

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	v
Table des matières.....	vi
Liste des tableaux.....	x
Liste des figures.....	xi
Liste des figures supplémentaires.....	xiii
Liste des abréviations.....	xiv
Remerciements.....	xviii
Avant-propos.....	xx
Chapitre 1 : Introduction.....	1
1.1 Les facteurs de transcription induits par l'hypoxie (HIF).....	1
1.1.1 Structure et composition des complexes HIF.....	1
1.1.1.1 La sous-unité HIF- α	3
1.1.1.2 La sous-unité HIF- β /ARNT.....	6
1.1.2 Régulation de la sous-unité HIF- α	6
1.1.2.1 Mécanismes de dégradation dépendants de l'oxygène.....	6
1.1.2.1.1 Les protéines à domaines prolyl-hydroxylase, les PHD.....	8
1.1.2.1.1.1 PHD1.....	8
1.1.2.1.1.2 PHD2.....	9
1.1.2.1.1.3 PHD3.....	9
1.1.2.1.1.4 P4H-TM.....	10
1.1.2.1.2 Réactions d'hydroxylation et cofacteurs essentiels des PHD.....	11
1.1.2.1.2.1 Oxygène.....	11
1.1.2.1.2.2 2-oxoglutarate (2-OG).....	11
1.1.2.1.2.3 Fer et ascorbate.....	12
1.1.2.1.3 La protéine VHL (Von Hippel Lindau).....	13
1.1.2.2 Mécanismes de dégradation indépendants de l'oxygène.....	14
1.1.2.3 Régulation de l'activité transcriptionnelle des HIF par l'oxygène.....	16
1.1.2.4 Modifications post-traductionnelles de la sous-unité HIF- α : la phosphorylation.....	18
1.1.2.4.1 Les p42/p44 MAPK.....	18
1.1.2.4.2 Autres protéines kinases.....	20
1.1.3 Induction de la sous-unité HIF- α en conditions hypoxiques.....	21
1.1.4 Induction de la sous-unité HIF- α en conditions non-hypoxiques : rôle de l'Ang II.....	24
1.1.4.1 Augmentation de l'expression du gène <i>HIF-1A</i> par un mécanisme dépendant de l'activation de la PKC.....	25
1.1.4.2 Augmentation de la traduction de l'ARNm de HIF-1 α par l'activation de la voie de signalisation PI3K/p70S6K.....	26
1.1.4.3 Augmentation de la stabilité de HIF- α par un mécanisme dépendant de la génération des espèces réactives de l'O ₂ (ROS).....	27
1.1.5 Rôles physiologiques des facteurs de transcription HIF.....	29

1.1.5.1 Rôle des HIF au niveau vasculaire.....	29
1.1.5.1.1 L'angiogenèse.....	29
1.1.5.1.2 L'érythropoïèse.....	31
1.1.5.2 Rôle des HIF au niveau du développement embryonnaire	32
1.1.6 Rôles pathologiques des facteurs de transcription HIF.....	33
1.1.6.1 Rôle au niveau du développement tumoral	34
1.1.6.2 Rôle au niveau de pathologies vasculaires.....	36
1.2 Les facteurs de transcription Sp1 et Sp3.....	38
1.2.1 Généralité.....	38
1.2.2 Structure de Sp1 et Sp3.....	39
1.2.3 Propriétés fonctionnelles de Sp1 et Sp3.....	42
1.2.4 Mécanismes de régulation des facteurs Sp1 et Sp3	44
1.2.4.1 Régulation du niveau protéique de Sp1 et Sp3	44
1.2.4.2 Modifications post-traductionnelles de Sp1 et Sp3.....	45
1.2.4.2.1 Phosphorylation	46
1.2.5 Régulation de la transcription des gènes cibles par Sp1 et Sp3	48
1.2.6 Gènes cibles et implications pathologiques de Sp1 et Sp3 : rôle au niveau tumoral	49
1.2.7 Les facteurs de transcription Sp1/3 et le facteur de transcription HIF-1	51
1.3 La peptidyl-prolyl cis/trans isomérase, Pin1	52
1.3.1 Généralité.....	52
1.3.2 Structure de Pin1	54
1.3.3 Mécanismes de régulation de Pin1	54
1.3.4 Rôles biologiques et pathologiques de Pin1	55
1.3.4.1 Pin1 au niveau de la prolifération cellulaire et d'autres processus biologiques	55
1.3.4.2 Pin1 au niveau tumoral.....	57
Objectifs	59

Chapitre 2: The prolyl isomerase Pin1 regulates hypoxia-inducible transcription factor (HIF) activity	61
2.1 Avant-propos.....	62
2.2 Résumé.....	63
2.3 Abstract	64
2.4 Introduction	65
2.5 Materials and methods.....	67
2.6 Results.....	73
2.6.1 Pin1 interacts with HIF-1 α	73
2.6.2 Phosphorylation and the p42/p44 MAPK pathway regulate Pin1's interaction with HIF-1 α	75
2.6.3 Pin1 changes HIF-1 α conformation	79
2.6.4 Pin1 regulates HIF-1 transcriptional activity	81
2.7 Discussion	85
2.8 Conclusion	87
2.9 Acknowledgements	88
2.10 References.....	88

Chapitre 3: The prolyl isomerase Pin1 is an important regulator of Sp1/3 activity and subsequent hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) gene expression.....	92
3.1 Avant-propos.....	93
3.2 Résumé.....	94
3.3 Abstract	95
3.4 Introduction	96
3.5 Materials and methods.....	98
3.6 Results.....	102
3.6.1 Pin1 interacts with Sp1 and Sp3	102
3.6.2 Pin1 regulates Sp1/3 transcriptional activity	103
3.6.3 Phosphorylation of specific Ser/Thr residues is required for Pin1 interaction	105
3.6.4 Pin1 regulates Sp1/3 DNA binding.....	107
3.6.5 Pin1 is required for Sp1/3-mediated <i>HIF-1A</i> gene expression	108
3.8 Acknowledgements	115
3.9 References.....	115
Chapitre 4: Selective HIF-1 Regulation under Nonhypoxic Conditions by the p42/p44 MAP Kinase Inhibitor, PD184161	120
4.1 Avant-propos.....	121
4.2 Résumé.....	122
4.3 Abstract	123
4.4 Introduction	124
4.5 Materials and methods.....	126
4.6 Results.....	131
4.6.1 PD184161 inhibits HIF-1 α protein induction induced by Ang II in VSMC.....	131
4.6.2 PD184161 blocks nonhypoxic HIF-1 α induction	133
4.6.3 PD184161 blocks Ang II-induced HIF-1 α stabilization	135
4.6.4 PD184161 inhibits Ang II-induced mitochondrial ROS generation and ascorbate levels in VSMC.....	139
4.6.5 PD184161 inhibits mitochondrial membrane potential depolarization and ATP production in Ang II-treated VSMC	142
4.7 Discussion	144
4.8 Acknowledgements	148
4.9 References.....	148
4.10 Supplementary figures	154
Chapitre 5: Discussion et perspectives futures.....	155
5.1 Régulation post-traductionnelle de HIF-1α par Pin1.....	156
5.1.1 Importance de l'isomérisation de HIF-1 α par Pin1 au niveau de l'activité du facteur HIF-1 et des réponses physiopathologiques	156
5.1.2 Mécanismes de régulation de l'activité transcriptionnelle de HIF-1 par Pin1	158
5.2 Régulation des facteurs Sp1 et Sp3 par Pin1 et son impact majeur sur l'expression de HIF-1α	162
5.2.1 Modes de régulation de l'activité transcriptionnelle de Sp1 et Sp3 par Pin1	162

5.2.2 Importance de Pin1 dans l'expression du régulateur clé de l'homéostasie de l'oxygène, HIF-1, ainsi que dans les réponses médiées par Sp1 et Sp3	164
5.3 Régulation de l'induction non-hypoxique de HIF-1α chez les VSMC par PD184161	166
5.3.1 Importance de PD184161 dans les réponses induites par les mtROS	166
5.3.2 Rôle potentiel de PD184161 dans le traitement des pathologies associées aux VSMC	167
Chapitre 6: Conclusion.....	171
Références	173
Annexe 1.....	212
Annexe 2.....	213
Annexe 3.....	214
Annexe 4.....	215

Liste des tableaux

Chapitre 1: Introduction

Tableau 1.1: Principales kinases responsables de la phosphorylation HIF-1 α et leur effet.	21
Tableau 1.2: Principales kinases responsables de la phosphorylation de Sp1/Sp3 et leur effet.	47

Chapitre 2: The prolyl isomerase Pin1 regulates hypoxia-inducible transcription factor (HIF) activity

Tableau 2. 1: Primers used for real time RT-PCR.	72
---	----

Liste des figures

Chapitre 1: Introduction

Figure 1.1: Schéma représentant les principaux gènes activés par le facteur HIF-1.	2
Figure 1.2: Structure des sous-unités HIF- α et HIF- β	5
Figure 1.3: Mécanismes de dégradation des sous-unités HIF- α en présence d'oxygène. ..	8
Figure 1.4: Mécanismes de régulation de la sous-unité HIF-1 α par RACK1 et HSP90....	14
Figure 1.5: Mécanismes de dégradation de la sous-unité HIF-1 α par GSK3.	15
Figure 1.6: Mécanismes de dégradation de la sous-unité HIF-1 α par l'autophagie médiée par les chaperons.	16
Figure 1.7: Régulation des sous-unités HIF- α et des gènes cibles par les PHD et FIH en fonction du taux de l'O ₂	17
Figure 1.8: Mécanismes de stabilisation hypoxique des sous-unités HIF- α et d'activation des gènes cibles.	23
Figure 1.9: Mécanismes d'induction et d'activation de la sous-unité HIF-1 α par Ang II.	28
Figure 1.10: Anomalies développementales associées à l'inactivation génique de HIF-1 α	33
Figure 1.11: Implication des complexes HIF dans divers aspects du développement tumoral.	35
Figure 1.12: Structure des isoformes Sp1 et Sp3.	41
Figure 1.13: Formation d'une boucle d'ADN entre le promoteur et les ``enhancers`` sous l'action du facteur Sp1 et super-activation du gène cible.	43
Figure 1.14: Régulation de l'expression génique par les facteurs de transcription Sp1 et Sp3.	49
Figure 1.15: Régulation des principaux processus impliqués dans le développement tumoral par les facteurs de transcription Sp1 et Sp3.	51
Figure 1.16: Schéma représentant la réaction d'isomérisation catalysée par Pin1 et son effet sur les protéines substrats.	53
Figure 1.17: Structure de peptidyl-prolyl isomérase Pin1.	54
Figure 1.18: Effet de l'activation de Pin1 sur les oncogènes et les suppresseurs de tumeurs dans un contexte tumoral.	58

Chapitre 2: The prolyl isomerase Pin1 regulates hypoxia-inducible transcription factor (HIF) activity

Figure 2.1: Pin1 interacts with HIF-1 α	74
Figure 2.2: p42/p44 MAPK pathway activation is required for Pin1 to interact with HIF-1 α	76
Figure 2.3: HIF-1 α phosphorylation by p42/p44 MAPK is required for interaction with Pin1.	78
Figure 2.4: The catalytic activity of Pin1 generates a conformational change in HIF-1 α	80
Figure 2.5: Pin1 positively regulates HIF-1 transcriptional activity.	82
Figure 2.6: Pin1 is required for gene-specific HIF-1 transcriptional activity.	84

Chapitre 3: The prolyl isomerase Pin1 is an important regulator of Sp1/3 activity and subsequent hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) gene expression

Figure 3.1: Pin1 interacts with Sp1 and Sp3.	102
---	-----

Figure 3. 2: Pin1 depletion reduces the Sp1/3 transcriptional activity.	104
Figure 3. 3: Phosphorylation of Thr ⁷³⁹ of Sp1 and Ser ⁷³ of Sp3 is important for Pin1 binding.	106
Figure 3. 4: Sp1/3 DNA binding affinity is modulated by Pin1.	108
Figure 3. 5: Pin1 is required for the Sp1/3-dependent expression of HIF-1 α	110

Chapitre 4: Selective HIF-1 Regulation under Nonhypoxic Conditions by the p42/p44 MAP Kinase Inhibitor, PD184161

Figure 4.1: Ang II-induced HIF-1 α is inhibited by PD184161, an inhibitor of p42/p44 MAPK activation.	132
Figure 4.2: HIF-1 α induction is selectively regulated by PD184161.	134
Figure 4.3: Effect of PD184161 on HIF-1 α proteasomal degradation.	136
Figure 4.4: PD184161 enhances HIF-1 α hydroxylation and VHL binding.	138
Figure 4.5: PD184161 influences mtROS production by Ang II.	140
Figure 4.6: PD184161 affects intracellular levels of ascorbate.	141
Figure 4.7: PD184161 inhibits mitochondrial membrane potential depolarization and ATP production.	143

Liste des figures supplémentaires

Chapitre 4: Selective HIF-1 Regulation under Nonhypoxic Conditions by the p42/p44 MAP Kinase Inhibitor, PD184161

Supplementary figure 4. 1: PD184161 inhibits PDGF-induced HIF-1 α accumulation.. 154

Supplementary figure 4. 2: PD184161 does not modify HIF-1 α gene transcription..... 154

Annexe 1

Figure Annexe 1: Étude de l'implication de Pin1 dans la régulation des gènes cibles de HIF par micropuce à ADN (microarray)..... 212

Annexe 2

Figure Annexe 2: Pin1 n'affecte pas l'interaction entre HIF-1 α et HIF-1 β 213

Annexe 3

Figure Annexe 3: Pin1 n'a aucun effet sur la localisation cellulaire de HIF-1 α 214

Annexe 4

Figure Annexe 4: Pin1 régule la liaison de HIF-1 aux séquences HRE des gènes cibles.
..... 215

Liste des abréviations

2-OG	2-oxoglutarate
$\Delta\Psi$	Potentiel de la membrane mitochondriale (<i>mitochondrial membrane potential</i>)
ADN	Acide désoxyribonucléique (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
AHR	Récepteur aryl hydrocarbure (<i>aryl hydrocarbon receptor</i>)
ALDOA	Aldolase A
AMPK	Protéine kinase activée par l'AMP (<i>AMP-activated protein kinase</i>)
Ang II	Angiotensine II (<i>angiotensin II</i>)
APL	Leucémie aiguë promyélocytaire (<i>acute promyelocytic leukemia</i>)
ARN	Acide ribonucléique (<i>ribonucleic acid</i>)
ARNi	Interférence à l'ARN (<i>RNA interference</i>)
ARNm	ARN messager (<i>RNA messenger</i>)
ARNT	Translocateur du récepteur nucléaire aryl hydrocarbure (<i>arylhydrocarbon receptor nuclear translocator</i>)
ATM	Muté dans l'ataxie télangiectasie (<i>ataxia-telangiectasia mutated</i>)
ATR	Ataxie télangiectasie et la protéine liée à Rad3 (<i>ataxia telangiectasia and Rad3-related protein</i>)
ATRA	Acide tout-trans rétinolique (<i>all-trans retinoic acid</i>)
AURKA	Kinase Aurora A
bHLH	Domaine basique hélice-boucle-hélice (<i>basic helix-loop-helix domain</i>)
BNIP3	<i>BCL2/Adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3</i>
BRCA1	Gène 1 du cancer du sein (<i>breast cancer 1</i>)
Btd	<i>Buttonhead box</i>
CBP	Protéine liant l'élément de réponse à l'AMP cyclique (<i>cAMP response element binding protein</i>)
CDK	Cycline dépendante de la kinase (<i>cyclin-dependent kinase</i>)
CE	Cellules endothéliales (<i>endothelial cell</i>)
ChIP	Immunoprécipitation de la chromatine (<i>chromatin immunoprecipitation</i>)
CMA	Autophagie médiée par les protéines chaperonnes (<i>chaperone mediated autophagy</i>)
CoCl₂	Cobalt chlorure cycloheximide
CPNPC	Cancer du poumon non à petites cellules (<i>non-small-cell lung cancer</i>)
MRC	Chaîne respiratoire mitochondriale (<i>mitochondrial respiratory chain</i>)
CRM1	Région 1 du maintien de chromosome (<i>chromosome region maintenance 1</i>)
Crta2	Co-activateur transcriptionnel pour le CREB (<i>CREB regulated transcription coactivator 2</i>)
CSC	Cellules souches cancéreuses (<i>cancer stem cell</i>)
CSE	Cellules souches embryonnaires (<i>embryonic stem cell</i>)
CUL1	Culline 1 (<i>cullin 1</i>)
DAG	Diacélglycérol (<i>diacylglycerol</i>)
DAPK1	Protéine kinase associée à la mort cellulaire (<i>death-associated protein kinase 1</i>)
DMEM	Milieu minimal de Eagle modifié par Dulbecco (<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>)
DMOG	Diméthylalylglycine (<i>dimethylalylglycine</i>)
DMSO	Diméthyl sulfoxyde (<i>dimethyl sulfoxide</i>)
ECL	Chimioluminescence améliorée (<i>enhanced chemiluminescence</i>)

EGF	Facteur de croissance de l'épiderme (<i>epidermal growth factor</i>)
EGFR	Récepteur de l'EGF (<i>EGF receptor</i>)
eIF-4F	Facteur 4F d'initiation de la traduction d'eucaryote (<i>eukaryotic translation initiation factor 4F</i>)
EPAS1	Protéine endothéliale à domaine PAS 1 (<i>endothelial PAS protein 1</i>)
EPO	Érythropoïétine (<i>erythropoietin</i>)
ERα	Récepteur alpha des œstrogènes (<i>estrogen receptor-alpha</i>)
ET-1	Endothéline-1 (<i>endothelin-1</i>)
FAK	Kinase d'adhésion focale (<i>focal adhesion kinase</i>)
Fe²⁺	Fer ferreux (<i>ferrous iron</i>)
Fe³⁺	Fer ferrique (<i>Ferric iron</i>)
FGF	Facteur de croissance des fibroblastes (<i>fibroblast growth factor</i>)
FH	Fumarate hydratase
FIH	Facteur inhibiteur de HIF (<i>factor inhibiting HIF</i>)
FKBP38	Protéine 38 liant la tacrolimus FK506 (<i>FK506-binding protein 38</i>)
FPN	Ferroportine (<i>ferroportin</i>)
GLUT1	Transporteur 1 du glucose (<i>glucose transporter-1</i>)
GLUT3	Transporteur 3 du glucose (<i>glucose transporter-3</i>)
GSK3	Kinase 3 de synthetase du glycogène (<i>glycogen synthase kinase 3</i>)
GST	Glutathione S-transferase
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène (<i>hydrogen peroxide</i>)
HA	Hémagglutinine (<i>hemagglutinin</i>)
HAF	Facteur associé à l'hypoxie (<i>hypoxia-associated factor</i>)
HAT	Acetyltransferase des histones (<i>histone acetyltransferase</i>)
HEK 293T	Cellules rénales embryonnaires humaines 293 (<i>human embryonic kidney cell 293</i>)
HeLa	Cellules de carcinome cervical humain (<i>human cervical carcinoma cell</i>)
HIF	Facteur inductible de l'hypoxie (<i>hypoxia-inducible factor</i>)
HK1	Hexokinase 1
HLF	Facteur semblable à HIF (<i>HIF-like factor</i>)
HO-1	Hème oxygénase 1 (<i>heme oxygenase 1</i>)
HRE	Élément de réponse à l'hypoxie (<i>hypoxia response element</i>)
HRF	Facteur relié à HIF (<i>HIF-related factor</i>)
HSP90	Protéine 90 de choc thermique (<i>heat shock protein 90</i>)
HuR	Antigène humain R (<i>human antigen R</i>)
ID	Domaine inhibiteur (<i>inhibiting domain</i>)
IDPm	Isocitrate déhydrogénase mitochondriale NADP ⁺ -dépendante (<i>mitochondrial NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase</i>)
IGF-1	Facteur de croissance semblable à l'insuline-1 (<i>insulin-like growth factor-1</i>)
IGF-1R	Récepteur à l'IGF-1 (<i>IGF-1 receptor</i>)
IP3	Inositol triphosphate
IPAS	Protéine à domaine inhibiteur PAS (<i>inhibitory PAS domain protein</i>)
IRES	Site interne d'entrée des ribosomes (<i>internal ribosome entry site</i>)
IRS-1	Substrat-1 du récepteur d'insuline (<i>insulin receptor substrate-1</i>)
K_m	Constante de Michaelis (<i>Michaelis constant</i>)
LDH A	Déshydrogénase A du lactate (<i>lactate deshydrogenase-A</i>)

LLC	Cellules de carcinome de poumon de Lewi (<i>Lewis lung carcinoma</i>)
MAO-B	Monoamine oxydase B
MAPK	Protéine kinase activée par un mitogène (<i>mitogen activated protein kinase</i>)
MEF	Fibroblaste embryonnaire de souris (<i>mouse embryonic fibroblast</i>)
MEK	Kinase MAPK/ERK (Kinases régulées par un signal extracellulaire) (<i>MAPK/ ERK (extracellular signal–regulated kinases) kinase</i>)
mitoK_{ATP}	Canal potassique mitochondrial ATP-sensible (<i>mitochondrial ATP-sensitive potassium channel</i>)
MMP	Métalloprotéases de la matrice (<i>matrix metalloprotease</i>)
MOP2	Membre de la superfamille PAS 2 (<i>member of PAS family 2</i>)
NASH	Stéatohépatite non-alcoolique (<i>nonalcoholic steatohepatitis</i>)
NCoR	Récepteur nucléaire corépresseur (<i>nuclear receptor corepressor</i>)
NES	Signal d'export nucléaire (<i>nuclear export signal</i>)
NF-κB	Facteur nucléaire-KB (<i>nuclear factor-KB</i>)
NHE	Échangeur de sodium-hydrogène (<i>sodium-hydrogen exchanger</i>)
NLS	Séquences de localisation nucléaires (<i>nuclear localisation signal</i>)
N-TAD	Domaine de transactivation dans la partie N-terminale (<i>N-terminal transactivation domain</i>)
O₂	Oxygène (<i>oxygen</i>)
ODDD	Domaine de dégradation dépendant de l'oxygène (<i>oxygen-dependent degradation domain</i>)
P4H-TM	Prolyl 4-hydroxylase transmembranaire (<i>transmembrane prolyl4-hydroxylase</i>)
p70S6K	Kinase de la protéine 70S6 (<i>protein 70S6 kinase</i>)
PAS	Per-ARNT-Sim
PDGF	Facteur de croissance dérivé des plaquettes (<i>platelet-derived growth factor</i>)
PDGFRA	Récepteur alpha de PDGF (<i>PDGF receptor alpha</i>)
PFKFB4	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase
PGK1	Phosphoglycérate kinase 1 (<i>phosphoglycerate kinase 1</i>)
PHD	Protéine à domain prolyl-hydroxylase (<i>prolyl-hydroxylase domain protein</i>)
PI3K	Kinase du phosphatidylinositol-3 (<i>phosphatidylinositol 3-kinase</i>)
Pin1	Protéine interagissant avec NIMA-1 (<i>protein interacting with NIMA-1</i>)
PKA	Protéine kinase A (<i>protein kinase A</i>)
PKC	Protéine kinase C (<i>protein kinase C</i>)
PKM2	Pyruvate kinase isozyme type M2 (<i>pyruvate kinase isozyme type M2</i>)
PLK1	Kinase 1 semblable à Polo (<i>polo-like kinase 1</i>)
PML	Leucémie promyélocytaire (<i>promyelocytic leukemia</i>)
PP2A	Protéine phosphatase 2A (<i>protein phosphatase 2A</i>)
PPIase	Peptidyl-prolyl isomérase (<i>peptidyl-prolyl isomerase</i>)
PTB	Protéine liant les séquences de polypyrimidines (<i>polypyrimidien tract- binding protein</i>)
PTP-	Protéine tyrosine phosphatase riche en proline, acide glutamique, sérine et thréonine
PEST	(<i>protein tyrosine phosphatase - proline-, glutamic acid-, serine- and threonine-rich</i>)
pVHL	Produit du gène suppresseur de tumeur de von Hippel-Lindau (<i>product of the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene</i>)
RACK1	Récepteur de la C-kinase activée 1 (<i>receptor for activated protein C kinase 1</i>)
RB1	Rétinoblastome 1 (<i>retinoblastoma 1</i>)

Rbx-1	<i>RING box1</i>
GPCR	Récepteurs couplés aux protéines G (<i>G protein-coupled receptors</i>)
RNAPII	ARN polymérase II (<i>RNA polymerase II</i>)
RNF4	<i>Ring finger protein 4</i>
ROS	Espèces réactives de l'oxygène (<i>reactive oxygen species</i>)
RSK2	Ribosomal S6 kinase 2
RT	Transcription inverse (<i>reverse transcription</i>)
RTK	Récepteurs à activité tyrosine kinase (<i>tyrosine kinase receptor</i>)
S1P	Sphingosine-1-phosphate
SDF-1α	Facteur-1 alpha dérivé des cellules stromales (<i>stromal cell-derived factor-1alpha</i>)
SDH	Succinate déshydrogénase (<i>succinate dehydrogenase</i>)
Siah	Protéines ubiquitine-ligases homologues à Seven in Absentia (<i>Seven in Absentia homolog</i>)
SKP1	Protéine 1 associée aux kinases de la phase S (<i>S-phase kinase associated protein 1</i>)
SMRT	Médiateur silencieux des récepteurs rétinoïdes et de l'hormone thyroïdienne (<i>silencing mediator for retinoid and thyroid receptors</i>)
Sp1	Protéine de spécificité 1 (<i>specificity protein 1</i>)
Sp3	Protéine de spécificité 3 (<i>specificity protein 3</i>)
SRA	Système rénine-angiotensine (<i>renin-angiotensin system</i>)
TAD	Domaine de transactivation (<i>transactivation domain</i>)
TEM	Transition épithélio-mésenchymateuse (<i>epithelial-mesenchymal transition</i>)
TGF	Facteur transformant de croissance (<i>transforming growth factor</i>)
Thr	Thrombine (<i>thrombin</i>)
TRAIL	Ligand inducteur d'apoptose apparenté au facteur de nécrose tumorale (<i>tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand</i>)
TSP-1	Thrombospondine-1 (<i>thrombospondin-1</i>)
UTR	Région non-traduite (<i>untranslated region</i>)
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (<i>vascular endothelial growth factor</i>)
VSMC	Cellules musculaires lisse vasculaire (<i>vascular smooth muscle cells</i>)

Remerciements

Ce travail est le fruit de plusieurs années de travail et de sacrifices. Je profite de cette opportunité pour se sentir en gratitude à l'égard de ceux qui, par leurs encouragements et soutien, ont enflammé mon goût pour la recherche.

En tout premier lieu, qu'il me soit permis d'abord d'éprouver mon immense gratitude et mes sincères remerciements à mon directeur de recherche Dr. Darren E. Richard pour son accueil chaleureux dans son laboratoire et avec qui j'ai eu le grand bonheur de réaliser ma thèse. Je le remercie infiniment d'avoir guidé mes premiers pas de recherche, pour la confiance qu'il m'a accordée durant ces années et de m'avoir appris le métier de chercheur. Quand je prends le temps de penser à mon parcours et les obstacles que j'ai vécu, je mesure encore mieux aujourd'hui, qu'hier, la chance que j'ai eu d'être membre de l'équipe du Dr. Richard et le privilège d'être son étudiante. À des moments durs de ma vie en tant que doctorante Dr. Richard était à mes côtés par ses conseils précieux et ses encouragements pour me pousser à remonter la pente. Je lui en suis vraiment reconnaissante pour sa rigueur scientifique, sa patience, sa compréhension et ses qualités humaines.

Bien évidemment, j'aimerais également remercier tous les membres du laboratoire qui m'ont fait le plaisir de travailler avec moi, et pour leur accompagnement durant ces années de doctorat. Par dérogation spéciale, je remercie Geneviève pour son dévouement au travail et pour sa gentillesse et qui, lors de mon arrivée au laboratoire, m'a aidé à acquérir des connaissances et des outils indispensables pour me préparer au mieux à mon projet de doctorat. Je remercie aussi tout particulièrement Laurent pour son bon sens d'humour et pour son dévouement et son implication au laboratoire. Ses conseils, son aide et son soutien m'ont été sources de grandes satisfactions.

Je remercie très sincèrement deux amies et partenaires, Véronique et Sophie, pour tous les bons moments et rigolades qu'on a vécus ensemble. Les belles discussions scientifiques, les échanges d'idées et les moments de réflexion que j'avais avec elles furent non seulement constructives mais aussi motivantes, rassurantes et fructueuses. C'était vraiment un très grand plaisir de partager avec elles le plaisir musical, les anecdotes et l'amour de la vie. C'était grâce à elles de vivre des moments émouvant et pur, des moments d'ambiance conviviale. Je ne garderai de cette expérience de doctorat

que de beaux souvenirs qui resteront gravées dans ma mémoire durant toute ma vie. Véronique: je n'oublierai jamais ton aide et ton bon contact humain lors de mes jours de grossesse. J'ai pu apprécier durant cette période assez délicate de ma vie tes qualités humaines et ton esprit de collaboration et de partage. Je remercie aussi Sophie pour son sérieux, sa franchise et son encouragement.

Je voudrais aussi remercier tous ceux que j'ai rencontrés lors de mon séjour au laboratoire de Dr. Richard, notamment Ronald pour son éminence et son sourire, Noémie pour sa vivacité et son rigueur, Bruna pour son calme et son sérieux, et Catherine pour sa motivation et son aide précieuse.

Je me permets aussi de remercier chaleureusement les membres du jury qui m'ont fait l'honneur d'évaluer mon travail. Je voudrais également remercier tous les professeurs et le personnel de la Faculté de Médecine de l'université Laval pour leur disponibilité et leur accueil.

J'exprime mon amour et toute ma reconnaissance envers ma chère mère Farida et mon cher père Mouldi qui étaient, et le sont encore, toujours à mes côtés. L'amour, la patience, les sacrifices, l'encouragement et le soutien infinis qu'ils m'ont apporté dans ma vie n'ont pas de mesure dans mes yeux. Ils étaient témoins de mes premiers pas dans la vie, témoins de mes premiers jours à l'école, témoins de tout dans ma vie. Je vous aime fort mes chers et je vous dois mon succès.

Je souhaite aussi remercier mes sœurs Manel, Mouna et Safa pour leur amour, leur encouragement et leur soutien moral tout au long de mon doctorat. Merci aussi à mes belles sœurs, particulièrement Soulef, mes beaux frères et tous mes amis.

Enfin, je voudrais remercier ma petite famille pour tout le temps que je lui ai volé. Mon cher mari Halim: je suis reconnaissante pour ta grande patience et pour tous les sacrifices que tu as consentis pour moi. Je suis vraiment très chanceuse de t'avoir à mes côtés. Je t'aime énormément. Mon cher fils Yakin: merci mon ange d'être parmi nous, et de donner un sens à ma vie. Tu es ma source d'espoir, de motivation et de l'énergie.

Avant-propos

Dans notre laboratoire, on s'intéresse principalement à caractériser de nouveaux mécanismes et régulateurs impliqués dans le contrôle de l'activité transcriptionnelle des facteurs de transcription induits par l'hypoxie, HIF. Une étude préliminaire effectuée au laboratoire suggérait une interaction possible entre l'isomérase Pin1 et la sous-unité HIF-1 α . Mes premiers travaux concernent alors le rôle de l'isomérisation de HIF-1 α dans l'activité du facteur HIF-1 et dans l'expression de ses gènes cibles ainsi que le mécanisme d'une telle régulation post-traductionnelle. Le deuxième volet de mes travaux consiste à investiguer l'implication de Pin1 dans la régulation transcriptionnelle de HIF-1 α par les facteurs de transcription Sp1 et Sp3. En effet, ces facteurs sont phosphorylés sur des sites de liaison putatifs de Pin1 et l'inhibition de la voie responsable de cette phosphorylation affecte négativement l'activité de ces facteurs, suggérant ainsi un lien possible entre Sp1/3 et Pin1. Finalement, l'utilisation d'un inhibiteur de MEK1/2, le PD184161, a permis de démontrer un effet suppresseur sur l'induction non-hypoxique de la protéine HIF-1 α . J'ai donc effectué des travaux portant sur l'identification du mécanisme par lequel PD184161 agit sur HIF-1 α et qui ont constitué le troisième volet de ma thèse.

Le **Chapitre 1** de cette thèse est consacré à une introduction générale qui permet une meilleure compréhension des travaux de recherche présentés dans cette thèse. Ainsi, un aperçu de caractéristiques structurales et fonctionnelles des HIF, des Sp1/3 et de Pin1 est donné, en plus d'une description des principaux mécanismes et facteurs impliqués dans leur régulation ainsi que de leurs rôles physiologiques et/ou pathologiques.

Le **Chapitre 2** de cette thèse présente mes travaux portant sur l'étude de l'isomérisation de HIF-1 α par Pin1 et de son effet sur l'activité du facteur HIF-1 ainsi que sur l'expression de ses gènes cibles. Ces travaux intitulés : *The prolyl isomerase Pin1 regulates hypoxia-inducible transcription factor (HIF) activity* (Jalouli M, Déry M.A, Lafleur V, Lamalice L, Zhou X.Z, Lu K.P et Richard D.E), ont été publiés dans le journal *Cellular Signalling* en aout 2014.

Au **Chapitre 3** sont présentés mes travaux soulignant l'importance de Pin1 dans l'activation des facteurs de transcription Sp1/3 et de son gène cible *HIF-1A*. Ces travaux intitulés : *The prolyl isomerase Pin1 is an important regulator of Sp1/3 activity and*

subsequent hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) gene expression (Jalouli M, Lafleur V, Lamalice L et Richard D.E), feront l'objet d'une soumission sous peu pour publication.

Le **Chapitre 4** de cette thèse décrit mes travaux qui concernent l'impact de PD184161 sur la stabilisation non-hypoxique de la protéine HIF-1 α . Ces travaux intitulés : *Selective HIF-1 Regulation under Nonhypoxic Conditions by the p42/p44 MAP Kinase Inhibitor, PD184161* (Jalouli M, Mokas S, Turgeon C.A, Lamalice L et Richard D.E), ont été publiés dans le journal *Molecular Pharmacology* en novembre 2017.

Également, j'ai effectué des travaux visant à identifier l'ensemble des gènes cibles des HIF modulés par Pin1 et à caractériser le mécanisme par lequel l'isomérisation de HIF-1 α par Pin1 module l'activité transcriptionnelle de HIF-1. Ces travaux, qui consistent en la poursuite de l'étude décrite dans le chapitre 2, sont présentés aussi bien en annexe que dans la discussion (chapitre 5).

Chapitre 1 : Introduction

1.1 Les facteurs de transcription induits par l'hypoxie (HIF)

Cette section vise à présenter les facteurs de transcription HIF, des médiateurs clés de la réponse adaptative à l'hypoxie. Les propriétés structurales et fonctionnelles des ces facteurs, les principaux mécanismes de leur régulation et de leur induction ainsi que leur implication physiologique et pathologique sont aussi décrits.

1.1.1 Structure et composition des complexes HIF

Les facteurs induits par l'hypoxie (*Hypoxia-inducible factors*, HIF) sont des médiateurs clés de l'homéostasie cellulaire en réponse à un stress hypoxique. Entre autres, ces facteurs activent l'expression de plusieurs gènes essentiels à l'adaptation cellulaire en conditions hypoxiques (Bracken *et al.* 2003). HIF-1 a été le premier identifié comme étant un facteur qui se fixe sur une séquence, sensible à l'hypoxie, en position 3' non codante du gène codant pour l'érythropoïétine (EPO) (Semenza *et al.* 1991; Semenza & Wang 1992). Outre son rôle dans l'érythropoïèse, le facteur de transcription HIF-1 est connu par son fort potentiel à induire plusieurs gènes hautement impliqués dans nombreux autres processus biologiques, tels que l'angiogenèse, la prolifération et la survie cellulaire (Figure 1.1).

Les facteurs HIF médient leurs effets en reconnaissant des séquences consensus 5' (A/G)CGTG 3' nommées HRE (*Hypoxia response elements*), qui sont présentes au niveau des régions promotrices et "enhancer" de nombreux gènes cibles. Le nombre de ces éléments de réponse à l'hypoxie ainsi que l'affinité des facteurs HIF pour ces séquences consensus varient d'un gène à un autre. Des études élégantes ont montré que HIF se lie préférentiellement à la séquence HRE qui possède le nucléotide A en première position et T en amont de la séquence HRE (Wenger *et al.* 2005). La régulation de l'expression des gènes cibles des facteurs HIF nécessite non seulement la séquence consensus HRE mais aussi des séquences régulatrices adjacentes (Wenger *et al.* 2005). La présence de ces régions régulatrices ainsi que l'interaction des facteurs HIF avec divers co-activateurs

transcriptionnels tels que CBP (*cAMP-response-element-binding protein (CREB)-binding protein*)/p300, PKM2 (*Pyruvate kinase M2*), SWI/SNF (*SWItching mating type/Sucrose Non Fermenting*) et Pontin sont à l'origine d'une activation spécifique et différentielle des gènes dépendants des HIF selon le type et le contexte cellulaire. L'activation des complexes HIF et ses gènes cibles en conditions hypoxiques sera plus détaillée dans une section ultérieure de cette thèse (section 1.1.3).

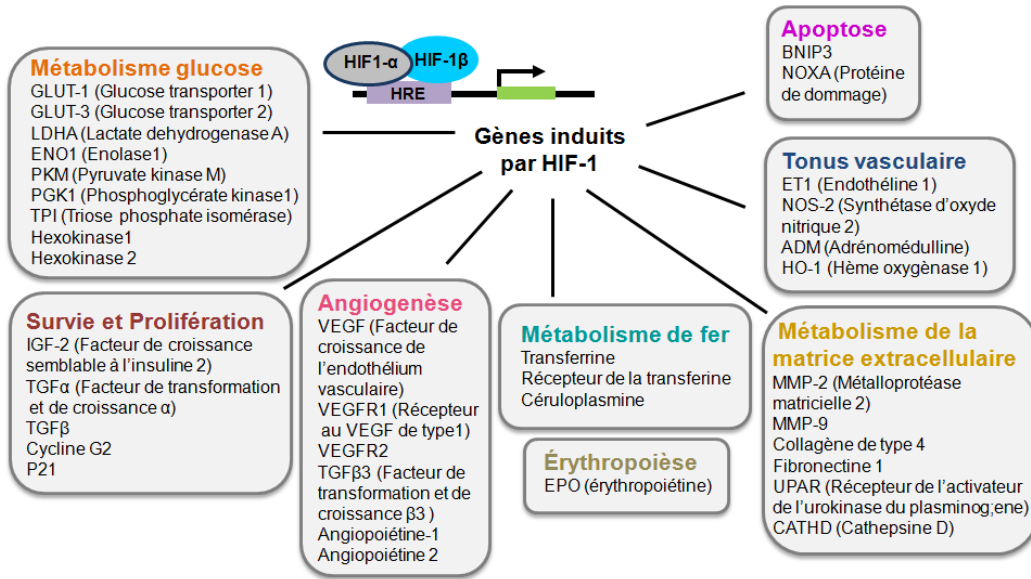


Figure 1.1: Schéma représentant les principaux gènes activés par le facteur HIF-1. Ces gènes cibles, induits à la suite de la liaison du complexe fonctionnel à la séquence HRE, sont impliqués dans divers processus cellulaires et physiologiques permettant le maintien de l'homéostasie cellulaire en réponse à un stress hypoxique. *Illustration par M. Jalouli.*

Les facteurs HIF sont des hétérodimères obligatoires constitués des sous-unités HIF- α et HIF- β . Contrairement à HIF- β , qui est constitutivement exprimée et localisée au noyau, HIF- α est hautement régulée par le niveau intracellulaire d'oxygène (O_2) (Wang & Semenza 1995). En condition normale d' O_2 , HIF- α est dégradée par le protéasome tandis que la carence d' O_2 entraîne sa stabilisation. Les deux sous-unités α et β possèdent un domaine basique PAS (*Per-ARNT-Sim*) et un domaine bHLH (*basic helix-loop-helix*) impliqués dans la dimérisation du complexe HIF ainsi que sa liaison à l'ADN, et

appartiennent donc à la famille des protéines contenant ces deux domaines (Wang *et al.* 1995a) (Figure 1.2).

1.1.1.1 La sous-unité HIF- α

Chez les mammifères, il existe trois isoformes α : HIF-1 α , HIF-2 α et HIF-3 α (Webb *et al.* 2009). Ces isoformes sont caractérisées par un domaine, fortement sensible à l'O₂, responsable de leur dégradation en condition normoxique (*oxygen-dependent degradation domain*, ODDD) (Jiang *et al.* 1996; Jiang *et al.* 1997; Huang *et al.* 1998; O'Rourke *et al.* 1999; Lendahl *et al.* 2009). Plus précisément, ce domaine possède deux prolines (Pro402 et Pro564 chez la protéine HIF-1 α ; Pro405 et Pro530 chez la protéine HIF-2 α) qui sont à l'origine de l'instabilité de ces protéines en réponse aux variations de la concentration d'O₂. En plus de domaines PAS, bHLH et ODDD, les sous-unités HIF- α , et surtout HIF-1 α et HIF-2 α , possèdent deux domaines de transactivation (TAD) qui sont nécessaires pour leur activité transcriptionnelle en permettant le recrutement des co-activateurs transcriptionnels (Carrero *et al.* 2000). Les deux TADs sont situés dans la partie carboxy-terminale de la protéine, N-TAD vers l'extrémité N-terminale et C-TAD vers l'extrémité C-terminale (Jiang *et al.* 1997; Pugh *et al.* 1997). Ils sont séparés par un domaine inhibiteur de la transcription, le domaine ID (*Inhibiting Domain*), impliqué dans l'inhibition de l'interaction de HIF- α avec ses coactivateurs transcriptionnels suite à l'action de l'asparagine hydroxylase, FIH (*Factor Inhibiting HIF*) (Mahon *et al.* 2001; Bracken *et al.* 2006; Qing & Simon 2009). Deux séquences de localisation nucléaires (NLS) sont également décrites chez HIF- α (Figure 1.2). La première séquence est située dans le domaine bHLH au niveau N-terminal (N-NLS). Cette séquence est réprimée par le domaine PAS ce qui a pour effet la rétention cytoplasmique de HIF- α . La deuxième séquence, quant à elle, est localisée dans la partie C-terminale (C-NLS) et est extrêmement importante pour l'import nucléaire de HIF- α en conditions hypoxiques (Kallio *et al.* 1998). En effet, il a été démontré que l'import nucléaire de HIF-1 α est hautement dépendant de C-NLS. HIF-1 α possède également, dans sa partie C-terminale, une séquence de signal d'export nucléaire (*nuclear export signal*, NES). Ce NES est constituée des résidus hydrophobes essentiels pour la fixation des récepteurs d'export

CRM1 (*chromosome region maintenance 1*) (Mylonis *et al.* 2008). Il a été démontré que l'export nucléaire de cette protéine est hautement régulé par la phosphorylation des résidus serines (Ser641 et Ser643) par les protéines kinases p42/p44 MAPK (*p42/p44 mitogen-activated protein kinases*). Cette phosphorylation influence négativement l'interaction de HIF-1 α avec CRM1, entraîne sa rétention nucléaire, et augmente par conséquent son activité transcriptionnelle (Mylonis *et al.* 2006).

La protéine HIF-2 α , initialement nommée EPAS1 (*endothelial PAS protein 1*), HLF (*HIF-like factor*), HRF (*HIF-related factor*) et MOP2 (*member of PAS family 2*), est fortement similaire à HIF-1 α et partage 48% d'homologie de séquence en acides aminés avec cette protéine. Ces deux sous-unités possèdent des domaines de transactivation C-TAD hautement homologues qui leur permettent de partager certains gènes cibles. Toutefois, leurs domaines N-TAD possèdent une faible homologie et sont à l'origine de la spécificité transcriptionnelle des gènes cibles. En ce sens, il a été démontré que la substitution du domaine N-TAD de HIF-2 α pour celle de HIF-1 α permet à HIF-2 d'induire les gènes cibles de HIF-1 (Hu *et al.* 2007). Il apparaît donc que HIF-1 et HIF-2 sont capables de réguler plusieurs gènes communs, tandis qu'ils sont spécifiques pour d'autres. Généralement, le complexe HIF-1 est responsable de la régulation du métabolisme cellulaire alors que le facteur HIF-2 est fortement impliqué dans la régulation des gènes nécessaires pour la division cellulaire, le maintien de l'homéostasie mitochondriale et l'érythropoïèse.

