plus générale car nous avons observé que l'hypoxie stimule l'expression de Rora dans tous les types cellulaires que nous avons analysés. Ces observations ouvrent donc de nouvelles voies pour mieux comprendre le rôle physiologique de ROR α et caractériser les gènes contrôlés par ce récepteur nucléaire.

Nos résultats soulignent aussi l'intérêt de connaître les mécanismes moléculaires qui permettent l'augmentation de l'expression de Rora sous hypoxie. Nous avons donc récemment initié plusieurs approches visant à progresser dans la connaissance de ces mécanismes et à mettre en évidence de nouveaux gènes cibles de ROR α .

LEPTINE PLACENTAIRE ET HYPOXIE

Michèle GUERRE-MILLO
Alexandra GROSFELD, Sylvie HAUGUEL-DE MOUZON, Jacques LEPERCQ,
Vladimir ZILBERFARB et Tarik ISSAD

*U 465 INSERM, Centre de Recherche des Cordeliers, Université Pierre et Marie Curie
15 rue de l'Ecole de Médecine 75006 Paris.*

La leptine, produit du gène *ob*, exerce un contrôle négatif sur la prise alimentaire et permet le maintien de l'homéostasie énergétique. Outre cet effet central, la leptine influence des fonctions telles que l'angiogenèse, l'hématopoïèse, la réponse immunitaire et la croissance de certains tissus. Le tissu adipeux est le principal site de production chez l'adulte. Cependant, le placenta devient une source non négligeable de leptine au cours de la grossesse. La production placentaire est dirigée essentiellement (> 80 %) vers la circulation maternelle, ce qui élève la leptinémie chez la femme enceinte.

La pré-éclampsie est une pathologie gravidique caractérisée par des anomalies placentaires sévères. Nous avons observé que l'ARNm et le contenu en leptine sont augmentés (x 4 à 10) dans les placentas issus de grossesses pré-éclamptiques, ce qui entraîne une hyperleptinémie chez la mère. Or, les placentas pré-éclamptiques présentent des défauts vasculaires qui provoquent une situation d'hypoxie cellulaire. Nous avons donc émis l'hypothèse d'un effet stimulateur de l'hypoxie sur l'expression du gène *ob*. Afin de tester cette possibilité, nous avons cultivé des cellules trophoblastiques (BeWo) dans différentes conditions d'hypoxie. Dans tous les cas, l'ARNm et la production de leptine sont augmentés 3 à 4 fois dans les cellules hypoxiques. La transfection d'un plasmide contenant une partie du promoteur *ob* humain en amont d'un gène rapporteur, a permis de montrer que cet effet de l'hypoxie repose sur l'activation du promoteur. Il faut noter que les mêmes effets s'observent dans des cellules d'origine adipocytaire (PAZ6), ce qui indique que la réponse du gène *ob* à l'hypoxie n'est pas restreinte au placenta.

La sur-expression des deux sous unités, HIF-1 α et HIF-1 β , du facteur de transcription « Hypoxia-Inducible Factor-1 » (HIF-1) dans les cellules BeWo, mime l'effet de l'hypoxie sur l'activité du promoteur. A l'inverse, l'expression d'une forme tronquée de HIF-1 α produisant des dimères non fonctionnels (forme négative dominante, fournie par Jacques Pouyssegur), annule la stimulation du promoteur par l'hypoxie. Ces résultats montrent que HIF-1 transactive le gène *ob* et relaie l'effet stimulateur de l'hypoxie sur le promoteur *ob* humain. Des expériences de mutagenèse dirigée et de retard sur gel ont permis de déterminer que HIF-1 se lie sur une séquence consensus HRE (HIF Responsive Element), située à -116 pb en amont du site d'initiation de la transcription.

Le gène *ob* s'ajoute donc à la liste des gènes induits par l'hypoxie via HIF-1. Quelle est l'importance physiopathologique de l'augmentation de leptine en réponse à un stimulus hypoxique? Cette question reste posée. Dans le placenta, on peut envisager que la surproduction de leptine, de concert avec d'autres facteurs angiogéniques, favorise la néovascularisation compensatoire à la situation d'hypoxie

placentaire qui caractérise la pré-éclampsie. Par ailleurs, l'hyperleptinémie maternelle pourrait constituer marqueur non invasif de pré-éclampsie.