La sous-unité HIF-3 α , quant à elle, possède une faible homologie de séquence ainsi que des caractéristiques fonctionnelles distinctes en comparaison avec HIF-1 α et HIF-2 α . HIF-3 α est considérée comme un régulateur négatif de l'expression des gènes qui dépendent de HIF-1 et HIF-2. Dans ce contexte, une étude a permis de montrer que la surexpression de HIF-3 α entraîne l'inhibition du gène rapporteur dont l'expression est sous le contrôle des facteurs HIF-1 et HIF-2 (Hara *et al.* 2001). D'une manière intéressante, il a été également démontré que la déplétion de HIF-1 α et HIF-2 α par interférence à l'ARN a pour effet de diminuer le niveau d'expression de la protéine HIF-3 α (Augstein *et al.* 2011), ce qui suggère la présence d'une boucle de rétrocontrôle négative entre les différentes sous-unités α . En plus de son effet de compétition avec les

autres sous-unités α pour la liaison de HIF-1 β , la protéine HIF-3 α possède un variant d'épissage, IPAS (*inhibitory PAS domain protein*), qui peut interagir avec HIF-1 α et HIF-2 α . Ainsi, il peut former le complexe IPAS-HIF α qui est incapable de lier l'ADN et activer les gènes cibles de HIF-1 et HIF-2.

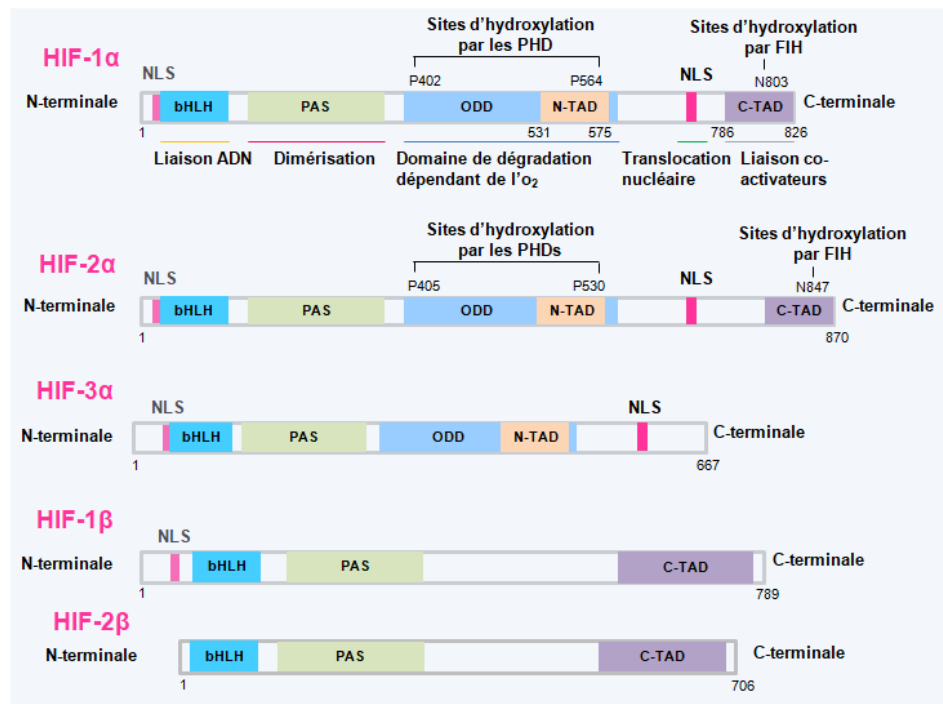


Figure 1.2: Structure des sous-unités HIF- α et HIF- β . Les différents domaines fonctionnels des sous-unités HIF- α (HIF-1 α , HIF-2 α et HIF-3 α) et HIF- β (HIF-1 β et HIF-2 β) ainsi que les principales modifications post-traductionnelles régulant leur stabilité et leur activité sont représentés. *Illustration par M. Jalouli.*

Bien que les protéines HIF- α soient similaires de point de vue biochimique et structural (dégradation en présence d'O₂, hétérodimérisation obligatoire avec HIF-1 β , liaison spécifique aux séquences HRE), l'expression tissulaire de HIF-2 α et HIF-3 α est beaucoup plus restreinte que celle de HIF-1 α , ce qui supporte la fine différence fonctionnelle entre ces protéines. En outre, HIF-1 α est exprimée de manière ubiquitaire, tandis que HIF-2 α et HIF-3 α sont présentes au niveau de certains types cellulaires y compris les cellules endothéliales (CE) des vaisseaux sanguins, les pneumocytes de type

II, les cellules interstitielles du rein, les cellules du parenchyme hépatique et les cellules myéloïdes (Bertout *et al.* 2008).

1.1.1.2 La sous-unité HIF- β /ARNT

La sous-unité β , dont la stabilité est indépendante de la variation de niveaux d'O₂, est une protéine ubiquitaire et fortement nécessaire pour la formation d'un complexe transcriptionnel fonctionnel HIF. HIF- β est présente sous forme de trois isoformes, HIF-1 β , HIF-2 β et HIF-3 β (Webb *et al.* 2009). La protéine HIF-1 β est exprimée de façon ubiquitaire (Carver *et al.* 1994). Tandis que HIF-2 β , qui partage 63% d'identité de séquence en acides aminés avec HIF-1 β (Hirose *et al.* 1996), est fortement exprimée dans le système nerveux central et les reins (Drutel *et al.* 1996). HIF-3 β , pour sa part, se trouve principalement au niveau du cerveau et du muscle (Shimba *et al.* 2005).

Contrairement à la sous-unité HIF- α , qui est spécifique à la réponse au stress hypoxique, la protéine HIF- β joue également le rôle d'un partenaire obligatoire du récepteur aryl hydrocarbure (*aryl hydrocarbon receptor*, AHR), impliqué dans le phénomène de détoxification cellulaire (Hoffman *et al.* 1991; McIntosh *et al.* 2010). Pour cette raison, La sous-unité HIF- β est aussi connue sous le nom d'ARNT (*Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*).

1.1.2 Régulation de la sous-unité HIF- α

La présente section porte sur les principaux mécanismes contrôlant HIF, permettant de mettre en évidence la complexité de régulation de l'activité de ces facteurs et de souligner l'importance de ces mécanismes dans la réponse hypoxique.

1.1.2.1 Mécanismes de dégradation dépendants de l'oxygène

Cette section est d'un grand intérêt dans le cadre des travaux présentés au chapitre 4 de cette thèse. Ainsi, une attention particulière sera accordée aux facteurs impliqués dans la déstabilisation de HIF- α ainsi qu'aux cofacteurs nécessaires à leur activité.

La formation d'un complexe transcriptionnel actif HIF repose essentiellement sur la disponibilité de sa sous-unité α , qui est hautement influencée par le niveau intracellulaire d'O₂. En condition oxygénée, la protéine HIF- α , bien qu'exprimée de manière constitutive, est très instable et sa demi-vie protéique ne dépasse pas cinq minutes. Cette instabilité est sous le contrôle des véritables senseurs d'O₂, les enzymes PHD (*Prolyl-hydroxylase domain*). Ces enzymes, dont l'activité repose strictement sur l'O₂, agissent par l'hydroxylation de HIF- α sur les deux prolines qui se trouvent dans l'ODDD (Epstein *et al.* 2001; Ivan *et al.* 2001; Jaakkola *et al.* 2001; Kaelin & Ratcliffe 2008). L'hydroxylation de HIF- α permet son interaction et sa polyubiquitination par le suppresseur de tumeur von Hippel-Lindau (pVHL), composante de reconnaissance d'un complexe E3 ubiquitine ligase, ce qui mène à sa dégradation par le protéasome (Kaelin & Ratcliffe 2008) (Figure 1.3). Plusieurs autres protéines régulatrices, telles RUNX3, OS-9, SSAT2, MCM7, LIMD1 et RHOBTB3 sont également impliquées dans le phénomène de dégradation dépendante de l'O₂ de HIF- α . En s'associant à la sous-unité HIF- α et PHD2, OS-9 (*osteosarcome protein 9*) et RUNX3 (*Runt Related Transcription Factor 3*) facilitent et augmentent l'efficacité d'hydroxylation des résidus prolines (Baek *et al.* 2005; Lee *et al.* 2014b). Les protéines SSAT2 (*spermidine/spermine N-acetyltransferase 2*) et MCM7 (*minichromosome maintenance protein 7*), quant à elles, jouent un rôle dans la stabilisation de l'interaction entre HIF- α , pVHL et élongine C, facilitant ainsi son ubiquitination (Baek *et al.* 2007; Hubbi *et al.* 2011). Pour leur part, LIMD1 (*LIM domain-containing protein 1*) et RHOBTB3 (*Rho-related BTB domain-containing protein 3*) interviennent pour promouvoir l'hydroxylation et l'ubiquitination par la formation d'un complexe avec HIF- α , PHD2 et pVHL (Zhang *et al.* 2015).

De façon générale, l'hydroxylation par les enzymes PHD ainsi que l'ubiquitination par pVHL sont deux étapes clés dans la voie de dégradation de la protéine HIF- α par l'O₂ (Figure 1.3).

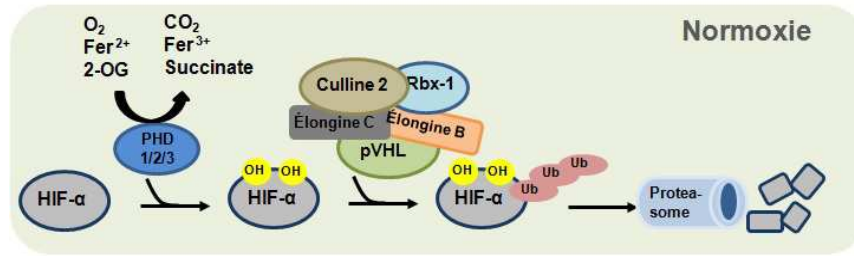


Figure 1.3: Mécanismes de dégradation des sous-unités HIF- α en présence d'oxygène. En condition normale d'oxygène, la sous-unité HIF- α subit une hydroxylation menant à sa polyubiquitination et à sa dégradation par le protéasome. *Illustration par M. Jalouli.*

1.1.2.1.1 Les protéines à domaines prolyl-hydroxylase, les PHD

Les PHD, qui font partie de la famille des prolyl-4-hydroxylases, sont des dioxygénases dépendantes de l'O₂, du fer ferreux (Fe²⁺), du 2-oxoglutarate (2-OG) et de l'ascorbate. Une diminution dans la concentration intracellulaire de l'un de ces cofacteurs essentiels a pour effet l'inhibition de leurs activités enzymatiques. Chez les mammifères, on retrouve quatre HIF prolyl-hydroxylases, soit PHD1, PHD2, PHD3, et P4H-TM, qui sont caractérisées par des différences au niveau de leurs profils d'expression tissulaire, leurs localisations intracellulaires ainsi que leurs fonctions envers chacune des sous-unités HIF- α (Bruick & McKnight 2001; Epstein *et al.* 2001; Berra *et al.* 2003; Appelhoff *et al.* 2004; Chan *et al.* 2005; Koivunen *et al.* 2007).

1.1.2.1.1.1 PHD1

PHD1 est une protéine nucléaire qui est particulièrement abondante dans les cellules des testicules (Wax *et al.* 1996; Willam *et al.* 2006). Contrairement aux protéines PHD2 et PHD3, l'expression de PHD1 n'est pas régulée par l'hypoxie. Cependant, sa stabilité est négativement affectée par sa liaison à la protéine ubiquitine ligase Siah (*Seven in Absentia Homolog*) (Nakayama *et al.* 2004). La protéine PHD1 est connue par son rôle dans la régulation de HIF-2 α . En effet, en conditions oxygénées, la délétion de cette enzyme par interférence à l'ARN entraîne l'accumulation de HIF-2 α , alors que la stabilité de HIF-1 α a été faiblement affectée (Appelhoff *et al.* 2004). D'une manière

intéressante, des études élégantes ont démontré que l'invalidation génique de PHD1 chez les souris provoque une reprogrammation du métabolisme de glucose et engendre une meilleure protection des tissus contre le stress ischémique (Aragones *et al.* 2008; Schneider *et al.* 2010).

1.1.2.1.1.2 PHD2

La protéine PHD2, exprimée de manière ubiquitaire, est une enzyme purement cytoplasmique (Wax *et al.* 1996; Metzen *et al.* 2003; Willam *et al.* 2006). En tant que gène cible des facteurs de transcription HIF, l'expression de PHD2 est augmentée par la diminution du niveau intracellulaire d'O₂. Ceci suggère l'existence d'une boucle de rétrocontrôle négative nécessaire pour une dégradation rapide des protéines HIF lors d'une réoxygénation. Par ailleurs, sa dégradation protéolytique est assurée par des ubiquitines ligases de la famille Siah, ainsi que par son interaction avec la peptidyl prolyl cis/trans isomérase FKBP38 (*FK506-binding protein 38*) (Habelhah *et al.* 2004; Nakayama *et al.* 2004; Barth *et al.* 2007). En possédant un fort potentiel à hydroxyler et déstabiliser HIF-1 α , PHD2 est l'enzyme la plus prédominante et spécifique des quatre prolyl-hydroxylases. Cette enzyme est caractérisée par son rôle important dans le développement embryonnaire et l'érythropoïèse. En effet, l'invalidation génique de PHD2 chez les souris entraîne une stimulation du processus érythropoïétique et est à l'origine d'une mort foetale à mi-gestation à cause de défauts placentaires et cardiaques (Takeda *et al.* 2006; Minamishima *et al.* 2008). De plus, plusieurs études ont démontré que les patients porteurs des mutations au niveau du gène *PHD2* souffrent d'érythrocytose, qui est une augmentation anormale du nombre de globules rouges causée principalement par l'activation du gène cible des complexes HIF, l'EPO (McDonough *et al.* 2006; Percy *et al.* 2006; Percy *et al.* 2007).

1.1.2.1.1.3 PHD3

PHD3 est une protéine hautement exprimée dans les cellules cardiaques et musculaires lisses (Wax *et al.* 1996; Willam *et al.* 2006). Au niveau cellulaire, cette enzyme est répartie uniformément entre le noyau et le cytoplasme (Metzen *et al.* 2003;

Willam *et al.* 2006). Au même titre que PHD1 et PHD2, la stabilité de PHD3 est régulée par Siah (Habelhah *et al.* 2004; Nakayama *et al.* 2004). De plus, son expression est sous le contrôle des complexes HIF, tout comme celle de la protéine PHD2 (Epstein *et al.* 2001). Contrairement à PHD2, PHD3 possède une plus grande affinité pour HIF-2 α comparativement à HIF-1 α (Appelhoff *et al.* 2004). En effet, des études d'interférence à l'ARN ont démontré que l'inhibition de PHD3, en conditions oxygénées, a un effet plus important sur la stabilité de HIF-2 α que celle de HIF-1 α , tandis que l'effet de l'inhibition de PHD2 sur HIF-2 α est faible par rapport à HIF-1 α (Appelhoff *et al.* 2004). En conséquence, PHD3 possède des fonctions distinctes de celles de PHD2. L'invalidation génique de PHD3 chez les souris mène à un développement anormal du système sympathoadrénergique aboutissant à une hypotension systémique ainsi qu'à une insuffisance cardiaque plus tard dans la vie (Bishop *et al.* 2008).

1.1.2.1.1.4 P4H-TM

En plus des trois PHD, la protéine P4H-TM (*transmembrane Prolyl 4-Hydroxylase*) est une autre proline hydroxylase capable d'hydroxyler HIF-1 α (Koivunen *et al.* 2007). Cette enzyme se trouve au niveau du réticulum endoplasmique et est exprimée dans plusieurs tissus, y compris le rein, le cœur, le pancréas, le placenta et le cerveau (Koivunen *et al.* 2007). Des études récentes démontrent l'importance de cette quatrième HIF prolyl-hydroxylases dans le phénomène d'érythropoïèse (Laitala *et al.* 2012). Comme PHD2 et PHD3, l'expression de P4H-TM est régulée par l'hypoxie (Koivunen *et al.* 2007). Néanmoins, l'implication des complexes HIF dans l'expression de P4H-TM demeure inconnue.

Les différences au niveau de leur localisation cellulaire, de leur distribution tissulaire, de leur régulation par l'hypoxie, et de leur rôle fonctionnel supportent le fait que les PHD interviennent de manière non-redondante pour réguler les sous-unités HIF- α . Ceci souligne le rôle important et unique de chaque PHD dans le contrôle des processus biologiques. Vu l'importance des HIF dans le maintien de l'hémostasie cellulaire en hypoxie, l'inhibition ou l'activation des PHD est considérée comme une

stratégie thérapeutique intéressante pour différentes maladies, dont le cancer et l'ischémie.

1.1.2.1.2 Réactions d'hydroxylation et cofacteurs essentiels des PHD

Tel que mentionné auparavant, l'activité des enzymes PHD est hautement régulée par la disponibilité d'O₂ et du 2-OG ainsi que leurs cofacteurs essentiels, le Fe²⁺ et l'ascorbate. En tant que dioxygénases, les enzymes HIF prolyl hydroxylases utilisent un premier atome d'O₂ dans la décarboxylation oxydative de 2-oxoglutarate produisant ainsi du succinate et CO₂. Le deuxième atome d'O₂, quant à lui, est incorporé directement dans la protéine HIF-1 α , pour l'hydroxyler, après avoir se fixé sur Fe²⁺ et formé par conséquent un intermédiaire Fe(IV)-oxo (Fe(IV)=O) hautement réactif (Schofield & Ratcliffe 2004). *L'importance et la contribution de ces cofacteurs dans la réaction l'hydroxylation seront décrites plus en détail dans les sections qui suivent.*

1.1.2.1.2.1 Oxygène

L'O₂ est clairement défini comme un facteur limitant pour l'hydroxylation et l'instabilité des sous-unités HIF- α . En effet, une diminution graduelle de la concentration d'O₂ au-dessous de 20-10% mène à l'inactivation progressive des PHD, alors qu'elle favorise l'accumulation accentuée des sous-unités α (Jiang *et al.* 1996; Epstein *et al.* 2001). Ceci suggère que les PHD agissent comme intermédiaires entre le niveau intracellulaire d'O₂ et l'activité transcriptionnelle des complexes HIF, d'où leurs noms des protéines senseurs d'O₂. La dépendance des PHD pour l'O₂ est supportée par la détermination de leur constante d'affinité (K_m) pour l'O₂ qui varie entre 230 à 250 μ M, ce qui est plus élevée que celle présente dans les cellules en conditions normoxiques (Hirsila *et al.* 2003).

1.1.2.1.2.2 2-oxoglutarate (2-OG)

Tout comme l'O₂, le 2-OG, un intermédiaire du cycle de Krebs, est utilisé comme substrat essentiel pour hydroxyler les sous-unités α . D'ailleurs, l'activité des enzymes

PHD est hautement régulée par sa disponibilité. En revanche, la présence d'autres intermédiaires du cycle de Krebs, tels que le citrate, l'isocitrate, le succinate, le fumarate, le malate, l'oxaloacetate et le pyruvate, influence négativement l'activité des PHD (Dalgard *et al.* 2004; Isaacs *et al.* 2005; Selak *et al.* 2005; Hewitson *et al.* 2007). Ceci démontre que la réponse hypoxique médiée par les HIF est modulée par l'abondance relative de ces métabolites. Effectivement, des mutations dans le gène de la fumarate hydratase (FH) ou dans les gènes d'une des sous-unités de la succinate déshydrogénase (SDH) prédisposent à des tumeurs caractérisées par une surexpression des protéines HIF- α (MacKenzie *et al.* 2007). L'inhibition des PHD suite à l'accumulation et la liaison compétitive du succinate et du fumarate au site de liaison du 2-OG est à l'origine de la forte expression des HIF- α , qui peut être corrigée par l'ajout du 2-OG exogène. Dans ce même contexte, l'inhibition compétitive des PHD par des analogues du 2-OG, comme le diméthylxalylglycine (DMOG), sont utiles pour la stabilisation des sous-unités HIF- α et la formation des complexes transcriptionnels HIF (Jaakkola *et al.* 2001).

1.1.2.1.2.3 Fer et ascorbate

Le fer ferreux (Fe^{2+}) et l'ascorbate (vitamine C) sont deux cofacteurs indispensables pour l'activité hydroxylase des PHD. Au cours de la réaction d'hydroxylation, le Fe^{2+} est transformé en Fe(IV)=O . Cet intermédiaire très réactif assure une oxydation rapide du groupement CH de la proline. En conséquence, il est lui-même oxydé en fer ferrique (Fe^{3+}) (Schofield & Ratcliffe 2004). L'ascorbate, pour sa part, intervient à ce niveau pour réactiver le fer en réduisant le Fe^{3+} lié au site actif des enzymes PHD en Fe^{2+} (de Jong *et al.* 1982; Majamaa *et al.* 1986). L'importance de l'ascorbate dans l'activation des PHD est soulignée par le fait que sa carence a pour conséquence une accumulation de Fe^{3+} , une inhibition des PHD et une forte activité HIF-dépendante (Salnikow *et al.* 2004; Vissers *et al.* 2007; Page *et al.* 2008). Les chélateurs de fer, tel que la déféroxamine, sont également des bons inducteurs non-hypoxiques des HIF- α . Finalement, en se liant au site de liaison du fer et en assurant la déplétion du niveau intracellulaire de l'ascorbate, certains métaux, comme le cobalt et le nickel, peuvent également inhiber les PHD et favoriser l'accumulation des sous unité HIF- α (Maxwell & Salnikow 2004; Salnikow *et al.* 2004).

1.1.2.1.3 La protéine VHL (Von Hippel Lindau)

En conditions oxygénées, la reconnaissance des protéines HIF- α par le suppresseur de tumeur pVHL constitue une étape clé dans leur voie de dégradation. pVHL, avec les élongines B et C, Rbx-1 et la culline-2, forme un complexe possédant une activité E3 ubiquitine ligase (Cockman *et al.* 2000; Ivan *et al.* 2001; Jaakkola *et al.* 2001). En se liant via son domaine β à la sous-unité HIF- α hydroxylée, pVHL permet la polyubiquitination des résidus lysines. Quant aux élongines B et C, ils sont des éléments essentiels pour l'ancrage de pVHL au complexe. Finalement, Rbx-1 et culline-2 sont responsables de la polyubiquitination des HIF- α (Kamura *et al.* 2000). Une fois polyubiquitinée, HIF- α est dirigée vers le protéasome pour y être dégradée.

pVHL est présente sous deux isoformes ayant une localisation cellulaire différente mais des fonctions similaires. La première, de 30 kDa (VHL30), se localise au niveau du cytoplasme, tandis que la deuxième, de 19 kDa (VHL19), se trouve tant au noyau qu'au cytoplasme (Iliopoulos *et al.* 1998). Ceci est en accord avec le fait que la dégradation de HIF- α se déroule aussi bien dans le noyau que dans le cytoplasme (Berra *et al.* 2001b).

Une anomalie au niveau du gène *VHL* entraîne l'accumulation des sous-unités HIF- α , la formation des complexes HIF et, par conséquent, la surexpression constitutive des gènes cibles tels que ceux qui codent pour le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) et le régulateur de l'érythropoïèse EPO. Effectivement, une invalidation génique de *VHL* chez les souris cause une létalité embryonnaire entre les stades E10.5 et E12.5 à la suite d'un défaut de vasculogénèse et une hémorragie placentaire, un phénotype déjà observé chez les souris *PHD*^{-/-} (section 1.1.2.1.1.2). Chez l'humain, une mutation inactivatrice du gène *VHL* prédispose à différentes pathologies dont la maladie de von Hippel-Lindau caractérisée par une disposition accrue à développer des tumeurs vascularisées (Kaelin 2007, 2008). La polycythémie de Chuvash, une autre maladie associée à la mutation de *VHL*, est caractérisée par une élévation plasmatique de l'EPO et de VEGF et une prédisposition à l'hypertension, aux thromboses, et aux accidents vasculaires (Hickey *et al.* 2007).

1.1.2.2 Mécanismes de dégradation indépendants de l'oxygène

Au cours des dernières années, l'étude des facteurs HIF a permis d'identifier plusieurs partenaires impliqués dans la régulation de la stabilité des sous-unités α d'une manière indépendante de leur hydroxylation et de leur liaison à pVHL. Entre autres, en interagissant avec l'élongine C, la protéine RACK1 (*receptor for activated C-kinase 1*) a été démontrée pour lier et induire l'ubiquitination et la dégradation protéasomale des sous-unités HIF-1 α indépendamment de la voie classique O₂/PHD/pVHL (Liu *et al.* 2007). Fait intéressant, cette voie de dégradation est sous le contrôle négatif de la protéine chaperon HSP90 (*heat shock protein 90*) qui entre en compétition avec RACK1 pour se fixer sur le domaine PAS de HIF-1 α , assurant ainsi sa stabilisation. D'ailleurs, sur le plan expérimental, une dégradation protéasomale de HIF-1 α , indépendante de pVHL, a été observée à la suite de l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de HSP90, le 17-allylaminogeldanamycin (17-AAG) (Figure 1.4).

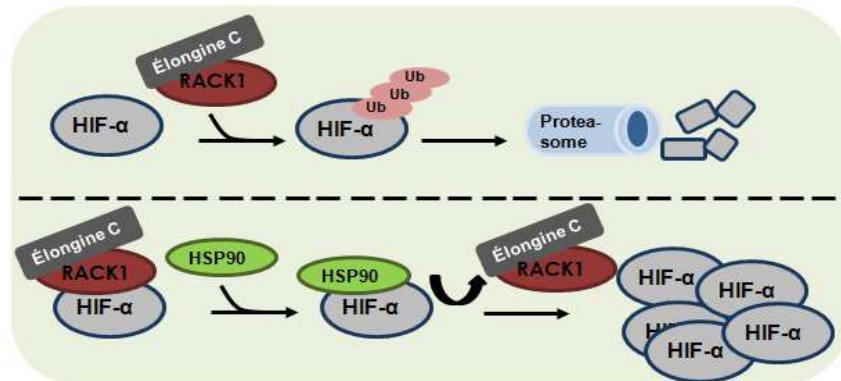


Figure 1.4: Mécanismes de régulation de la sous-unité HIF-1 α par RACK1 et HSP90. L'interaction de HIF- α avec RACK1 entraîne son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome. Cette interaction est inhibée par la liaison de HSP90 à la protéine HIF- α , menant ainsi sa stabilisation. *Illustration par M. Jalouli.*

La phosphorylation de la sous-unité HIF-1 α par la glycogène synthase kinase 3 (GSK3) est un autre mécanisme de régulation de sa stabilité indépendant de son statut d'hydroxylation (Schnitzer *et al.* 2005; Flugel *et al.* 2007; Cassavaugh *et al.* 2011; Flugel *et al.* 2012). En effet, HIF-1 α a été démontrée pour être phosphorylée par GSK3 sur le domaine ODDD et N-TAD (Sodhi *et al.* 2001; Flugel *et al.* 2007; Cassavaugh *et al.*

2011). La phosphorylation de HIF-1 α entraîne sa dégradation protéosomale suite à sa reconnaissance par le suppresseur de tumeur Fbw7, qui constitue, à la manière de pVHL, la protéine de reconnaissance d'un complexe E3 ligase comprenant les protéines SKP1 (*S-phase kinase associated protein1*), CUL1 (*Cullin 1*) et Rbx-1 (*RING box1*) (Cassavaugh *et al.* 2011; Flugel *et al.* 2012). La dégradation de HIF-1 α par l'axe GSK3/Fbw7 représente un mode supplémentaire pour la régulation de l'activité des complexes HIF qui est indépendante de la tension en O₂. Cette régulation serait plutôt dépendante de l'activation de la voie de la protéine kinase B(PKB)/Akt, une voie qui est activée par plusieurs stimuli dont les facteurs de croissance, les cytokines et les hormones. En effet, la phosphorylation de GSK3 par PKB/Akt a été montrée pour inhiber son activité (Cross *et al.* 1995). Ce mécanisme pourrait être impliqué dans la stabilisation de HIF-1 α en réponse aux signaux de prolifération et de croissance cellulaire (Figure 1.5).

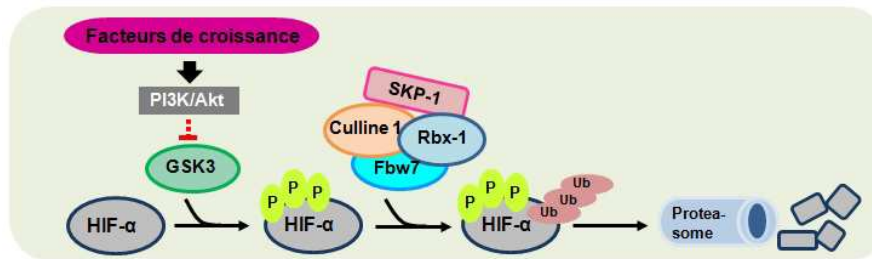


Figure 1.5: Mécanismes de dégradation de la sous-unité HIF-1 α par GSK3. La phosphorylation de HIF-1 α par GSK3 entraîne sa dégradation protéosomale. Cette phosphorylation est inhibée via l'activation de la voie de signalisation PKB/Akt par plusieurs stimuli dont les facteurs de croissance. *Illustration par M. Jalouli.*

Récemment, une nouvelle voie de dégradation de HIF-1 α par un mécanisme nommé l'autophagie médiée par les chaperons (*Chaperone Mediated Autophagy, CMA*) a été identifiée (Hubbi *et al.* 2013). En effet, les protéines HSC70 et LAMP2A, qui sont deux composants essentiels de la machinerie CMA, ont été démontrées comme pouvant interagir avec HIF-1 α , permettant ainsi sa dégradation lysosomale. De plus, l'ubiquitine ligase STUB1 a également été démontrée comme étant impliquée dans la dégradation des sous-unités α des complexes HIF par les lysosomes (Ferreira *et al.* 2013). Bien qu'il

existe très peu d'information concernant le mode de régulation de cette voie de dégradation et les facteurs impliqués, l'utilisation des inhibiteurs ou des activateurs de la dégradation lysosomale a permis de souligner son importance dans la régulation de l'activité du complexe HIF-1 (Figure 1.6).

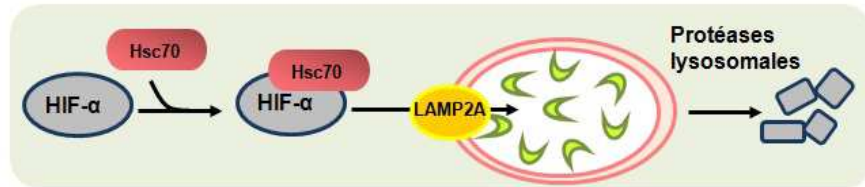


Figure 1.6: Mécanismes de dégradation de la sous-unité HIF-1 α par l'autophagie médiée par les chaperons. La liaison de HIF-1 α avec les protéines Hsc70 et LAMP2A permet son ciblage vers la dégradation lysosomale. *Illustration par M. Jalouli.*

Finalement, plusieurs autres partenaires, tels que le facteur associé à l'hypoxie (*hypoxia-associated factor*, HAF), la co-chaperonne CHIP (*c-terminus of Hsc70 interacting protein*)/ la chaperonne HSP70 (*heat-shock protein 70*), la désacétylase NAD-dépendante SIRT7 (*sirtuin-7*) et le facteur de transcription BHLHE41 (*Basic Helix-Loop-Helix Family Member E41*; également connu sous le nom SHARP1), ont été également décrits comme impliqués dans la dégradation protéasomale des sous-unités HIF-1 α d'une façon indépendante de l'O₂ et de pVHL (Koh *et al.* 2008; Luo *et al.* 2010; Montagner *et al.* 2012; Hubbi *et al.* 2013). Malgré la présence de ces voies alternatives de dégradation, l'axe PHD/pVHL demeure le principal dans la régulation de l'activité des complexes HIF.

1.1.2.3 Régulation de l'activité transcriptionnelle des HIF par l'oxygène

Le contrôle de l'activité des complexes HIF par le facteur inhibant HIF-1 (*Factor Inhibiting HIF-1*, FIH), également connu sous le nom asparginyle hydroxylase, représente un autre mécanisme majeur de la régulation des sous-unités HIF- α dépendante de l'O₂. Tout comme les HIF prolyl-hydroxylases, FIH est une dioxygénase dépendante de l'O₂, du Fe²⁺ et du 2-OG (Dann *et al.* 2002; McNeill *et al.* 2002; Lee *et al.* 2003). En

conditions normales d'O₂, cette enzyme hydroxyle les sous-unités HIF- α sur un résidu asparagine présent au niveau du domaine C-TAD, ce qui prévient leur interaction avec ses co-activateurs transcriptionnels CBP et p300, conduisant ainsi à la répression de l'expression génique dépendante des HIF (Mahon *et al.* 2001). Ainsi, l'hydroxylation de HIF- α par FIH contrôle négativement sa capacité transcriptionnelle associée au domaine C-TAD.

Bien que l'expression de la plupart des gènes cibles des complexes HIF soit sous le contrôle négatif de FIH (gènes N-TAD/C-TAD sensibles), il est intéressant de mentionner qu'il existe un groupe de gènes dont l'expression est indépendante de l'activité de cette enzyme (gènes N-TAD sensibles/ C-TAD insensibles) (Dayan *et al.* 2006). Ceci suggère la présence d'un mécanisme de régulation sélective et différentielle des réponses adaptatives médiées par HIF. Cette régulation résulte probablement de la différence de sensibilité des gènes cibles au gradient d'O₂ puisque FIH a une plus grande affinité pour l'O₂ (K_m = 90 μ M) que les enzymes PHD, et donc l'inhibition de l'activité de ces dernières, en hypoxie, s'effectue bien avant celle de FIH (Koivunen *et al.* 2004; Stolze *et al.* 2004) (Figure 1.7).

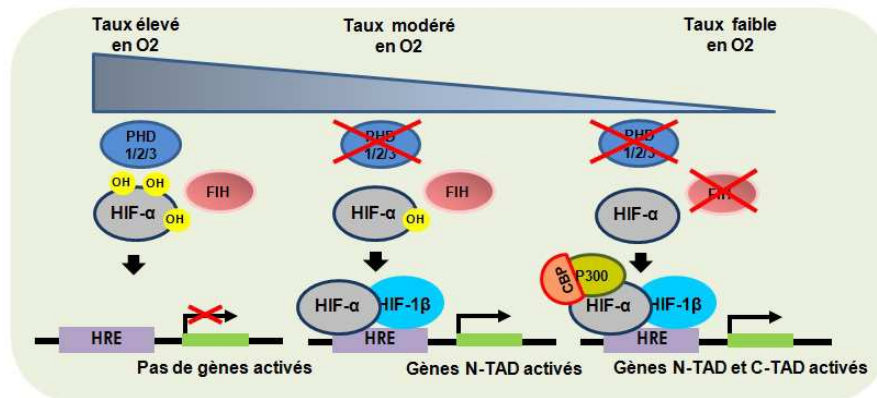


Figure 1.7: Régulation des sous-unités HIF- α et des gènes cibles par les PHD et FIH en fonction du taux de l'O₂. Un taux d'O₂ élevé entraîne la dégradation et l'inactivation des sous-unités HIF- α . Un taux d'O₂ modéré mène à la stabilisation des sous-unités HIF- α et à l'activation des gènes cibles dont l'expression est indépendante de l'activité des enzymes FIH (gènes N-TAD sensibles/ C-TAD insensibles). Un taux d'O₂ faible provoque l'inhibition de l'hydroxylation des sous-unités HIF- α au niveau du domaine C-TAD par FIH et à l'induction des gènes N-TAD/C-TAD sensibles. *Illustration par M. Jalouli.*

Au même titre que PHD2, FIH possède une affinité plus grande pour la sous-unité HIF-1 α (Koivunen *et al.* 2004), ce qui offre un autre niveau de spécificité transcriptionnelle des gènes dépendants de l'hypoxie. D'ailleurs, une inhibition de l'activité enzymatique de FIH n'est pas suffisante pour induire tous les gènes cibles des HIF.

1.1.2.4 Modifications post-traductionnelles de la sous-unité HIF- α : la phosphorylation

En plus de l'hydroxylation et de l'ubiquitination, plusieurs autres modifications post-traductionnelles des protéines HIF- α sont également nécessaires pour permettre la régulation de l'activité transcriptionnelle des complexes HIF dans une multitude de microenvironnements hypoxiques ou non. Parmi ces modifications post-traductionnelles, on note la phosphorylation, la méthylation, la sumoylation, l'acétylation et la S-nitrosylation. *Pour les besoins de cette thèse, je me contenterai uniquement sur la phosphorylation de la sous-unité HIF-1 α .*

La phosphorylation de la sous-unité HIF-1 α est la modification post-traductionnelle la plus étudiée. De nombreuses études ont démontré que HIF-1 α est une protéine hautement phosphorylée et que cette phosphorylation joue un rôle clé dans la régulation de l'activité du complexe HIF-1 ainsi que l'expression de leurs gènes cibles (Lisy & Peet 2008; Dimova *et al.* 2009; Kietzmann *et al.* 2016). L'utilisation des phosphatases, des inhibiteurs de phosphatases et des inhibiteurs de protéines kinases a permis de démontrer l'importance de cette modification post-traductionnelle dans la liaison HIF-1/ADN, la stabilisation et l'activation des HIF-1 α (Wang & Semenza 1993; Wang *et al.* 1995b). Une variété des protéines kinases ont été identifiées comme étant responsables de la phosphorylation de HIF-1 α (Tableau 1.1).

1.1.2.4.1 Les p42/p44 MAPK

Compte tenu de l'importance des kinases p42/p44 MAPK dans les travaux présentés au Chapitre 2 de cette thèse, cette section s'intéresse à décrire leur implication

dans la phosphorylation de HIF-1 α ainsi que l'impact de cette phosphorylation sur l'activité du facteur HIF-1.

Tout d'abord, les p42/p44 MAPK sont des sérines/thréonines kinases qui jouent un rôle majeur aussi bien dans la prolifération que dans la différenciation, la survie, l'invasion et la migration cellulaire (Raman *et al.* 2007). Ces protéines kinases sont généralement activées suite à la stimulation des récepteurs membranaires, tels que les récepteurs à activité tyrosine kinase (*tyrosine kinase receptor*, RTK) et les récepteurs couplés aux protéines G (*G protein-coupled receptors*, GPCR), par une panoplie de facteurs de croissance et de cytokines, y compris l'EGF (*epidermal growth factor*), l'IGF (*insulin-like growth factor*), la FGF (*fibroblast growth factor*) et la PDGF (*platelet-derived growth factor*) (Wood *et al.* 1992; Campbell *et al.* 1998).

De manière intéressante, il a été démontré que les protéines kinases p42/p44 MAPK peuvent directement phosphoryler la sous-unité HIF-1 α tout en permettant la régulation de l'activité transcriptionnelle du facteur HIF-1 (Richard *et al.* 1999). Des études subséquentes ont démontré que cette phosphorylation se produit sur deux résidus sérine de la protéine HIF-1 α , soient Ser641 et Ser643 (Mylonis *et al.* 2006). En effet, il a été démontré que la mutation de ces deux résidus entraîne une importante diminution de la phosphorylation de HIF-1 α par p42/p44 MAPK, accompagnée par une baisse de l'activité du facteur HIF-1 (Mylonis *et al.* 2006). Toutefois, le mécanisme impliqué dans l'activation du complexe HIF-1 par cette phosphorylation est controversé. En effet, la phosphorylation de HIF-1 α par p42/p44 MAPK a été montrée pour augmenter son interaction avec HIF-1 β (Suzuki *et al.* 2001). Une deuxième étude a toutefois suggéré que la phosphorylation de HIF-1 α joue un rôle clé dans l'inhibition de l'export nucléaire de HIF-1 α en masquant le signal d'export dépendant de CRM1, ce qui favorise son accumulation dans le noyau, permettant ainsi une augmentation de l'activité transcriptionnelle du facteur HIF-1 (Mylonis *et al.* 2008). Par contre, d'autres travaux effectués auparavant ont démontré que la phosphorylation de HIF-1 α par p42/p44 MAPK n'affecte pas son association avec HIF-1 β , ni sa localisation cellulaire, sa stabilité ou sa liaison à l'ADN (Richard *et al.* 1999; Hur *et al.* 2001). La poursuite de la caractérisation du mécanisme par lequel la phosphorylation de HIF-1 α par p42/p44 MAPK régule

l'activité du complexe HIF-1 est donc essentielle pour mieux comprendre les voies de signalisation reliée à l'induction de HIF-1 ainsi que pour l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques. *Ce point sera étudié au chapitre 2.*

1.1.2.4.2 Autres protéines kinases

En plus des p42/p44 MAPK, d'autres protéines kinases, telles que la CDK1 (*cyclin-dependent kinase 1*), l'ATM (*ataxia-telangiectasia mutated*) et la CK2 (*casein kinase II*), ont été également proposées pour phosphoryler et augmenter l'activité transcriptionnelle de HIF-1 α . En effet, CDK1 a été montrée pour jouer un rôle au niveau de la stabilisation de la protéine HIF-1 α en phosphorylant le résidu serine 668 (Ser668) (Warfel *et al.* 2013). La surexpression de CDK1 ou son inhibition a démontré que cette kinase est impliquée dans la régulation de la dégradation de HIF-1 α d'une manière dépendante de pVHL. Au même titre que CDK1, ATM contribue également à la stabilisation de HIF-1 α par la phosphorylation du résidu serine 696 (Ser696) (Cam *et al.* 2010). La kinase CK2, quant à elle, favorise la phosphorylation du résidu thréonine 796 (Thr796) présent dans le domaine C-TAD de la protéine HIF-1 α (Mottet *et al.* 2005). Une telle phosphorylation prévient la liaison de FIH à HIF-1 α inhibant ainsi son hydroxylation, ce qui augmente son interaction avec ses co-activateurs transcriptionnels CBP/p300 (Gradin *et al.* 2002; Lancaster *et al.* 2004). Par contre, une autre étude a démontré que la phosphorylation de HIF-1 α par la CK2 n'influence pas sa liaison aux co-activateurs CBP/p300 (Cho *et al.* 2007), ce qui complexifie la compréhension du rôle précis de cette kinase dans la régulation de l'activité transcriptionnelle du facteur HIF-1.

Tableau 1.1: Principales kinases responsables de la phosphorylation HIF-1 α et leur effet.

Kinases	Résidus	Effet sur HIF-1 α	Références
p42/p44 MAPK	Ser641 et Ser643	Augmentation de son activité	Mylonis et al., 2006 Richard et al., 1999 Hur et al., 2001
CDK1	Ser668	Augmentation de sa stabilité	Warfel et al., 2013
ATM	Ser696	Augmentation de sa stabilité	Cam et al., 2010
CK2	Thr796	Augmentation de son activité	Mottet et al., 2005

En résumé, la phosphorylation est une modification post-transcriptionnelle majeure qui joue un rôle clé dans le contrôle de l'activité transcriptionnelle du complexe HIF-1 en régulant la stabilité de HIF-1 α , sa localisation nucléaire ainsi que son interaction avec HIF-1 β et/ou ses co-activateurs. Toutefois, les mécanismes impliqués dans la régulation spatiotemporelle de la plupart des protéines kinases responsables de la phosphorylation de HIF-1 α ne sont pas encore bien définis. De même, le rôle précis de certaines protéines kinases dans la régulation de HIF-1 α demeure jusqu'à ce jour incertain et nécessite plus de clarifications.

1.1.3 Induction de la sous-unité HIF- α en conditions hypoxiques

La régulation du taux de traduction de l'ARNm de HIF- α en hypoxie représente aussi une étape essentielle pour assurer l'activation des HIF. Malgré une baisse générale de la synthèse protéique suite à l'inhibition de la voie d'initiation de traduction dépendante de la coiffe des ARNm (*cap-dependent translation*) résultant du stress hypoxique, l'ARNm de HIF- α est traduit d'une manière constitutive, et ce grâce à la présence d'un site interne d'entrée des ribosomes (*internal ribosome entry site; IRES*) dans sa région 5' non-traduite (*untranslated region; UTR*) (Lang *et al.* 2002; Schepens *et*

al. 2005). En effet, cette séquence permet le recrutement de la sous-unité ribosomique 40S au voisinage de site d'initiation de la traduction, indépendamment de la coiffe, ce qui favorise le phénomène de la traduction (Komar *et al.* 2012). En plus de la séquence IRES, la stabilisation de l'ARNm de HIF- α via la liaison de la protéine HuR (*human antigen R*) et la protéine PTB (*polypyrimidien tract-binding protein*) aux régions UTR permet également d'augmenter sa traduction en situation d'hypoxie (Galban *et al.* 2008). À ce jour, très peu d'informations concernant les voies d'initiation de la traduction non conventionnelles de l'ARNm des HIF- α sont disponibles.

Malgré la diversité des processus de régulation de la sous-unité α , sa stabilisation, qui est décrite brièvement dans les sections précédentes, représente le mécanisme principal de l'induction et de l'activation des facteurs HIF. En situation d'hypoxie, la diminution de la disponibilité de l'O₂ mène à l'inhibition de l'hydroxylation des résidus proline de la protéine HIF- α par les enzymes PHD, ce qui prévient la liaison de la protéine pVHL. En conséquence, la sous-unité HIF- α s'échappe de la dégradation protéosomale, s'accumule, migre vers le noyau et s'associe avec la sous-unité HIF-1 β afin de former un complexe fonctionnel capable d'activer la transcription des gènes cibles en se liant aux séquences HRE (5' (A/G)CGTG 3') (Figure 1.8). En s'associant au complexe HIF, de nombreux co-activateurs, y compris CBP/p300, SRC-1 (*steroid receptor coactivator 1*), TIF-2 (*transcriptional intermediate factor 2*), CDK8 (*cyclin-dependent kinase 8*) et Pontine, peuvent intervenir pour augmenter son activité transcriptionnelle et activer ainsi l'expression de ses gènes cibles de façon sélective (Carrero *et al.* 2000; Lee *et al.* 2011a; Galbraith *et al.* 2013). Jusqu'à présent, plus que huit cents gènes, impliqués dans plusieurs processus physiologiques et pathologiques, ont été identifiés comme étant directement activés par les facteurs HIF (Semenza 2012).

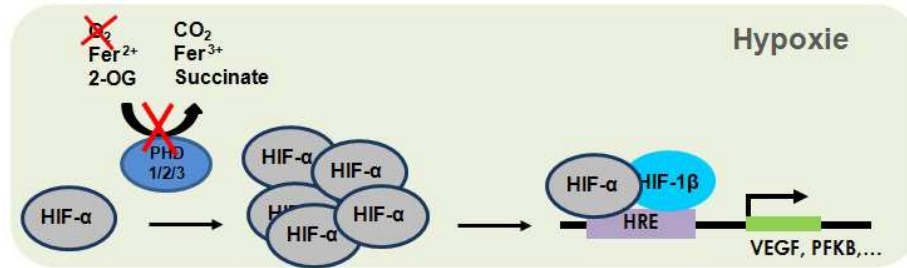


Figure 1.8: Mécanismes de stabilisation hypoxique des sous-unités HIF- α et d'activation des gènes cibles. En hypoxie, l'hydroxylation et la dégradation de HIF- α sont inhibées, ce qui se traduit par une stabilisation de HIF- α et une activation du complexe transcriptionnel HIF. *Illustration par M. Jalouli.*

Il est intéressant de mentionner que l'affinité des complexes HIF pour la séquence HRE varie selon sa composition en nucléotide. En effet, il a été démontré que HIF possèdent une préférence pour A sur G situé en première position du HRE et une préférence pour T placé en amont de cette séquence (Wenger *et al.* 2005; Mole *et al.* 2009; Xia & Kung 2009; Schodel *et al.* 2011). En outre, les complexes HIF se lient préférentiellement aux séquences HRE localisées dans des régions de chromatine permissives pour la transcription, qui sont caractérisés par une hypersensibilité à la DNase I, un enrichissement de la RNA polymérase II (RNAPII) et une activité transcriptionnelle basale en conditions normoxiques (Mole *et al.* 2009; Xia & Kung 2009; Schodel *et al.* 2011; Galbraith *et al.* 2013). Ce phénomène de liaison préférentielle des HIF peut donc expliquer la spécificité de la réponse à l'hypoxie d'un type cellulaire ou d'un stimulus. Cependant, il semble désormais clair que ce phénomène n'est pas le seul mécanisme responsable de cette spécificité. Divers autres mécanismes, dont l'interaction des facteurs HIF avec des co-activateurs spécifiques, peuvent donner lieu à une activation différentielle des gènes dépendants de HIF. Aujourd'hui, plus que jamais, la compréhension et la caractérisation de ces mécanismes sont nécessaires.

1.1.4 Induction de la sous-unité HIF- α en conditions non-hypoxiques : rôle de l'Ang II

Cette section a pour but de détailler les principaux mécanismes de l'induction de HIF- α par l'Ang II, en raison de leur importance dans le contexte des travaux présentés dans le chapitre 4 de cette thèse.

Bien que l'hypoxie soit l'inducteur majoritaire et ubiquitaire de la sous-unité HIF- α , plusieurs stimuli spécifiques à certains types cellulaires ont été identifiés comme étant capable d'induire la formation des complexes fonctionnels HIF en conditions normales d'O₂ (Dery *et al.* 2005). Parmi ces activateurs non-hypoxiques, on retrouve des facteurs de croissance, des hormones, des cytokines ainsi que des protéines bactériennes et virales (Feldser *et al.* 1999; Richard *et al.* 2000; Page *et al.* 2002; Blouin *et al.* 2004; Moon *et al.* 2004; Wakisaka *et al.* 2004; Dery *et al.* 2005; Lauzier *et al.* 2008). Une variété de mécanismes moléculaires, impliquant une augmentation de la transcription, de la traduction et/ou de la stabilité de HIF- α , sont à l'origine de l'activation non-hypoxique des HIF. *Pour les besoins de cette thèse, je me limiterai à décrire les mécanismes associés à l'induction de HIF- α par l'angiotensine II (Ang II).*

L'Ang II, principal médiateur du système rénine-angiotensine (SRA), est une hormone peptidique reconnue comme pouvant réguler une multitude de processus biologiques dont le maintien de la pression artérielle en exerçant un effet vasoconstricteur, la réabsorption rénale de sodium, la libération d'aldostérone par la corticosurrénale, et la croissance de plusieurs types cellulaires dont les cellules musculaires lisses vasculaires (*vascular smooth muscle cells*, VSMC) et les myocytes cardiaques (Schelling *et al.* 1991; Pratt & Dzau 1993; Brooks & Ruffolo 1994; Wang *et al.* 1994). De plus, l'Ang II joue un rôle important dans la pathogenèse de nombreuses maladies cardiovasculaires, y compris les maladies de remodelages vasculaires tels que l'athérosclérose et l'hypertension (Touyz 2003; Heeneman *et al.* 2007).

Les réponses induites par l'Ang II sont issues de l'activation des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés à des phospholipases par l'intermédiaire de protéines G (les GPCR), soit les récepteurs AT1 et AT2. Le récepteur AT1 se trouve majoritairement dans l'aorte, les artères pulmonaires et rénales, le cœur, les poumons, les

cortex rénal et surrénal, le cerveau et le foie. Il est responsable de la plupart des effets physiologiques et pathologiques de l'Ang II (Timmermans *et al.* 1993; Brooks & Ruffolo 1994). Ces effets sont médiés par l'activation de trois principaux événements de signalisation, soit la phospholipase C, la voie de la kinase du phosphatidylinositol-3 (PI3K) et la voie des MAPK. Toutefois le récepteur AT2, dont l'expression est restreinte à certains organes (la médullosurrénale, l'appareil reproducteur féminin et le cerveau), exerce des effets opposés à celui de récepteur AT1, tels que son effet anti-prolifératif ainsi que son effet vasodilatateur (Nakajima *et al.* 1995; Siragy & Carey 2001).

Outre ses effets classiques, l'Ang II peut agir comme un puissant inducteur des sous-unités HIF-1 α dans les VSMC, via l'activation du récepteur AT1 (Richard *et al.* 2000; Page *et al.* 2002; Lauzier *et al.* 2007; Page *et al.* 2008; Patten *et al.* 2010). Les mécanismes associés à l'induction de HIF-1 α par Ang II sont à la fois distincts et semblables aux mécanismes classiques de l'activation hypoxique et impliquent trois principaux processus, soit l'augmentation de la transcription, de la traduction et de la stabilité de la protéine HIF-1 α .

1.1.4.1 Augmentation de l'expression du gène *HIF-1A* par un mécanisme dépendant de l'activation de la PKC

Brièvement, l'activation du récepteur AT1 entraîne la génération de l'inositol triphosphate (IP3) et du diacylglycérol (DAG) par la phospholipase C. Une fois généré, l'IP3 entraîne la libération de calcium à partir du réticulum sarcoplasmique, ce qui participe au phénomène d'activation de la protéine kinase C (PKC) par le DAG. L'activation de la PKC contribue à l'activation de la transcription du gène *HIF-1A*, probablement via la phosphorylation et l'augmentation de l'activité du facteur de transcription Sp1 *qui sera décrit plus en détail dans la section 1.2* (Zheng *et al.* 2000; Han *et al.* 2001; Page *et al.* 2002).

1.1.4.2 Augmentation de la traduction de l'ARNm de HIF-1 α par l'activation de la voie de signalisation PI3K/p70S6K

Une fois activée, la cascade de signalisation PI3K/p70S6K permet d'induire la traduction des ARNm contenant une séquence pyrimidique particulière située en 5' (5'TOP) (Dufner & Thomas 1999), dont l'ARNm de HIF-1 α (Iyer *et al.* 1998b), via l'activation de la protéine S6 de la sous-unité ribosomique 40S et du facteur 4F d'initiation eucaryote de la traduction (eIF-4F). La sous-unité ribosomique 40S est un acteur principal de la traduction. Son activation, par la phosphorylation de la protéine S6 via la voie PI3K/p70S6K, permet donc d'augmenter la synthèse protéique de HIF-1 α . Le complexe eIF-4F (eIF-4E, eIF-4G et eIF-4A), quant à lui, joue un rôle primordial dans l'initiation de la traduction en se liant à la coiffe (m7G) présente dans la région 5'UTR d'ARNm et en recrutant la sous-unité ribosomique 40S (Raught *et al.* 2001). L'assemblage de ce complexe est inhibé par la liaison d'eIF-4E à la protéine 4E-BP (*eIF4E-binding protein 1*) présente sous forme hypophosphorylée. Cependant, l'hyperphosphorylation de cette dernière, par l'activation de la voie PI3K/p70S6K et particulièrement de la kinase mTOR, entraîne sa dissociation d'eIF-4E, la formation et l'activation du complexe eIF-4F, ce qui se traduit par une augmentation de la traduction d'ARNm de HIF-1 α . Il est important de mentionner que l'activation de la voie PI3K/p70S6K par l'Ang II est principalement médiée par la transactivation des RTK, l'IGF-1R (*insulin-like growth factor receptor*, IGF-1R) (Lauzier *et al.* 2007).

Outre la voie PI3K/p70S6K, la voie de signalisation p42/p44 MAPK est également impliquée dans l'activation du complexe HIF-1 par Ang II (Lauzier *et al.* 2007). Une fois activé par Ang II, la voie p42/p44 MAPK joue un rôle majeur dans l'augmentation de l'activité transcriptionnelle de HIF-1 chez les VSMCs, via la phosphorylation des sous-unités HIF-1 α (Lauzier *et al.* 2007). Toutefois, ce sentier de signalisation contribue de façon très modeste aux mécanismes impliqués dans l'induction protéique de HIF-1 α par Ang II (Lauzier *et al.* 2007). Suite à une activation par Ang II, la voie p42/p44 MAPK participe potentiellement aux processus de transcription du gène *HIF-1A* par la phosphorylation du facteur de transcription Sp1 et/ou de la traduction de son ARNm par l'activation du eIF-4E (Ueda *et al.* 2004). Tout comme la voie PI3K/p70S6K, l'activation

de la voie p42/p44 MAPK par l'Ang II est dépendante de la transactivation d'un RTK, soit le récepteur de facteur de croissance de l'épiderme (*epidermal growth factor receptor*, EGFR) (Lauzier *et al.* 2007).

1.1.4.3 Augmentation de la stabilité de HIF- α par un mécanisme dépendant de la génération des espèces réactives de l'O₂ (ROS)

En plus d'augmenter la transcription et la traduction de la protéine HIF-1 α , l'Ang II permet également l'altération de son hydroxylation, ce qui conduit à la diminution de son interaction avec pVHL, permettant ainsi l'augmentation de sa stabilité (Page *et al.* 2002; Page *et al.* 2008). Cette stabilisation est attribuable à la génération des espèces réactives de l'O₂ mitochondriales (mtROS), qui entraîne une diminution des niveaux d'ascorbate intracellulaire (Page *et al.* 2008; Patten *et al.* 2010). En effet, la supplémentation des VSMC traitées par l'Ang II avec l'ascorbate ou SkQ1, un antioxydant mitochondrial, a démontré une forte diminution du niveau protéique de HIF-1 α (Page *et al.* 2008; Patten *et al.* 2010). Vu l'importance de l'ascorbate dans l'activation des enzymes PHD via la réduction du Fe³⁺ en Fe²⁺, la diminution des niveaux de ce cofacteur mène à l'inactivation des enzymes PHD, un important évènement de stabilisation de HIF- α . Une hypothèse intéressante basée sur de nombreux résultats expérimentaux suggère que la diminution du niveau d'ascorbate résulte de la forte consommation de ce dernier afin de réduire le Fe³⁺ accumulé via la réaction de Fenton. Au cours de cette réaction, le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) oxyde le Fe²⁺ en Fe³⁺ selon la réaction d'oxydo-réduction suivante : $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{OH}^- + \cdot\text{OH} + \text{Fe}^{3+}$, ce qui a pour effet l'inactivation des PHD et, par conséquent, l'augmentation de la stabilité des sous-unités α .

Il est évident que les mtROS sont générés par la chaîne respiratoire mitochondriale (*mitochondrial respiratory chain*, MRC), plus précisément au niveau du complexe I, II et III (Murphy 2009; Drose 2013; Kembro *et al.* 2014). L'utilisation des inhibiteurs du complexe III a permis de mettre en évidence l'importance de ce complexe dans l'induction de HIF-1 α par Ang II (Patten *et al.* 2010). Toutefois, Les mécanismes permettant la production des mtROS par Ang II en amont de la MRC sont, à ce jour, encore mal définis. Il est proposé que cette production résulte de la dépolarisation du

potentiel de la membrane mitochondriale (*mitochondrial membrane potential*, $\Delta\Psi$) suite à l'ouverture des canaux potassiques ATP mitochondriaux (mtKATP) (Kimura *et al.* 2005a). La génération des ROS via l'activation de NADPH oxydase par Ang II-AT1R a été démontrée pour être impliquée dans l'ouverture de ces mtKATP (Kimura *et al.* 2005b).

Malgré que l'augmentation de la transcription et de la traduction de la protéine HIF-1 α permet une importante élévation des niveaux protéiques, ces évènements seuls sont insuffisants pour assurer la forte induction observée par Ang II et ce, grâce à l'activité du système de dégradation protéasomale de HIF- α qui est à son maximum en conditions oxygénées. Ainsi, la stabilisation de la protéine HIF-1 α représente sans doute le mécanisme principal de l'induction non-hypoxiques par l'Ang II. La figure 1.9 résume de façon schématique les principaux évènements menant à l'induction de HIF-1 α par Ang II.

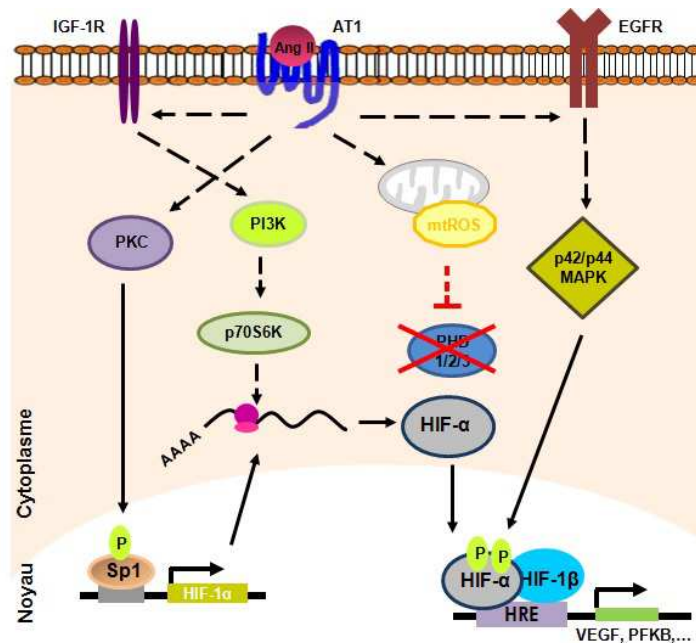


Figure 1.9: Mécanismes d'induction et d'activation de la sous-unité HIF-1 α par Ang II. L'activation de la PKC mène à l'augmentation de l'expression du gène *HIF-1A*. L'activation de la voie de signalisation PI3K/p70S6K augmente la traduction de l'ARNm de HIF-1 α . L'activation de la voie de signalisation p42/p44 MAPK entraîne l'augmentation de l'activité transcriptionnelle de HIF-1. Finalement, la génération des espèces réactives de l'O₂ (ROS) permet la stabilisation de HIF- α par l'inhibition de son hydroxylation par les PHD. *Illustration M. Jalouli.*

1.1.5 Rôles physiologiques des facteurs de transcription HIF

L'O₂ est vital pour toutes les cellules du corps. Ainsi, une diminution de la disponibilité de l'O₂ a pour conséquence l'activation de plusieurs mesures d'adaptation, visant à rétablir l'alimentation en O₂ dans la région hypoxique et à maintenir la survie cellulaire. Parmi ces mesures, on peut citer la production d'EPO par les reins qui stimulent la moelle osseuse à produire des globules rouges, ainsi que la sécrétion des catécholamines par les cellules de la carotide et des surrénales, qui augmentent la respiration et le rythme de battement de cœur. Afin de produire l'énergie nécessaire au fonctionnement de la cellule, il se produit également une augmentation de la synthèse de plusieurs enzymes impliquées dans le métabolisme anaérobique qui prend la place du métabolisme aérobie. Les facteurs de transcription HIF sont les régulateurs principaux de ces réponses adaptatrices. Par l'activation de plusieurs gènes impliqués dans divers processus cellulaires et physiologiques, HIF assurent le maintien de l'homéostasie cellulaire en réponse à un stress hypoxique et possèdent ainsi un rôle bénéfique durant plusieurs situations d'hypoxie physiologiques telle que celle de la haute altitude et celle du stade précoce du développement embryonnaire. *Dans le but de bien démontrer l'importance des facteurs HIF au niveau de la signalisation hypoxique, nous porterons une attention particulière à leur contribution essentielle au niveau du système vasculaire et du développement embryonnaire.*

1.1.5.1 Rôle des HIF au niveau vasculaire

1.1.5.1.1 L'angiogenèse

L'angiogenèse est un processus physiologique responsable de la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir d'autres préexistants (Potente *et al.* 2011; Schuermann *et al.* 2014). Ce phénomène on le trouve particulièrement lors du développement embryonnaire. En effet, le système vasculaire apparaît comme l'un des premiers organes qui se développe chez l'embryon afin de garantir la bonne circulation de l'O₂ et des métabolites, permettant ainsi la croissance rapide des tissus et des organes embryonnaires (Betz *et al.* 2016). Chez l'adulte, le processus angiogénique se produit

également mais il se limite à des situations particulières telles que la cicatrisation des plaies et la formation du placenta.

L'angiogenèse est un phénomène régulé par une balance entre des facteurs pro-angiogéniques, tels que VEGF, IGF, FGF et HGF (*hepatocyte growth factor*) (Riedel *et al.* 2007; Koellensperger *et al.* 2014) et des facteurs anti-angiogéniques telles que la thrombospondine-1, l'endostatine et l'angiostatine (Kalluri 2003). Il s'agit d'un processus complexe qui s'effectue en plusieurs étapes et est déclenché par une multitude de voies de signalisation qui peuvent agir d'une manière particulière sur les différents vaisseaux sanguins (Wiley *et al.* 2011; Vanhollebeke *et al.* 2015; Ulrich *et al.* 2016).

Les facteurs de transcription HIF sont des éléments clés dans l'activation de l'expression de nombreux facteurs favorisant l'angiogenèse (Skuli *et al.* 2012; Franke *et al.* 2013; Hu *et al.* 2014). Parmi ces facteurs contrôlés par HIF, on note le PDGF- β , l'angiopoïétine-2, le SDF-1 α (*stromal derived factor-1*) et le VEGF (Forsythe *et al.* 1996; Ceradini *et al.* 2004; Kelly *et al.* 2004). Le VEGF est considéré comme le plus puissant médiateur de l'angiogenèse, et ce grâce à son rôle central dans la régulation des différentes étapes de l'angiogenèse. En effet, en se liant aux récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2, qui sont également des gènes cibles des HIF (Koop *et al.* 2003), ce facteur permet l'augmentation de la perméabilité des vaisseaux, la prolifération, la migration des cellules endothéliales et leur formation en tubes (Ferrara 2004).

Plusieurs évidences démontrent l'importance des facteurs HIF dans le processus angiogénique. D'abord, l'inactivation génique conditionnelle de HIF-1 *in vivo* peut entraîner une diminution de la prolifération des cellules endothéliales et la formation de tubes vasculaires (Tang *et al.* 2004). Cependant, en conditions oxygénées, l'infection des cellules endothéliales avec une forme constitutivement active de HIF-1 α provoque une invasion de la membrane basale et la formation de tubes vasculaires de façon similaire aux cellules cultivées dans des conditions hypoxiques (Manalo *et al.* 2005). Finalement, l'inactivation génique de HIF-1 α chez les souris mène à la mort fœtale causée par une altération grave de la vascularisation de l'embryon (Carmeliet *et al.* 1998; Ryan *et al.* 1998).

1.1.5.1.2 L'érythropoïèse

Tout d'abord l'érythropoïèse est un processus complexe permettant de produire les globules rouges ou érythrocytes à partir d'une cellule souche hématopoïétique sous le contrôle d'une hormone régulatrice principale, l'EPO. Celle-ci est synthétisée par les fibroblastes du cortex et de la médullaire externe du rein et exerce son effet au niveau de la moelle osseuse pour stimuler le processus érythropoïétique (Maxwell *et al.* 1993; Maxwell *et al.* 1997). Les complexes HIF, et particulièrement HIF-2, ont été démontrés pour jouer un rôle clé dans l'activation de la transcription du gène codant l'EPO en conditions hypoxiques (Rosenberger *et al.* 2002). Grâce à cette propriété, les facteurs de transcription HIF constituent un moyen thérapeutique efficace dans le traitement physiologique de l'anémie de la maladie rénale chronique (Bonomini *et al.* 2016). La démonstration de l'implication et de l'importance des facteurs HIF dans le processus érythropoïétique est clairement établie par l'étude des mutations du gène *VHL* démontrant un développement d'une érythrocytose chez les patients porteurs de ces mutations comme conséquence de la stabilisation des sous-unités HIF- α (Gordeuk *et al.* 2005). De même, une production anormale d'EPO responsable d'une érythrocytose a été démontrée pour être associée à des mutations affectant PHD2 ou HIF-2 α (mutations inactivatrices de PHD2 ou mutations activatrices de HIF-2 α) (Percy *et al.* 2006; Percy *et al.* 2007; Zhuang *et al.* 2012).

Les facteurs HIF jouent également un rôle principal dans le métabolisme du fer qui est un élément essentiel à l'érythropoïèse pour la synthèse d'hémoglobine. Vu l'importance du fer, ses mouvements au sein de l'organisme sont soumis à un contrôle strict qui intervient tant au niveau de son absorption intestinale qu'au niveau de son recyclage (Nicolas *et al.* 2001a; Nicolas *et al.* 2002). HIF ont été démontrés pour affecter presque tous les aspects du métabolisme de fer. En effet, ces facteurs, plus précisément HIF-2, améliorent l'absorption du fer au niveau du duodénum par les entérocytes, et ce en régulant l'expression du gène codant pour la ferroportine (FPN, SLC40A1) (Donovan *et al.* 2000; Taylor *et al.* 2011; Solak *et al.* 2016). La FPN assure donc le transport du fer de la membrane basolatérale des entérocytes vers le plasma (Abboud & Haile 2000; Donovan *et al.* 2005). HIF permettent également le recyclage du fer en induisant

l'expression de l'hème oxygénase 1 (HO-1) (Lee *et al.* 1997), qui contribue à la récupération du fer présent dans l'hémoglobine des érythrocytes sénescents phagocytés par les macrophages. Une fois libéré dans la circulation sanguine, le fer est immédiatement retenu par la transferrine, le seul transporteur du fer dans le sérum, pour le distribuer principalement à la moelle osseuse et au niveau du foie. HIF intervient à cette étape en induisant une augmentation des taux sériques de la transferrine et de ses récepteurs (Lok & Ponka 1999; Tacchini *et al.* 1999). Bref, en régulant l'expression d'EPO ainsi que le métabolisme du fer, les facteurs de transcription HIF sont des joueurs importants au niveau de la physiologie vasculaire.

1.1.5.2 Rôle des HIF au niveau du développement embryonnaire

Au cours des stades précoces de l'embryogenèse, l'embryon croît dans un environnement relativement hypoxique. Cet environnement hypoxique, et plus précisément les facteurs de transcription HIF, jouent un rôle essentiel dans le développement embryonnaire. L'importance des complexes HIF a été clairement démontrée par le fait que l'inactivation génique de HIF-1 α chez les souris cause une létalité embryonnaire au jour E10.5 (Iyer *et al.* 1998a; Ryan *et al.* 1998). Cette létalité se manifeste par des anomalies développementales graves, y compris des défauts de formation au niveau du tube neural, des malformations cardiaques et un dysfonctionnement de l'angiogenèse (Figure 1.10). Également, l'inactivation génique de HIF-2 α entraîne la mort de la souris après la naissance, causée par un défaut d'hématopoïèse, des anomalies métaboliques telles que le dysfonctionnement mitochondrial et des anomalies au niveau du foie, du cœur et des muscles squelettiques (Scortegagna *et al.* 2003). Des études plus approfondies ont permis de démontrer que l'inactivation génique de HIF-1 α dans les cardiomyocytes ventriculaires chez les souris entraîne des défauts au niveau de la vascularisation et la fonction cardiaque (Huang *et al.* 2004). Ces observations ont été appuyées par une étude ultérieure démontrant que le facteur HIF-1 joue un rôle essentiel dans la régulation de l'expression des éléments clés de la myofibrillogenèse et des facteurs de transcription cardiaques (Krishnan *et al.* 2008). Finalement, des études élégantes ont permis de démontrer que l'activation de HIF-1 α ou

HIF-2 α a un effet positif sur la différenciation de cellules souches embryonnaires (CSE) en cardiomyocytes *in vitro* (Ng *et al.* 2010; Sun *et al.* 2015). Par contre, l'absence de HIF-1 α dans les CSE HIF-1 α ^{-/-} influence négativement la qualité et la quantité des cardiomyocytes différenciées *in vitro* (Kudova *et al.* 2016), suggérant ainsi un rôle important des facteurs HIF dans la cardiomyogenèse. Bref, en régulant nombreux processus physiologiques telles que l'angiogenèse, la myofibrillogenèse et la cardiomyogenèse, les facteurs de transcription HIF sont des joueurs importants au niveau du développement embryonnaire.

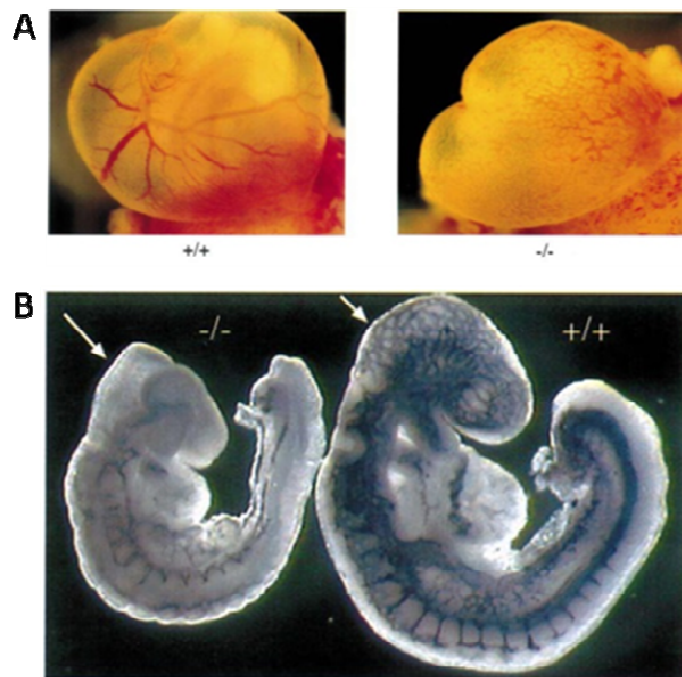


Figure 1.10: Anomalies développementales associées à l'inactivation génique de HIF-1 α . (A) Défauts de vascularisation du sac vitellin. (B) Malformation vasculaire et retard de croissance embryonnaire (*Reproduite avec la permission de John Wiley and Sons publishers (Ryan *et al.* 1998), copyright 2017*).

1.1.6 Rôles pathologiques des facteurs de transcription HIF

HIF sont également connus pour être activés dans de nombreuses situations pathologiques, favorisant ainsi la pathogenèse de nombreuses maladies telles que le cancer et les maladies cardiovasculaires.

1.1.6.1 Rôle au niveau du développement tumoral

En tant que régulateurs majeurs de plusieurs processus cellulaires et physiologiques considérés comme pro-oncogéniques, particulièrement l'angiogenèse, les facteurs de transcription HIF jouent un rôle important dans la pathologie tumorale. Effectivement, la protéine HIF-1 α a été démontrée pour être surexprimée dans diverses tumeurs malignes, y compris celle du sein, du côlon, de l'ovaire, de la prostate et du rein (Zhong *et al.* 1999; Daponte *et al.* 2008). Dans une cellule cancéreuse, HIF peuvent être activés par l'hypoxie tumorale, par divers stimuli non-hypoxiques et par des mutations oncogéniques. La conséquence de cette activation est grandement néfaste vu le rôle important des HIF dans la régulation de l'expression de divers gènes favorisant le développement et la progression des cancers. En effet, le facteur HIF-1 augmente l'expression de nombreux gènes impliqués dans la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM), notamment le TGF β (*transforming growth factor* β), ce qui lui confère un rôle majeur dans la motilité des cellules cancéreuses et par conséquent dans le phénomène invasif et métastatique (Lu & Kang 2010). HIF-1 favorise également l'invasion des cellules métastatiques en induisant des gènes impliqués dans la dégradation de la matrice extracellulaire, comme les métalloprotéases de la matrice (*matrix metalloprotease*, MMP), ainsi que des gènes codant pour des facteurs pro-angiogéniques, tels que le VEGF (Forsythe *et al.* 1996; Munoz-Najar *et al.* 2006). De même, le complexe HIF-1 contribue à la reprogrammation métabolique, une caractéristique fondamentale du cancer, via la surexpression des gènes codant pour les transporteurs de glucose (GLUT1, GLUT3), de nombreuses enzymes glycolytiques telles que l'aldolase A (ALDOA), l'hexokinase 1 (HK1), la pyruvate kinase isozyme M2 (PKM2) et la lactate déshydrogénase A (LDHA) (Semenza 2010b), ainsi que divers gènes impliqués dans le métabolisme lipidique, telle que la lipine-1 (Santos & Schulze 2012). De plus, les facteurs HIF sont impliqués dans l'induction et le maintien de l'auto-renouvellement des cellules souches cancéreuses (*cancer stem cell*, CSC). En particulier, HIF-1 active l'expression de Twist1 ce qui offre plusieurs avantages pour les cellules cancéreuses tels que l'aptitude d'auto-renouvellement, la capacité de migrer et d'envahir d'autres tissus et, aussi la résistance à la chimiothérapie (Tseng *et al.* 2015). Finalement, l'activation des HIF dans les cellules cancéreuses provoque le recrutement

des cellules immunitaires ayant une activité immunosuppressive telles que les macrophages associés aux tumeurs, les cellules myéloïdes suppressives et les lymphocytes T régulateurs (Corzo *et al.* 2010; Doedens *et al.* 2010; Clambey *et al.* 2012). Parallèlement, HIF-1 permet l'inhibition des fonctions des cellules dendritiques et des lymphocytes NK (*Natural Killer*), ce qui peut affecter négativement la réaction immunitaire antitumorale, favorisant ainsi la croissance tumorale (Palazon *et al.* 2012; Barsoum *et al.* 2014).

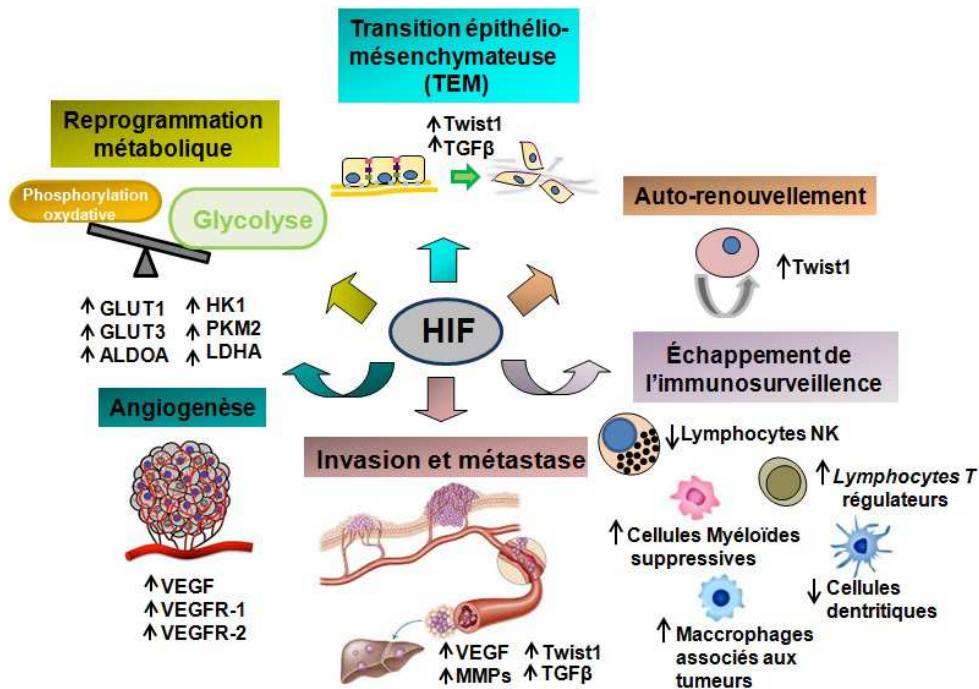


Figure 1.11: Implication des complexes HIF dans divers aspects du développement tumoral. Les complexes HIF régulent l'expression de plusieurs gènes impliqués dans divers processus pro-oncogéniques telles que la reprogrammation métabolique, la TEM, l'angiogenèse, l'auto-renouvellement, la survie et l'invasion cellulaire, favorisant la tumorigenèse et la progression tumorale. *Illustration par M. Jalouli.*

Bref, en favorisant la reprogrammation métabolique, la TEM, l'angiogenèse, l'auto-renouvellement, la survie et l'invasion des cellules cancéreuses, HIF sont des régulateurs clés au cœur des événements pro-oncogéniques (Figure 1.11) et constituent une cible thérapeutique dans le traitement du cancer. D'ailleurs, plusieurs inhibiteurs ciblant

l'expression, la traduction, la stabilité des protéines HIF- α , la dimérisation HIF- α /HIF-1 β , la liaison HIF/ADN et l'activité transcriptionnelle des HIF ont été développés (Masoud & Li 2015).

1.1.6.2 Rôle au niveau de pathologies vasculaires

Le nombre d'études démontrant l'implication des facteurs HIF dans diverses maladies vasculaires telles que l'athérosclérose et l'hypertension pulmonaire ne cesse d'augmenter durant ces dernières années (Brusselmans *et al.* 2003; Kasivisvanathan *et al.* 2011; Shimoda & Laurie 2014; Ferns & Heikal 2017).

L'athérosclérose est une atteinte dégénérative des artères consistant à l'épaississement de leur paroi suite à la formation des plaques d'athérome au niveau de la couche interne, l'intima. Au cours de l'athérogenèse, la diffusion de l'O₂ peut alors diminuer créant ainsi un environnement hypoxique responsable de l'augmentation des niveaux protéiques de HIF-1 α au niveau des plaques athéromateuses (Bjornheden *et al.* 1999; Parathath *et al.* 2013). Outre l'hypoxie, plusieurs autres facteurs non-hypoxiques contribuant fortement à la pathogenèse de l'athérosclérose, tel que l'Ang II, peuvent activer le complexe HIF-1 au niveau de la paroi vasculaire (Richard *et al.* 2000; Page *et al.* 2002). Il a été démontré qu'en régulant de nombreux processus biologiques, particulièrement la prolifération, la migration des VSMC et la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, le facteur HIF-1 joue un rôle important dans le développement et la progression de l'athérosclérose (Juan-Babot *et al.* 2003; Lim *et al.* 2013; Ferns & Heikal 2017). D'autre part, la transformation des cellules vasculaires lisses en cellules cartilagineuses responsables de la calcification vasculaire est l'un des mécanismes majeurs qui contribuent à la formation des lésions d'athérosclérose. D'ailleurs, la calcification vasculaire est considérée comme un bon marqueur de la présence de l'athérosclérose coronarienne (Li *et al.* 2014). De façon intéressante, l'hypoxie et particulièrement le facteur HIF-1 semblent impliquées dans le processus de calcification vasculaire (Nangaku & Eckardt 2007; Gunaratnam & Bonventre 2009; Li *et al.* 2014). En effet, une augmentation de l'expression de HIF-1 et ses gènes cibles, comme VEGF et GLUT-1, a été mise en évidence dans le plasma de patients diabétiques présentant une

calcification des artères coronaires (Idelevich *et al.* 2011; Li *et al.* 2014). L'importance du facteur HIF-1 au niveau de la calcification vasculaire est supportée par une étude réalisée dans notre laboratoire qui démontre que l'inactivation génique du HIF-1 dans les VSMC entraîne une diminution de la calcification, induite par un déséquilibre phospho-calcique, de ces cellules (Mokas *et al.* 2016).

Les complexes HIF possèdent aussi un rôle fondamental au niveau des réponses vasculaires pulmonaires à un stress hypoxique aiguë et chronique (Yu *et al.* 1999; Brusselmans *et al.* 2003; Yao *et al.* 2012; Tan *et al.* 2013; Shan *et al.* 2014). L'importance des facteurs HIF est soulignée par des études réalisées sur des souris HIF-1 α +/- démontrant une diminution de la susceptibilité de développer une hypertension pulmonaire (Yu *et al.* 1999; Shimoda *et al.* 2001). De même, il a été montré que la mutation de HIF-2 α chez les tibétains, une population vivante en altitude et caractérisée par une adaptation particulière à la rareté de l'O₂, cause une diminution de leur pression artérielle pulmonaire (van Patot & Gassmann 2011). Par contre, l'élévation des niveaux protéiques des HIF- α chez des patients porteurs des mutations du gène *VHL*, comme le cas de la polycythémie de Tchouvache, est à l'origine d'une augmentation de la pression artérielle pulmonaire (Hickey *et al.* 2010). L'implication des HIF dans cette augmentation se fait principalement à travers l'induction des gènes cibles, entre autre l'endothéline-1 et la thrombospondine-1, qui agissent à la fois comme des puissants vasoconstricteurs et des forts inducteurs de la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses de l'artère pulmonaire (Phelan *et al.* 1998; Bushuev *et al.* 2006; Smith *et al.* 2006; Labrousse-Arias *et al.* 2016). Également, les facteurs HIF jouent un rôle majeur au niveau des réponses inflammatoires qui contribuent à la pathogenèse de l'hypertension pulmonaire, via l'activation de nombreux autres gènes cibles dont SDF-1 et NF- κ B (*nuclear factor-KB*) (Burke *et al.* 2009; Voelkel *et al.* 2013).

En somme, l'ensemble de ces études supporte le rôle important que HIF et ses voies de signalisation jouent dans la progression des maladies vasculaires. En ce sens, l'inhibition des facteurs HIF est considérée comme une stratégie thérapeutique efficace dans le traitement de ces pathologies associées à l'induction de HIF- α .

1.2 Les facteurs de transcription Sp1 et Sp3

Compte tenu de l'importance des facteurs de transcription Sp1 et Sp3 dans la régulation transcriptionnelle de HIF-1A et dans le cadre des travaux présentés dans le chapitre 3, la présente section se penche vers la description des propriétés structurales et fonctionnelles de ces facteurs, des principaux mécanismes de leur régulation, de leur mode d'action ainsi que leur rôle au niveau tumoral. Des évidences supportant le rôle de Sp1 et Sp3 dans l'activation de l'expression du gène HIF-1A sont également détaillées dans cette section.

1.2.1 Généralité

La protéine de spécificité 1 (*Specificity protein 1*, Sp1) et la protéine de spécificité 3 (*Specificity protein 3*, Sp3) sont des facteurs de transcription principaux pour la régulation d'une multitude des processus cellulaires et physiologiques. Ces deux facteurs de transcription sont exprimés dans toutes les cellules des mammifères et possèdent au moins 12 000 sites de liaison à l'ADN dans le génome humain (Cawley *et al.* 2004). Sp1 fut le premier facteur de transcription Sp découvert et a été identifié en 1983 comme un facteur essentiel pour la transcription du gène immédiat précoce de SV40 (Dyan & Tjian 1983). Initialement reconnu comme un activateur de l'expression constitutive des gènes ménagers (*housekeeping genes*), Sp1 est aujourd'hui décrit comme pouvant jouer un rôle central dans la régulation de divers processus biologiques essentiels, telles que la croissance cellulaire et la tumorigenèse (Pugh & Tjian 1990; Azizkhan *et al.* 1993; Suske 1999; Li & Davie 2010). Également, Sp3 est reconnue comme un facteur essentiel pour la régulation fine de l'expression de divers gènes de manière spécifique à un type et un contexte cellulaire.

Sp1 et Sp3 sont membres de la famille de facteurs de transcription Sp qui sont caractérisés par des domaines de liaison à l'ADN hautement conservés, soit trois doigts de zinc de type Cys2His2, et par la ressemblance à la famille des facteurs Krüppel-like (Black *et al.* 2001; Kaczynski *et al.* 2003; Suske *et al.* 2005). Ces facteurs de transcription Sp sont reconnus pour réguler les gènes cibles en se liant spécifiquement à

des motifs riches en résidus GC et sont classés en deux groupes; Sp1-4 qui sont similaires de point de vue structural, et Sp5-9 qui sont très différents des protéines Sp1-4 mais plus similaires aux facteurs Krüppel-like (Thiesen & Bach 1990; Suske 1999). Malgré l'homologie des séquences, Sp1-4 possèdent des fonctions spécifiques et différentes (Supp *et al.* 1996; Marin *et al.* 1997; Bouwman *et al.* 2000; Harrison *et al.* 2000; Gollner *et al.* 2001a; Gollner *et al.* 2001b; Nakashima *et al.* 2002; Bell *et al.* 2003). À titre d'exemple, il a été démontré que Sp1-4 contribuent de manière unique et distincte au niveau du développement embryonnaire. En effet, l'inactivation génique de Sp1 a permis de déterminer que cette protéine est essentielle aussi bien au début du développement embryonnaire que pour la croissance et la différenciation cellulaire (Marin *et al.* 1997). En ce qui concerne Sp2, l'inactivation génique de cette protéine démontre que cette dernière est impliquée dans le développement précoce de la souris (Terrados *et al.* 2012). Finalement, l'inactivation génique de Sp3 mène à un défaut du développement hématopoïétique et du système respiratoire ainsi qu'à une altération de la formation d'os (Bouwman *et al.* 2000; Gollner *et al.* 2001b; Van Loo *et al.* 2003). Les différences fonctionnelles des facteurs Sp sont bien illustrées par leur profil d'expression tissulaire. Sp1 et Sp3 sont exprimées de manière ubiquitaire (Li *et al.* 2004). Sp2, quant à elle, est également ubiquitaire mais possède une localisation cellulaire distincte, particulièrement au niveau des foyers associés à la matrice nucléaire (Moorefield *et al.* 2006). Finalement Sp4 est plus abondante au niveau des cellules neurales (Hagen *et al.* 1992).

1.2.2 Structure de Sp1 et Sp3

Sp1 et Sp3 possèdent la plus forte homologie de séquence (90% d'homologie). Tout comme les autres membres de la famille Sp, Sp1 et Sp3 possèdent dans leurs parties C-terminales un domaine de liaison à l'ADN constitué de trois doigts de zinc de type Cys2-His2 (ZF1 à ZF3), qui est hautement conservé chez les facteurs Sp. Les trois doigts de zinc sont nécessaires pour la liaison de haute affinité du facteur Sp aux séquences GC (Thiesen & Schroder 1991; Kriwacki *et al.* 1992). En effet, chaque doigt possède une affinité spécifique pour une séquence donnée du site GC (Thiesen & Schroder 1991;

Kriwacki *et al.* 1992). Encore plus intéressant, ces doigts de zinc sont également impliqués dans la localisation nucléaire des facteurs Sp (Ito *et al.* 2009; Ito *et al.* 2010).