EFFETS TRANSCRIPTIONNELS DE L'HYPOXIE DANS LE PLACENTA NORMAL ET PATHOLOGIQUE

Daniel VAIMAN^A

**Françoise MONDON^A, Alexandra GARCES-DURANA, Thérèse-Marie MIGNOTA,
Bruno CARBONNEA,^c Brigitte ROBERTA, Régis REBOURCETA,
Jean-Louis DANAN^B et Françoise FERREA,**

a INSERM U361, Université René Descartes,

Hôpital Cochin, 123 Boulevard de Port-Royal, 75014 Paris

b CNRS-UPR 9078, Faculté de Médecine Necker, 156 rue de Vaugirard, 75730 Paris

*c Service de Gynécologie Obstétrique, Hôpital Saint-Antoine,
184 rue du Faubourg Saint-Antoine 75012 Paris*

L'oxygène joue un rôle majeur à l'interface foeto-maternelle pour des raisons essentielles :

C'est tout d'abord un élément trophique indispensable au contrôle du métabolisme énergétique du fœtus et de ses annexes.

Il intervient dans la différenciation des cytotrophoblastes en syncytiotrophoblaste. Ce tissu plurinucléé d'origine fœtale (responsable de l'activité endocrine du placenta) est en contact direct avec les structures utérines maternelles. Des expériences réalisées *in vitro* montrent que l'hypoxie active la prolifération des cytotrophoblastes, tandis que l'hyperoxie induit leur différenciation. La pO₂ est donc un modulateur très fin de la biologie du trophoblaste à l'interface foeto-maternelle.

Nous avons cherché à évaluer l'impact de l'oxygène dans deux pathologies principales de la grossesse, souvent associées : la prééclampsie (PE), syndrome complexe d'hypertension gravidique affectant environ 7% des femmes enceintes en France, et le Retard de Croissance Intra-Utérin (RCIU), par une approche globale d'analyse du transcriptome.

Dans un premier temps, la technique d'Hybridation Suppressive Soustractive (SSH) a permis de mettre en évidence des différences entre le transcriptome des villosités placentaires précoces (10 semaines d'aménorrhée) maintenues en conditions de culture hypoxiques (3h à 2% de pression partielle en oxygène) ou normoxiques (3h à pression atmosphérique). Nous avons réalisé deux banques soustraites de 1500 et 900 clones (hypoxie soustraite par normoxie et normoxie soustraite par hypoxie, respectivement). Ces banques ont été déposées sur des membranes nylon à haute-densité.

Par la suite, nous avons hybridé ces membranes à l'aide d'ADNc de villosités placentaires de différentes patientes. Les hybridations ont été effectuées avec les ADNc préparés à partir de villosités maintenues dans des conditions d'hypoxie contrôlée. Cette série d'hybridation a permis de définir des gènes spécifiques de l'état hypoxique et normoxique. Après séquençage et identification de 142 gènes, des amorces ont été définies pour réaliser des expériences de RT-PCR dans le but d'affiner la quantification des effets de l'oxygène.

Dans une deuxième série d'expériences, quatre préparations d'ADNc de villosités de placentas obtenus à partir de patientes développant une grossesse pathologique ont été hybridées (PE, PE sévère, RCIU isolé, RCIU+PE). Nous avons utilisé une approche stringente d'exclusion pour définir des gènes spécifiquement induits ou éteints dans le cas de chacune des pathologies mais non affectés par la pO_2 . Après séquençage et identification des gènes, des amorces ont été définies pour quinze gènes.

Ces expériences nous ont permis : (i) d'établir un profil d'expression du placenta dans des conditions variables de pO_2 , pouvant simuler les effets nécessaires à sa physiologie normale, et (ii) d'identifier 15 gènes spécifiquement modulés par les deux pathologies étudiées. Parmi ceux-ci, quatre sont induits en cas de PE et deux sont inhibés, cinq sont induits par le RCIU et quatre sont inhibés.

Un protocole de PCR semi-quantitative a été mis au point pour analyser plus finement les variations d'expression des gènes identifiés, sur un plus grand nombre d'échantillons d'ADNc. Les premiers résultats nous conduisent à présenter un profil d'expression permettant de discriminer les deux pathologies étudiées et leurs relations avec l'état de la pO_2 au niveau de la villosité.

Ces expériences contribueront à la compréhension des mécanismes de différenciation du trophoblaste en rapport avec l'environnement, et ceci en corrélation avec d'autres facteurs que l'oxygène (tels que les cytokines, les facteurs de croissance, les hormones ...). Par ailleurs, les quinze gènes modulés par la PE et/ou le RCIU sont susceptibles de présenter un intérêt dans le diagnostic précoce de ces pathologies multifactorielles.