En plus du domaine de liaison à l'ADN, les protéines Sp1 et Sp3 contiennent quatre différents domaines fonctionnels, soient deux domaines de transactivation A et B, un domaine C et un domaine D. Les domaines de transactivation A et B, riches en glutamines, jouent un rôle important dans la régulation de leur activité transcriptionnelle en permettant l'interaction avec la machinerie transcriptionnelle (Courey & Tjian 1988; Emili *et al.* 1994; Gill *et al.* 1994). Ces domaines se situent en N-terminal à proximité d'une région riche en résidus sérine et thréonine, qui est sujet de plusieurs modifications post-traductionnelles (Yang *et al.* 2001). Le domaine C, localisé en aval des domaines A et B, est nécessaire pour l'activité transactivatrice des Sp. Ce domaine riche en acides aminés chargés contient une séquence CXCPXC, nommée boîte Btd (*Buttonhead box*), dont la délétion affecte négativement l'activité de Sp1 (Courey & Tjian 1988). Le dernier domaine (domaine D) constitue l'extrémité C-terminale des facteurs Sp et est impliqué particulièrement dans l'activité transcriptionnelle synergique du facteur Sp1.

La boîte Sp, située en amont des domaines de transactivation A et B, est également présente chez Sp1 et Sp3. Cette boîte, composée de 13 acides aminés conservés chez tous les facteurs Sp, possède un site de clivage endoprotéolytique, lui conférant un rôle dans la régulation de la stabilité de ces facteurs (Su *et al.* 1999). De plus, Sp1 et Sp3 possèdent un domaine inhibiteur qui se situe en N-terminal chez Sp1 et en amont du domaine de liaison à l'ADN chez Sp3. Cette différence structurale semble être à l'origine des différences fonctionnelles entre Sp1 et Sp3 (Suske 1999). La figure 1.12 illustre les divers domaines structuraux des facteurs de transcription Sp1 et Sp3.

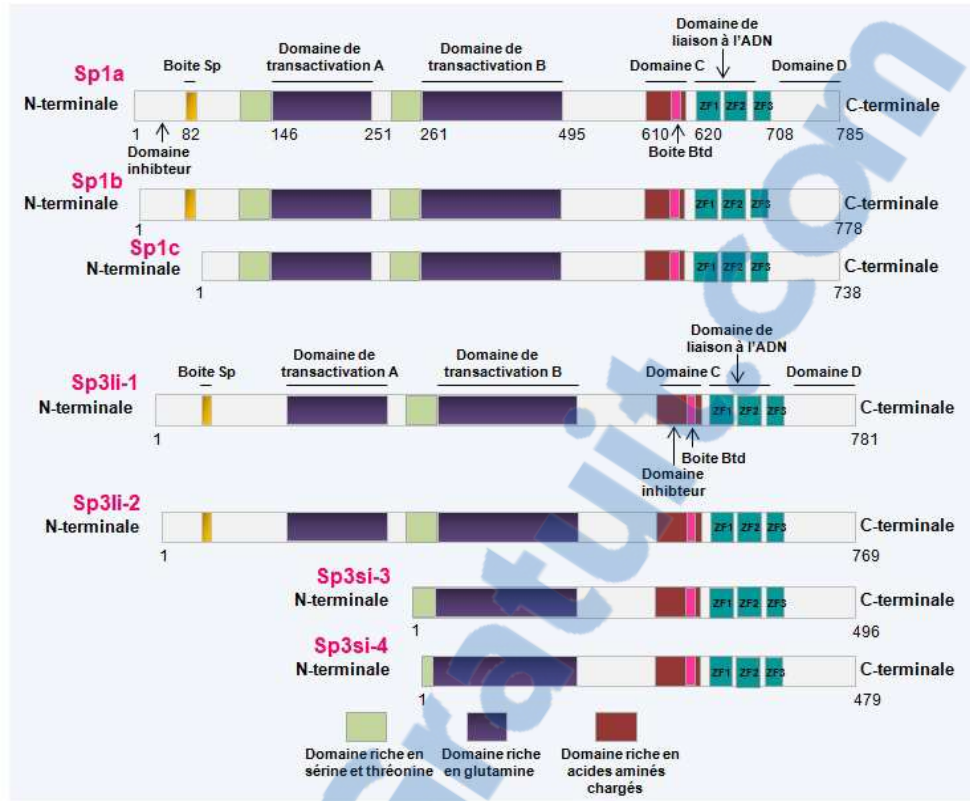


Figure 1.12: Structure des isoformes Sp1 et Sp3. Les divers domaines fonctionnels des facteurs de transcription Sp1 et Sp3 ainsi que leurs différentes isoformes sont représentés. Les isoformes représentés de Sp1 sont Sp1a, Sp1b et Sp1c. Les isoformes représentés de Sp3 sont Sp3li-1, Sp3li-2, Sp3si-3 et Sp3si-4. *Illustration par M. Jalouli.*

Jusqu'à présent, trois isoformes de Sp1 sont décrites (Figure 1.12). La première, de 785 acides aminés, représente la forme entière de la protéine. Les deux autres isoformes possèdent des domaines N-terminaux plus courts (778 et 738 acides aminés) suite à une initiation alternative de la traduction ainsi qu'à des mécanismes d'épissage alternatif de l'ARNm (Infantino *et al.* 2011). Ces isoformes sont exprimées de manière ubiquitaire. Cependant, très peu d'information existe sur le niveau d'expression ainsi que sur les caractéristiques fonctionnelles de ces deux dernières isoformes.

Le facteur de transcription Sp3, quant à lui, est présent sous quatre isoformes, une forme entière de 781 acides aminés, et trois formes de tailles différentes, soient 769, 496 et 479 acides aminés (Figure 1.12). Ces dernières sont le résultat de l'utilisation alternative de nombreux codons d'initiation de la traduction, qui sont situés en position

37, 856 et 907 de l'ARNm de Sp3 (Sapetschnig *et al.* 2004). De façon intéressante, il a été démontré que les petites isoformes, celles de 496 et 479 acides aminés, sont responsables de l'activité répressive du facteur Sp3, car il leur manque le domaine de transactivation A (Kennett *et al.* 2002). Bien que les isoformes courtes et longues soient exprimées dans toutes les cellules et les tissus de mammifères, leur niveau d'expression peuvent varier avec la différenciation cellulaire (Gartel *et al.* 2000; Kennett *et al.* 2002). En effet, il a été démontré que, dans les cellules cancéreuses de colon humain Caco-2 différenciées, les isoformes longues sont plus exprimées que les courtes (Gartel *et al.* 2000).

1.2.3 Propriétés fonctionnelles de Sp1 et Sp3

Comme précédemment mentionné, Sp1 et Sp3 exercent leurs effets en se liant de façon spécifique aux sites consensus GC (5'-(G/T)GGGCGG(G/A)(G/A)(G/T)-3'), nommés sites de liaison Sp, qui sont présents au niveau des promoteurs des gènes cibles (Briggs *et al.* 1986; Kadonaga & Tjian 1986; Kadonaga *et al.* 1987). Étant donné que Sp1 et Sp3 possèdent une forte homologie dans leur domaine de liaison à l'ADN, ces facteurs peuvent donc reconnaître le même site de liaison à l'ADN avec une affinité similaire (Li *et al.* 2004; Davie *et al.* 2008). Bien qu'ils soient capables de se lier aux mêmes sites Sp, Sp1 et Sp3 possèdent des propriétés transcriptionnelles différentes qui dépendent de la structure du promoteur ainsi que du contexte cellulaire (Majello *et al.* 1995; Fandos *et al.* 1999; Suske 1999; Yu *et al.* 2003; Safe & Abdelrahim 2005). Il a été démontré que la protéine Sp1 intervient comme un trans-activateur des promoteurs ayant un seul site de liaison Sp ou en agissant en synergie avec elle-même sur des promoteurs possédant plusieurs sites de liaison Sp, qui peuvent être proximaux ou bien distaux (Courey *et al.* 1989; Pugh & Tjian 1990). De ce fait, le facteur Sp1 est capable de s'oligomériser via son domaine D et former un ou plusieurs tétramères (Li *et al.* 2004). Ceci favorise la génération de plusieurs sites de liaison pour diverses protéines partenaires de Sp1, tels que les coactivateurs et les corépresseurs. Ainsi, grâce à son activité synergique, Sp1 est capable d'interagir avec des facteurs essentiels pour le remodelage de la chromatine et des coactivateurs nécessaires pour l'initiation de la transcription (Chen *et al.* 1994; Lu *et*

al. 2003). De plus, cette activité synergique permet Sp1 de former une boucle d'ADN entre les promoteurs et les sites ``enhancers``(Figure 1.13). En rapprochant les sites distants, Sp1 assure donc une juxtaposition des régions intra-chromosomiques et une super-activation de la transcription (Mastrangelo *et al.* 1991; Su *et al.* 1991). En plus d'activer l'expression des gènes cibles, Sp1 peut agir comme un répresseur transcriptionnel en interagissant avec des corépresseurs, tels que SMRT (*silencing mediator for retinoid and thyroid receptors*) et NCoR (*nuclear receptor corepressor*) via son domaine inhibiteur (Pagliuca *et al.* 1998; Zaid *et al.* 2001; Won *et al.* 2002; Lee *et al.* 2005).

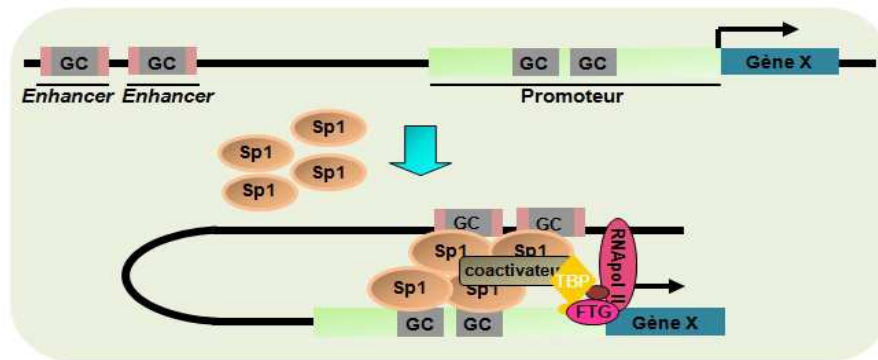


Figure 1.13: Formation d'une boucle d'ADN entre le promoteur et les ``enhancers`` sous l'action du facteur Sp1 et super-activation du gène cible. Grâce à leur activité synergique, les facteurs de transcription Sp1, liés sur plusieurs sites GC présents au niveau du promoteur et des sites ``enhancers``, sont capables de s'oligomériser en tétramères, permettant la formation d'une boucle d'ADN et la super-activation de la transcription. *Illustration par M. Jalouli.*

De sa part, Sp3 peut également fonctionner comme un répresseur ou activateur de la transcription et ce, dépendamment de la structure du promoteur ainsi que du type et contexte cellulaire (Sjottem *et al.* 1996). Dans certain cas, Sp3 peut agir à la fois comme un régulateur bi-fonctionnel (répresseur et activateur) de la transcription d'un même gène cible. Par exemple, Sp3 a été démontré pour activer l'expression de la monoamine oxydase B (MAO-B), lorsqu'il se lie au site Sp, tandis qu'il peut agir comme un répresseur en se liant, avec une affinité similaire, à la séquence CACCC qui est un site de liaison spécifique aux facteurs Krüppel-like (Ou *et al.* 2004).

À l'inverse de Sp1, le facteur Sp3, qui possède également un domaine D, est incapable d'agir en synergie et super-activer des promoteurs contenant plusieurs sites GC (Yu *et al.* 2003). En revanche, Sp3 a été démontré pour inhiber fortement la super-activation médiée par Sp1 de manière dépendante de sa capacité de liaison à l'ADN (Hagen *et al.* 1994; Dennig *et al.* 1995; Discher *et al.* 1998; Hata *et al.* 1998; Yu *et al.* 2003). En effet, par une compétition avec Sp1 pour les mêmes sites, Sp3 peut déplacer le facteur Sp1 lié à l'ADN (Yu *et al.* 2003). Ceci conduit à la répression des gènes dont l'activation nécessite une multimérisation des facteurs Sp1 présents dans plusieurs sites de liaison. Ainsi, le ratio des protéines Sp1 et Sp3 au niveau de la cellule semble jouer un rôle important dans la régulation de l'expression des gènes possédant des sites de liaison GC (Li & Davie 2010).

1.2.4 Mécanismes de régulation des facteurs Sp1 et Sp3

1.2.4.1 Régulation du niveau protéique de Sp1 et Sp3

Afin d'assurer une régulation fine des réponses médiées par Sp1/3, le niveau protéique de ces facteurs de transcription est hautement contrôlé par le taux de transcription de leurs gènes ainsi que par des mécanismes de régulation post-transcriptionnelle et post-translationnelle.

Dans un premier temps, malgré que Sp1 et Sp3 soient des protéines ubiquitaires, le niveau d'expression de leurs ARNm diffère d'un type cellulaire à l'autre et il est hautement régulé par divers stimuli. En ce sens, il a été démontré qu'au cours du développement, le profil d'expression de Sp1 varie entre les différents tissus de souris et il est régulé à la baisse dans les cellules complètement différenciées (Saffer *et al.* 1991). Un autre niveau de régulation transcriptionnelle réside dans le fait que les promoteurs des gènes codant pour Sp1 et Sp3 possèdent des sites de liaison Sp1/3 et que l'inhibition de l'un de ces facteurs entraîne la diminution de leurs niveaux d'expression, ce qui reflète l'existence des mécanismes d'auto-régulation positives (Nicolas *et al.* 2001b; Tapias *et al.* 2004).

Comme mentionné, Sp1 et Sp3 sont régulés au niveau post-transcriptionnel par l'épissage alternatif ainsi que des mécanismes d'initiation alternative de la traduction. En

conséquence, il y a une augmentation des protéines tronquées, qui sont souvent moins efficaces pour induire la transcription des gènes cibles que les protéines entières. À titre d'exemple, plusieurs types de cellules tumorales démontrent une augmentation dans le niveau protéique des isoformes courtes de Sp3, ce qui provoque une inhibition de l'expression génique (Rothen *et al.* 2003).

Finalement, Sp1 et Sp3 peuvent être régulés au niveau de leur stabilité. Il a été démontré que Sp1 peut être sumoylé sur le résidu lysine 16, ce qui favorise son interaction avec la protéine RNF4 (*Ring finger protein 4*), une E3 ubiquitine ligase, entraînant ainsi sa dégradation par le protéasome (Wang *et al.* 2008; Wang *et al.* 2011). De plus, en condition de privation du glucose, la diminution de la glycosylation de Sp1, une modification post-traductionnelle qui consiste à l'addition d'un glucide, provoque sa dégradation protéosomale via sa boîte Sp (Han & Kudlow 1997; Su *et al.* 1999; Su *et al.* 2000). La présence de la boîte Sp chez la protéine Sp3 suggère que la stabilité de cette dernière est aussi régulée de la même façon. Sp1 possède également d'autres sites de clivage protéolytique qui sont ciblés par différentes protéases dont la caspase-3 et la myoblastine (Rao *et al.* 1998; Rickers *et al.* 1999). Ces sites, une fois clivés, sont responsables de la génération d'une séquence peptidique C-terminale qui est capable de se lier aux séquences GC et agir comme un suppresseur transcriptionnel puisqu'elle ne possède pas les domaines de transactivation.

1.2.4.2 Modifications post-traductionnelles de Sp1 et Sp3

Les facteurs de transcription Sp1 et Sp3 sont des protéines qui subissent une multitude de modifications post-traductionnelles (Li *et al.* 2004; Li & Davie 2010; Chang & Hung 2012; Chu 2012). Ces modifications post-traductionnelles, dont la phosphorylation, la glycosylation, l'acétylation et la sumoylation, ont été démontrées pour permettre une régulation structurale et fonctionnelle de Sp1 et Sp3. *Dans la présente section, nous portons une attention particulière à la phosphorylation, en raison de son importance dans les travaux présentés dans le chapitre 3 de cette thèse ainsi que pour bien illustrer le rôle des modifications post-traductionnelles dans la régulation de l'activité transcriptionnelle de Sp1 et Sp3.*

1.2.4.2.1 Phosphorylation

La phosphorylation de Sp1 est une modification post-traductionnelle qui a suscité beaucoup d'intérêt. En possédant 164 sites putatifs de phosphorylation sur 785 acides aminés, le facteur Sp1 est considéré comme une protéine hautement phosphorylée. Plusieurs kinases et phosphatases ont été reconnues comme pouvant affecter l'état de phosphorylation du Sp1 et moduler son activité transcriptionnelle en réponse à divers stimuli. La régulation de la capacité de liaison de Sp1 à l'ADN est l'un des impacts majeurs de la phosphorylation. En effet, la phosphorylation de Sp1 sur le résidu sérine 59 (Ser59) situé dans le domaine N-terminal, par le complexe cycline A/CDK, augmente sa liaison au promoteur et la transcription de la dihydrofolate réductase (Fojas de Borja *et al.* 2001). Également, la phosphorylation des résidus thréonine 453 et 739 (Thr453 et Thr739), présents respectivement dans le domaine de transactivation B et le domaine D, par les protéines kinases p42/p44 MAPK, joue un rôle clé dans l'augmentation de l'activité transcriptionnelle de Sp1. La mutation de ces résidus entraîne une diminution de la liaison de Sp1 au promoteur du gène *VEGF* réduisant ainsi son expression (Milanini-Mongiat *et al.* 2002). À l'inverse, durant la mitose, la phosphorylation du Thr739, par le complexe CDK1/cycline B1, empêche la liaison de Sp1 à l'ADN, ce qui facilite le processus de condensation de la chromatine et ainsi que la progression du cycle cellulaire (Chuang *et al.* 2012). Ainsi, durant l'interphase, la phosphorylation du Thr739 est requise pour l'augmentation de la capacité transcriptionnelle du facteur Sp1 alors qu'en mitose, la phosphorylation de ce même résidu est nécessaire pour le phénomène de condensation de la chromatine en permettant le détachement du Sp1. Finalement, il est intéressant de mentionner qu'en plus de son effet sur la liaison à l'ADN, la phosphorylation est susceptible d'affecter la localisation cellulaire du Sp1, sa stabilité ainsi que son interaction avec ses protéines partenaires, ce qui conduit à une modulation de l'expression de certains gènes cibles (Chu *et al.* 2003; Chang & Hung 2012).

La phosphorylation de Sp3 a été moins caractérisée. Néanmoins, plusieurs évidences soulignent l'importance de cette modification dans la régulation de la transcription du promoteur des gènes cibles de Sp3. Il a été démontré que la phosphorylation de Sp3, présent dans un extrait nucléaire des cellules épithéliales

intestinales humaines, par la protéine kinase A (PKA) entraîne une forte diminution de l'expression du gène de l'échangeur de sodium-hydrogène (NHE), causée par une baisse du potentiel de liaison du Sp3 au promoteur (Amin *et al.* 2006). De plus, le traitement des cellules épithéliales des poumons avec l'acide okadaïque, un inhibiteur des sérine-thréonine phosphatases, augmente la capacité de liaison de Sp3 au promoteur du gène de la sous-unité α du canal de sodium (α -ENaC2) (Chu *et al.* 2003). Comme Sp1, la phosphorylation de la protéine Sp3 sur le résidu sérine 73 (Ser73) par p42/p44 MAPK a été démontrée pour augmenter l'expression du gène *VEGF* (Pages 2007). Cette modification semble augmenter le potentiel de transactivation de Sp3 sans affecter sa capacité de liaison à l'ADN. Vu que le résidu sérine 73 se situe à proximité des domaines de transactivation A et B, il est donc possible qu'elle contribue à la régulation de l'interaction du facteur Sp3 avec des coactivateurs transcriptionnels spécifiques.

Tableau 1.2: Principales kinases responsables de la phosphorylation de Sp1/Sp3 et leur effet.

	Kinases	Résidus	Effet sur Sp	Références
Sp1	Cycline A/CDK	Ser59	Augmentation de sa liaison au site Sp	Fojas de Borja et al., 2001
	p42/p44 MAPK	Thr453 et Thr739	Augmentation de sa liaison au site Sp	Milanini-Mongiati et al., 2002
	CDK1/cycline B1	Thr739	Diminution de sa liaison au site Sp	Chuang et al., 2012
Sp3	p42/p44 MAPK	Ser73	Augmentation de son activité	Pages, 2007

En somme, la phosphorylation est un processus complexe qui, dépendamment du promoteur, de la position de site de phosphorylation et du contexte cellulaire, peut augmenter ou réduire l'activité transcriptionnelle du facteur Sp1 et Sp3. Toutefois, les mécanismes précis par lesquels cette modification régule l'activité de ces facteurs demeurent à éclaircir.

1.2.5 Régulation de la transcription des gènes cibles par Sp1 et Sp3

Un gène cible des facteurs de transcription Sp1 et Sp3 est un gène qui peut être régulé par ces facteurs grâce à la présence d'un ou plusieurs sites GC, situés au niveau de son promoteur, nécessaires pour leur liaison. La séquence consensus de ce site a été identifiée comme (G/T)GGG(C/A)GG(G/A)(G/A)(C/T) (Bucher 1990; Kriwacki *et al.* 1992). Il est probable que la variation de séquences issues des différentes combinaisons possibles du triplet de nucléotides situés en 3' affecte l'affinité de liaison du Sp1 et Sp3, ce qui pourrait causer une différence dans le degré d'activation d'un gène cible à un autre, permettant ainsi une régulation spécifique et différentielle. Outre la séquence du site GC, l'affinité spécifique de Sp1 et Sp3 pour l'ADN peut être modulée en fonction du contexte chromatinien. En ce sens, il a été démontré que l'affinité de liaison de Sp1 à l'ADN nucléosomal est 10 fois plus faible que son affinité de liaison à l'ADN nu (Li *et al.* 1994), ce qui suggère que l'activité transcriptionnelle de Sp1/3 est régulée en fonction de l'état épigénétique de la chromatine.

La seule liaison de Sp1 et Sp3 aux sites GC ne suffit pas pour induire la transcription de leurs gènes cibles. De nombreux mécanismes dont les modifications post-traductionnelles et les interactions avec différentes protéines partenaires, telles que les enzymes modifiant la chromatine (HAT/HDAC), sont susceptibles de réguler l'expression génique de façon spécifique selon le type cellulaire et en réponse à divers stimuli. La position des séquences GC au niveau du promoteur joue également un rôle central dans la régulation de la transcription des gènes dépendants de Sp1 et Sp3, et surtout ceux qui possèdent un promoteur dépourvu de la boîte TATA nécessaire pour la liaison de la machinerie de la transcription basale. En effet, il a été démontré qu'en se liant aux sites GC au niveau des promoteurs ne contenant pas une boîte TATA, les facteurs de transcription Sp1 et Sp3 permettent le recrutement de la machinerie de la transcription (Figure 1.14A), et que l'éloignement de ces sites par rapport au site d'initiation de la transcription entraîne une diminution de l'expression génique (Figure 1.14B) (Kollmar *et al.* 1994; Lu *et al.* 1994).

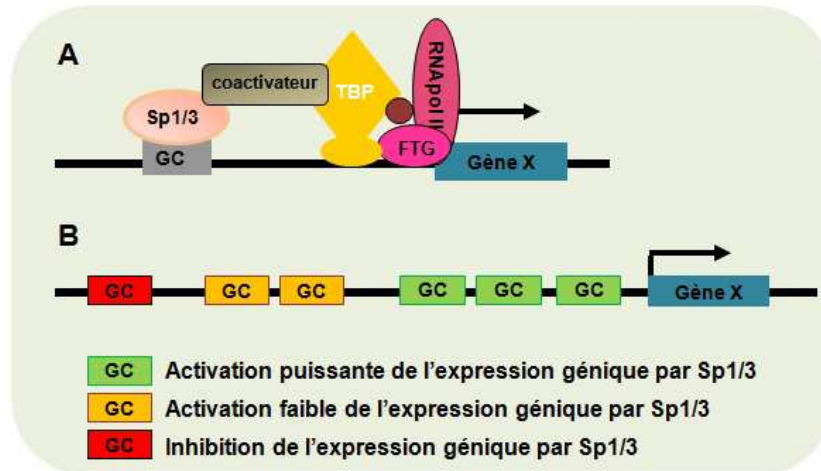


Figure 1.14: Régulation de l'expression génique par les facteurs de transcription Sp1 et Sp3. A: Mécanisme d'activation du promoteur dépourvu de la boîte TATA par Sp1/3. B: Organisation des sites Sp au niveau du promoteur et leurs effets sur la transcription du gène dépendant de Sp1/3. *Illustration par M. Jalouli.*

En somme, l'activité transcriptionnelle des facteurs de transcription Sp1 et Sp3 ainsi que l'expression de leurs gènes cibles sont hautement régulées par la liaison de ces facteurs à différents partenaires, par leurs caractéristiques biochimiques ainsi que par le contexte du promoteur et de la cellule de façon générale.

1.2.6 Gènes cibles et implications pathologiques de Sp1 et Sp3 : rôle au niveau tumoral

Les facteurs de transcription Sp1 et Sp3 sont reconnus comme pouvant réguler l'expression d'une multitude des gènes, notamment ceux codant pour des régulateurs du cycle cellulaire, des facteurs pro ou anti-apoptotiques, des facteurs pro ou anti-angiogéniques ainsi que des gènes suppresseurs de tumeurs et des oncogènes, ce qui fait de ces facteurs des régulateurs importants dans différents processus cellulaires (DesJardins & Hay 1993; Feng *et al.* 2000; Kavurma *et al.* 2001; Kavurma & Khachigian 2003; Lagger *et al.* 2003; Li *et al.* 2005; Olofsson *et al.* 2007; Yuan *et al.* 2007a; Marampon *et al.* 2008). Parmi ceux-ci, l'angiogenèse, la prolifération, la survie et la migration/invasion cellulaire sont considérés comme étant des processus pro-

oncogéniques, conférant ainsi à Sp1 et Sp3 un rôle majeur dans la tumorigenèse et la progression tumorale. D'ailleurs, la principale évidence qui supporte le rôle de Sp1 et Sp3 au niveau tumoral est que ces facteurs de transcription sont fortement surexprimés dans plusieurs types de tumeurs, dont le cancer du pancréas, du côlon, du poumon, de la prostate et du sein (Maurer *et al.* 2007; Jiang *et al.* 2008; Kong *et al.* 2010; Bedolla *et al.* 2012; Hsu *et al.* 2012; Lee *et al.* 2013a; Kong *et al.* 2014). De plus, des études d'interférence à l'ARN ont démontré que l'inhibition de ces facteurs mène à la diminution de la prolifération des cellules cancéreuses et de leurs capacités migratoires et invasives ainsi qu'à une induction des processus apoptotiques (Hedrick *et al.* 2016).

Les effets néfastes de l'activation de Sp1 et Sp3 sur le développement tumoral sont multiples. D'abord, les facteurs Sp1 et Sp3 sont reconnus pour permettre l'activation de l'expression de plusieurs gènes jouant un rôle central dans le processus angiogénique notamment VEGF et VEGFR-1, favorisant ainsi l'invasion des cellules cancéreuses et la genèse d'une métastase (Ishibashi *et al.* 2000; Stoner *et al.* 2000; Higgins *et al.* 2006). Outre que l'expression des facteurs pro-angiogéniques, la protéine Sp1 régule également le processus invasif des cellules tumorales en augmentant la transcription des gènes impliqués dans le phénomène de remodelage de la matrice extracellulaire tels que MMP-9 et MMP-2 (Hung *et al.* 2010). Il a été démontré que Sp1 et Sp3 contribuent également à la prolifération cellulaire via l'induction de nombreux gènes codant pour des protéines impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire tels que la cycline E, la CDK4, l'E2F-1 et la c-Myc, ainsi que via la répression des inhibiteurs du cycle cellulaire tel que p21 (DesJardins & Hay 1993; Biggs *et al.* 1996; Abdelrahim *et al.* 2004; Safe & Abdelrahim 2005; Willoughby *et al.* 2009). Finalement, les facteurs Sp1 et Sp3 ont été démontrés pour jouer un rôle important dans le maintien de la survie des cellules tumorales via la surexpression des gènes codant pour des facteurs anti-apoptotiques tels que la survivine (Xu *et al.* 2007). La figure 1.15 résume de façon schématique les principaux événements favorisant le développement tumoral, régulés par les facteurs de transcription Sp1 et Sp3.

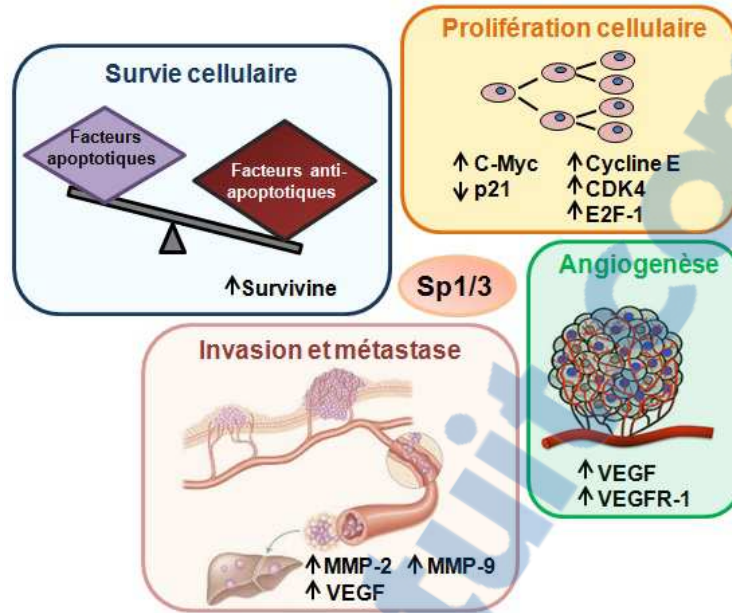


Figure 1.15: Régulation des principaux processus impliqués dans le développement tumoral par les facteurs de transcription Sp1 et Sp3. Sp1 et Sp3 joue un rôle majeur au niveau tumoral en régulant plusieurs gènes impliqués dans des processus caractéristiques du cancer tels que l'angiogenèse, la survie, la prolifération, l'invasion cellulaire. *Illustration par M. Jalouli.*

Finalement, il est intéressant de mentionner qu'outre le cancer, Sp1 et Sp3 sont également impliquées dans la pathogenèse de diverses autres maladies comme la maladie de Huntington (HD) et les maladies cardiovasculaires (Freiman & Tjian 2002; Chan *et al.* 2010).

1.2.7 Les facteurs de transcription Sp1/3 et le facteur de transcription

HIF-1

En permettant l'expression constitutive du gène *HIF-1A* qui contient plusieurs sites putatifs Sp au niveau de son promoteur, le facteur de transcription Sp1 est considéré comme un activateur important de ce gène (Iyer *et al.* 1998b; Minet *et al.* 1999). Plusieurs évidences ont souligné l'implication et l'importance de Sp1 et Sp3 dans la régulation de la transcription de HIF-1 α . En effet, il a été démontré que le traitement des cellules de carcinome de poumon de Lewi (LLC) par la mithramycine, un inhibiteur de

Sp1, entraîne une forte diminution de l'expression du transcrit de HIF-1 α (Koshikawa *et al.* 2009). En utilisant des essais luciférase ainsi que la technique d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP), cette étude a permis de confirmer que le facteur Sp1 est requis pour l'expression du gène *HIF-1A*. De même, une autre étude a indiqué que l'activation du facteur Sp1 par la trichostatine A, augmente l'expression du gène *HIF-1A*, alors que son inhibition par la mithramycine affecte négativement la transcription au niveau de ce gène (Kim & Park 2010). De plus, une forte baisse de l'ARNm de HIF-1 α a été observée suite à la diminution de l'activité transcriptionnelle du facteur Sp1 causée par la suppression de ses voies d'activations via la délétion de l'isocitrate dehydrogenase mitochondrial NADP+-dépendante (IDPm) par interférence à l'ARN (Kim & Park 2010). Finalement, des études réalisées au niveau de notre laboratoire ont permis de démontrer que la surexpression des facteurs de transcription Sp1 et Sp3 provoque une augmentation de l'activité transcriptionnelle de ces facteurs au niveau de promoteur de gène *HIF-1A* en essai luciférase (Lafleur *et al.* 2014).

1.3 La peptidyl-prolyl cis/trans isomérase, Pin1

La présente section vise à présenter l'isomérase Pin1, qui est au cœur des travaux présentés dans les chapitres 2 et 3. Les caractéristiques structurales de cette protéine, sa régulation ainsi que ses implications biologiques et pathologiques sont abordées.

1.3.1 Généralité

Depuis sa découverte en 1996, Pin1 a été intensément étudiée, et ce grâce à son rôle central dans la régulation fonctionnelle de plusieurs protéines impliquées dans divers processus physiologiques et pathologiques. Pin1 est une protéine d'environ 18 kDa qui fait partie de la famille des peptidyl-prolyl isomérases (PPIases), et plus précisément de la sous-famille des parvulines. Cette enzyme se distingue des autres PPIases par sa capacité de se lier spécifiquement à des substrats possédant des prolines précédées par des sérines ou des thréonines phosphorylées (pSer/Thr-Pro) (Lu *et al.* 1996). Une fois liée aux motifs pSer/Thr-Pro, la PPIase Pin1 permet l'isomérisation de ses substrats, entraînant ainsi un

changement de leur conformation qui peut être responsable de la régulation de leur localisation cellulaire, leur stabilité, leur état de phosphorylation ainsi que leur interaction avec leurs protéines partenaires (Wulf *et al.* 2005; Lu *et al.* 2007; Liou *et al.* 2011; Khanal *et al.* 2012) (Figure 1.16).

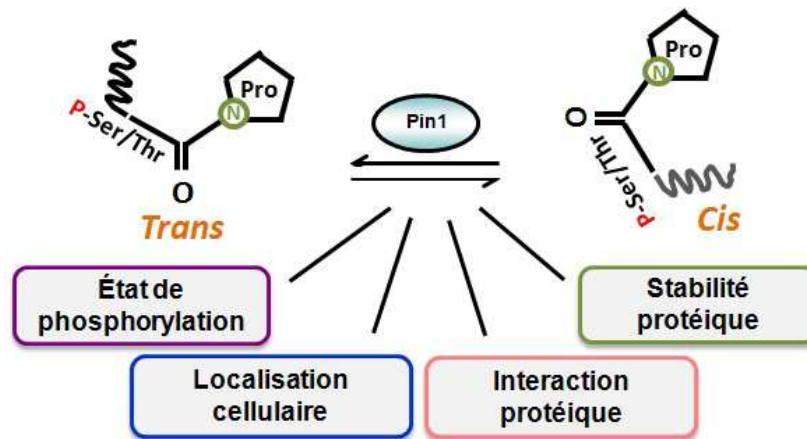


Figure 1.16: Schéma représentant la réaction d'isomérisation catalysée par Pin1 et son effet sur les protéines substrats. En assurant un changement de conformation *cis*↔*trans* des protéines substrats, Pin1 permet la régulation de leur localisation cellulaire, leur stabilité, leur état de phosphorylation et leur interaction protéique, affectant ainsi leur activité. *Illustration par M. Jalouli.*

L'isomérisation par Pin1 consiste à la conversion des liens peptidyl-prolines de la forme *cis* vers la forme *trans*, et inversement (Figure 1.16). Cette réaction est particulièrement importante au niveau des plusieurs interactions protéine-protéine, qui dépendent strictement d'une conformation *cis* ou *trans* spécifique. Effectivement, plusieurs kinases *trans*-spécifiques et des phosphatases *cis*- ou bien *trans*-spécifiques ont été identifiées (Lu & Zhou 2007; Mayfield *et al.* 2015). Au sein de la cellule, l'isomérisation se déroule naturellement et de façon très lente, mais elle est fortement accélérée sous l'action des PPIases, incluant Pin1, d'où leur importance (Fanghanel & Fischer 2004; Pastorino *et al.* 2006). Ainsi, l'isomérisation par Pin1 constitue un mécanisme important et spécifique pour la régulation de la fonction de plusieurs protéines.

1.3.2 Structure de Pin1

Pin1 est une protéine de 163 acides aminés constituée de deux domaines séparés par une région charnière flexible, le domaine WW, et le domaine catalytique PPIase (Figure 1.17). Ces deux domaines sont importants au niveau de l'activité de Pin1. Le domaine WW permet la liaison aux substrats en reconnaissant spécifiquement des motifs pSer/Thr-Pro, tandis que le domaine PPIase permet l'isomérisation *cis/trans* de liens peptidyl-proline (Lu *et al.* 1999; Lu *et al.* 2002).



Figure 1.17: Structure de peptidyl-prolyl isomérase Pin1. Les deux domaines fonctionnels de Pin1 sont représentés. *Illustration par M. Jalouli.*

1.3.3 Mécanismes de régulation de Pin1

En plus du fait que l'interaction entre Pin1 et ses substrats est fortement dépendante de la phosphorylation des résidus sérines ou thréonines suivis d'une proline, l'activité de Pin1 est hautement régulée à plusieurs niveaux, ce qui lui permet d'exercer des effets spatiotemporaux précis. D'abord, Pin1 est finement régulée au niveau transcriptionnel. La transcription du gène codant pour Pin1 est augmentée par les facteurs de transcription impliqués dans la progression du cycle cellulaire E2F, ainsi que par l'oncogène Notch1, alors qu'elle est réduite par le suppresseur de tumeur BRCA1 (*breast cancer 1*) (MacLachlan *et al.* 2000; Ryo *et al.* 2002; Rustighi *et al.* 2009). Ceci indique une corrélation entre l'expression de Pin1 et la prolifération cellulaire, suggérant un rôle pour Pin1 au niveau du cycle cellulaire. Pin1 est aussi régulée au niveau post-transcriptionnel. En effet, la stabilité de l'ARNm de Pin1 est réduite par plusieurs micro-ARNs (Zhang *et al.* 2013; Lee *et al.* 2014a; Luo *et al.* 2014). Finalement, l'isomérase Pin1 peut subir plusieurs modifications post-traductionnelles permettant la régulation de son activité. La serine 16 (Ser16) située dans le domaine WW a été démontrée pour être phosphorylée par

la protéine kinase A (PKA), la kinase de la protéine S6 (RSK2) et la kinase Aurora A (AURKA) (Lu *et al.* 2002; Cho *et al.* 2012; Lee *et al.* 2013b). Ces phosphorylations influencent négativement l'interaction de Pin1 avec ses substrats ainsi que sa localisation cellulaire. Pin1 est aussi phosphorylée par la kinase associée à la mort cellulaire, DAPK1, sur la sérine 71 (Ser71) présente au niveau du domaine PPIase ce qui inhibe son activité catalytique et empêche sa localisation nucléaire (Lee *et al.* 2011b). Finalement, la phosphorylation de la sérine 65 (Ser65) par la kinase 1 semblable à Polo (*polo-like kinase 1*, PLK1) contribue à diminuer l'ubiquitination de Pin1 augmentant ainsi sa stabilité et par conséquent son activité (Eckerdt *et al.*, 2005). Outre que la phosphorylation, Pin1 est sumoylée sur la lysine 6 (Lys6) située dans son domaine WW et la lysine 63 (Lys63) présente au niveau du domaine PPIase menant respectivement à l'inhibition de sa capacité de liaison aux protéines substrats et l'inactivation de son potentiel catalytique (Chen *et al.* 2013). De plus, il a été démontré que Pin1 est inactivée par une modification oxydative de la cystéine 113 (Cys113) située au niveau de son domaine catalytique (Chen *et al.* 2015).

1.3.4 Rôles biologiques et pathologiques de Pin1

1.3.4.1 Pin1 au niveau de la prolifération cellulaire et d'autres processus biologiques

En tant que régulateur de l'activité d'une multitude des protéines substrats, Pin1 est impliquée dans divers processus biologiques dont le principal est la prolifération cellulaire. Ce rôle important de Pin1 est souligné par l'observation que les souris Pin1^{-/-} présentent des signes importants de défauts de la prolifération cellulaire tels qu'une diminution du poids corporel et des atrophies testiculaires et rétinienne (Liou *et al.* 2002). Effectivement, Pin1 est un joueur important au niveau de la progression du cycle cellulaire. D'ailleurs, Pin1 a été démontrée pour permettre la transition G1-S par l'inactivation de la protéine rétinoblastome 1 (RB1), la stabilisation de la cycline D1 et la déstabilisation de la cycline E1 et la p21 qui sont impliquées dans la transition G1-S à différents temps (Liou *et al.* 2002; van Drogen *et al.* 2006; Rizzolio *et al.* 2012). De plus, il a été suggéré que durant la phase S du cycle cellulaire, Pin1 contribue à la synthèse de l'ADN et à la duplication des centrosomes (Suizu *et al.* 2006). En effet, l'inactivation de

Pin1, par des mutants dominants négatifs, entraîne l'inhibition de l'amplification du centrosome dans les cellules arrêtées en phase S alors que sa surexpression induit la duplication des centrosomes. Finalement, de nombreuses études ont démontré que Pin1 est également impliquée dans la coordination des événements mitotiques en interagissant avec et en régulant (activant ou inhibant) la topoisomérase-II α , la séparase, la phosphatase Cdc25, les kinases Myt1, Wee1 et Plk1 (Crenshaw *et al.* 1998; Shen *et al.* 1998; Xu & Manley 2007; Hellmuth *et al.* 2015). De même, il a été démontré que l'inhibition de Pin1 dans les cellules HeLa provoque un arrêt mitotique et une fragmentation nucléaire, résultant d'une entrée prématurée en mitose, alors que sa surexpression bloque les cellules en phase G2 (Lu *et al.* 1996), suggérant que Pin1 agit comme un inhibiteur de l'entrée prématurée dans la mitose. En plus d'interagir avec les protéines régulatrices du cycle cellulaire, Pin1 permet la régulation de plusieurs facteurs de transcription impliqués dans ce processus. En effet, il a été démontré qu'en interagissant avec et en augmentant l'activité transcriptionnelle de c-Jun et β -caténine, l'isomérase Pin1 contribue à l'activation de la transcription de leur gène cible codant pour la cycline D1 (Ryo *et al.* 2001; Wulf *et al.* 2001). Plusieurs autres facteurs de transcription qui contrôlent l'expression des gènes intervenant dans la prolifération cellulaire y compris c-Myc, NF- κ B et le récepteur alpha des œstrogènes sont également des substrats de Pin1 (Ryo *et al.* 2003; Rajbhandari *et al.* 2012; Farrell *et al.* 2013; Rajbhandari *et al.* 2015). Il a été également démontré que Pin1 est impliquée dans la stabilisation de la protéine Nanog et le facteur de transcription Oct4, ce qui lui permet de jouer un rôle clé dans l'induction et le maintien de la pluripotence et l'auto-renouvellement des cellules souches (Moretto-Zita *et al.* 2010; Nishi *et al.* 2011).

En plus d'être impliquée dans la prolifération cellulaire, Pin1 joue également un rôle crucial au niveau de l'invasion et la migration cellulaire en se liant à la kinase d'adhésion focale (*focal adhesion kinase*, FAK) et la protéine tyrosine phosphatase PTP-PEST (Zheng *et al.* 2009; Zheng *et al.* 2011). Également, Pin1 intervient dans la régulation du métabolisme du glucose et des lipides via son interaction avec le substrat-1 du récepteur d'insuline (*insulin receptor substrate-1*, IRS-1), la protéine kinase activée par l'AMP (*AMP-activated protein kinase*, AMPK) et le coactivateur transcriptionnel

pour le CREB (*CREB Regulated Transcription Coactivator 2*, Crtc2) (Nakatsu *et al.* 2010; Nakatsu *et al.* 2011; Nakatsu *et al.* 2015). En outre, cette PPIase est impliquée au niveau de la réponse aux stress cellulaires via la stabilisation de p53 et ses deux homologues p63 et p73 ainsi que par l'activation d'ataxia telangiectasia et la protéine liée à Rad3 (*ataxia telangiectasia and Rad3-related protein*, ATR), qui sont des protéines importantes dans le maintien de l'intégrité du génome (Wulf *et al.* 2002; Zacchi *et al.* 2002; Li *et al.* 2013; Hilton *et al.* 2015; Mantovani *et al.* 2015). Un rôle clé de Pin1 dans le maintien des fonctions cardiovasculaires et au niveau de l'ostéogenèse a été également décrit (Yoon *et al.* 2014; Nakatsu *et al.* 2016).

1.3.4.2 Pin1 au niveau tumoral

L'implication importante de Pin1 dans divers mécanismes intervenant dans l'oncogenèse et le développement tumoral, tel que discuté précédemment, lui confère un rôle crucial au niveau tumoral. Effectivement, il a été observé que la surexpression de Pin1 dans les cellules épithéliales mammaires non transformées mène à leur transformation en cellules malignes (Ryo *et al.* 2002). Par contre, l'inactivation génique de cette enzyme bloque la croissance des cellules cancéreuses du sein *in vivo* et *in vitro* (Ryo *et al.* 2002; Suizu *et al.* 2006). De plus, Pin1 a été démontrée pour être surexprimée dans plusieurs types de tumeurs, tels que le carcinome hépatocellulaire, le cancer du poumon non à petites cellules (CPNPC), le lymphome de Burkitt, le cancer du sein et la leucémie (Pang *et al.* 2006; Pang *et al.* 2007; Tan *et al.* 2010; Luo *et al.* 2014; Rustighi *et al.* 2014; Wei *et al.* 2015; Franciosa *et al.* 2016). Au niveau de ces tumeurs, le niveau élevé d'expression de Pin1 est souvent corrélé à un mauvais pronostic. Puisque de nombreuses études ont souligné l'importance de Pin1 dans la stimulation de diverses voies du cancer via l'activation de plus que 40 oncogènes et l'inactivation d'au moins 20 suppresseurs de tumeur, l'inhibition de cette PPIase constitue une stratégie thérapeutique intéressante dans le traitement de cette pathologie (Zhou & Lu 2016). En ce sens, une étude récente démontre que l'acide trans-rétinoïque (ATRA) agit comme agent thérapeutique efficace dans le traitement du cancer du sein et de la leucémie aiguë promyélocytaire (APL) en provoquant la dégradation de Pin1 (Wei *et al.* 2015).

Également, il a été suggéré que l'utilisation de l'antiparasitaire buparvaquone, qui cible Pin1, constitue une voie thérapeutique intéressante dans le traitement du cancer lié au parasite *Theileria* (Marsolier *et al.* 2015).

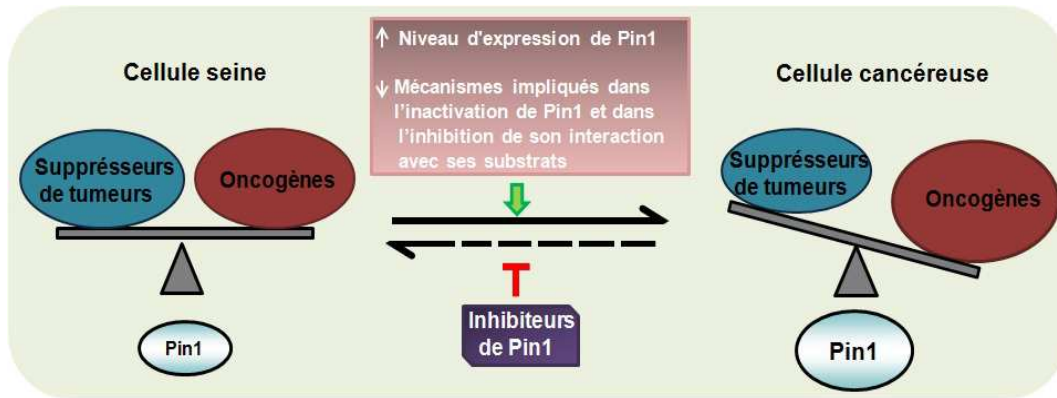


Figure 1.18: Effet de l'activation de Pin1 sur les oncogènes et les suppresseurs de tumeurs dans un contexte tumoral. L'augmentation du niveau d'expression et de l'activité de Pin1 a pour effet l'activation de plusieurs oncogènes et l'inactivation de différents suppresseurs de tumeurs, événements cruciaux dans le développement tumoral. *Illustré par M. Jalouli.*

Finalement, il est intéressant de mentionner qu'outre son rôle au niveau tumoral, l'isomérase Pin1 contribue à la pathogénèse de plusieurs autres maladies telles que l'hypertrophie cardiaque, l'athérosclérose, l'ostéoporose, le diabète, l'obésité et la stéatohépatite non-alcoolique (NASH) (Nakatsu *et al.* 2016).

Objectifs

En raison de l'importance du facteur de transcription HIF-1 dans le maintien de l'homéostasie cellulaire, de nombreux processus régulateurs interviennent afin de moduler son activité transcriptionnelle. Étant donné les conséquences néfastes d'une activation inadéquate de HIF-1 dans le développement de différentes maladies comme le cancer, l'élucidation de ces processus est d'un grand intérêt pour la compréhension de la régulation de ce facteur de transcription ainsi que pour l'élaboration des nouvelles stratégies thérapeutiques. D'ailleurs, depuis la découverte de HIF-1, les voies de sa régulation ont été largement étudiées. Cependant, les mécanismes moléculaires précis et détaillés de sa régulation ainsi que l'effet de cette régulation sur l'expression de ses gènes cibles, et par conséquent sur son rôle physio-pathologique, ne sont pas encore complètement élucidés. Les travaux présentés dans cette thèse visent à élargir et améliorer les connaissances actuelles sur la régulation du facteur de transcription HIF-1. De façon plus précise, nous nous sommes intéressés à caractériser les mécanismes impliqués dans la régulation transcriptionnelle et post-traductionnelle de la sous-unité HIF-1 α en conditions hypoxiques et non-hypoxiques.

Dans un premier temps, de nombreuses études ont démontré que l'isomérase Pin1 régule l'expression d'un gène cible de HIF-1, *VEGF* (Ryo et al., 2005; Kim et al., 2008). Sachant que la sous-unité HIF-1 α est phosphorylée par p42/p44 MAPK sur deux résidus sérines suivis par des prolines (Mylonis et al., 2006), qui constituent des motifs consensus pSer/Thr-Pro, nous avons donc émis l'hypothèse que Pin1 est un nouveau régulateur de l'activité transcriptionnelle du complexe HIF-1 en agissant directement sur sa sous-unité α . Ainsi, l'objectif de cette partie de thèse est d'évaluer l'implication de Pin1 dans l'isomérisation de la protéine HIF-1 α et de déterminer l'impact de cette régulation sur l'activité du facteur HIF-1 ainsi que sur l'expression de ses gènes cibles. *Les résultats de cette étude sont présentés dans le chapitre 2 et en annexe de cette thèse.*

Un deuxième mécanisme de régulation évoqué dans cette thèse concerne l'implication de Pin1 dans l'activation des régulateurs positifs de l'expression du gène *HIF-1A*, les facteurs de transcription Sp1 et Sp3. En effet, il a récemment été démontré que durant la mitose, la phosphorylation du facteur de transcription Sp1 sur Thr739, par

CDK1, permet son interaction avec Pin1, ce qui provoque son détachement de l'ADN, favorisant ainsi la condensation de la chromatine (Yang *et al.* 2014). De façon intéressante, la phosphorylation de ce même résidu par p42/p44 MAPK est aussi importante pour l'expression des gènes cibles du facteur Sp1. De même, le facteur Sp3 est également activé via la phosphorylation d'un motif consensus pour la liaison de Pin1, par p42/p44 MAPK. Mise ensemble, ces évidences nous ont permis d'envisager l'hypothèse qu'en affectant positivement l'activité des Sp1 et Sp3, Pin1 joue un rôle important au niveau de la transcription du gène *HIF1A*. Ainsi, notre objectif, dans un deuxième temps, consiste à évaluer le rôle de Pin1 dans la régulation positive de l'activité transcriptionnelle des facteurs Sp1 et Sp3 et à caractériser le mécanisme de régulation de Sp1/3 par Pin1, en accordant une attention particulière à l'impact de cette régulation sur la sous-unité HIF-1 α . *Le chapitre 3 présente les résultats de cette étude.*

Il est connu qu'en bloquant la voie de signalisation p42/p44 MAPK, les inhibiteurs de MEK1/2 régulent négativement l'activité du facteur HIF-1 sans affecter la stabilité de la sous-unité HIF-1 α . De façon surprenante, l'utilisation de PD184161, un inhibiteur de MEK1/2, a montré que celui-ci influence négativement l'induction non-hypoxique de la protéine HIF-1 α . Nous avons donc, dans un troisième temps, voulu caractériser le mécanisme d'action de PD184161 sur HIF-1 α . Pour cela, nous avons cherché à comprendre si PD184161 agissait par un mécanisme distinct de son potentiel répresseur sur p42/p44 MAPK et si l'effet de cet inhibiteur était spécifique à certains facteurs d'induction de HIF-1 α . Nous avons également évalué le rôle de PD184161 au niveau de la stabilité de la sous-unité HIF-1 α , plus précisément au niveau de sa dégradation protéosomale par l'axe PHD/pVHL. Pour finir, nous avons investigué l'effet de PD184161 sur la production de mtROS, un évènement important d'induction non-hypoxique de HIF-1 α , sur le niveau intracellulaire d'ascorbate, sur la dépolarisation du potentiel de la membrane mitochondriale ($\Delta\Psi_M$) ainsi que sur la production de l'ATP. *Les résultats de cette étude sont présentés dans le chapitre 4.*

Chapitre 2: The prolyl isomerase Pin1 regulates hypoxia-inducible transcription factor (HIF) activity

Maroua Jalouli^{a,1}, Marc-André C. Déry^{a,1}, Véronique N. Lafleur^a, Laurent Lamalice^a, Xiao Zhen Zhou^b, Kun Ping Lu^b and Darren E. Richard^{a,*}

^aCentre de recherche du CHU de Québec, L'Hôtel-Dieu de Québec, Department of Molecular Biology, Medical Biochemistry and Pathology, Université Laval, Québec, QC, G1R 3S3, Canada. ^bDepartment of Medicine, Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, Boston, Ma 02215, United States.

¹ Equal contributors.

Running head: Pin1 positively regulates HIF-1

Keywords: Hypoxia, HIF-1, VEGF, Pin1, Phosphorylation, Isomerase

Abbreviations: Bnip3, BCL2/Adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3; CoCl₂, cobalt chloride; GLUT1, glucose transporter 1; GST, glutathione S-transferase; HeLa, Human cervical carcinoma cell; HEK 293T, human embryonic kidney cell; HIF, hypoxia-inducible factor; HRE, hypoxic response element; MAPK, mitogen-activated protein kinase; ODDD, oxygen-dependent degradation domain; PFKFB4, 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase; PGK1, phosphoglycerate kinase 1; PHD, HIF prolyl-hydroxylase; PPIase, peptidyl-prolyl isomerase; pVHL, von Hippel-Lindau tumor suppressor protein; VEGF, vascular endothelial growth factor

Correspondence to: Darren E. Richard, darren.richard@crhdq.ulaval.ca

2.1 Avant-propos

Ce chapitre consiste en une étude de l'implication de l'isomérase Pin1 dans la régulation des HIF- α , qui a été publiée dans le journal *Cellular Signalling* en aout 2014. Cette étude est reproduite avec la permission des coauteurs et d'*Elsevier* (Copyright 2017, Elsevier).

Ce projet a été débuté par mon ancien collègue Marc-André C. Déry qui a étudié les caractéristiques de l'interaction entre Pin1 et HIF-1 α ainsi que l'effet de la déplétion de Pin1 sur l'activité du facteur HIF-1 et son gène cible *VEGF*. Lors de mon arrivée au laboratoire, je me suis intéressée à déterminer si Pin1 agit par isomérisation de HIF-1 α ainsi qu'au rôle de cette isomérisation sur HIF-1, en plus de poursuivre l'étude de la régulation de l'interaction entre ces deux protéines. Ainsi, mes travaux ont permis de démontrer que Pin1 régule l'activité de HIF-1 par isomérisation de sa sous-unité α , tout en permettant une régulation différentielle de ses gènes cibles.

Nos contributions à la réalisation et l'élaboration de cette étude ont été jugées équivalentes. J'ai conçu et réalisé les expériences présentées aux figures 2.1A, 2.2A, 2.4, 2.5C et 2.6. J'ai également rédigé la totalité du manuscrit, qui a été corrigé par Dr. Darren E. Richard, et effectué toutes les révisions. Pour sa part, Marc-André C. Déry a développé des outils moléculaires nécessaires pour cette étude, conçu et réalisé des expériences présentées aux figures 2.1B, 2.2B, 2.3, 2.5A-B et 2.6B. Véronique Lafleur a réalisé des travaux concernant HIF-2 qui sont présentés à la figure 2.1B et a participé à la correction du manuscrit. Laurent Lamalice a aidé à la conception de la figure 2.4 et aux révisions finales. Ce projet a été effectué en collaboration avec Dr Kun Ping et Xiao Zhen Zhou qui ont fourni certains outils moléculaires et lignées cellulaires en plus d'apporter leur expertise pour l'étude de Pin1. L'ensemble de cette étude a été réalisé sous la direction du Dr. Darren E. Richard.

Comme poursuite de ce projet, j'ai également effectué des expériences supplémentaires non publiées qui sont présentées aussi bien en annexe que dans le chapitre 5 de cette thèse.

2.2 Résumé

En contrôlant l'expression des gènes impliqués dans l'homéostasie de l'oxygène, le facteur induit par l'hypoxie 1 (HIF-1) joue un rôle décisif dans la survie et l'adaptation des cellules au stress hypoxique. L'activité du facteur HIF-1 est finement régulée par diverses modifications post-traductionnelles spécifiques de sa sous-unité essentielle HIF-1 α . Parmi ces modifications, la phosphorylation est importante pour l'activité transcriptionnelle de HIF-1. Des études ont montré que les protéines kinases activées par les mitogènes, p42/p44 MAPK, phosphorylent directement HIF-1 α et augmentent la transcription induite par HIF-1. Pin1, une peptidyl-prolyl cis/trans isomérase, reconnaît spécifiquement des protéines possédant des motifs phosphorylés pSer/pThr-Pro. L'isomérisation par Pin1 entraîne un changement de la conformation des protéines substrat, ce qui peut modifier leur activité. Ici, nous identifions Pin1 comme un partenaire important de HIF-1 α . Des études d'immunoprécipitation et de pull-down ont montré que Pin1 interagit avec HIF-1 α . Nous démontrons que l'interaction entre Pin1 et HIF-1 α est régulée par l'activation de la voie p42/p44 MAPK. En effectuant des études de protéolyse partielle, nos résultats indiquent que Pin1, par son activité catalytique, induit un changement de conformation de HIF-1 α . Finalement, notre travail montre que Pin1 est requise pour la régulation spécifique de l'activité transcriptionnelle de HIF-1 et de ses gènes cibles. Nos résultats indiquent que la prolyl isomérase Pin1 régule l'activité transcriptionnelle de HIF-1 en interagissant et en changeant la conformation de HIF-1 α d'une manière dépendante de sa phosphorylation par p42/p44 MAPK.

2.3 Abstract

Hypoxia-inducible transcription factor-1 (HIF-1) plays a decisive role in cell survival and adaptation to hypoxic stress by controlling the expression of genes involved in oxygen homeostasis. HIF-1 activity is fine-tuned through specific post-translational modifications of its essential HIF-1 α subunit. Amongst these modifications, phosphorylation is important for HIF-1 transcriptional activity. Studies have shown that the mitogen-activated protein kinases, p42/p44 MAPK, directly phosphorylate HIF-1 α and increase HIF-1-mediated transcription. Pin1, a peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerase, targets a number of proteins containing a phosphorylated Ser/Thr-Pro motif. Pin1 isomerization causes a change in target protein conformation which can modify their activity. Here, we identify Pin1 as an important HIF-1 α partner. Immunoprecipitation and pull-down studies show that Pin1 interacts with HIF-1 α . We demonstrate that the interaction between Pin1 and HIF-1 α is regulated through p42/p44 MAPK pathway activation. By performing proteolysis studies, our results indicate that Pin1 catalytic activity generates a conformational change in HIF-1 α . Finally, our work shows that Pin1 is required for gene-specific HIF-1 transcriptional activity. Our results indicate that the prolyl isomerase Pin1 regulates HIF-1 transcriptional activity by interacting with HIF-1 α and promoting conformational changes in a p42/p44 MAPK phosphorylation-dependent manner.

2.4 Introduction

Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) is a key regulator of oxygen homeostasis in mammalian cells. HIF-1 controls the expression of genes involved in cellular adaptive responses to low oxygen such as cell respiration, glucose metabolism, erythropoiesis and angiogenesis (Semenza 2003). The HIF-1 complex is formed following the interaction of a constitutive HIF-1 β subunit with a tightly regulated and post-translationally-modified HIF-1 α subunit (Wang & Semenza 1995). When cells are in the presence of oxygen, HIF-1 α is hydroxylated through the action of HIF prolyl hydroxylases (PHD). HIF-1 α hydroxylation allows the binding of pVHL, the product of the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene. As the recognition component of an E3 ubiquitin ligase complex, pVHL allows for HIF-1 α polyubiquitination and subsequent proteasomal degradation (Kaelin & Ratcliffe 2008). When oxygen levels are decreased, hydroxylation of HIF-1 α is impeded, resulting in HIF-1 α subunit stabilization and formation of the HIF-1 transcription complex.

Maximal HIF-1 activation requires further HIF-1 α protein modification and interaction with diverse co-activators (Greer *et al.* 2012). Direct phosphorylation of HIF-1 α is essential for full HIF-1 activity and different HIF-1 α -targeting protein kinases have been described (Minet *et al.* 2001). Among suggested HIF-1 α kinases, p42/p44 mitogen-activated protein kinases (MAPK) can directly phosphorylate HIF-1 α and increase the transcriptional activity of the HIF-1 complex (Richard *et al.* 1999; Lauzier *et al.* 2007). This phosphorylation occurs on two serine residues, Ser641 and Ser643 (Mylonis *et al.* 2006). However, the mechanism behind enhanced HIF-1 transactivation by p42/p44 MAPK phosphorylation remains to be fully elucidated.

Pin1 is a peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerase containing an N-terminal WW domain isomerization which specifically binds proteins containing proline residues preceded by a phosphorylated serine or threonine residue (pSer/Thr-Pro) (Lu & Zhou 2007). Catalyzed through a C-terminal peptidyl-prolyl isomerase (PPIase) domain, Pin1 changes the structure of its substrates between two distinct *cis* and *trans* conformations (Lu *et al.* 1996). Pin1 plays an important role in regulating the subcellular localization, stability, protein interactions or phosphorylation status of targeted substrates. Additionally, Pin1

has been shown to regulate the function of diverse transcription factors including p53, β -catenin, NF- κ B and Stat3 (Ryo *et al.* 2001; Wulf *et al.* 2002; Ryo *et al.* 2003; Lufei *et al.* 2007).

In the present study, we show that HIF-1 α interacts with Pin1. We demonstrate that HIF-1 α phosphorylation by the p42/p44 MAPK pathway is important for this interaction. Furthermore, our studies indicate that Pin1 promotes HIF-1 α conformational changes through its prolyl-isomerase activity. Finally, we show that the transcriptional activity of HIF-1 and the expression of target genes are selectively regulated by Pin1. Taken together, our studies identify Pin1 as an important regulator of the HIF-1 transcription factor.

2.5 Materials and methods

Materials

Cobalt chloride (CoCl₂), PD98059 and subtilisin A were from Sigma-Aldrich (St-Louis, MO). LipofectamineTM 2000 was from Life Technologies / Invitrogen (Grand Island, NY). γ -phosphatase and p42 MAPK were from New England Biolabs (Ipswich, MA). Polyclonal anti-HIF-1 α and anti-HIF-2 α antibodies were raised in our laboratory in rabbits immunized against the last 20 amino acids of the C-termini of each human protein (Richard *et al.* 1999; Lauzier *et al.* 2008). Anti-HIF-1 α used in proteolysis assays and anti-glutathione S-transferase (GST) antibody were from Novus Biologicals (Littleton, CO). Polyclonal anti-Pin1 antibody was from Cell Signaling Technology (Danvers, MA). Monoclonal anti-phospho-p42/p44 MAPK, anti- α -tubulin and anti-FLAG antibodies were from Sigma-Aldrich. Polyclonal p42/p44 MAPK antibody was from EMD Millipore/Upstate (Billerica, MA). Horseradish peroxidase-coupled anti-mouse and anti-rabbit antibodies were from Promega (Madison, WI). Wild-type human FLAG-Pin1 and GST-Pin1 plasmids were previously described (Shen *et al.* 1998). Mutant FLAG-Pin1K63A and GST-Pin1K63A (catalytically inactive) plasmids were constructed using QuikChange[®] site-directed mutagenesis (Agilent, Santa Clara, CA). Wild-type human FLAG-HIF-1 α plasmid was previously described (Richard *et al.* 1999). Mutant plasmids HIF-1 α S641A, HIF-1 α S643A and the double mutant HIF-1 α SDMA were also constructed by site-directed mutagenesis. HIS-HIF-1 α plasmid was constructed by amplifying the human HIF-1 α gene from the FLAG-HIF-1 α plasmid by PCR using specific primers bearing NdeI and BamHI sites. The PCR product was cloned into pET16b (EMD Millipore/Novagen) to generate pET16b-HIF-1 α . HIS-HIF-1 α protein was purified using a Talon column (BD Biosciences, Palo Alto, CA, USA) and FPLC as previously described (Ploquin *et al.* 2007). pGL3(R2.2)3HRE-tk-LUC luciferase reporter vector was previously described (Lauzier *et al.* 2007). *Renilla reniformis* luciferase expression plasmid was from Promega.

Cell culture

Human cervical carcinoma (HeLa) and human embryonic kidney (HEK 293T) cells were from the American Type Culture Collection. Pin1^{+/+} and Pin1^{-/-} mouse embryonic fibroblast cells (MEF) were previously described (Fujimori *et al.* 1999). NIH 3T3 cells stably expressing the 3HRE-tk-LUC luciferase reporter (NIH 3T3 HIF-Luc cells) were from Affymetrix / Panomics (Santa Clara, CA). Cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) and supplemented with antibiotics (50 U/mL penicillin and 50 µg/mL streptomycin) and 2 mM glutamine (Life Technologies). Cells were cultured in a humid atmosphere (5% CO₂, 95% air) and were serially passaged upon reaching confluence. Quiescent cells were obtained by total deprivation of serum for 16 h. Hypoxic conditions were obtained by placing cells in a sealed hypoxic workstation (Ruskin Technology, Bridgend, UK). The oxygen level in this workstation was maintained at 1%, with the residual gas mixture containing 94% nitrogen and 5% CO₂.

Western blot analysis

Cells were lysed in a 2× Laemmli sample buffer. Protein concentration was determined by Lowry assay. Samples were resolved on SDS-polyacrylamide gels and electrophoretically transferred to polyvinylidene difluoride membranes (PVDF, Immobilon-P; Millipore Corporation, Billerica, MA) or nitrocellulose membranes (Hybond C Extra; GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ). Proteins were analyzed using indicated antibodies and visualized with enhanced chemiluminescence (ECL) system (GE Healthcare Life Sciences) or with the Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE). Western blots were quantitated using LI-COR Image Studio software 2.0 (LI-COR Biosciences). For Western blot studies, results are representative of at least three independent experiments.

RNA silencing

Cells were seeded in 60 mm plates. 24 h after plating, small interfering RNA (siRNA) oligonucleotides were transfected by calcium phosphate (CaPO₄) precipitation. 16 h after transfection, the medium was changed, and the cells were allowed to recover. 48 h post-transfection, cells were treated and harvested. Ambion® siRNA duplexes were obtained from Life Technologies / Applied Biosystems and the specific sequences used are as follows: human Pin1 (accession no. NM_006221; sense: 5'-UUUGCCACCACUGCUGCUGuu-3'), human HIF-1 α (accession no. NM_001530; sense: 5'-AGGACAAGUCACAACAGGAuu-3'), human HIF-2 α (accession no. NM_001430; sense: 5'-GGGUCAGGUAGUAAGUGGCuu-3'). As a control, Ambion® *Silencer Negative Control #2* siRNA was used (Life Technologies / Applied Biosystems).

Luciferase assay

Cells, seeded in 6-well plates, were transfected by calcium phosphate precipitation with pGL3 (R2.2) 3HRE-tk-LUC luciferase reporter vector (500 ng/well). *Renilla reniformis* luciferase expression vector (25 ng/well) was used as a control for transfection efficiency. NIH 3T3 HIF-Luc cells were transfected by Lipofectamine 2000 (Life Technologies). In experiments using NIH 3T3 HIF-Luc cells, total protein levels were determined and used to normalize samples. 48 hours post-transfection, cells were exposed to hypoxic conditions for 6 hours and luciferase assays were performed using the Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega). Results were quantified using a Luminoskan Ascent microplate reader with integrated injectors (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Results are expressed as a ratio of firefly luciferase activity over *Renilla reniformis* luciferase activity or total protein levels. Experiments are an average \pm SEM of three independent experiments performed in triplicate.

GST pull-down assay

Nuclear extracts were prepared as previously described (Semenza & Wang 1992). Nuclear extracts (100 μ g) were incubated with GST or wild-type human GST-Pin1 fusion

protein (45 μ g) coupled to glutathione-Sepharose 4B beads (GE Healthcare Life Sciences) for 2 h at 4°C with rotation in GST buffer (50 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 10% glycerol, 1% Triton X-100, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 100 mM NaF, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM DTT, 0.5 μ g/ml leupeptin, 1 μ g/ml pepstatin, 0.2 mM PMSF). Samples were washed with GST buffer and denatured in 2 \times Laemmli sample buffer. Samples were resolved in SDS-polyacrylamide gels and revealed by Western blot analysis with specific antibodies as indicated.

Immunoprecipitation

Total cell extracts (1 mg) were incubated with anti-HIF-1 α in IP buffer (0.5% NP-40, 0.5% Triton X-100, 150 mM NaCl, 50 mM Tris HCl pH 7.4, 1 mM EDTA, 50 mM NaF, 1 mM B-glycerophosphate, 1 mM sodium orthovanadate, 0.5 μ g/ml leupeptin, 1 μ g/ml pepstatin, 0.2 mM PMSF). Extracts were left overnight at 4°C with rotation before the addition of 50 μ l protein G magnetic beads (Life Technologies) for 1 h at 4°C. Magnetic beads were then washed three times with IP buffer and suspended in 2 \times Laemmli sample buffer. Samples were resolved in SDS-polyacrylamide gels and revealed by Western blot analysis with specific antibodies as indicated.

HIF-1 α dephosphorylation and phosphorylation

HIF-1 α dephosphorylation and phosphorylation assays were performed on nuclear extracts using endogenous HIF-1 α as a substrate. Phosphatase buffer (supplied by the manufacturer) was added to extracts and incubated with γ -phosphatase (New England Biolabs) for 1 hour at 30°C. γ -phosphatase was then heat inactivated for 1 hour at 65°C. Kinase reaction buffer (supplied by the manufacturer) was added to extracts and incubated with or without active recombinant p42 MAPK (New England Biolabs) for 1 h at 30°C. Samples were then used in GST-Pin1 pull-down assays described above.

Subtilisin proteolysis assay

Purified HIS-HIF-1 α was subjected to phosphorylation by active recombinant p42 MAPK (New England Biolabs) for 1 h at 30°C in kinase reaction buffer (supplied by the manufacturer). Phosphorylated HIS-HIF-1 α was then incubated with either GST-Pin1 or GST-Pin1K63A in 50 mM HEPES pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM DTT with phosphatase inhibitors in the presence of indicated concentrations of subtilisin A for 5 min at 5°C. For experiments using endogenous HIF-1 α , 100 μ g of total cell extracts from CoCl₂-treated Pin1^{+/+} and Pin1^{-/-} MEF were incubated with indicated concentration of subtilisin A for 10 min at 5°C. All reactions were stopped with 2 \times Laemmli sample buffer containing 6 M urea. Samples were then resolved in SDS-polyacrylamide gels and revealed by Western blot analysis with anti-HIF-1 α antibodies.

Real-time qRT-PCR

HeLa cells were lysed with TRizol reagent. RNA and protein were extracted according to the manufacturer's protocol (Life Technologies). Reverse transcription (RT) was performed using the qScript cDNA SuperMix kit (Quanta Biosciences Inc., Gaithersburg, MD). Real-time qPCR analysis was performed on a Stratagene MX3005P (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) using Perfecta SYBR Green SuperMix, Low ROX kit according to the manufacturer's protocol (Quanta BioSciences). Real-Time qRT-PCR primers used in this study are outlined in Table 1. The expression of the gene of interest relative to HPRT, used as a reference gene, was calculated based on the threshold cycle (Ct) using the Pfaffl formula (Pfaffl 2001). HPRT stability was assessed using geNorm (www.biogazelle.com). Experiments are an average \pm SEM of at least three independent experiments.

Tableau 2. 1: Primers used for real time RT-PCR.

Gene:	Sequence:
GLUT1 fwd	5'-TCATGGGCAACAAGGACC-3'
GLUT1 rev	5'-GCTTCTTTAGCACACTCTTGG-3'
PGK1 fwd	5'-GCTTCTGGGAACAAGGT-3'
PGK1 rev	5'-CTTCTGTGGCAGATTGACTC-3'
VEGF fwd	5'-TACTGCCATCCAATCGAGAC-3'
VEGF rev	5'-GCATGGTGATGTTGGACT-3'
PFKFB4 fwd	5'-ATGGGCTGAGGTGTAGCTGA-3'
PFKFB4 rev	5'-TATTTATTGCAAAGAATGCTGGA-3'
BNIP3 fwd	5'-GATGATATTGAAAGAAGGAAAGAAGTTG-3'
BNIP3 rev	5'-GTTCCCTCATGCTGAGGG-3'
HPRT fwd	5'-CAGTCCCAGCGTCGTGATTAGT-3'
HPRT rev	5'-ATCCAGCAGGTCAGCAAAGAAC-3'

Statistical analysis

Statistical analyses of different experiments were performed using InStat (www.graphpad.com). Unless otherwise noted, one-way ANOVA tests were performed. Results were deemed significant if they attained a 95% confidence level ($P < 0.05$).

2.6 Results

2.6.1 Pin1 interacts with HIF-1 α

Initial analysis of the human HIF-1 α amino acid sequence indicated that this subunit contained potential Pin1 consensus motifs (pSer-Pro). In order to determine whether Pin1 and HIF-1 α are able to interact in human cells, we first performed co-immunoprecipitation (IP) assays. As seen in Figure 2.1A, endogenous Pin1 bound HIF-1 α when cells were treated with cobalt chloride (CoCl₂), a known HIF-1 α inducer in oxygenated conditions. Interaction between Pin1 and HIF-1 α was also observed using GST pull-down assays with a Pin1-GST fusion protein under both hypoxic conditions and CoCl₂ treatment (Figure 2.1B). Since HIF-1 α and HIF-2 α share strong sequence homology, we examined whether Pin1 could also bind HIF-2 α . Pin1 bound HIF-2 α in similar manner to HIF-1 α in the Pin1-GST pull-down assay (Figure 2.1B). These results indicate that Pin1 interacts with the two main HIF complexes, HIF-1 and HIF-2.

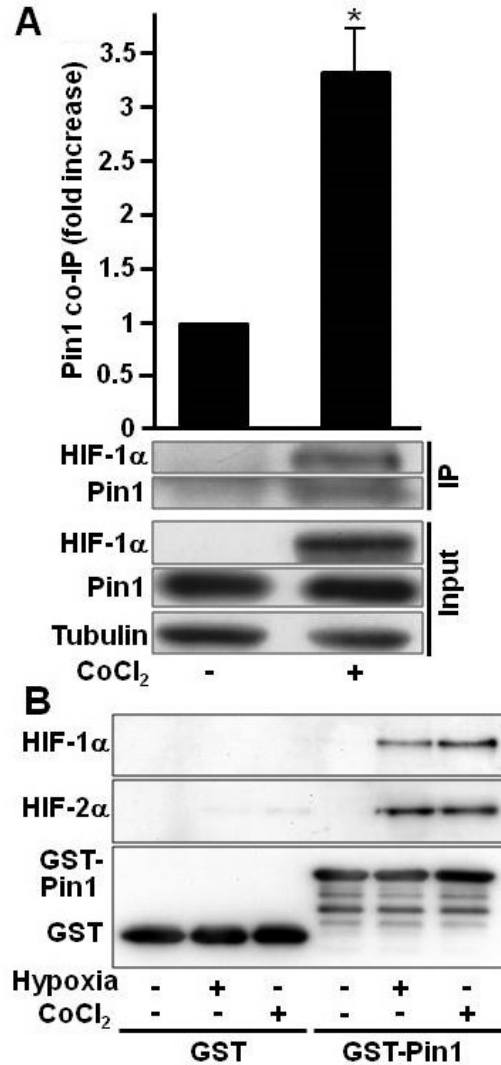


Figure 2.1: Pin1 interacts with HIF-1 α . (A) HeLa cells were treated with or without 200 μ M cobalt chloride (CoCl₂) for 2 hours. Total cell extracts were immunoprecipitated with anti-HIF-1 α and resolved by SDS-PAGE. Western blots were performed by using the indicated antibodies on either immunoprecipitated proteins (IP) or total cellular protein (Input). Western blot experiments were quantified (upper panel) with the Odyssey Infrared Imaging System using α -tubulin as a loading control. Results are expressed as a ratio of the amount of co-immunoprecipitated Pin1 protein to the amount of Pin1 protein available for co-immunoprecipitation (Input). *P<0.05 as compared to cells not treated with CoCl₂. (B) HEK 293T were pretreated or not with CoCl₂ (200 μ M) or hypoxia (1% O₂) for 4 hours. Nuclear extracts were incubated with GST (lanes 1-3) or wild-type human GST-Pin1 (lanes 4-6). Precipitates were resolved by SDS-PAGE and Western blotted with antibodies against HIF-1 α (top panel), HIF-2 α (middle panel) and GST (bottom panel).

2.6.2 Phosphorylation and the p42/p44 MAPK pathway regulate Pin1's interaction with HIF-1 α

As mentioned above, Pin1 recognizes a proline residue which is preceded by a phosphorylated serine or threonine (Wulf *et al.* 2005). HIF-1 α was shown to be phosphorylated by p42/p44 MAPK on two specific serine residues (Mylonis *et al.* 2006). We therefore decided to examine whether HIF-1 α phosphorylation by p42/p44 MAPK was essential for its interaction with Pin1. Firstly, cells were pretreated with PD98059, an inhibitor of p42/p44 MAPK activation, and the interaction between Pin1 and HIF-1 α was determined by co-IP assays. As seen in Figure 2.2A, PD98059 treatment decreased the binding of Pin1 to HIF-1 α . Additionally, we obtained similar results using the Pin1-GST pull-down assay (Figure 2.2B).

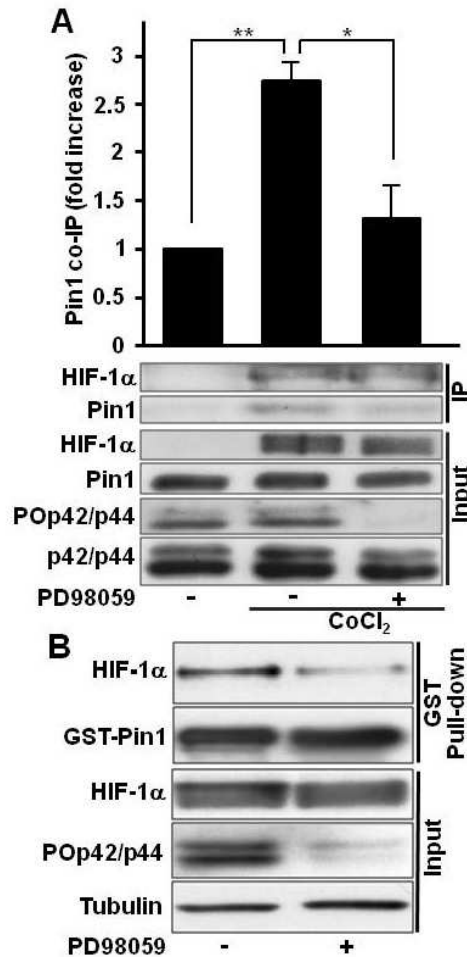


Figure 2.2: p42/p44 MAPK pathway activation is required for Pin1 to interact with HIF-1 α . (A) Quiescent HeLa cells were pretreated or not with PD98059 (50 μ M) for 20 min and then treated with or without CoCl₂ (200 μ M) for 2 hours. Total cell extracts were immunoprecipitated with anti-HIF-1 α and resolved by SDS-PAGE. Western blots were performed by using the indicated antibodies on either immunoprecipitated proteins (IP) or total cellular protein (Input). POP42/p44 indicates an antibody against phosphorylated p42/p44 MAPK while p42/p44 indicates and antibody against total p42/p44 MAPK. Western blot experiments were quantified (upper panel) with the Odyssey Infrared Imaging System using α -tubulin as a loading control. Results are expressed as a ratio of the amount of co-immunoprecipitated Pin1 protein to the amount of Pin1 protein available for co-immunoprecipitation (Input). **P<0.01, *P<0.05 as compared to the conditions indicated. (B) Hela cells were pretreated with PD98059 (50 μ M) for 15 minutes and then treated with CoCl₂ (200 μ M) for 2 hours. Nuclear extracts were incubated with GST-Pin1. GST-Pin1 precipitated proteins (GST pull-down) or total nuclear protein (Input) were resolved by SDS-PAGE and Western blotted with antibodies against HIF-1 α , phosphorylated p42/p44 MAPK (POP42/p44), α -tubulin and GST.

Secondly, to further investigate the importance of p42/p44 MAPK activity for the interaction between Pin1 and HIF-1 α , HIF-1 α phosphorylation assays were performed followed by Pin1-GST pull-down studies. Endogenous HIF-1 α from cells was dephosphorylated with γ -phosphatase, a nonspecific protein phosphatase, and re-phosphorylated with active recombinant p42 MAPK (Figure 2.3A). Equal amounts of dephosphorylated and phosphorylated HIF-1 α were then used in a Pin1-GST pull-down assay. Interestingly, HIF-1 α phosphorylation with p42 MAPK increased the interaction between Pin1 and HIF-1 α (Figure 2.3B). The two specific HIF-1 α residues which are phosphorylated by p42/p44 MAPK pathway activation, Ser⁶⁴¹ and Ser⁶⁴³, are both Pin1 consensus motifs (pSer-Pro). We therefore investigated the importance of these residues for Pin1 binding to HIF-1 α . We created mutant HIF-1 α constructs in which either Ser⁶⁴¹ or Ser⁶⁴³ were substituted for alanine (S641A or S643A, respectively) and a double mutant construct in which both serine residues were mutated (SDMA). Cells were transfected with either wild-type or mutant HIF-1 α constructs. Pin1 binding to HIF-1 α was analyzed using the Pin1-GST pull-down assay. As seen in Figure 2.3C, the interaction of Pin1 with the double SDMA HIF-1 α mutant was strongly decreased as compared to wild-type HIF-1 α or S641A and Ser643A mutants. These findings demonstrate that both Ser⁶⁴¹ and Ser⁶⁴³ are necessary for the interaction between Pin1 and HIF-1 α . Taken together, our results indicate that HIF-1 α phosphorylation on Ser⁶⁴¹ and Ser⁶⁴³ during p42/p44 MAPK pathway activation is important for the interaction between Pin1 and HIF-1 α .

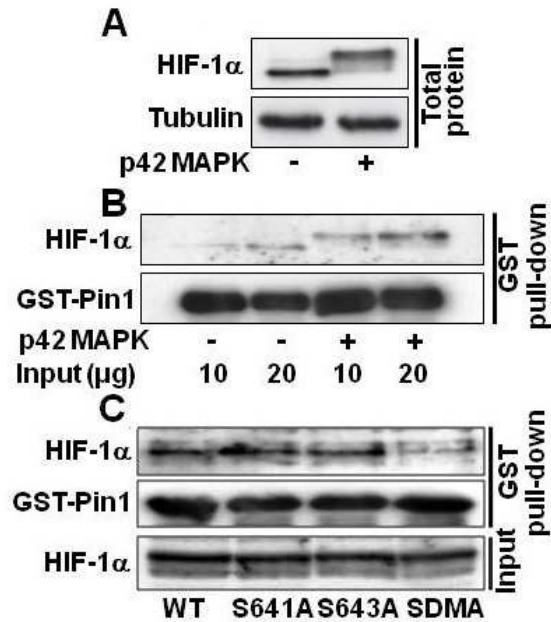


Figure 2.3: HIF-1 α phosphorylation by p42/p44 MAPK is required for interaction with Pin1. (A) HEK 293T cells were pretreated with CoCl₂ (200 μ M) for 4 hours. Nuclear extracts were incubated with γ -phosphatase followed by an incubation or not with active p42 MAPK. Samples were resolved by SDS-PAGE and Western blotted with antibodies against HIF-1 α and α -tubulin. (B) Extracts (10 μ g or 20 μ g) were then incubated with GST-Pin1. GST-Pin1 precipitated proteins (GST pull-down) were resolved by SDS-PAGE and Western blotted with antibodies against HIF-1 α and GST. (C) HEK 293T cells were transfected with wild-type FLAG-HIF-1 α , HIF-1 α S641A, HIF-1 α S643A or the double mutated HIF-1 α SDMA. 48 hours post-transfection, cells were treated with 200 μ M CoCl₂ for 2 hours. Nuclear extracts were then incubated with GST-Pin1 fusion protein. GST-Pin1 precipitated proteins (GST pull-down) or total nuclear protein (Input) were resolved by SDS-PAGE and Western blotted with antibodies against the FLAG epitope (HIF-1 α constructs) and GST.

2.6.3 Pin1 changes HIF-1 α conformation

We next wanted to determine whether Pin1 induces changes in HIF-1 α conformation. Since conformational changes can hide or expose protease cleavage sites in proteins, we used a partial proteolysis assay to perform these experiments (Zacchi *et al.* 2002). Cell extracts from Pin1 knock-out (Pin1^{-/-}) and Pin1 wild-type (Pin1^{+/+}) mouse embryonic fibroblast cells (MEF) were incubated with increasing concentrations of the endoproteinase, subtilisin. Protease digestion patterns were observed by immunoblotting using a mixture of HIF-1 α antibodies which target different HIF-1 α sequence regions. As seen in a representative Western blot, results showed differences in subtilisin-dependent HIF-1 α digestion products between Pin1^{+/+} and Pin1^{-/-} cells (Figure 2.4A). 5 HIF-1 α digestion products (p1-p5) are highlighted in the right panels of Figure 2.4A. Results showed higher (p1, p2, p3 and p5) or lower (p4) levels of the product in subtilisin-treated Pin1^{-/-} cell extracts when compared with Pin1^{+/+} cell extracts. These results indicate that the presence of Pin1 can modify HIF-1 α degradation and therefore, conformation. This is especially apparent when extracts were treated with 0.25ng/ μ l of subtilisin. In order to determine whether Pin1 isomerization activity modified HIF-1 α conformation we performed a proteolysis assay using an inactive PPIase Pin1 mutant (K63A) (Tun-Kyi *et al.* 2011). Purified recombinant HIS-HIF-1 α was incubated with wild-type Pin1 or catalytically K63A Pin1 mutant prior to incubation with subtilisin. Protease digestion patterns were observed by immunoblotting. As observed in Figure 2.4B, results showed differences in subtilisin-dependent HIF-1 α digestion products between wild-type Pin1 and inactive Pin1K63A. Undigested HIS-HIF-1 α (HIF) and 3 HIF-1 α digestion products (p1-p3) are highlighted in the right panels of Figure 2.4B. Firstly, the level of undigested HIF-1 α was decreased in the presence of Pin1K63A ($65.2 \pm 0.1\%$ as compared to Pin1). Secondly, results showed decreased levels of all three digestion products in the presence of Pin1K63A (p1, $69.1 \pm 0.3\%$ as compared to Pin1; p2, $39.4 \pm 0.1\%$ as compared to Pin1; p3, $61.8 \pm 0.1\%$ as compared to Pin1). This is especially apparent when extracts were treated with 0.025ng/ μ l of subtilisin. It is important to note that unphosphorylated a recombinant HIS-HIF-1 α did not show differences in subtilisin-dependant HIF-1 α digestion products between wild-type Pin1 and inactive Pin1K63A (results not shown).

Taken together, these results indicate that Pin1 PPIase activity can promote HIF-1 α conformational changes.

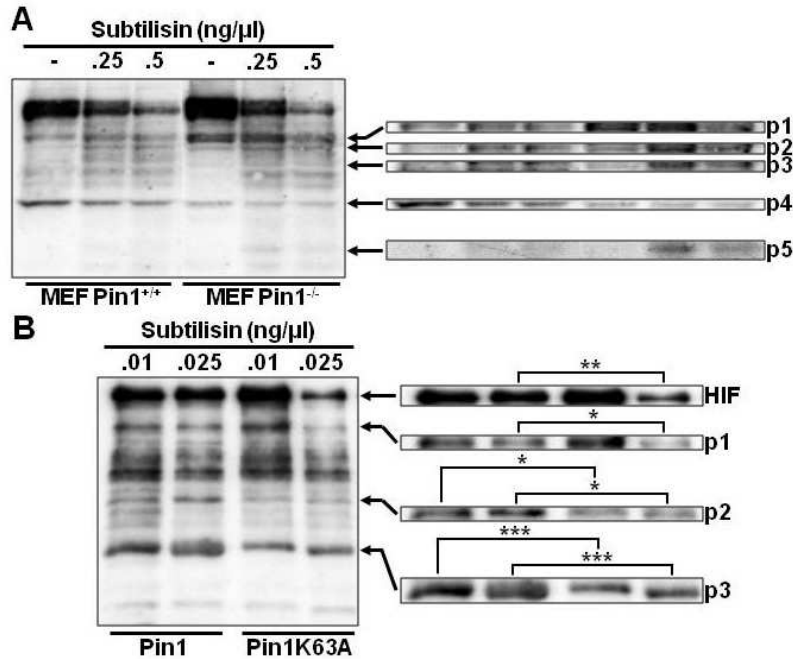


Figure 2.4: The catalytic activity of Pin1 generates a conformational change in HIF-1 α . (A) Subtilisin proteolysis was performed on total extracts (100 μ g) from MEF cells from wild-type animals (MEF Pin1^{+/+}) or Pin1 knockout animals (MEF Pin1^{-/-}) treated with CoCl₂ (200 μ M) for 2 hours. Proteolytic fragments were then resolved by SDS-PAGE and Western blotted using an anti-HIF-1 α antibodies. Arrows indicate changes of HIF-1 α digestion products between Pin1^{+/+} and Pin1^{-/-} cells. The right panel shows variations in selected digestion products. A brightness and contrast level for each digestion product was adjusted individually. These results are representative of three independent experiments. (B) Purified and phosphorylated HIS-HIF-1 α was incubated with either wild-type GST-Pin1 (Pin1; lanes 1 and 2) or catalytically inactive GST-Pin1 (Pin1K63A; lanes 3 and 4) followed by treatment with subtilisin (0.01 or 0.025 ng/ μ l). Proteolytic fragments were analyzed by SDS-PAGE and Western blotted using anti-HIF-1 α antibodies. Arrows indicate changes of HIF-1 α digestion products between Pin1 and Pin1K63A conditions. The right panel shows variations in selected digestion products. The intensity of each product was quantified with the Odyssey Infrared Imaging System and each band from Pin1K63A samples was normalized relative to its reciprocal condition in Pin1 samples. Results are an average \pm SEM of at least three independent experiments. ***P<0.001, **P<0.01, *P<0.05, as compared to the conditions indicated.

2.6.4 Pin1 regulates HIF-1 transcriptional activity

We next wanted to determine whether Pin1 activity is required for HIF-1 transcriptional activity. We first evaluated the effects of Pin1 depletion on HIF-1 transcriptional activity by using a luciferase reporter assay. A siRNA targeting Pin1 (siPin1) or a control siRNA (siCtrl) were transfected along with a HIF-1-responsive luciferase reporter construct (pGL3 (R2.2) 3HRE-TK) in cells prior to treatment in hypoxic conditions (1% O₂). As seen in Figure 2.5A, hypoxia strongly increased HRE reporter activity in siCtrl-transfected cells, as compared to control conditions (20.9% O₂). However, increased HRE reporter activity during hypoxia was blocked in siPin1-transfected cells as compared to siCtrl-transfected cells. Similar results were also obtained in Pin1^{-/-} or Pin1^{+/+} MEF cells (Figure 2.5B). These findings indicate that Pin1 is important for HIF-1-mediated transcriptional activity. To determine the importance of Pin1 catalytic activity for HIF-1 transcriptional activation, HRE reporter assays were performed using the inactive Pin1 K63A mutant. Cells stably expressing a HIF-1-responsive luciferase reporter construct were transfected with HIF-1 α and either wild-type Pin1 or the K63A Pin1 mutant. As expected, cells transfected with only HIF-1 α or wild-type Pin1 showed increased reporter activity as compared to control conditions (Figure 2.5C). More interestingly, cells co-transfected with both HIF-1 α and wild-type Pin1 showed strikingly enhanced HIF-1-dependent reporter activity. Finally, cells co-transfected with both HIF-1 α and K63A Pin1 mutant showed no significant increase in reporter activity. These results indicate that Pin1 isomerization promotes HIF-1 transcriptional activity.

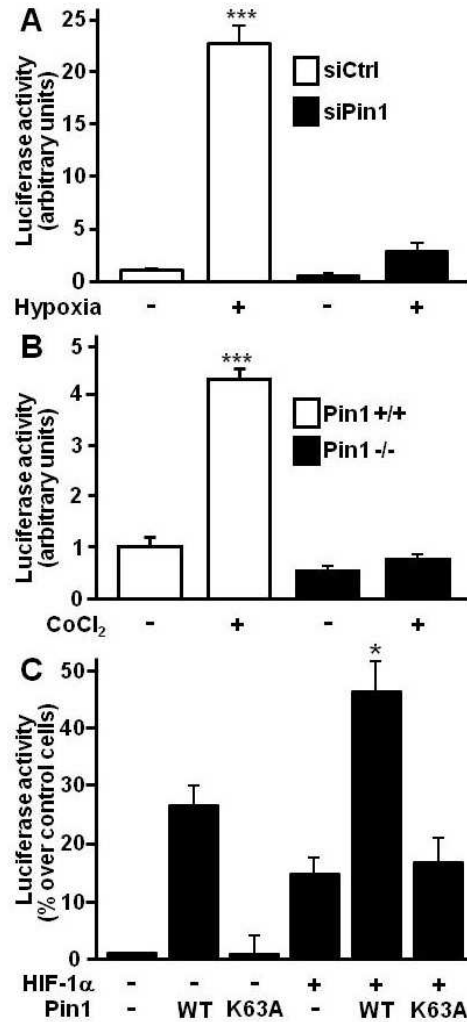


Figure 2.5: Pin1 positively regulates HIF-1 transcriptional activity. (A) HEK 293T cells transfected with a control siRNA (siCtrl) or a siRNA against Pin1 mRNA (siPin1) or (B) MEF cells with wild-type Pin1 (Pin1^{+/+}) or knockout for Pin1 (Pin1^{-/-}) were transfected with 500 ng of pGL3(R2.2)3HRE-tk-LUC luciferase reporter vector and 50 ng of Renilla reniformis luciferase expression vector. 48 hours post-transfection, cells were maintained under control conditions, hypoxic conditions (1% O₂) or pretreated with CoCl₂ (200 μM) for 6 hours. Cells were lysed and luciferase activity was measured. Results are expressed as a ratio of firefly luciferase activity to R. reniformis luciferase activity. (C) NIH3T3 cells containing a luciferase reporter gene driven by 3 HRE sequences were transfected with wild-type HIF-1α (HIF-1α), wild-type Pin1 (Pin1), catalytically inactive Pin1K63A (K63A) or pCDNA3 plasmids (-). 48 hours post-transfection, cells were lysed and luciferase activity was measured. Results are expressed as a ratio of firefly luciferase activity to total protein level. All results are an average ± SEM of three independent experiments performed in triplicate. ***P<0.001 and *P<0.05 as compared to control transfected cells.

Finally, we wanted to determine the importance of Pin1 for HIF-dependent gene expression. For these assays, we evaluated the effect of Pin1 depletion on the expression of known HIF target genes, such as BCL2/adenovirus E1B interacting protein 3 (BNIP3), glucose transporter 1 (GLUT1), 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 4 (PFKFB4), phosphoglycerate kinase 1 (PGK1) and vascular endothelial growth factor (VEGF). Cells were transfected with siCtrl, siPin1 or siRNAs targeting HIF-1 α and HIF-2 α (siHIF) prior to treatment in hypoxic conditions (Figure 2.6A). As expected, the expression of these selected HIF target genes was increased under hypoxia in siCtrl-transfected cells and this increase was blocked in siHIF-transfected cells (Figure 2.6A). More importantly, the expression of HIF-dependent VEGF, GLUT1 and PGK1 mRNA was markedly decreased in siPin1-transfected cells as compared to siCtrl-transfected cells (Figure 2.6B and C). Interestingly, Pin1 depletion had no effect on HIF-dependent PFKFB4 and BNIP3 expression (Figure 2.6D). Taken together, our results indicate that Pin1 can selectively modulate certain HIF-target genes in an isomerization dependent manner.

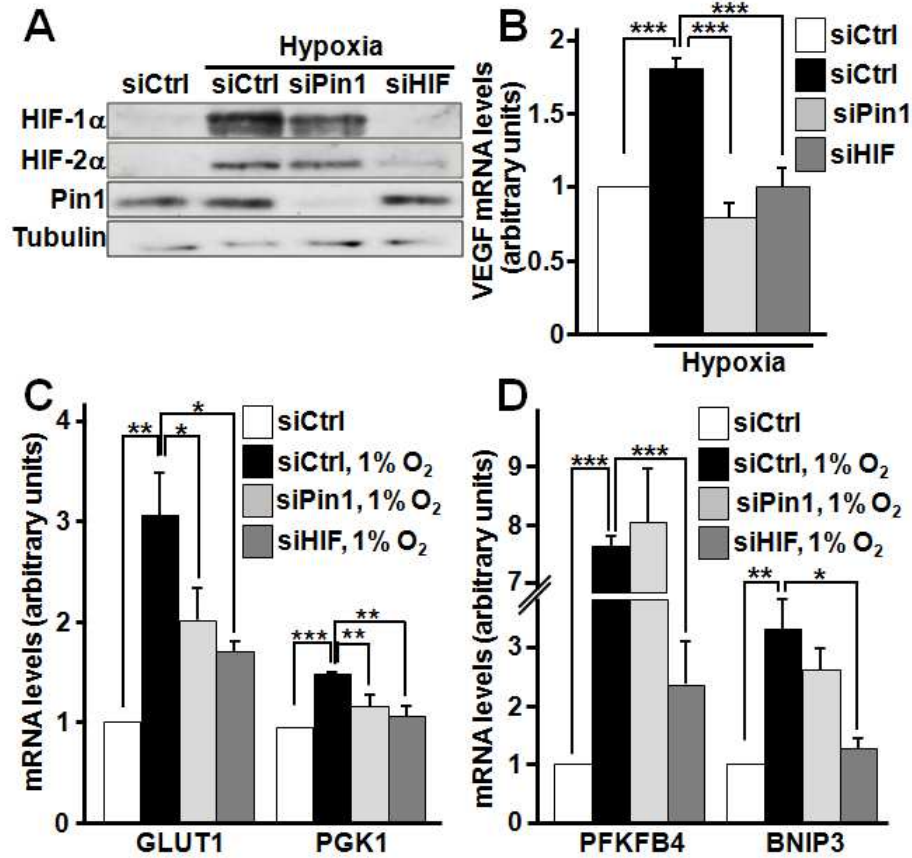


Figure 2.6: Pin1 is required for gene-specific HIF-1 transcriptional activity. HeLa cells were transfected with a control siRNA (siCtrl), siRNA against Pin1 mRNA (siPin1) or siRNAs against both HIF-1 α and HIF-2 α (siHIF). 48 hours after transfection, cells were maintained under either control conditions or hypoxic conditions (1% O₂) for 6 hours prior to total RNA and protein extraction. (A) Protein samples were Western blotted with antibodies against HIF-1 α , HIF-2 α , Pin1 and α -tubulin. Real-time PCR was performed using VEGF (B), GLUT1 and PGK1 (C), PFKFB4 and BNIP3 (D) oligonucleotides. HPRT was used as a reference gene. Results are an average \pm SEM of at least three independent experiments. ***P<0.001, **P<0.01, *P<0.05 as compared to the conditions indicated.

2.7 Discussion

Pin1 is an essential regulator of several cellular processes, including tumor cell progression. Through its direct interaction with phosphorylated target proteins and its prolyl isomerase activity, Pin1 is involved in the regulation of transcription factors shown to play important roles in cancer (Lu & Zhou 2007). Interestingly, Pin1 was previously shown to regulate VEGF expression (Ryo *et al.* 2005; Lv *et al.* 2013). Evidence has also suggested that Pin1 activates VEGF expression by affecting HIF-1 activity (Kim *et al.* 2008; Kim *et al.* 2009). Quercetin and Amurensin G were identified as potential inhibitors of Pin1-dependent VEGF expression, by blocking HIF-1 activity (Oh *et al.* 2010; Kim *et al.* 2012). Pin1 was also shown to act indirectly on HIF-1 induction by promoting promyelocytic leukemia (PML) proteasomal degradation, a negative regulator of HIF-1 (Yuan *et al.* 2011). Interestingly, a recent study showed that in hippocampal neuronal cells, Pin1 can interact with HIF-1 α and affect HIF-1 α degradation (Lonati *et al.* 2014). Here, we demonstrate that Pin1 can indeed bind to HIF-1 α . This binding is dependent on HIF-1 α phosphorylation by p42/p44 MAPK activation and is essential for specific HIF target gene expression.

Pin1 is known to play an important role in regulating the function of its substrates through its WW domain (Lu *et al.* 1996). Pin1 binding to substrates can hide specific protein domains, thus modulating activity or interaction with partner proteins. It was shown that the interaction of Pin1 with nuclear factor of activated T cells (NFAT), a transcription factor, leads to the inhibition of NFAT activity by blocking its dephosphorylation by calcineurin (Liu *et al.* 2001). Additionally, Pin1 PPIase activity can regulate the function of its substrates by inducing conformational changes (Lu *et al.* 1996). Pin1-regulated isomerization between *cis* and *trans* conformations was shown to be required for the activation of both p53 and STAT3 (Wulf *et al.* 2002; Lufei *et al.* 2007). Accordingly, we now demonstrate that Pin1 PPIase activity is important for HIF-1 activation and promotes HIF-1 α conformational changes.

Pin1 isomerization can also play a key role in regulating the protein stability and subcellular localization of target substrates (Lu & Zhou 2007). Our results demonstrate that, in our human cell models, Pin1 is not implicated in HIF-1 α stabilization since Pin1

depletion does not modify either HIF-1 α or HIF-2 α protein levels. These results agree with previous studies indicating that MAPK pathway inhibition decreases HIF-1 transcriptional activity but not HIF-1 α protein levels (Richard *et al.* 1999; Berra *et al.* 2001a; Hofer *et al.* 2001; Hur *et al.* 2001; Mylonis *et al.* 2006). These results also indicate that Pin1 can directly regulate HIF-1 activity through PML-independent mechanisms, since PML was shown to negatively regulate HIF-1 activity by inhibiting HIF-1 α translation. It was shown that Pin1 cooperates with KLHL20, a Cullin3 substrate adaptor induced by HIF-1, to promote PML destruction and further enhance HIF-1 α levels (Bernardi *et al.* 2006; Yuan *et al.* 2011). Previous studies have indicated that HIF-1 α phosphorylation by p42/p44 MAPK pathway activation is required for nuclear retention (Mylonis *et al.* 2006; Mylonis *et al.* 2008). However, in our cellular model, we were unable to observe p42/p44 MAPK-regulated nuclear translocation of HIF-1 α ¹. Specifically, we did not observe any changes in the cellular localization of the HIF-1 α phosphorylation mutant (HIF-1 α SDMA) when transfected in HIF-1 α ^{-/-} MEF cells or endogenous HIF-1 α in Pin1^{-/-} MEF cells. We believe that our findings of a p42/p44 MAPK phosphorylation-dependent interaction between Pin1 and HIF-1 α may provide a better understanding of the mechanism involved in MAPK-dependent HIF-1 activation.

Previous studies have demonstrated that HIF-1 α post-translational modifications along with HIF-1 α protein induction play an essential role in regulating HIF-1 transcriptional activity (Brahimi-Horn *et al.* 2005). Our results show that the interaction between Pin1 and HIF-1 α allows for the activation of specific HIF-1-dependent genes. In agreement with previous reports, we demonstrate that Pin1 regulates VEGF expression (Ryo *et al.* 2005; Kim *et al.* 2009). However, our studies additionally show that Pin1 regulates VEGF expression by modulating HIF-1 complex activity. Our results therefore provide an important link between HIF-1, Pin1 activity and VEGF expression. As mentioned above, we demonstrate that Pin1 is able to selectively regulate the expression of other HIF-1-regulated genes, including GLUT1 and PGK1. Interestingly, the expression of other HIF-1 target genes, such as PFKFB4 and BNIP3, was not affected by

¹ M.A.C. Déry and D.E. Richard, unpublished observations.

Pin1, indicating that the regulation of HIF-1 activity by Pin1 is gene specific. The regulation of HIF-1-dependent gene expression requires not only the presence of consensus HRE sequences but also their flanking regions, which allows binding of various transcriptional cofactors (Wenger *et al.* 2005). Our work raises the possibility that HIF-1 α isomerization by Pin1 could increase HIF-1 binding to specific HREs or flanking regions or to HIF-1 partners and transcriptional cofactors which are specific to certain HIF-1-regulated genes. Additionally, Pin1 may also decrease associations between HIF-1 and transcriptional inhibitors. Future studies investigating elements on and around the specifically regulated HREs may clarify the differential effect of Pin1 on HIF-1 target genes.

2.8 Conclusion

In summary, our study identifies Pin1 as a potent regulator of HIF-1 activity by modulating HIF-1 α conformation in a MAPK-dependent manner. HIF-1 is known to play a major role in tumorigenesis, through activation of several genes implicated in many aspects of cancer progression and prognosis (Brahimi-Horn & Pouyssegur 2007; Finger & Giaccia 2010; Semenza 2010a). On the other hand, Pin1 has been shown to be up-regulated in many human cancers (Bao *et al.* 2004). Based on our results, we suggest that Pin1 may be implicated in tumorigenesis by modulating HIF-1-dependent genes. In this study, we show that Pin1 depletion decreases the expression of genes implicated in angiogenesis (VEGF) and the glycolytic pathway (GLUT1 and PGK1), two mechanisms known to play an important role in cancer progression. Hence, a better characterization of the mechanism involved in prolyl isomerase-dependent regulation of specific HIF-1 target genes will be interesting in order to better understand hypoxia signaling mechanisms and for the identification of new therapeutic targets.

2.9 Acknowledgements

We thank Drs. J.Y. Masson and M. Ploquin for help with the generation and purification of the HIS-HIF-1 α construct. This work was supported by research grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR; MOP-102760 to D.E.R.) and the Heart and Stroke Foundation of Québec (to D.E.R.). V.N.L. is the recipient of a Frederick Banting and Charles Best Canada Graduate Scholarship. D.E.R. is a senior research scholar from the Fonds de recherche du Québec - Santé (FRQS).

2.10 References

- Bao L., Kimzey A., Sauter G., Sowadski J.M., Lu K.P. & Wang D.G. (2004) Prevalent overexpression of prolyl isomerase Pin1 in human cancers. *Am J Pathol* **164**, 1727-37.
- Bernardi R., Guernah I., Jin D., Grisendi S., Alimonti A., Teruya-Feldstein J., Cordon-Cardo C., Simon M.C., Rafii S. & Pandolfi P.P. (2006) PML inhibits HIF-1 α translation and neoangiogenesis through repression of mTOR. *Nature* **442**, 779-85.
- 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.
- Brahimi-Horn C., Mazure N. & Pouyssegur J. (2005) Signalling via the hypoxia-inducible factor-1 α requires multiple posttranslational modifications. *Cell Signal* **17**, 1-9.
- Brahimi-Horn M.C. & Pouyssegur J. (2007) Harnessing the hypoxia-inducible factor in cancer and ischemic disease. *Biochem Pharmacol* **73**, 450-7.
- Finger E.C. & Giaccia A.J. (2010) Hypoxia, inflammation, and the tumor microenvironment in metastatic disease. *Cancer Metastasis Rev* **29**, 285-93.
- Fujimori F., Takahashi K., Uchida C. & Uchida T. (1999) Mice lacking Pin1 develop normally, but are defective in entering cell cycle from G(0) arrest. *Biochem Biophys Res Commun* **265**, 658-63.
- Greer S.N., Metcalf J.L., Wang Y. & Ohh M. (2012) The updated biology of hypoxia-inducible factor. *EMBO J* **31**, 2448-60.
- Hofer T., Desbaillets I., Hopfl G., Gassmann M. & Wenger R.H. (2001) Dissecting hypoxia-dependent and hypoxia-independent steps in the HIF-1 α activation cascade: implications for HIF-1 α gene therapy. *FASEB J* **15**, 2715-7.
- Hur E., Chang K.Y., Lee E., Lee S.K. & 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-1 α . *Mol Pharmacol* **59**, 1216-24.

- Kaelin W.G., Jr. & Ratcliffe P.J. (2008) Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol Cell* **30**, 393-402.
- Kim J.A., Kim M.R., Kim O., Phuong N.T., Yun J., Oh W.K., Bae K. & Kang K.W. (2012) Amurensin G inhibits angiogenesis and tumor growth of tamoxifen-resistant breast cancer via Pin1 inhibition. *Food Chem Toxicol* **50**, 3625-34.
- Kim M.R., Choi H.S., Heo T.H., Hwang S.W. & Kang K.W. (2008) Induction of vascular endothelial growth factor by peptidyl-prolyl isomerase Pin1 in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* **369**, 547-53.
- Kim M.R., Choi H.S., Yang J.W., Park B.C., Kim J.A. & Kang K.W. (2009) Enhancement of vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis in tamoxifen-resistant breast cancer cells: role of Pin1 overexpression. *Mol Cancer Ther* **8**, 2163-71.
- Lauzier M.C., Page E.L., Michaud M.D. & Richard D.E. (2007) Differential regulation of hypoxia-inducible factor-1 through receptor tyrosine kinase transactivation in vascular smooth muscle cells. *Endocrinology* **148**, 4023-31.
- Lauzier M.C., Robitaille G.A., Chan D.A., Giaccia A.J. & Richard D.E. (2008) (2R)-[(4-Biphenyl)sulfonyl]amino]-N-hydroxy-3-phenylpropionamide (BiPS), a matrix metalloprotease inhibitor, is a novel and potent activator of hypoxia-inducible factors. *Mol Pharmacol* **74**, 282-8.
- Liu W., Youn H.D., Zhou X.Z., Lu K.P. & Liu J.O. (2001) Binding and regulation of the transcription factor NFAT by the peptidyl prolyl cis-trans isomerase Pin1. *FEBS Lett* **496**, 105-8.
- Lonati E., Brambilla A., Milani C., Masserini M., Palestini P. & Bulbarelli A. (2014) Pin1, a new player in the fate of HIF-1 α degradation: an hypothetical mechanism inside vascular damage as Alzheimer's disease risk factor. *Front Cell Neurosci* **8**, 1-11.
- Lu K.P., Hanes S.D. & Hunter T. (1996) A human peptidyl-prolyl isomerase essential for regulation of mitosis. *Nature* **380**, 544-7.
- Lu K.P. & Zhou X.Z. (2007) The prolyl isomerase PIN1: a pivotal new twist in phosphorylation signalling and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 904-16.
- Lufei C., Koh T.H., Uchida T. & Cao X. (2007) Pin1 is required for the Ser727 phosphorylation-dependent Stat3 activity. *Oncogene* **26**, 7656-64.
- Lv L., Zhang J., Zhang L., Xue G., Wang P., Meng Q. & Liang W. (2013) Essential role of Pin1 via STAT3 signalling and mitochondria-dependent pathways in restenosis in type 2 diabetes. *J Cell Mol Med* **17**, 989-1005.
- 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**, 847-55.
- Mylonis I., Chachami G., Paraskeva E. & Simos G. (2008) Atypical CRM1-dependent nuclear export signal mediates regulation of hypoxia-inducible factor-1 α by MAPK. *J Biol Chem* **283**, 27620-7.
- Mylonis I., Chachami G., Samiotaki M., Panayotou G., Paraskeva E., Kalousi A., Georgatsou E., Bonanou S. & Simos G. (2006) Identification of MAPK phosphorylation sites and their role in the localization and activity of hypoxia-inducible factor-1 α . *J Biol Chem* **281**, 33095-106.

- Oh S.J., Kim O., Lee J.S., Kim J.A., Kim M.R., Choi H.S., Shim J.H., Kang K.W. & Kim Y.C. (2010) Inhibition of angiogenesis by quercetin in tamoxifen-resistant breast cancer cells. *Food Chem Toxicol* **48**, 3227-34.
- Pfaffl M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**, e45.
- Ploquin M., Petukhova G.V., Morneau D., Dery U., Bransi A., Stasiak A., Camerini-Otero R.D. & Masson J.Y. (2007) Stimulation of fission yeast and mouse Hop2-Mnd1 of the Dmc1 and Rad51 recombinases. *Nucleic Acids Res* **35**, 2719-33.
- Richard D.E., 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**, 32631-7.
- Ryo A., Nakamura M., Wulf G., Liou Y.C. & Lu K.P. (2001) Pin1 regulates turnover and subcellular localization of beta-catenin by inhibiting its interaction with APC. *Nat Cell Biol* **3**, 793-801.
- Ryo A., Suizu F., Yoshida Y., Perrem K., Liou Y.C., Wulf G., Rottapel R., Yamaoka S. & Lu K.P. (2003) Regulation of NF-kappaB signaling by Pin1-dependent prolyl isomerization and ubiquitin-mediated proteolysis of p65/RelA. *Mol Cell* **12**, 1413-26.
- Ryo A., Uemura H., Ishiguro H., Saitoh T., Yamaguchi A., Perrem K., Kubota Y., Lu K.P. & Aoki I. (2005) Stable suppression of tumorigenicity by Pin1-targeted RNA interference in prostate cancer. *Clin Cancer Res* **11**, 7523-31.
- Semenza G.L. (2003) Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **3**, 721-32.
- Semenza G.L. (2010) Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene* **29**, 625-34.
- Semenza G.L. & Wang G.L. (1992) A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* **12**, 5447-54.
- Shen M., Stukenberg P.T., Kirschner M.W. & Lu K.P. (1998) The essential mitotic peptidyl-prolyl isomerase Pin1 binds and regulates mitosis-specific phosphoproteins. *Genes Dev* **12**, 706-20.
- Tun-Kyi A., Finn G., Greenwood A., Nowak M., Lee T.H., Asara J.M., Tsokos G.C., Fitzgerald K., Israel E., Li X., Exley M., Nicholson L.K. & Lu K.P. (2011) Essential role for the prolyl isomerase Pin1 in Toll-like receptor signaling and type I interferon-mediated immunity. *Nat Immunol* **12**, 733-41.
- Wang G.L. & Semenza G.L. (1995) Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* **270**, 1230-7.
- Wenger R.H., Stiehl D.P. & Camenisch G. (2005) Integration of oxygen signaling at the consensus HRE. *Sci STKE* **2005**, re12.
- Wulf G., Finn G., Suizu F. & Lu K.P. (2005) Phosphorylation-specific prolyl isomerization: is there an underlying theme? *Nat Cell Biol* **7**, 435-41.
- Wulf G.M., Liou Y.C., Ryo A., Lee S.W. & Lu K.P. (2002) Role of Pin1 in the regulation of p53 stability and p21 transactivation, and cell cycle checkpoints in response to DNA damage. *J Biol Chem* **277**, 47976-9.

Yuan W.C., Lee Y.R., Huang S.F., Lin Y.M., Chen T.Y., Chung H.C., Tsai C.H., Chen H.Y., Chiang C.T., Lai C.K., Lu L.T., Chen C.H., Gu D.L., Pu Y.S., Jou Y.S., Lu K.P., Hsiao P.W., Shih H.M. & Chen R.H. (2011) A Cullin3-KLHL20 Ubiquitin ligase-dependent pathway targets PML to potentiate HIF-1 signaling and prostate cancer progression. *Cancer Cell* **20**, 214-28.

Zacchi P., Gostissa M., Uchida T., Salvagno C., Avolio F., Volinia S., Ronai Z., Blandino G., Schneider C. & Del Sal G. (2002) The prolyl isomerase Pin1 reveals a mechanism to control p53 functions after genotoxic insults. *Nature* **419**, 853-7.

Rapport-Gratuit.com

Chapitre 3: The prolyl isomerase Pin1 is an important regulator of Sp1/3 activity and subsequent hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) gene expression

Maroua Jalouli, Véronique N. Lafleur, Laurent Lamalice, Darren E. Richard

Centre de recherche du CHU de Québec, Department of Molecular Biology, Medical Biochemistry and Pathology, Université Laval, Québec, QC.

Running head: Sp1/3 regulation by Pin1

Abbreviations: MAPK, mitogen-activated protein kinases; SP/KLF, Specificity Protein/Krüppel-like Factor; VEGF, vascular endothelial growth factor; PDGFRA, platelet-derived growth factor receptor alpha; ER α , Estrogen receptor-alpha; HIF-1, hypoxia-inducible factor-1; PP2A, protein phosphatase 2; PML, promyelocytic leukemia; CDK1, cyclin-dependent kinase 1; HeLa, Human cervical carcinoma cell; HEK 293T, human embryonic kidney cell; MEF, mouse embryonic fibroblast cell; TRAIL, tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand

Correspondence to: Darren E. Richard, darren.richard@crchudequebec.ulaval.ca

3.1 Avant-propos

Ce chapitre présente mes travaux portant sur l'implication de l'isomérase Pin1 dans la régulation positive des activateurs transcriptionnels du gène *HIF-1A*, les facteurs de transcription Sp1 et Sp3, ainsi que l'effet de cette régulation sur le promoteur *HIF-1A*. Ces travaux feront l'objet d'une soumission sous peu pour publication et sont reproduits avec la permission des coauteurs.

En tant que premier auteur, j'ai conçu et réalisé la totalité des expériences de ce projet. J'ai également rédigé le manuscrit, qui a été corrigé par Dr. Darren E. Richard. Véronique Lafleur a contribué à quelques expérimentations qui ne sont pas incluses dans ce manuscrit ainsi que par la gestion de certains outils essentiels utilisés pour cette étude. Laurent Lamalice a participé à la correction du manuscrit. Cette étude a été réalisée sous la direction du Dr. Darren E. Richard

3.2 Résumé

En modulant l'expression d'un grand nombre de gènes, les facteurs de transcription Sp1 et Sp3 (Sp1/3), exprimés de manière ubiquitaire, sont des joueurs clés dans la régulation de plusieurs processus physiologiques et pathologiques. L'activité de Sp1/3 est finement régulée par des modifications post-traductionnelles qui modulent leur activité de transactivation, leur affinité de liaison à l'ADN ainsi que leur stabilité. La phosphorylation de Sp1/3 joue un rôle crucial dans la régulation de l'activité transcriptionnelle de Sp1/3 et de l'expression des gènes cibles. Des études ont démontré que la phosphorylation des résidus spécifiques Ser/Thr par les protéines kinases p42/p44 activées par des mitogènes (MAPK) augmente la transcription induite par Sp1/3. Pin1, une peptidyl-prolyl isomérase, se lie spécifiquement à un groupe de protéines contenant des motifs phosphorylés pSer/pThr-Pro. L'activité catalytique de Pin1 induit un changement de conformation de ses substrats entre la forme *cis* et la forme *trans*. L'isomérisation par Pin1 est un mécanisme important pour la régulation de la fonction de ses substrats tant en conditions physiologiques que pathologiques. Dans ce travail, nous montrons que Pin1 interagit avec Sp1 et Sp3. Nous avons constaté que la phosphorylation de Sp1 sur Thr⁷³⁹ et de Sp3 sur Ser⁷³ est essentielle pour cette interaction. Nous démontrons aussi que l'activité transcriptionnelle de Sp1/3 et l'expression du gène cible important, le facteur induit par l'hypoxie-1 α (*HIF-1A*), sont finement régulés par Pin1. Finalement, nous montrons que Pin1 régule l'activité de Sp1/3 en affectant leur capacité de liaison à l'ADN. Cette étude identifie donc Pin1 comme un régulateur important tant au niveau de l'activité transcriptionnelle de Sp1/3 qu'au niveau l'expression de *HIF-1A*.

3.3 Abstract

By modulating gene expression, the ubiquitously expressed Sp1 and Sp3 transcription factors (Sp1/3) are key players in regulating several biological and pathological processes. Sp1/3 activity is finely regulated by post-translational modifications that modulate their transactivation, DNA binding affinity, and stability. Sp1/3 phosphorylation plays a crucial role in regulating Sp1/3 transcriptional activity and target gene expression. Elegant studies have demonstrated that phosphorylation of specific Ser/Thr residues by p42/p44-activated protein kinases (MAPK) enhanced Sp1/3-mediated transcription. Pin1, a peptidyl isomerase, specifically binds a group of proteins containing phosphorylated Ser/Thr-Pro motif. Pin1 catalytic activity generates a conformational change in its substrates between *cis* and *trans* conformations. Pin1 isomerization is important for regulating the function of its substrates under both physiological and pathological conditions. In this work, we show that Pin1 interacts with Sp1 and Sp3. We found that phosphorylation of Sp1 on Thr⁷³⁹ and Sp3 on Ser⁷³ are important for this interaction. Additionally, we demonstrate that Sp1/3 transcriptional activity and the expression of an important target gene, Hypoxia-inducible factor-1 α (*HIF-1A*), are fine-tuned by Pin1. Finally, we show that Pin1 regulates Sp1/3 activity by affecting DNA binding capacity. This study therefore identifies Pin1 as an important regulator of both Sp1/3 transcriptional activity and *HIF-1A* expression.

3.4 Introduction

Specificity protein 1 and 3 (Sp1/3) are essential transcription factors for different physiological processes, including angiogenesis, differentiation, apoptosis and senescence (Chuang & Hung 2011). Sp1/3 belong to the specificity protein/Krüppel-like factor (SP/KLF) transcription factor family which contains three Cys2-His2-type zinc finger DNA binding motifs in the C-terminal domain (Suske *et al.* 2005). Sp1/3 bind GC-rich motifs present in the promoter regions of target genes (Briggs *et al.* 1986; Kadonaga & Tjian 1986; Kadonaga *et al.* 1987). Sp1 and Sp3 have strong homology in their DNA binding domains and can consequently recognize the same DNA binding site with similar affinity (Li *et al.* 2004; Davie *et al.* 2008). Sp1/3 transcriptional activity is regulated by specific post-translational modifications including phosphorylation, glycosylation, acetylation and sumoylation (Li *et al.* 2004). Phosphorylation was clearly identified as an important event that regulates Sp1/3-mediated transcription (Li *et al.* 2004; Chu & Ferro 2005; Tan & Khachigian 2009; Chang & Hung 2012; Chu 2012). In fact, Sp1 is highly phosphorylated during cell cycle progression. During interphase, Sp1 phosphorylation plays a crucial role in regulating the target gene expression by affecting DNA binding and transactivation activity (Chu & Ferro 2005; Tan & Khachigian 2009; Chang & Hung 2012; Chu 2012). Direct phosphorylation of two Sp1 threonine residues (Thr⁴⁵³ and Thr⁷³⁹) by p42/p44 mitogen-activated protein kinases (MAPKs) has been shown to increase Sp1 recruitment to promoter regions of specific genes, including vascular endothelial growth factor (*VEGFA*) and platelet-derived growth factor receptor alpha (*PDGFRA*) (Bonello & Khachigian 2004). Phosphorylation of a Sp3 serine residue (Ser⁷³) by p42/p44 MAPK was also demonstrated to be important for Sp3 function (Pages 2007). However, the mechanism by which Sp1/3 phosphorylation regulates transcriptional activity remains to be fully elucidated.

The peptidyl-prolyl isomerase Pin1 is a substrate-specific enzyme that specifically binds proteins containing proline residues preceded by a phosphorylated serine or threonine residue (pSer/Thr-Pro) (Lu *et al.* 1996). Pin1 catalyzes structural protein changes between two distinct *cis* and *trans* conformations resulting in the regulation of subcellular localization, stability, protein interactions, and phosphorylation status of

target substrates (Wulf *et al.* 2005; Lu *et al.* 2007; Liou *et al.* 2011; Khanal *et al.* 2012). Pin1 contains a N-terminal WW domain, which binds pSer/Thr-Pro motifs, and a C-terminal peptidyl prolyl isomerase (PPIase) domain responsible for pSer/Thr-Pro peptide bonds isomerisation (Lu *et al.* 1999; Lu *et al.* 2002). The activity of diverse transcriptional factors, including Sp7, has been shown to be regulated by Pin1 (Lee *et al.* 2015). Interestingly, during mitosis, Pin1 was shown to be implicated in maintaining Sp1 stability and decreasing Sp1 DNA binding affinity through phosphorylation by cyclin-dependent kinase 1 (CDK1) (Yang *et al.* 2014). Our studies have shown that Pin1 also regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) by promoting a conformational change of its essential HIF-1 α subunit (Jalouli *et al.* 2014).

The present study strengthens the importance of Pin1 on Sp1/3 and HIF-1 activity. We demonstrate that Pin1 is involved in regulating *HIF-1A* gene expression by activating Sp1/3. We show that as well as binding Sp1, Pin1 also interacts with Sp3. Our studies indicate that Sp1/3 phosphorylation at specific Ser/Thr residues is necessary for this interaction. Finally, we demonstrate that Pin1 strongly affects Sp1 DNA binding. Taken together, these results identify Pin1 as an important regulator of Sp1/3 activity and Sp1/3-mediated *HIF-1A* gene expression.

3.5 Materials and methods

Materials

PD98059 was from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Polyclonal Sp1 and Sp3 antibodies were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Polyclonal Pin1 and Myc-Tag antibodies were from Cell Signaling Technology (Danvers, MA). Polyclonal GST antibody was from Novus Biologicals (Littleton, CO). Monoclonal phospho-p42/p44MAPK antibody was from Sigma-Aldrich. Polyclonal p42/p44 MAPK antibody was from EMD Millipore/Upstate (Billerica, MA). Horseradish peroxidase-coupled anti-mouse and anti-rabbit antibodies were from Promega (Madison, WI). Wild-type human FLAG-Pin1 and GST-Pin1 plasmids were previously described (Shen *et al.* 1998). Mutant FLAG-Pin1K63A (catalytically inactive) plasmid was generated in our laboratory (Jalouli *et al.* 2014). Wild-type Sp1, mutant ^{T739A}Sp1, mutant ^{T453A}Sp1, double mutant ^{DM}Sp1, wild-type Sp3, and mutant ^{S73A}Sp3 plasmids were graciously provided by Dr. Gilles Pagès (University of Nice-Sophia Antipolis, Nice, FR). pHIF-1A-572/+32Luc reporter vector was provided by Dr. Gregg Semenza (John Hopkins University, Baltimore, MD). PGL3 promoter vector was from Promega (Madison, WI).

Cell culture

Human embryonic kidney (HEK 293T) and human cervical carcinoma (HeLa) cells lines are from the American Type Culture Collection. Pin1^{+/+} and Pin1^{-/-} mouse embryonic fibroblast cells (MEF) were provided by Dr Kun Ping Lu (Harvard University, Boston, MA) (Fujimori *et al.* 1999). Cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), antibiotics (50 U/mL penicillin and 50 µg/mL streptomycin) and 2 mM glutamine (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA). Cells were cultured at 37°C in a humid atmosphere (5% CO₂, 95% air) and were serially passaged upon reaching confluence.

Western blot analysis

Cells or cell lysates were denatured in 2× Laemmli buffer (Laemmli 1970). Protein concentration was determined by Lowry assay (Lowry *et al.* 1951). Cell lysates were subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and electrophoretically transferred to polyvinylidene difluoride membranes (PVDF, Immobilon-P; EMD Millipore). Proteins of interest were analyzed using indicated antibodies and visualized with enhanced chemiluminescence (ECL) system (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ).

GST pull-down assay

Cells were transfected with or without indicated vectors by calcium phosphate (CaPO₄) precipitation. Nuclear extracts were prepared as previously described (Semenza & Wang 1992), extracts were incubated with GST or wild-type GST-Pin1 fusion protein coupled to glutathione-sepharose 4B beads (GE Healthcare Life Sciences) for 2 hours at 4°C with rotation in GST buffer (50 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 10% glycerol, 1% Triton X-100, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 100 mM NaF, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM DTT, 0.5 µg/ml leupeptin, 1 µg/ml pepstatin, 0.2 mM PMSF). Samples were then washed with GST buffer and denatured in 2× Laemmli buffer. Precipitates were resolved in SDS-polyacrylamide gels and revealed by Western blot analysis with specific antibodies, as indicated.

Immunoprecipitation (IP)

Total HeLa cell extracts were incubated for 2 hours with the appropriate antibodies in IP buffer (0.05% NP-40, 0.1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 50 mM Tris HCl pH 7.8, 1 mM EDTA, 50 mM NaF, 1 mM B-glycerophosphate, 1 mM sodium orthovanadate, 0.5 µg/mL leupeptin, 1 µg/mL pepstatin, 0.2 mM PMSF) at 4°C. Protein G magnetic beads (ThermoFisher Scientific) were added to mixture for 1h at 4°C. Beads were then washed three times with IP buffer and denatured in 2× Laemmli buffer. Immunoprecipitated proteins were resolved in SDS-polyacrylamide gels and Western blotted with specific antibodies, as indicated.

RNA silencing

Cells, seeded in 60 mm plates, were transfected by CaPO₄ precipitation with small interfering RNA (siRNA) oligonucleotides. 48 hours after transfection, cells were harvested. Ambion® siRNA duplexes were obtained from ThermoFisher Scientific. The specific sequences used are as follows: human Pin1 (accession no. NM_006221; sense: 5'-UUUGCCACCACUGCUGCUGuu-3'), human Sp1 (accession no. NM_138473; sense: 5'-GGUAGCUCUAAGUUUUGAUtt-3'), human Sp3 (accession no. NM_003111; predesigned siRNA 115336 sense: 5'-CCUUCUGCUAACAUCCAGAtt-3'). As a control, Ambion® *Silencer Negative Control #2* siRNA (ThermoFisher Scientific) was used.

Luciferase assay

Cells were seeded in 6-well plates. 24h after plating, pHIF1A-571/+32Luc or control pGL3 promoter vector (500 ng/well) were transfected by CaPO₄ precipitation. 48h post-transfection, luciferase assays were performed using a luciferase reporter assay system (Promega). Results were quantified using a Luminoskan Ascent microplate reader with integrated injectors (Thermo Fisher Scientific). Results are expressed as a ratio of firefly luciferase activity over total protein levels.

Transcription factor enzyme-linked immunoassay (TF-EIA)

Experiments were performed using high-bind NeutrAvidin-coated 96-well strip plates (Thermo Fisher Scientific). Plates were first incubated with 5'-biotinylated 26-base pair dsDNA oligonucleotides for 1h at room temperature. The sequence used in this study was 5'- GAATTCGATCGGGGCGGGGCGAGCTC-3', which contains Sp1/3 binding motifs (Koshikawa et al. 2009). dsDNA was then incubated with nuclear extracts from HeLa, Sp1/3 antibodies and horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies, respectively. Sp1/3 bound to DNA was detected by spectrophotometry using TMB-ONE solution (Promega).

Statistical analysis

Results are an average or representative of at least two independent experiments. InStat (www.graphpad.com) was used for the statistical analyses of different experiments. Unless otherwise noted, one-way ANOVA tests were performed. Results were deemed significant if they attained a 95% confidence level ($p < 0.05$).

Rapport-Gratuit.com

3.6 Results

3.6.1 Pin1 interacts with Sp1 and Sp3

To examine whether Pin1 can bind Sp1, we first performed GST pull-down assays. As seen in the left panels of Figure 3.1A, GST-Pin1 fusion protein interacted with Sp1. The interaction between endogenous Pin1 and Sp1 was also observed using co-immunoprecipitation (co-IP) assays (left panels of Figure 3.1B). As mentioned above, the structure and function of Sp3 is similar to Sp1. We therefore wanted to determine whether Pin1 could also bind Sp3. As expected, Pin1 also bound Sp3 in a similar manner to Sp1 in both Pin1-GST pull-down and co-IP assays (right panels of Figure 3.1A and B, respectively). These results indicate that Pin1 can interact with Sp1 and Sp3, the main members of the Sp transcription factor family.

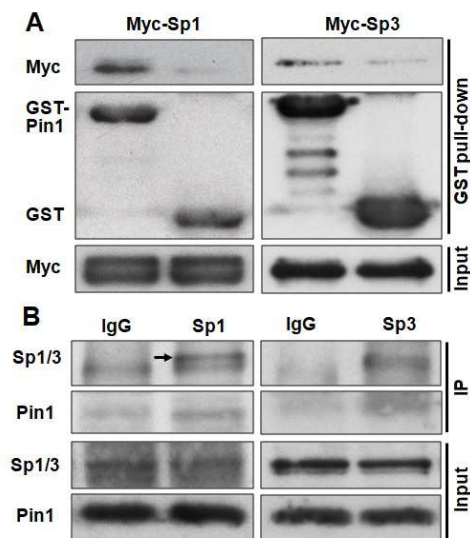


Figure 3.1: Pin1 interacts with Sp1 and Sp3. (A) HEK 293T cells were transfected by Myc-tagged Sp1 (left panels) or Myc-tagged Sp3 (right panels) constructs. Nuclear Extracts were incubated with wild-type human GST-Pin1 (lane 1) or GST (lane 2). Total nuclear extracts (Input) and GST-Pin1 precipitated proteins (GST pull-down) were resolved by SDS-PAGE and analyzed by Western blot using anti-Myc and anti-GST antibodies. (B) Co-immunoprecipitation assays. Total extracts from HeLa cells were immunoprecipitated with anti-IgG, anti-Sp1 (left panels) or anti-Sp3 (right panels) antibodies. Immunoprecipitated proteins (IP) or total cellular proteins (Input) were resolved by SDS-PAGE. Western blots were performed by using antibodies against Sp1, Sp3, and Pin1.

3.6.2 Pin1 regulates Sp1/3 transcriptional activity

As previously mentioned, Pin1 specifically binds phosphorylated Ser/Thr-Pro motifs found in targeted substrates (Wulf *et al.* 2005). Phosphorylation was clearly identified as a potent regulator of Sp1/3 activity (Chu & Ferro 2005; Pages 2007; Tan & Khachigian 2009; Chang & Hung 2012; Chu 2012). We therefore decided to determine whether Pin1 was implicated in regulating Sp1/3 transcriptional activity. For these assays, we evaluated the effects of Pin1 depletion on Sp1/3 activity by performing gene reporter assays. Cells were transiently transfected with either siRNA targeting Pin1 (siPin1), siRNAs targeting both Sp1 and Sp3 (siSp), or control siRNA (siCtrl) along with a luciferase reporter plasmid driven by a promoter containing six Sp-specific GC-rich elements (Dyanan & Tjian 1983). As expected, Sp1/3 depletion strongly decreased promoter activity as compared to siCtrl-transfected cells (Figure 2A). More interestingly, a significant decrease in Sp1/3-specific promoter activity was also observed in siPin1-transfected cells as compared to siCtrl-transfected cells. Similar results were also obtained using Pin1 knock-out (Pin1^{-/-}), in comparison to Pin1 wild-type (Pin1^{+/+}), mouse embryonic fibroblast (MEF) cells (Figure 2B). Taken together, these results indicate that Pin1 is required for Sp1/3-mediated transcriptional activity.

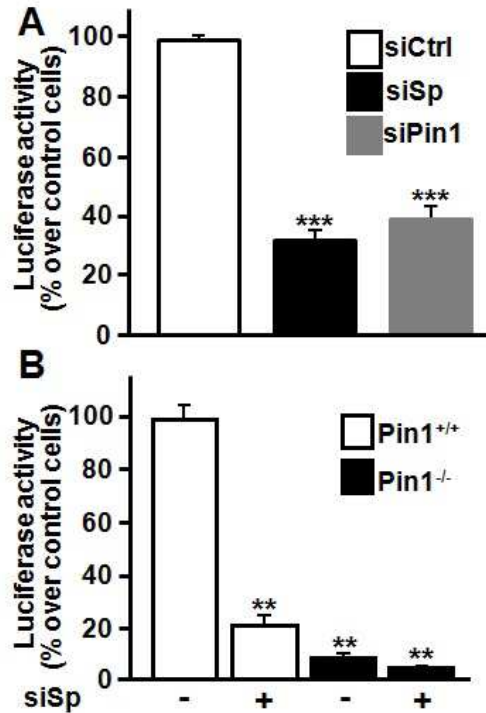


Figure 3.2: Pin1 depletion reduces the Sp1/3 transcriptional activity. (A) HEK 293T cells were transfected with control siRNA (siCtrl), a siRNA targeting Pin1 (siPin1), siRNAs targeting both Sp1 and Sp3 (siSp) along with 500 ng of luciferase reporter plasmid driven by a promoter containing six Sp-specific GC-rich elements (Sp-promoter vector). 48 h post-transfection, cells were lysed and luciferase activity was measured. Results are expressed as a ratio of firefly luciferase activity to total protein levels and are an average \pm SEM of three independent experiments performed in triplicate. *** $p < 0.001$ as compared to control transfected cells. (B) MEF cells wild-type Pin1 (Pin1^{+/+}) or knockout for Pin1 (Pin1^{-/-}) were transfected with control siRNA (siCtrl) or siRNAs targeting both Sp1 and Sp3 (siSp) along with 500 ng of Sp-promoter vector. At 48 h post-transfection, cells were lysed and luciferase activity was measured. Results are expressed as in (A). ** $p < 0.01$ as compared to control transfected MEF Pin1^{+/+} cells.

3.6.3 Phosphorylation of specific Ser/Thr residues is required for Pin1 interaction

Pin1 was shown to interact with Thr⁷³⁹-phosphorylated Sp1 in mitotic cells (Yang *et al.* 2014). In addition, previous results have demonstrated that, during interphase, Sp1 phosphorylation on Thr⁴⁵³ and Thr⁷³⁹ by p42/p44 MAPK played an important role in regulating Sp1 transcriptional activity (Milanini-Mongiat *et al.* 2002). It is important to note that both residues are Pin1 consensus motifs (pThr-Pro). Having established that Pin1 is important for Sp1/3 activity, we therefore wanted to determine the role of these residues for Pin1 binding to Sp1. For these experiments, we performed Pin1-GST pull-down assays using lysates from cells transfected with either wild-type or mutant Sp1 constructs. Mutant constructs contained unique alanine substitutions at either Thr⁴⁵³ or Thr⁷³⁹ (T^{453A}Sp1 and T^{739A}Sp1) or a double alanine substitution (^{DM}Sp1). As seen in Figure 3A, Pin1 binding to ^{DM}Sp1 was strongly reduced as compared to wild-type Sp1. Interestingly, in contrast to T^{453A}Sp1, T^{739A}Sp1 was unable to interact with Pin1, indicating that Thr⁷³⁹ is important for the Pin1-Sp1 interaction. p42/p44 MAPK can also phosphorylate Sp3 at Ser⁷³, resulting in increased Sp3 transcriptional activity (Pages 2007). We therefore examined whether Ser⁷³ was essential for Pin1 binding to Sp3. A Pin1-GST pull-down assay was performed using lysates from cells transfected with either wild-type or a mutant Sp3 construct containing a unique alanine substitution at Ser⁷³ (^{S73A}Sp3). Interestingly, Pin1 binding to ^{S73A}Sp3 was strongly reduced as compared to wild-type Sp3 (Figure 3B). Taken together, our results indicate that Sp1/3 phosphorylation, at described p42/p44 MAPK sites, play an essential role for interactions between Sp1, Sp3, and Pin1.

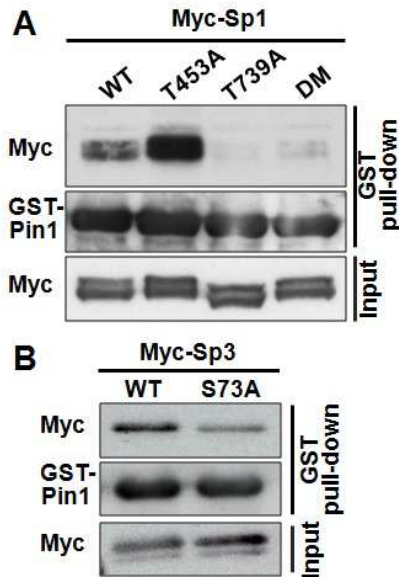


Figure 3.3: Phosphorylation of Thr⁷³⁹ of Sp1 and Ser⁷³ of Sp3 is important for Pin1 binding. (A) HEK 293T cells were transfected with Myc-wild-type Sp1 (WT), Myc-T^{453A}Sp1 (T453A), Myc-T^{739A}Sp1 (T739A) or Myc-^{DM}Sp1 (double mutant T453A/T739A, DM) constructs. Nuclear extracts were then incubated with GST-Pin1 fusion protein. Total nuclear protein (Input) or GST-Pin1 precipitated protein (GST pull-down) were subjected to SDS-PAGE and Western blotted with antibodies against the Myc epitope and GST. (B) Nuclear extracts from HEK 293T cells, transfected with Myc-wild-type Sp3 (WT) or Myc-S^{73A}Sp3 (S73A) constructs, were incubated with GST-Pin1 fusion protein. Total nuclear protein (Input) or GST-Pin1 precipitated protein (GST pull-down) were resolved in SDS-polyacrylamide gels and revealed by Western blot analysis with antibodies against the Myc epitope and GST.

3.6.4 Pin1 regulates Sp1/3 DNA binding

Sp1/3 phosphorylation has been shown to clearly influence the DNA-binding activity of these transcription factors (Ye & Liu 2002; Arinze & Kawai 2003; Chu *et al.* 2003). Previous studies have demonstrated that for Sp1, Thr⁴⁵³ or Thr⁷³⁹ phosphorylation by p42/p44 MAPK enhanced DNA binding, resulting in increased VEGF gene expression, a Sp1/3 target gene (Milanini-Mongiati *et al.* 2002). It was also shown that Imatinib (STI-571), a BCR/Abl tyrosine kinase inhibitor, negatively regulated VEGF expression via the inhibition of p42/p44 MAPK and Sp1/3 DNA binding (Legros *et al.* 2004). Therefore, we wanted to determine the importance of Pin1 for Sp1/3 binding to targeted DNA domains. To do this, we performed Sp transcription factor-enzyme-linked immunoassays (TF-EIA) using double-strand DNA oligonucleotides containing specific Sp1/3 binding sites (GC-rich sequences) (Blouin *et al.* 2004). As seen in Figure 4A, Sp1 DNA binding was significantly decreased in siSp-transfected cells as compared to siCtrl cells. Additionally, cells treated with PD98059, an inhibitor of p42/p44 MAPK pathway activity, also showed decreased Sp1 DNA binding as compared to untreated cells. More interestingly, siPin1-transfected cells also showed significantly decreased Sp1 DNA binding. However, PD98059 pretreatment or Pin1 inhibition had only minor effect on Sp3 DNA binding affinity (Figure 4B). Taken together, these results indicate that Pin1 regulates Sp1/3 transcriptional activity, at least in part, through the modulation of DNA binding capacity.

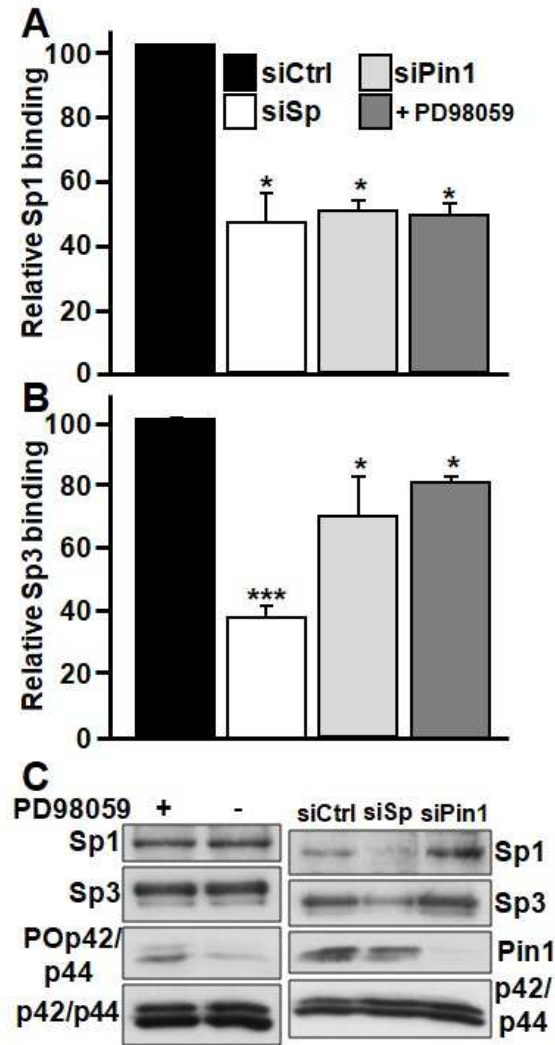


Figure 3.4: Sp1/3 DNA binding affinity is modulated by Pin1. HeLa cells were treated (+) or not (-) with PD98059 (50 μ M) or transfected with a control siRNA (siCtrl), a siRNA against Pin1 (siPin1) or siRNA against both Sp1 and Sp3 (siSp). Nuclear extracts were incubated in a 96-well plate coated with oligonucleotides containing the Sp1/3 binding motif. Sp1 bound to DNA were detected using anti-Sp1 antibody (A) and Sp3 bound to DNA were detected using anti-Sp3 antibody (B). Results are expressed as the fold increase of absorbance at 450 nM over control conditions and are an average \pm SEM of, at least, two independent experiments performed in triplicate. * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ as compared to control cells. (C) Protein samples were Western blotted with antibodies against Sp1, Sp3, Pin1, phospho-p42/p44 (POp42/p44) and total-p42/p44 (p42/p44).

3.6.5 Pin1 is required for Sp1/3-mediated *HIF-1A* gene expression

Our research has shown that Sp1/3 transcription factors play an important role in the activation of *HIF-1A* transcription (Lafleur *et al.* 2014). Previous studies demonstrated that the *HIF-1A* gene promoter contains several Sp1/3 binding sites (Iyer *et al.* 1998b; Minet *et al.* 1999). These specific DNA-binding sequences are required for constitutive *HIF-1A* gene transcription. We therefore decided to investigate whether Pin1 is implicated in Sp1/3-mediated *HIF-1A* gene expression. To undertake these experiments, we performed a reporter assay using a luciferase construct driven by the minimal *HIF-1A* gene promoter (pHIF1A-571/+32Luc). Cells were transiently transfected with pHIF1A-571/+32Luc, siCtrl or siPin1 along with Sp1, Sp3 or control (pcDNA3) vectors. As shown in Figure 5A, the expression of either Sp1 or Sp3 significantly increased *HIF-1A* gene promoter activity as compared to cells transfected with the control vector. Interestingly, increased Sp1/3-dependent *HIF-1A* gene promoter activity was blocked by Pin1 depletion. We then examined the effect of Pin1 overexpression on Sp-mediated *HIF-1A* gene promoter activity. As seen in Figure 5B, cells transfected with either Sp1 or Pin1 showed increased *HIF-1A* gene promoter activity as compared to control cells. More importantly, cells expressing both Sp1 and Pin1 demonstrated enhanced promoter activity in a concentration-dependent manner. These findings indicate that Pin1 is important for Sp-mediated *HIF-1A* gene expression. To determine whether Pin1 isomerization activity is essential for *HIF-1A* transcriptional activation, we performed reporter assays using a catalytically inactive PPIase Pin1 mutant (K63A). Cells were transiently transfected with the pHIF1A-571/+32Luc, Sp1 and either wild-type (WT) Pin1 or K63A Pin1 construct. As seen in Figure 5C, enhanced *HIF-1A* gene promoter activity, observed when cells are transfected with Sp1 and WT Pin1, was not observed in cells transfected with Sp1 and K63A Pin1. Taken together, these results indicate that Pin1 PPIase activity promotes Sp-mediated *HIF-1A* gene expression.

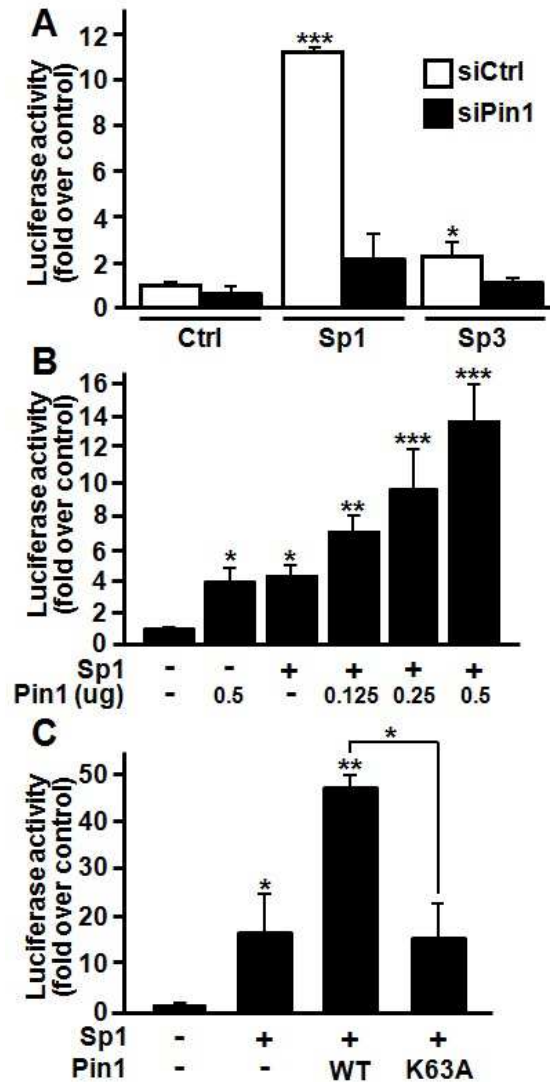


Figure 3.5: Pin1 is required for the Sp1/3-dependent expression of HIF-1 α . (A) HEK 293T Cells were transfected with a control siRNA (siCtrl) and siRNA targeting Pin1 (siPin1) along with Sp1, Sp3 or pCDNA3 (Ctrl) plasmids and pHIF1A-571/+32Luc vector. 48 h post-transfection, cells were lysed and luciferase activity was measured. (B) HEK 293T cells were transfected with Sp1, Pin1 or pCDNA3(-) plasmids along with pHIF1A-571/+32Luc vector. 48 h after transefection, cells were lysed and luciferase activity was measured. (C) HEK 293T cells were transfected with Sp1, wild-type Pin1 (WT), catalytically inactive Pin1K63A (K63A) or pCDNA3(-) plasmids. 48 h post-transfection, cells were lysed and luciferase activity was measured as described above. All results are expressed as a ratio of firefly luciferase activity to total protein levels and are an average \pm SEM of, at least, two independent experiments performed in triplicate. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ as compared to control transfected cells or the indicated conditions.

3.7 Discussion

By controlling the expression of several genes implicated in driving the tumor process, Sp1 and Sp3 are key regulators of cancer development (Abdelrahim *et al.* 2004; He & Davie 2006; Jungert *et al.* 2006; Song *et al.* 2010; Chang & Hung 2012; Hsu *et al.* 2012). In order to mediate responses under different circumstances, Sp family members are fine-tuned by a broad range of factors and signaling pathways. Interestingly, Pin1 was shown to play an important role in regulating transcriptional activity of Sp7 (Osterix) through a direct interaction (Lee *et al.* 2015). More importantly, it was shown that in mitotic cells, Pin1 binds phosphorylated Sp1 to maintain its stability and reduce its DNA binding ability, an important event for chromosome packaging and thereby cell cycle progression (Yang *et al.* 2014). In the present study, we push these important findings further by demonstrating that Pin1 is also required for positive regulation of Sp1 transcriptional activity and *HIF-1A* expression, an important target gene. Hence, we demonstrate that Pin1 can indeed bind to Sp1. This interaction is essential for increasing the activity and the binding affinity of Sp1 to specific DNA sites. Furthermore, we show, for the first time, that Pin1 is also a potent regulator of Sp3 activity through interacting with Ser⁷³-phosphorylated Sp3 in p42/p44 MAPK phosphorylation-dependent manner.

Depending on cell conditions or phosphorylation status, Sp1/3 DNA binding capacity and transcriptional activity can either be positively or negatively regulated (Li *et al.* 2004; Chu & Ferro 2005; Tan & Khachigian 2009; Chang & Hung 2012; Chu 2012). It was shown that in mitotic cells, Sp1 phosphorylation on Thr⁷³⁹ by CDK1 reduced DNA binding affinity (Chuang *et al.* 2012). However, phosphorylation of Sp1 at Thr⁴⁵³ and Thr⁷³⁹ by p42/p44 MAPK, in interphase, increases its transcriptional activity (Milanini-Mongiat *et al.* 2002). Additionally, previous studies demonstrated that Sp1 is also phosphorylated at Ser⁵⁹, by cyclin A/CDK, to enhance its DNA binding activity (Fojas de Borja *et al.* 2001). Nevertheless, the molecular mechanism by which these specific modifications regulated Sp1/3 DNA binding affinity and transcriptional activity was not fully elucidated. Recently, it was shown that during mitosis, Pin1 interacts with Thr⁷³⁹-phosphorylated Sp1 to decrease its DNA binding capacity, facilitating its release from the chromosomes and leading to chromatin condensation (Yang *et al.* 2014). Here, we

demonstrate that, through binding Thr⁷³⁹-phosphorylated Sp1, Pin1 is also required for the movement of Sp1 within the chromosomes and hence, for a Sp1-mediated transcriptional response. Through its positive effect on Sp1 DNA binding capacity and activity, we report in the present study a new and additional regulatory mechanism of Sp1 by Pin1, which reinforces the importance of Pin1 in controlling Sp1 function during cell cycle progression. During mitosis, Pin1 enables the detachment of Sp1 from the chromosome, thereby facilitating its packaging. However, it positively influences Sp1 transcriptional activity during interphase, promoting target gene expression. We believe that our work provides a better understanding of the mechanism implicated in the regulation of Sp1/3 activity by phosphorylation and a possible explanation of how a single phosphorylation site on Sp1, namely Thr⁷³⁹, exerts opposite effects on its transcriptional activity.

Pin1, as an isomerase that promotes conformational changes of its substrate factors through its PPIase domain, is known to play an important role in regulating the function of diverse transcription factors (Lu & Zhou 2007). It was shown that Pin1 can regulate the activity of estrogen receptor α (ER α) by modulating DNA binding affinity in an isomerization dependent manner (Rajbhandari *et al.* 2015). Accordingly, we report here that Pin1 PPIase activity plays a crucial role in regulating Sp1/3-target gene, *HIF-1A*. Our results indicate that Pin1 interacts with Sp1 to increase its transcriptional activity by modulating its binding affinity to consensus DNA elements and that Thr⁷³⁹ is required for the interaction between Pin1 and Sp1. The specific localisation of Thr⁷³⁹, which is present in the C-terminal extremity responsible for the binding of Sp1 to specific DNA sites, may explain the importance of this residue for Sp1 binding to Pin1. Our results also demonstrate that Pin1 plays a crucial role in regulating the activity of Sp3. However, its effect on Sp3 DNA binding affinity was not as clear as for Sp1. These results agree with previous reports indicating that Sp3 phosphorylation at Ser⁷³ by p42/p44 MAPK had only a modest effect on Sp3 DNA binding capacity while still increasing its transcriptional activity (Pages 2007). Since the Sp3 Ser⁷³ phosphorylation site is located next to Sp3's two N-terminus transcription activation domains, it is logical that post-translational

modifications of this residue affect the Sp3 transcriptional activation capacity while only partially influencing DNA binding, possibly in an indirect manner.

During mitosis, it has been shown that high Sp1 phosphorylation by CDK1 is responsible for decreasing DNA binding activity (Yang *et al.* 2014). However, at the beginning of the interphase, Sp1 was shown to be dephosphorylated by protein phosphatase 2 (PP2A) which allows its return to chromosomes (Chuang *et al.* 2012). Since Pin1 isomerization of Ser/Thr-Pro motifs is known to be important in facilitating the binding of kinases and phosphatases (Zhou *et al.* 2000; Werner-Allen *et al.* 2011), our work raises the possibility that Pin1 can promote conformational changes of Sp1 to increase its interaction with PP2A and thereby to enable its dephosphorylation. Given that Thr⁷³⁹ is present in the D domain at the C-terminal extremity of Sp1, which is necessary for the interaction with Sp1 partners and the synergistic transcriptional activation, it is possible that Pin1 isomerization of Sp1 could increase its binding with transcriptional co-activators and chromatin remodeling factors (Pascal & Tjian 1991; Lee *et al.* 1993; Doetzlhofer *et al.* 1999). Pin1 may also prevent the interaction of Sp1 transcriptional inhibitors. Another possible mechanism is that changes in Sp1 conformation may simply increase its affinity to bind the GC-rich sequence. Further investigation underlying the regulation of Sp1/3 activity by Pin1 will provide a better understanding of the full mechanism by which phosphorylation and Pin1 regulate Sp1/3 activity.

Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) is a major regulator of cellular homeostasis in response to hypoxic stress. It promotes cell adaptation to hypoxic conditions by activating the expression of several genes involved in diverse cell processes such as angiogenesis, glucose metabolism and cell respiration (Semenza 2003). Maximal HIF-1 activity requires transcriptional, translational and post-translational regulation of its essential HIF-1 α subunit (Page *et al.* 2002; Brahimi-Horn *et al.* 2005; Dengler *et al.* 2014). We recently demonstrated that Pin1 is an essential regulator of HIF-1 activity by interacting with HIF-1 α and altering its conformation (Jalouli *et al.* 2014). Interaction of Pin1 with HIF-1 α was shown to be important for maintaining HIF-1 α stability (Han *et al.* 2016). It has also been reported that Pin1 acts indirectly on HIF-1 α stability by promoting

promyelocytic leukemia (PML) proteasomal degradation, a negative regulator of HIF-1 (Yuan *et al.* 2011). In this study, we show that Pin1-mediated increase in Sp1/3 activity is important for the transcription of *HIF-1A*. Thus, we demonstrate, for the first time, that Pin1 is involved in regulating *HIF-1A* gene expression, an additional mechanism for the HIF-1 regulation by Pin1 which may provide a better understanding of HIF-mediated adaptive responses.

In summary, our work strengthens current knowledge concerning links between Sp1/3 phosphorylation, Pin1 activity and Sp1/3 transcriptional activity. Hence, we identify Pin1 as a positive regulator of Sp1/3 transcription factors. Our data indicates that the interaction between Pin1 and phosphorylated Sp1/3 allows for the regulation of Sp1/3 transcriptional activity and an important target gene, *HIF-1A*. Given that Pin1, Sp1/3, and HIF-1 play an important role in tumorigenesis, our study provides a better understanding of the molecular network between these factors in the context of cancer and should have a strong impact on strategies for the therapeutic targeting of Pin1.

3.8 Acknowledgements

This work was supported by research grants to D.E.R. from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR; MOP-102760) and the Heart and Stroke Foundation of Québec. We thank Drs Kun Ping Lu, Gilles Pagès and Gregg Semenza for providing certain molecular tools and cell lines used in this manuscript.

3.9 References

- Abdelrahim M., Smith R., 3rd, Burghardt R. & Safe S. (2004) Role of Sp proteins in regulation of vascular endothelial growth factor expression and proliferation of pancreatic cancer cells. *Cancer Res* **64**, 6740-9.
- Arinze I.J. & Kawai Y. (2003) Sp family of transcription factors is involved in valproic acid-induced expression of Galphai2. *J Biol Chem* **278**, 17785-91.
- Blouin C.C., Page E.L., Soucy G.M. & Richard D.E. (2004) Hypoxic gene activation by lipopolysaccharide in macrophages: implication of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Blood* **103**, 1124-30.
- Bonello M.R. & Khachigian L.M. (2004) Fibroblast growth factor-2 represses platelet-derived growth factor receptor-alpha (PDGFR-alpha) transcription via ERK1/2-dependent Sp1 phosphorylation and an atypical cis-acting element in the proximal PDGFR-alpha promoter. *J Biol Chem* **279**, 2377-82.
- Brahimi-Horn C., Mazure N. & Pouyssegur J. (2005) Signalling via the hypoxia-inducible factor-1alpha requires multiple posttranslational modifications. *Cell Signal* **17**, 1-9.
- Briggs M.R., Kadonaga J.T., Bell S.P. & Tjian R. (1986) Purification and biochemical characterization of the promoter-specific transcription factor, Sp1. *Science* **234**, 47-52.
- Chang W.C. & Hung J.J. (2012) Functional role of post-translational modifications of Sp1 in tumorigenesis. *J Biomed Sci* **19**, 94.
- Chu S. (2012) Transcriptional regulation by post-transcriptional modification--role of phosphorylation in Sp1 transcriptional activity. *Gene* **508**, 1-8.
- Chu S., Cockrell C.A. & Ferro T.J. (2003) Expression of alpha-ENaC2 is dependent on an upstream Sp1 binding motif and is modulated by protein phosphatase 1 in lung epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **303**, 1159-68.
- Chu S. & Ferro T.J. (2005) Sp1: regulation of gene expression by phosphorylation. *Gene* **348**, 1-11.
- Chuang J.Y. & Hung J.J. (2011) Overexpression of HDAC1 induces cellular senescence by Sp1/PP2A/pRb pathway. *Biochem Biophys Res Commun* **407**, 587-92.
- Chuang J.Y., Wang S.A., Yang W.B., Yang H.C., Hung C.Y., Su T.P., Chang W.C. & Hung J.J. (2012) Sp1 phosphorylation by cyclin-dependent kinase 1/cyclin B1 represses its DNA-binding activity during mitosis in cancer cells. *Oncogene* **31**, 4946-59.

- Davie J.R., He S., Li L., Sekhavat A., Espino P., Drobic B., Dunn K.L., Sun J.M., Chen H.Y., Yu J., Pritchard S. & Wang X. (2008) Nuclear organization and chromatin dynamics--Sp1, Sp3 and histone deacetylases. *Adv Enzyme Regul* **48**, 189-208.
- Dengler V.L., Galbraith M.D. & Espinosa J.M. (2014) Transcriptional regulation by hypoxia inducible factors. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **49**, 1-15.
- Doetzlhofer A., Rotheneder H., Lagger G., Koranda M., Kurtev V., Brosch G., Wintersberger E. & Seiser C. (1999) Histone deacetylase 1 can repress transcription by binding to Sp1. *Mol Cell Biol* **19**, 5504-11.
- Dynan W.S. & Tjian R. (1983) The promoter-specific transcription factor Sp1 binds to upstream sequences in the SV40 early promoter. *Cell* **35**, 79-87.
- Fojas de Borja P., Collins N.K., Du P., Azizkhan-Clifford J. & Mudryj M. (2001) Cyclin A-CDK phosphorylates Sp1 and enhances Sp1-mediated transcription. *EMBO J* **20**, 5737-47.
- Fujimori F., Takahashi K., Uchida C. & Uchida T. (1999) Mice lacking Pin1 develop normally, but are defective in entering cell cycle from G(0) arrest. *Biochem Biophys Res Commun* **265**, 658-63.
- Han H.J., Kwon N., Choi M.A., Jung K.O., Piao J.Y., Ngo H.K., Kim S.J., Kim D.H., Chung J.K., Cha Y.N., Youn H., Choi B.Y., Min S.H. & Surh Y.J. (2016) Peptidyl Prolyl Isomerase PIN1 Directly Binds to and Stabilizes Hypoxia-Inducible Factor-1alpha. *PLoS One* **11**, e0147038.
- He S. & Davie J.R. (2006) Sp1 and Sp3 foci distribution throughout mitosis. *J Cell Sci* **119**, 1063-70.
- Hsu T.I., Wang M.C., Chen S.Y., Yeh Y.M., Su W.C., Chang W.C. & Hung J.J. (2012) Sp1 expression regulates lung tumor progression. *Oncogene* **31**, 3973-88.
- Iyer N.V., Leung S.W. & Semenza G.L. (1998) The human hypoxia-inducible factor 1alpha gene: HIF1A structure and evolutionary conservation. *Genomics* **52**, 159-65.
- Jalouli M., Dery M.A., Lafleur V.N., Lamalice L., Zhou X.Z., Lu K.P. & Richard D.E. (2014) The prolyl isomerase Pin1 regulates hypoxia-inducible transcription factor (HIF) activity. *Cell Signal* **26**, 1649-56.
- Jungert K., Buck A., Buchholz M., Wagner M., Adler G., Gress T.M. & Ellenrieder V. (2006) Smad-Sp1 complexes mediate TGFbeta-induced early transcription of oncogenic Smad7 in pancreatic cancer cells. *Carcinogenesis* **27**, 2392-401.
- Kadonaga J.T., Carner K.R., Masiarz F.R. & Tjian R. (1987) Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain. *Cell* **51**, 1079-90.
- Kadonaga J.T. & Tjian R. (1986) Affinity purification of sequence-specific DNA binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 5889-93.
- Khanal P., Yun H.J., Lim S.C., Ahn S.G., Yoon H.E., Kang K.W., Hong R. & Choi H.S. (2012) Proyl isomerase Pin1 facilitates ubiquitin-mediated degradation of cyclin-dependent kinase 10 to induce tamoxifen resistance in breast cancer cells. *Oncogene* **31**, 3845-56.
- Koshikawa N., Hayashi J., Nakagawara A. & Takenaga K. (2009) Reactive oxygen species-generating mitochondrial DNA mutation up-regulates hypoxia-inducible

- factor-1alpha gene transcription via phosphatidylinositol 3-kinase-Akt/protein kinase C/histone deacetylase pathway. *J Biol Chem* **284**, 33185-94.
- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.
- Lafleur V.N., Richard S. & Richard D.E. (2014) Transcriptional repression of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) by the protein arginine methyltransferase PRMT1. *Mol Biol Cell* **25**, 925-35.
- Lee J.S., Galvin K.M. & Shi Y. (1993) Evidence for physical interaction between the zinc-finger transcription factors YY1 and Sp1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 6145-9.
- Lee S.H., Jeong H.M., Han Y., Cheong H., Kang B.Y. & Lee K.Y. (2015) Prolyl isomerase Pin1 regulates the osteogenic activity of Osterix. *Mol Cell Endocrinol* **400**, 32-40.
- Legros L., Bourcier C., Jacquelin A., Mahon F.X., Cassuto J.P., Auberger P. & Pages G. (2004) Imatinib mesylate (STI571) decreases the vascular endothelial growth factor plasma concentration in patients with chronic myeloid leukemia. *Blood* **104**, 495-501.
- Li L., He S., Sun J.M. & Davie J.R. (2004) Gene regulation by Sp1 and Sp3. *Biochem Cell Biol* **82**, 460-71.
- Liou Y.C., Zhou X.Z. & Lu K.P. (2011) Prolyl isomerase Pin1 as a molecular switch to determine the fate of phosphoproteins. *Trends Biochem Sci* **36**, 501-14.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. & Randall R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**, 265-75.
- Lu K.P., Finn G., Lee T.H. & Nicholson L.K. (2007) Prolyl cis-trans isomerization as a molecular timer. *Nat Chem Biol* **3**, 619-29.
- Lu K.P., Hanes S.D. & Hunter T. (1996) A human peptidyl-prolyl isomerase essential for regulation of mitosis. *Nature* **380**, 544-7.
- Lu K.P. & Zhou X.Z. (2007) The prolyl isomerase PIN1: a pivotal new twist in phosphorylation signalling and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 904-16.
- Lu P.J., Zhou X.Z., Liou Y.C., Noel J.P. & Lu K.P. (2002) Critical role of WW domain phosphorylation in regulating phosphoserine binding activity and Pin1 function. *J Biol Chem* **277**, 2381-4.
- Lu P.J., Zhou X.Z., Shen M. & Lu K.P. (1999) Function of WW domains as phosphoserine- or phosphothreonine-binding modules. *Science* **283**, 1325-8.
- Milanini-Mongiati J., Pouyssegur J. & Pages G. (2002) Identification of two Sp1 phosphorylation sites for p42/p44 mitogen-activated protein kinases: their implication in vascular endothelial growth factor gene transcription. *J Biol Chem* **277**, 20631-9.
- Minet E., Ernest I., Michel G., Roland I., Remacle J., Raes M. & Michiels C. (1999) HIF1A gene transcription is dependent on a core promoter sequence encompassing activating and inhibiting sequences located upstream from the transcription initiation site and cis elements located within the 5'UTR. *Biochem Biophys Res Commun* **261**, 534-40.

- Page E.L., Robitaille G.A., Pouyssegur J. & Richard D.E. (2002) Induction of hypoxia-inducible factor-1alpha by transcriptional and translational mechanisms. *J Biol Chem* **277**, 48403-9.
- Pages G. (2007) Sp3-mediated VEGF regulation is dependent on phosphorylation by extra-cellular signals regulated kinases (Erk). *J Cell Physiol* **213**, 454-63.
- Pascal E. & Tjian R. (1991) Different activation domains of Sp1 govern formation of multimers and mediate transcriptional synergism. *Genes Dev* **5**, 1646-56.
- Rajbhandari P., Ozers M.S., Solodin N.M., Warren C.L. & Alarid E.T. (2015) Peptidylprolyl Isomerase Pin1 Directly Enhances the DNA Binding Functions of Estrogen Receptor alpha. *J Biol Chem* **290**, 13749-62.
- Semenza G.L. (2003) Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **3**, 721-32.
- Semenza G.L. & Wang G.L. (1992) A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* **12**, 5447-54.
- Shen M., Stukenberg P.T., Kirschner M.W. & Lu K.P. (1998) The essential mitotic peptidyl-prolyl isomerase Pin1 binds and regulates mitosis-specific phosphoproteins. *Genes Dev* **12**, 706-20.
- Song I.S., Ha G.H., Kim J.M., Jeong S.Y., Lee H.C., Kim Y.J., Kwon T.K. & Kim N.S. (2010) Human ZNF312b oncogene is regulated by Sp1 binding to its promoter region through DNA demethylation and histone acetylation in gastric cancer. *Int J Cancer*.
- Suske G., Bruford E. & Philipsen S. (2005) Mammalian SP/KLF transcription factors: bring in the family. *Genomics* **85**, 551-6.
- Tan N.Y. & Khachigian L.M. (2009) Sp1 phosphorylation and its regulation of gene transcription. *Mol Cell Biol* **29**, 2483-8.
- Werner-Allen J.W., Lee C.J., Liu P., Nicely N.I., Wang S., Greenleaf A.L. & Zhou P. (2011) cis-Proline-mediated Ser(P)5 dephosphorylation by the RNA polymerase II C-terminal domain phosphatase Ssu72. *J Biol Chem* **286**, 5717-26.
- Wulf G., Finn G., Suizu F. & Lu K.P. (2005) Phosphorylation-specific prolyl isomerization: is there an underlying theme? *Nat Cell Biol* **7**, 435-41.
- Yang H.C., Chuang J.Y., Jeng W.Y., Liu C.I., Wang A.H., Lu P.J., Chang W.C. & Hung J.J. (2014) Pin1-mediated Sp1 phosphorylation by CDK1 increases Sp1 stability and decreases its DNA-binding activity during mitosis. *Nucleic Acids Res* **42**, 13573-87.
- Ye X. & Liu S.F. (2002) Lipopolysaccharide down-regulates Sp1 binding activity by promoting Sp1 protein dephosphorylation and degradation. *J Biol Chem* **277**, 31863-70.
- Yoon W.J., Cho Y.D., Kim W.J., Bae H.S., Islam R., Woo K.M., Baek J.H., Bae S.C. & Ryoo H.M. (2014) Prolyl isomerase Pin1-mediated conformational change and subnuclear focal accumulation of Runx2 are crucial for fibroblast growth factor 2 (FGF2)-induced osteoblast differentiation. *J Biol Chem* **289**, 8828-38.
- Yoon W.J., Islam R., Cho Y.D., Woo K.M., Baek J.H., Uchida T., Komori T., van Wijnen A., Stein J.L., Lian J.B., Stein G.S., Choi J.Y., Bae S.C. & Ryoo H.M. (2013) Pin1-mediated Runx2 modification is critical for skeletal development. *J Cell Physiol* **228**, 2377-85.

- Yuan W.C., Lee Y.R., Huang S.F., Lin Y.M., Chen T.Y., Chung H.C., Tsai C.H., Chen H.Y., Chiang C.T., Lai C.K., Lu L.T., Chen C.H., Gu D.L., Pu Y.S., Jou Y.S., Lu K.P., Hsiao P.W., Shih H.M. & Chen R.H. (2011) A Cullin3-KLHL20 Ubiquitin ligase-dependent pathway targets PML to potentiate HIF-1 signaling and prostate cancer progression. *Cancer Cell* **20**, 214-28.
- Zhou X.Z., Kops O., Werner A., Lu P.J., Shen M., Stoller G., Kullertz G., Stark M., Fischer G. & Lu K.P. (2000) Pin1-dependent prolyl isomerization regulates dephosphorylation of Cdc25C and tau proteins. *Mol Cell* **6**, 873-83.

Chapitre 4: Selective HIF-1 Regulation under Nonhypoxic Conditions by the p42/p44 MAP Kinase Inhibitor, PD184161

Maroua Jalouli, Sophie Mokas, Catherine A. Turgeon, Laurent Lamalice, Darren E. Richard

Centre de recherche du CHU de Québec, Department of Molecular Biology, Medical Biochemistry and Pathology, Université Laval, Québec, QC.

Running title: HIF-1 regulation by PD184161

Abbreviations: Ang II, angiotensin II; CoCl₂, cobalt chloride; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; EGFR, epidermal growth factor receptor; GST, glutathione S-transferase; HA, hemagglutinin; HIF-1, hypoxia-inducible factor-1; MAPK, mitogen-activated protein kinase; MG132, benzyl N-[(2S)-4-methyl-1-[[[(2S)-4-methyl-1-[[[(2S)-4-methyl-1-oxopentan-2-yl]amino]-1-oxopentan-2-yl]amino]-1-oxopentan-2-yl]carbamate]; mito-KATP, mitochondrial ATP-sensitive potassium channel; mtROS, mitochondria-derived reactive oxygen species; ODDD, oxygen-dependent degradation domain; PD184161, 5-bromo-2-[2-chloro-4-iodo-phenylamino]-N-cyclopropylmethoxy-3,4-difluoro-benzamide; PD98059, 2-(2-amino-3-methoxyphenyl)-4H-chromen-4-one; PDGF, platelet-derived growth factor; PHD, HIF prolyl hydroxylase domain-containing enzymes; qRT-PCR, real-time quantitative reverse transcription–polymerase chain reaction; S1P, sphingosine-1-phosphate; SkQ1, 10-(6'-plastoquinonyl) decyltriphenylphosphonium; Thr, thrombin; TMRM, tetramethylrhodamine methyl ester; U0126, 1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis(2-aminophenylthio)butadiene; VHL, von Hippel-Lindau tumor suppressor protein; VSMC, vascular smooth muscle cells.

Correspondence to: Darren E. Richard, darren.richard@crchudequebec.ulaval.ca

Reprinted with permission of the American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics. All rights reserved.

4.1 Avant-propos

Ce chapitre présente mes travaux abordant l'impact de PD184161, un inhibiteur de MEK1/2, sur l'induction non-hypoxique de la sous-unité HIF-1 α . Ces travaux ont été récemment publiés dans le journal *Molecular Pharmacology* en novembre 2017. Ces travaux sont reproduits avec la permission d'*American Society for Pharmacology and Experimental therapeutics* (Copyright 2017, American Society for Pharmacology and Experimental therapeutics), à qui une cession de droits a été signée par tous les coauteurs.

En tant que premier auteur, j'ai conçu et réalisé la presque totalité des expérimentations de ce projet. J'ai également rédigé le manuscrit, qui a été corrigé par Dr. Darren E. Richard, et effectué les révisions proposées. Sophie Mokas a été d'une aide précieuse dans la culture des VSMC ainsi que dans la transfection de ces cellules par le vecteur rapporteur luc-HIF-1 α -ODDD, a participé aux expérimentations de MitoSOX et a contribué à la correction du manuscrit. Catherine Turgeon et Laurent Lamalice ont contribué aux résultats présentés aux figures 4.2C, 4.5B, 4.6 et 4.7 et à la révision du manuscrit. L'ensemble de cette étude a été réalisé sous la direction du Dr. Darren E. Richard.

4.2 Résumé

Le facteur induit par l'hypoxie 1 (HIF-1) est un régulateur clé des gènes permettant l'adaptation cellulaire à de faibles niveaux d'oxygène. En plus de l'hypoxie, plusieurs stimuli non-hypoxiques, incluant des hormones et des facteurs de croissances, participent à la régulation cellulaire spécifique de HIF-1. Nos études ont identifié l'angiotensine II (Ang II), une hormone vasoactive, comme un activateur puissant de HIF-1 chez les cellules musculaires lisses vasculaires (VSMC). L'Ang II a été démontré pour augmenter l'activité transcriptionnelle de HIF-1 en modulant des sentiers de signalisation spécifiques. Chez les VSMC, l'activation de la voie des protéines kinases p42/p44 activées par des mitogènes (MAPK) est essentielle pour la transcription médiée par HIF-1 lors d'un traitement à l'Ang II. Cette étude présente PD184161, un inhibiteur puissant de MEK1/2, comme un inhibiteur de la protéine HIF-1 α chez les VSMC traitées avec l'Ang II. Nous avons constaté que contrairement à PD98059, un inhibiteur de MEK1/2 largement utilisé, PD184161 bloque l'induction de HIF-1 α par l'Ang II de manière dose-dépendante. De façon intéressante, l'effet de PD184161 est spécifique aux inducteurs non-hypoxiques, puisque l'induction de HIF-1 α par l'hypoxie n'est pas affectée dans des conditions identiques. Le traitement des VSMC avec MG132, un inhibiteur du protéasome, a indiqué que PD184161 influence la stabilité de la protéine HIF-1 α . Nous démontrons également que PD184161 augmente la liaison de HIF-1 α à VHL, une composante du complexe E3 ubiquitine ligase, ce qui indique l'hydroxylation de HIF-1 α . Finalement, nous montrons que PD184161 modifie la production des mtROS et augmente la disponibilité de l'ascorbate dans les VSMC traitées avec l'Ang II. Notre étude indique que, indépendamment de l'activation de la voie p42/p44 MAPK, PD184161 bloque la génération de mtROS par l'Ang II, ce qui entraîne le rétablissement du niveau intracellulaire d'ascorbate, l'augmentation de la liaison à VHL, et la diminution de la stabilité de HIF-1 α . Ainsi, cette étude met en lumière un rôle précédemment inattendu de cet inhibiteur puissant de MEK1/2, qui est l'inhibition de HIF-1 dans des conditions non-hypoxiques chez les VSMC.

4.3 Abstract

Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) is a key gene regulator for cellular adaptation to low oxygen. In addition to hypoxia, several nonhypoxic stimuli, including hormones and growth factors, are an essential part for cell-specific HIF-1 regulation. Our studies have highlighted angiotensin II (Ang II), a vasoactive hormone, as a potent HIF-1 activator in vascular smooth muscle cells (VSMC). Ang II increases HIF-1 transcriptional activity by modulating specific signaling pathways. In VSMC, p42/p44 mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway activation is essential for HIF-1-mediated transcription during Ang II treatment. The present study shows that PD184161, a potent MEK1/2 inhibitor, is a HIF-1 blocker in Ang II-treated VSMC. Unlike PD98059, a widely-used MEK1/2 inhibitor, we found that PD184161 blocked Ang II-driven HIF-1 α protein induction in a dose-dependent manner. Interestingly, the effect of PD184161 was specific to nonhypoxic activators, since HIF-1 α induction by hypoxia (1% O₂) was unaffected under similar conditions. VSMC treatment with MG132, a proteasome inhibitor, indicated that PD184161 influenced HIF-1 α protein stability. PD184161 also increased HIF-1 α binding to VHL, a E3 ligase component and an indication of HIF-1 α hydroxylation. Finally, we show that PD184161 blocked mitochondrial ROS (mtROS) production and cellular ATP levels, while enhancing ascorbate availability in Ang II-treated VSMC. Taken together, our study indicates that, independently of p42/p44MAPK activation, PD184161 blocks mtROS generation by Ang II, leading to reestablishment of cellular ascorbate levels, increased VHL binding and decreased HIF-1 α stability. Therefore, this study reveals a previously unsuspected role for PD184161 as a HIF-1 inhibitor in VSMC under nonhypoxic conditions.

4.4 Introduction

Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) is an essential transcription factor for all cells that regulates cellular adaptation responses to low oxygen (O₂) availability (Semenza 2003). Transcriptionally active HIF-1 is a heterodimeric complex composed of a stable HIF-1 β subunit and an oxygen-sensitive HIF-1 α subunit. HIF-1 is mainly regulated by proteasomal degradation, a mechanism under the control of oxygen-sensitive HIF prolyl hydroxylase domain-containing enzymes (PHD) (Epstein *et al.* 2001; Ivan *et al.* 2001; Jaakkola *et al.* 2001; Kaelin & Ratcliffe 2008). Under normal O₂, HIF-1 α is hydroxylated on two conserved proline residues (P⁴⁰² and P⁵⁶⁴ for human HIF-1) located within its oxygen-dependent degradation domain (ODDD). PHD activity and HIF-1 α hydroxylation are dependent on obligate cofactors including O₂, 2-oxoglutarate, iron (Fe) and ascorbate (Schofield & Ratcliffe 2005). Ascorbate rescues PHD activity following the hydroxylation reaction by reducing inactive Fe³⁺ to active Fe²⁺ (de Jong *et al.* 1982; Majamaa *et al.* 1986). HIF-1 α hydroxylation promotes von Hippel-Lindau tumor suppressor protein (VHL)-directed HIF-1 α polyubiquitination and subsequent proteasomal degradation (Huang *et al.* 1998; Maxwell *et al.* 1999; Cockman *et al.* 2000; Ivan *et al.* 2001; Jaakkola *et al.* 2001). When cofactor availability is modified, such as during low O₂, PHD activity and HIF-1 α stability are directly altered. Stable HIF-1 α can bind constitutive HIF-1 β , forming the functional HIF-1 transcription complex. HIF-1 binds to specific hypoxia response elements (HRE), found within target genes promoters, resulting in adaptive gene activation. HIF-1 activation is also dependent on HIF-1 α phosphorylation by p42/p44 mitogen-activated protein kinases (MAPK) (Richard *et al.* 1999; Minet *et al.* 2000; Hur *et al.* 2001; Sodhi *et al.* 2001; Fukuda *et al.* 2002; Lee *et al.* 2002; Sutton *et al.* 2007). HIF-1 α phosphorylation permits Pin1 binding, a proline isomerase, which is indispensable for full HIF-1 transcriptional activity. (Jalouli *et al.* 2014; Han *et al.* 2016).

Under normal O₂, HIF-1 is also activated by different cellular stimuli, a condition we described as nonhypoxic HIF-1 activation. Vascular smooth muscle cells (VSMC) show nonhypoxic HIF-1 activation following cell treatment with different receptor agonists, including angiotensin II (Ang II), platelet derived growth factor (PDGF),

sphingosine-1-phosphate (S1P), and thrombin (Thr) (Richard *et al.* 2000; Michaud *et al.* 2009). Distinct mechanisms come together for nonhypoxic HIF-1 activation in VSMC, including transcriptional and translational upregulation (Richard *et al.* 2000; Page *et al.* 2002; Lauzier *et al.* 2007; Page *et al.* 2008; Patten *et al.* 2010). HIF-1 α protein stabilization is arguably the main mechanism for HIF-1 activation under these conditions. By stimulating mitochondrial-derived reactive oxygen species (mtROS) generation, Ang II treatment causes a prooxidative intracellular microenvironment which leads to ascorbate depletion, PHD inhibition and finally HIF-1 α stabilization (Page *et al.* 2008; Patten *et al.* 2010).

In this study, we show that PD184161 (5-bromo-2-[2-chloro-4-iodo-phenylamino]-N-cyclopropylmethoxy-3,4-difluoro-benzamide), abolishes Ang II-induced HIF-1 activation in VSMC independently of p42/p44 MAPK activity. PD184161 is a potent and selective inhibitor of MEK1/2 (IC₅₀ = 10-100 nM). Biologically active in plasma and more effective at inhibiting p42/p44 MAPK activation than other MEK1/2 inhibitors (PD98059, U0126), PD184161 has been useful for studying both the *in vitro* and *in vivo* roles of the Raf/MEK/MAPK pathway (Marshall *et al.* 2004; Thottassery *et al.* 2004; Klein *et al.* 2006). We demonstrate that PD184161 restores VHL-HIF-1 α binding and HIF-1 α degradation that was lost during Ang II treatment. Finally, we show that PD184161 decreases Ang II-induced mtROS generation and reestablishes cellular ascorbate levels, which is essential for HIF-1 α hydroxylation and destabilization. Taken together, our work identifies PD184161 as a potent inhibitor of nonhypoxic HIF-1 induction in VSMC.

4.5 Materials and methods

Materials

Ang II, cobalt chloride (CoCl₂), PD98059, PD184161, PDGF and thrombin were from Sigma-Aldrich (St-Louis, MO). S1P and MG132 were from EMD Millipore (Billerica, MA). MitoSOX and tetramethylrhodamine methyl ester (TMRM) were from ThermoFisher Scientific (Waltham, MA). SkQ1 was from Dr. Vladimir Skulachev at Moscow State University (Skulachev *et al.* 2009). Polyclonal anti-HIF-1 α antibody was raised in our laboratory using rabbits immunized against the last 20 amino acids of the C-termini of the human protein (Richard *et al.* 1999). The monoclonal anti-phospho-p42/p44 MAPK antibody was from Sigma-Aldrich, whereas the polyclonal anti-p42/p44 MAPK was from EMD Millipore. Anti-glutathione S-transferase (GST) antibody was from Novus Biologicals (Littleton, CO). Monoclonal HA.11 antibody was from Covance (Emeryville, CA). Horseradish peroxidase-coupled anti-mouse and anti-rabbit antibodies were from Promega (Madison, WI). GST-HIF-1 α fusion protein, VHL-hemagglutinin (HA) and luc-HIF-1 α -ODDD constructs were kind gifts from Drs. Jacques Pouyssegur (University of Nice-Sophia Antipolis), Peter Ratcliffe (University of Oxford), Richard K. Bruick (University of Texas Southwestern) and Gregg Semenza (Johns Hopkins University, Baltimore, MD), respectively.

Cell culture

VSMC were isolated from thoracic aortas of 6-week-old male Wistar rats by enzymatic dissociation (Owens *et al.* 1986). Cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 12.5% fetal bovine serum (FBS) and supplemented with antibiotics (50 U/mL penicillin and 50 μ g/mL streptomycin) and 2 mM glutamine (ThermoFisher Scientific). In all experiments, cells were deprived of serum 16 h prior to treatment. Hypoxic conditions were achieved by incubating cells in a sealed hypoxic workstation (Baker Ruskinn, Bridgend, UK). Oxygen levels in the workstation were maintained at 1% with a residual gas mixture containing 94% nitrogen and 5% CO₂.

Western blot analysis

VSMC were lysed in 2× Laemmli sample buffer. Lowry assay was used to determine protein concentration. Cell lysates were resolved on SDS-polyacrylamide gels and then electrophoretically transferred to polyvinylidene difluoride membranes (PVDF, Immobilon-P; EMD Millipore). Proteins of interest were analyzed using the indicated antibodies and visualized with the Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR, Lincoln, NE) or with enhanced chemiluminescence system (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ). Western blots were quantified using Odyssey Application software v.3.1 (LI-COR). Results are representative of at least three independent experiments.

Real-time quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction

RNA was isolated from VSMC using TRizol per the manufacturer's protocol (ThermoFisher Scientific). RNA purity was assessed by Nanodrop (ThermoFisher Scientific). Reverse transcription (RT) was performed with qScript cDNA SuperMix (Quanta Biosciences, Gaithersburg, MD). qRT-PCR was performed on a MX3005P system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) using Perfecta SYBR Green SuperMix, Low ROX kit (Quanta Biosciences). The primer pair used for rat HIF-1 α (accession no. NM_024359) was fwd: 5'-CTTCTGATGGAAGCACTAGACAA-3', rev: 5'-TTCCAAGTCTAAATCAGTGTCCT-3'. Rat HPRT1 (accession no. NM_012583) was used as a reference gene (fwd: 5'-CAGTCCCAGCGTCGTGATTAGT-3', rev: 5'-ATCCAGCAGGTCAGCAAAGAAC-3'). The expression of each gene of interest relative to HPRT1, a reference gene, was calculated based on the threshold cycle (Ct) using the Pfaffl formula (Pfaffl 2001). Results are presented as a fold change calculated by comparing the treated sample with its corresponding control condition.

Luciferase assay

Cells were seeded in 12-well plates and transfected by Superfect transfection reagent (Qiagen, Valencia, CA) at a 1:3 DNA/reagent ratio with 2 μ g/well of luc-HIF-1 α -ODDD luciferase reporter vectors. *Renilla reniformis* luciferase expression vector (25

ng/well) was used to control transfection efficiency. 48 h post-transfection, cells were serum-deprived for 16 h and treated as indicated. The Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega) was used for luciferase assays. Measurements were performed on a Luminoskan Ascent microplate reader with integrated injectors (ThermoFisher Scientific). Results are expressed as a ratio of firefly luciferase activity over *Renilla reniformis* luciferase activity. Experiments are an average \pm SD of triplicate data representative of three independent experiments.

VHL capture assay

VHL capture assay was performed as previously described (Page *et al.* 2008). Briefly, cells were grown to confluence, deprived of serum for 16 h, treated as indicated and then lysed. Cytoplasmic extracts (250 μ g) were incubated with Sepharose-bound GST-HIF-1 α (50 μ g) for 1 h at room temperature and then washed with NETN buffer (150 mM NaCl, 0.5 mM ethylenediamine tetraacetic acid, 20 mM Tris pH 8.0, 0.5% Igepal, and 100 μ M DFO) prior to incubation with *in vitro*-translated VHL-HA in NETN buffer overnight at 4°C with rotation. Sepharose-bound GST-HIF-1 α was then washed with NETN buffer and suspended in 2 \times Laemmli sample buffer. Samples were resolved in SDS-polyacrylamide gels, transferred to PVDF and revealed using Western blot analysis with specific antibodies as indicated.

mtROS assay

Mitochondrial ROS production was determined using MitoSOX Red mitochondrial superoxide indicator (ThermoFisher Scientific) which is selectively targeted to the mitochondria and is fluorescent upon ROS oxidation. MitoSOX was used per manufacturer's protocol. Briefly, cells seeded on glass-bottomed cell culture dishes, were serum-deprived overnight in phenol red-free DMEM and then incubated with MitoSOX (1 μ M) for 1 h before imaging. VSMC were treated with or without PD184161 for 20 min prior to incubation with Ang II during the final 20 min. Cell imaging was performed with FV1000 confocal microscope equipped with a live cell apparatus (60 \times oil, 1.4 NA)

driven by FluoView software (Olympus, Tokyo, Japan). Fluorescence quantification was performed using the Measure Integrated Density function of ImageJ (imagej.nih.gov).

Intracellular ascorbate assay

Ascorbate levels were analyzed by spectrophotometry using a modified protocol (Queval & Noctor 2007). Briefly, VSMC were cultured in DMEM supplemented with 250 μ M ascorbate. Upon reaching confluence, cells were serum-deprived for 16 h in ascorbate-supplemented DMEM. Fresh DMEM without ascorbate was added 1 h prior to treatment. Cells were washed twice with PBS, lysed in methanol, briefly sonicated and centrifuged at 20,000 \times g. Samples were diluted in 0.2 mM NaH₂PO₄ pH 5.6 and absorbance was measured at 265 nm. Ascorbate peroxidase (0.4 U) was then added to samples for 15 min, and the absorbance was again measured at 265 nm. Ascorbate concentrations were determined as the difference in absorbance before and after addition of ascorbate peroxidase. A Lowry protein assay was used for sample normalization.

ATP assay

VSMC were serum-deprived overnight in low glucose DMEM. Cells were treated as indicated and intracellular ATP levels were measured with a luminescent ATP detection kit (Abcam, Cambridge, UK) according to the manufacturer's protocol using a Luminoskan Ascent microplate reader. A Lowry protein assay was used for sample normalization.

Mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_M$) measurements

$\Delta\Psi_M$ was determined using tetramethylrhodamine methyl ester. VSMC pretreated as indicated prior to incubation with TMRM (200 nM) for 20 min. Cells were then washed and placed in phenol red-free DMEM. Live cell imaging was performed with an AxioObserver Z1 system using a 40 \times objective and a AxioCam MRm camera controlled by Zen 2 software (Carl Zeiss Microscopy, Oberkochen, Germany). Fluorescence

quantification was performed using the Measure Integrated Density function of ImageJ (imagej.nih.gov).

Statistical analysis

GraphPad Prism 5 software was used for statistical analyses of experiments. Statistical analysis on Figures 4.1C and Figure 4.4A were performed using a one-way repeated measures ANOVA with a Newman–Keuls post hoc test. Statistical analysis on Figures. 4.1A, 4.2B, 4.2D, 4.4B, 4.5B, 4.6, 4.7B and C were performed using a two-way repeated measures ANOVA with a Bonferroni correction. Statistical analysis on Figure 4.3B was performed using a three-way ANOVA with the Benjamini–Hochberg procedure. Results were deemed significant if they attained a 95% confidence level ($p < 0.05$) and all comparisons were performed with an experiment-wise error rate (EER) of 0.05.

4.6 Results

4.6.1 PD184161 inhibits HIF-1 α protein induction induced by Ang II in VSMC

p42/p44 MAPK activation is essential for HIF-1 function (Richard *et al.* 1999; Mylonis *et al.* 2006; Sutton *et al.* 2007). In VSMC, HIF-1 is strongly induced by Ang II, independently of oxygen availability (Richard *et al.* 2000). Through epidermal growth factor (EGF) receptor transactivation, Ang II is a potent activator of p42/p44 MAPK in VSMC and HIF-1 activity is strongly linked to p42/p44 MAPK activation (Lauzier *et al.* 2007). However, HIF-1 α protein induction is only modestly affected by p42/p44 MAPK pathway inhibitors, such as PD98059. To more clearly investigate the role of p42/p44 MAPK in Ang II-induced HIF-1 activation in VSMC, we assayed a potent inhibitor of the p42/p44 MAPK pathway, PD184161. This MEK1/2 inhibitor was shown to strongly inhibit p42/p44 MAPK signaling at concentrations lower than 1 μ M (Klein *et al.* 2006). Theoretically, PD184161 should have fewer off target effects. However, we were surprised to discover that VSMC pretreatment with low concentrations of PD184161 blocked HIF-1 α accumulation by Ang II in a dose-dependent manner (Figure 4.1A). As expected, VSMC pretreatment with PD98059 had only minor inhibitory effects on HIF-1 α induction by Ang II (Figure 4.1B and 4.1C). It is important to note that the concentrations used for both inhibitors demonstrate similar effects on p42/p44 MAPK phosphorylation levels (Figure 4.1B). These results indicate that PD184161 possesses a potent inhibitory effect on HIF-1 α protein accumulation when VSMC are treated with Ang II. The effect of PD184161 on HIF-1 α is independent of p42/p44 MAPK pathway activation.

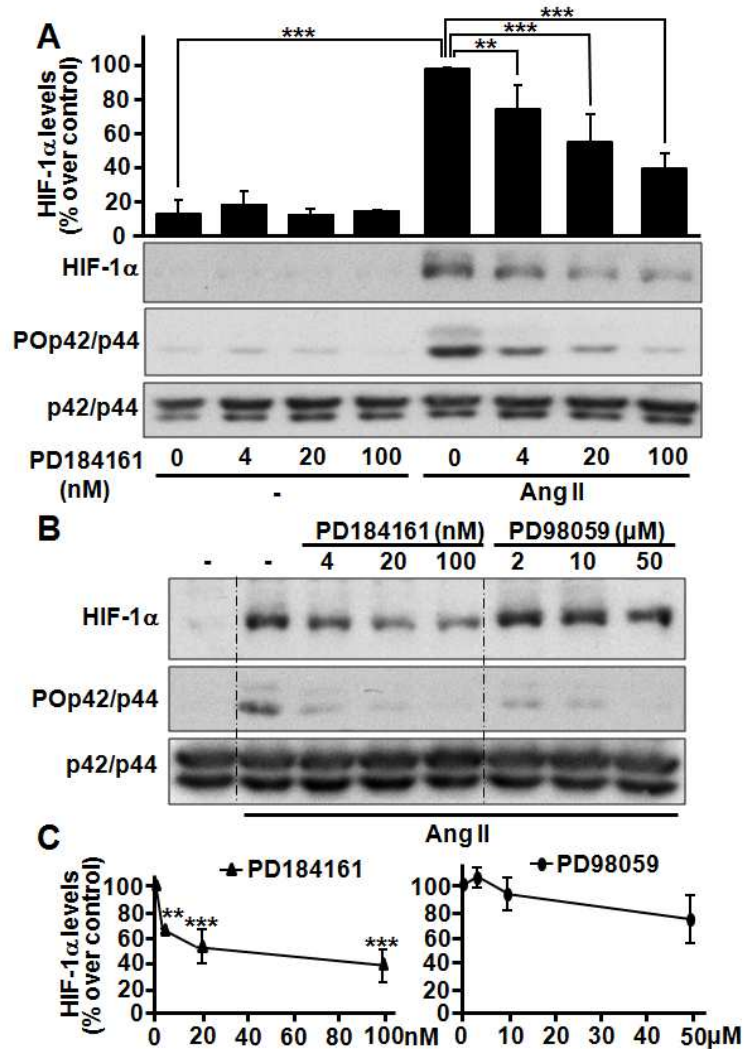


Figure 4.1: Ang II-induced HIF-1 α is inhibited by PD184161, an inhibitor of p42/p44 MAPK activation. (A) Quiescent VSMC were pretreated or not with PD184161 (at indicated concentrations) for 20 min and then treated with Ang II (100 nM) for 4 h. Total extracts were resolved by SDS-PAGE and Western blotted with HIF-1 α , phospho-p42/p44 (POp42/p44), and total-p42/p44 (p42/p44) antibodies. Western blot experiments were quantified (upper panel) using the Odyssey Infrared Imaging System. Results are expressed as a ratio of the amount of HIF-1 α protein to the amount of total-p42/p44 protein and are an average with SD of three independent experiments. **p < 0.01 and ***p < 0.001 as compared to indicated conditions. (B) Quiescent VSMC were pretreated or not with PD184161/ PD98059 (at indicated concentrations) for 20 min and then treated with Ang II as previously described. (C) Western blot experiments were quantified using the Odyssey Infrared Imaging System. Results are expressed as a ratio of the amount of HIF-1 α protein to the amount of total-p42/p44 protein and are an average with SD of three independent experiments. **p < 0.01 and ***p < 0.001 compared to cells treated with Ang II only.

4.6.2 PD184161 blocks nonhypoxic HIF-1 α induction

Our previous studies have shown that in VSMC, Ang II activates HIF-1 through mechanisms that differ from hypoxia (1% O₂) (Page *et al.* 2002; Lauzier *et al.* 2007; Page *et al.* 2008; Patten *et al.* 2010). We wanted to determine whether the effect of PD184161 on HIF-1 α induction was specific to cells treated in nonhypoxic conditions. VSMC were pretreated with PD184161 and then incubated under hypoxic (1% O₂) or treated with CoCl₂, a potent inhibitor of HIF-1 hydroxylation which mimics hypoxia. As seen in Figure 4.2A and 4.2B, while PD184161 pretreatment blocked HIF-1 α protein induction by Ang II, it was ineffective in blocking HIF-1 α protein induction by 1% O₂ or CoCl₂ treatment. Other nonhypoxic activators are also known to induce HIF-1 α in VSMC. To determine whether HIF-1 α induction by other nonhypoxic stimuli is also affected by PD184161, we treated cells with thrombin and sphingosine-1-phosphate. Thr and S1P both induce HIF-1 α protein levels through similar mechanisms to those observed with Ang II (Richard *et al.* 2000; Michaud *et al.* 2009). As seen in Figure 4.2C and 4.2D, PD184161 also decreased HIF-1 α accumulation by both Thr and S1P treatment in a similar fashion to that observed with Ang II-treated VSMC. Similar results were also observed when VSMC were treated with PDGF (Supplementary figure 4.1). Taken together, our results indicate the selective inhibition of nonhypoxic HIF-1 α protein induction by PD184161 in VSMC.

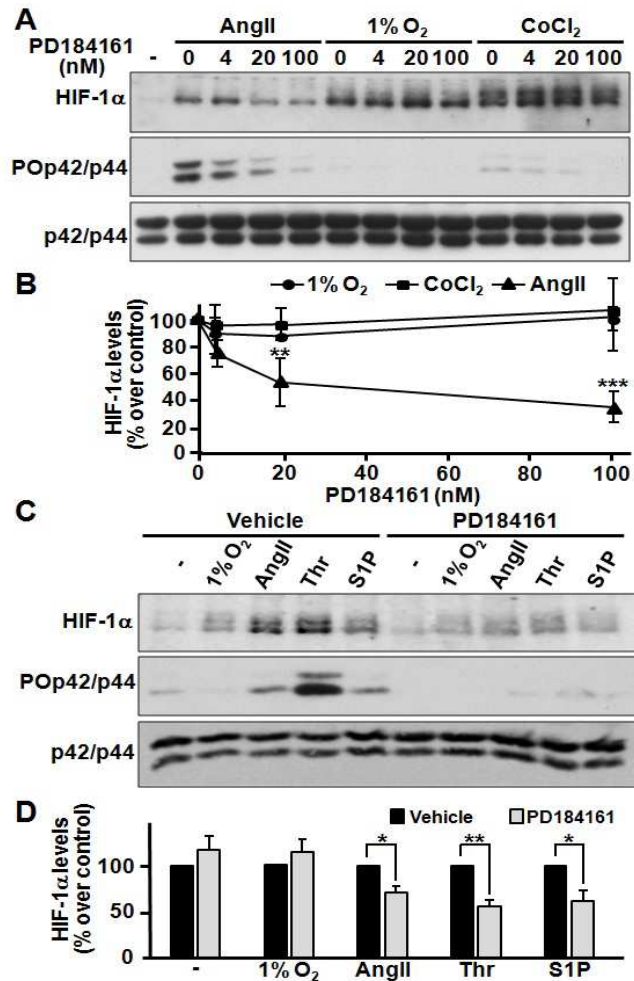


Figure 4.2: HIF-1 α induction is selectively regulated by PD184161. (A) Quiescent VSMC were pretreated or not with PD184161 (at indicated concentrations) and then were treated with Ang II (100 nM), 1% O₂ or cobalt (CoCl₂, 200 μ M) for 4 h. Samples were resolved by SDS-PAGE and Western blotted with HIF-1 α , phospho-p42/p44 (POp42/p44) and total-p42/p44 (p42/p44) antibodies. (B) Western blot experiments were quantified using the Odyssey Infrared Imaging System. Results are expressed as a ratio of the amount of HIF-1 α protein to the amount of total-p42/p44 protein and are an average with SD of three independent experiments. ** p < 0.01 and *** p < 0.001 as compared to treated cells without PD184161. (C) Quiescent VSMC were pretreated or not with PD184161 (50 nM) for 20 min and then treated with 1% O₂, Ang II (100 nM), Thr (5 U/ml) and S1P (2 μ M) for 4 h. Western blot was then used to analyze HIF-1 α , POp42/p44 and p42/p44 levels. (D) Western blot experiments were quantified using the Odyssey Infrared Imaging System. Results are expressed as a ratio of the amount of HIF-1 α protein to the amount of total-p42/p44 protein and are an average with SD of three independent experiments. * p < 0.05 and ** p < 0.01 as compared to indicated conditions.

4.6.3 PD184161 blocks Ang II-induced HIF-1 α stabilization

Since Ang II modulates HIF-1 activation through different mechanisms, we first wanted to determine whether PD184161 treatment alters HIF-1 α gene transcription. To undertake these experiments, we evaluated the effect of PD184161 on HIF-1 α mRNA expression by performing qRT-PCR experiments. As seen in Supplementary figure 4.2, our results show that PD184161 had no significant effect on HIF-1 α mRNA levels either in the presence or absence of Ang II. Additionally, PD184161 did not significantly affect expression levels of a reporter driven by the minimal HIF-1 α gene promoter (pHIF-1A-572/+32Luc, results not shown) in the presence or absence of Ang II. Taken together, these results indicate that PD184161 does not modify HIF-1 α levels by blocking HIF-1 α gene transcription.

As mentioned previously, regulating HIF-1 α stability is the main mechanism by which Ang II activates HIF-1 in VSMC (Page *et al.* 2008; Patten *et al.* 2010). We therefore investigated the impact of PD184161 on HIF-1 α protein stability by using MG132, a widely-used proteasome inhibitor. As expected, VSMC pretreatment with MG132 blocked HIF-1 α degradation and led to its accumulation in VSMC treated with or without Ang II (Figure 4.3A and 4.3B). Interestingly, while HIF-1 α protein levels were significantly reduced by PD184161 during Ang II treatment, it was ineffective in the presence of MG132. This result indicated that in VSMC, PD184161 affected Ang II-mediated changes in HIF-1 α protein stability prior to proteasomal degradation.

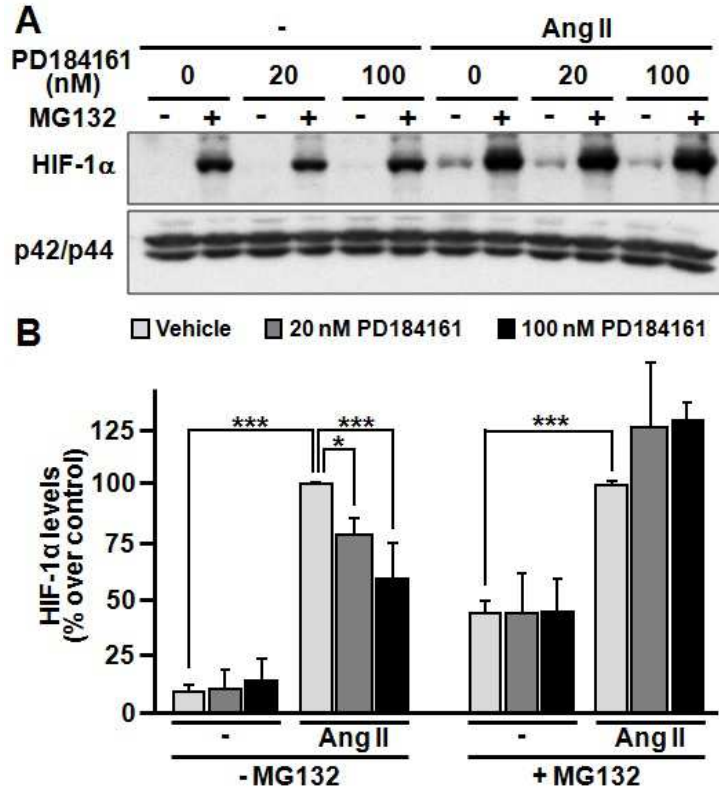


Figure 4.3: Effect of PD184161 on HIF-1 α proteasomal degradation. (A) Quiescent VSMC were pretreated or not with MG132 (10 μ M) for 20 min prior to the addition or not of PD184161 (at indicated concentrations) for 20 min. VSMC were then treated with Ang II (100 nM) for 4 h. Samples were resolved by SDS-PAGE and Western blotted with antibodies against HIF-1 α and total-p42/p44 (p42/p44). (B) Western blot experiments were quantified with the Odyssey Infrared Imaging System using total-p42/p44 as a loading control. Results are expressed as the percentage of HIF-1 α levels compared to either vehicle + Ang II or to MG132 + Ang II treated cells and are an average with SD of three independent experiments. * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ as compared to indicated conditions.

VHL binding to hydroxylated HIF-1 α is a decisive step for HIF-1 α proteasomal degradation (Huang *et al.* 1998; Maxwell *et al.* 1999; Cockman *et al.* 2000; Ivan *et al.* 2001; Jaakkola *et al.* 2001). Since we have previously shown that in VSMC, Ang II treatment increases HIF-1 α stability by blocking PHD activity and subsequent VHL binding, we decided to investigate the effect of PD184161 on VHL-dependent HIF-1 α degradation (Page *et al.* 2008). First, we performed a VHL capture assay to determine HIF-1 α hydroxylation levels. A GST-HIF-1 α fusion protein, comprising amino acids 344-582 from human HIF-1 α , was incubated with extracts of cells treated with Ang II in the presence or absence of PD184161. These extracts were then incubated with *in vitro*-translated HA-tagged VHL. As seen in Figure 4.4A and 4.4B, VHL binding to HIF-1 α was significantly reduced in Ang II-treated VSMC as compared to untreated cells. As expected, the potent hydroxylase inhibitor CoCl₂ completely blocked VHL binding to hydroxylated HIF-1 α . More interestingly, decreased VHL binding to HIF-1 α observed under Ang II treatment was reversed in cells pretreated with increasing concentrations of PD184161. Second, we used the luc-HIF-1 α ODDD construct in a luciferase assay to further determine how PD184161 regulates HIF-1 α stability. Luc-HIF-1 α ODDD encodes a fusion protein between firefly luciferase and HIF-1 α 's oxygen dependent degradation domain (ODDD). This construct contains two proline residues targeted for oxygen-dependent hydroxylation and, consequently, VHL binding (Salnikow *et al.* 2004). VSMC were transfected with luc-HIF-1 α ODDD, pretreated with PD184161 and then treated with Ang II. As expected, Ang II significantly increased luciferase activity in VSMC as compared to untreated cells (Figure 4.4C). More importantly, PD184161 pretreatment significantly blocked Ang II-dependent luciferase activity in a dose-dependent manner. Of note, PD184161 had no effect on CoCl₂-dependent luciferase activity using this same construct (results not shown). Taken together, these results indicate that PD184161 inhibits HIF-1 α stabilization during Ang II treatment by reestablishing HIF-1 α hydroxylation and VHL binding to the ODDD.

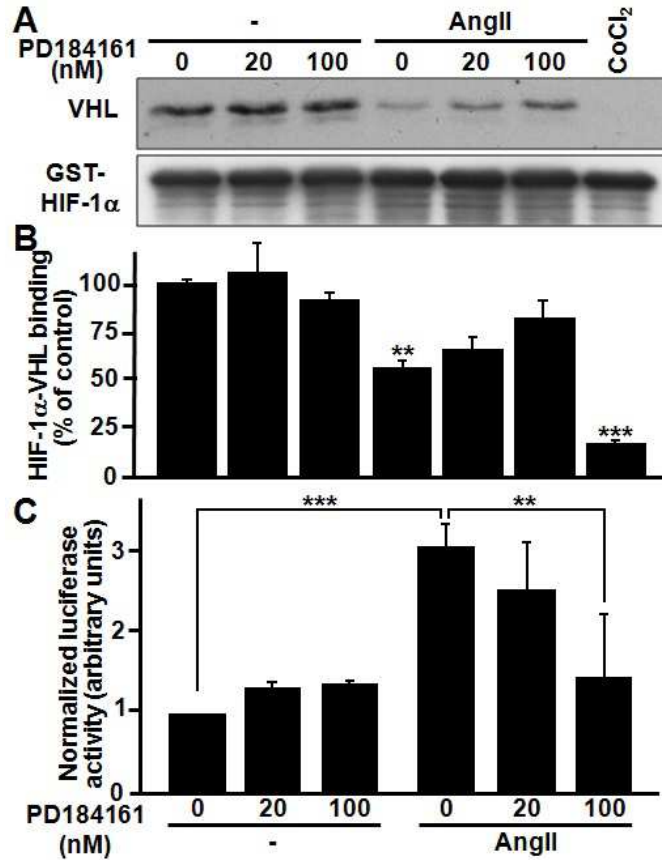


Figure 4.4: PD184161 enhances HIF-1 α hydroxylation and VHL binding. (A) Quiescent VSMC were pretreated or not with PD184161 (at indicated concentrations) for 20 min. VSMC were then treated with Ang II (100 nM) or CoCl₂ (200 μ M) for 4 h. GST-HIF-1 α coupled to sepharose beads were incubated with cytoplasmic extracts for 1 h followed by *in vitro*-translated VHL for 16 h. Precipitates were resolved by SDS-PAGE and Western blotted with HA (VHL) and GST antibodies. Western blot experiments were quantified (B) with the Odyssey Infrared Imaging System software using GST-HIF-1 α as a loading control. Results are expressed as the percentage of ratio of VHL levels compared to GST-HIF-1 α levels and are an average with SD of three independent experiments. ** p < 0.01 and *** p < 0.001 as compared to untreated cells (vehicle only). (C) VSMC were transfected with 2 μ g of CMV-luc-HIF-1 α -ODDD and 25 ng of *Renilla reniformis* luciferase expression vectors. 48 h post-transfection, quiescent VSMC were pretreated or not with PD184161 (at indicated concentrations) for 20 min and treated with Ang II (100 nM) for 4 h. Cells were then lysed and luciferase activity was measured. Results are expressed as a ratio of firefly luciferase activity to *R. reniformis* luciferase activity and are an average with SD of three independent experiments performed in triplicate. ** p < 0.01 and *** p < 0.001 as compared to indicated conditions.

4.6.4 PD184161 inhibits Ang II-induced mitochondrial ROS generation and ascorbate levels in VSMC

Our previous studies showed that increased mtROS production is responsible for decreasing cellular ascorbate levels and inhibiting PHD activity during Ang II treatment (Page *et al.* 2008; Patten *et al.* 2010). Therefore, we wanted to determine whether PD184161 could also block Ang II-induced mtROS production. Using MitoSOX, a mitochondrial-targeted probe for detecting ROS, VSMC treated with Ang II showed increased mtROS levels as compared to untreated cells (Figure 4.5A and 4.5B). More importantly, VSMC pretreated with PD184161 showed a striking inhibition of mtROS levels. This result suggests that PD184161 decreases Ang II-induced HIF-1 α stabilization by reducing mtROS generation in VSMC.

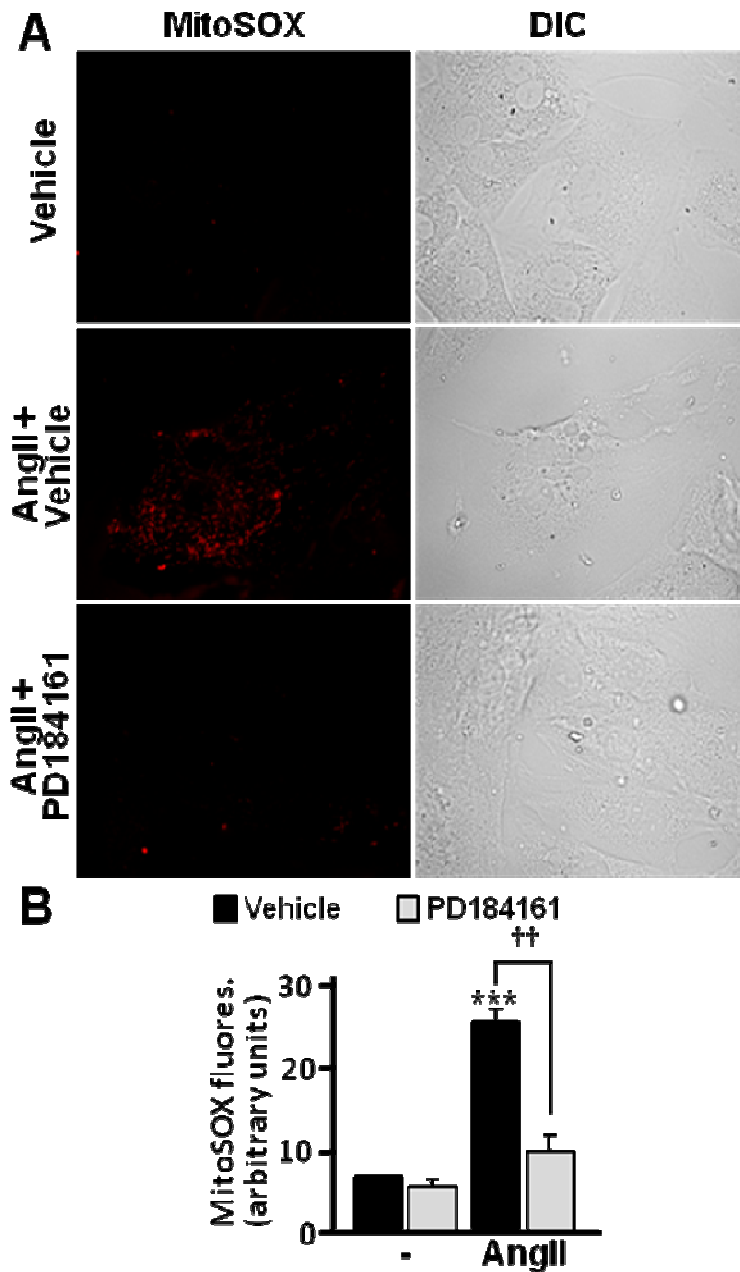


Figure 4.5: PD184161 influences mtROS production by Ang II. (A) VSMC, seeded on 35-mm glass-bottomed cell culture dishes, were incubated with MitoSOX (1 μ M) for a total of 1 h. 20 min after adding MitoSOX, cells were pretreated or not with PD184161 (50 nM). 20 min before imaging, VSMC were treated with Ang II (100 nM). Differential interference contrast (DIC) was used for whole cell imaging and subsequent quantification. B) Quantification of measurements in A are expressed as arbitrary units of MitoSOX fluorescence and are an average with SD of three independent experiments, $n = 50$ cells. *** $p < 0.001$ as compared to untreated VSMC. †† $p < 0.01$ as compared to indicated conditions.

Our previous work showed that cellular ascorbate levels are modified and closely linked to mtROS generation and HIF-1 activation in VSMC (Page *et al.* 2008; Patten *et al.* 2010). We therefore wanted to determine whether PD184161 could block decreased cellular ascorbate levels observed during Ang II treatment. Using a protocol based on differential spectrometric measurements, Ang II treatment significantly decreased cellular ascorbate levels in VSMC (Figure 4.6). When VSMC were treated with SkQ1, a mitochondrial-targeted antioxidant, decreased intracellular ascorbate levels observed during Ang II treatment were reestablished. More importantly, pretreatment of VSMC with increasing concentrations of PD184161 restored intracellular ascorbate levels under Ang II treatment. Taken together, our results indicate that PD184161 abrogates mtROS production by Ang II treatment in VSMC and reestablishes intracellular ascorbate levels and HIF-1 α destabilization under nonhypoxic conditions.

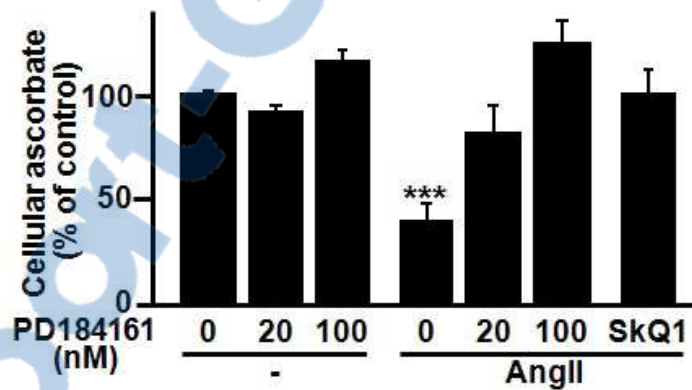


Figure 4.6: PD184161 affects intracellular levels of ascorbate. Quiescent VSMC were cultured in ascorbate-supplemented DMEM and pretreated or not with PD184161 (at indicated concentrations) or SkQ1 (250 nM). VSMC were then treated with Ang II (100 nM) for 4 h. Cells were washed twice with PBS and resuspended in methanol. Ascorbate concentrations were determined using a protocol based on differential spectrometric measurements (see Materials and methods). Results are expressed as the percentage of relative intracellular ascorbate levels compared to untreated cells and are an average with SD of three independent experiments. *** $p < 0.001$ as compared to untreated cells.

4.6.5 PD184161 inhibits mitochondrial membrane potential depolarization and ATP production in Ang II-treated VSMC

Depolarization of mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_M$), is known to influence mtROS generation in VSMC (Kimura *et al.* 2005a). To determine if PD184161 affects $\Delta\Psi_M$ in Ang II-treated VSMC, we analyzed $\Delta\Psi_M$ using TMRM. As seen in Figure 4.7A and 7B, VSMC treated with Ang II showed decreased TMRM staining as compared to untreated cells, an indication $\Delta\Psi_M$ depolarization. More interestingly, pretreatment of VSMC with PD184161 restored $\Delta\Psi_M$ under Ang II treatment. These results indicate that the maintenance of mitochondrial membrane potential by PD184161 may be responsible for inhibition of mtROS generation.

ATP is essential for the opening of mitochondrial ATP-sensitive potassium channels (mitoK_{ATP}), a main mediator of $\Delta\Psi_M$ depolarization. PD184161 was previously shown to affect ATP production (Yung *et al.* 2004). As seen in Figure 4.7C, VSMC pretreated with PD184161 show decreased ATP production in comparison to untreated cells. These results indicate that PD184161 may decrease HIF-1 levels induced under nonhypoxic conditions by modifying both ATP production and $\Delta\Psi_M$ depolarization. These two phenomena could therefore reestablish mtROS generation and cellular ascorbate levels to those seen in untreated cells.

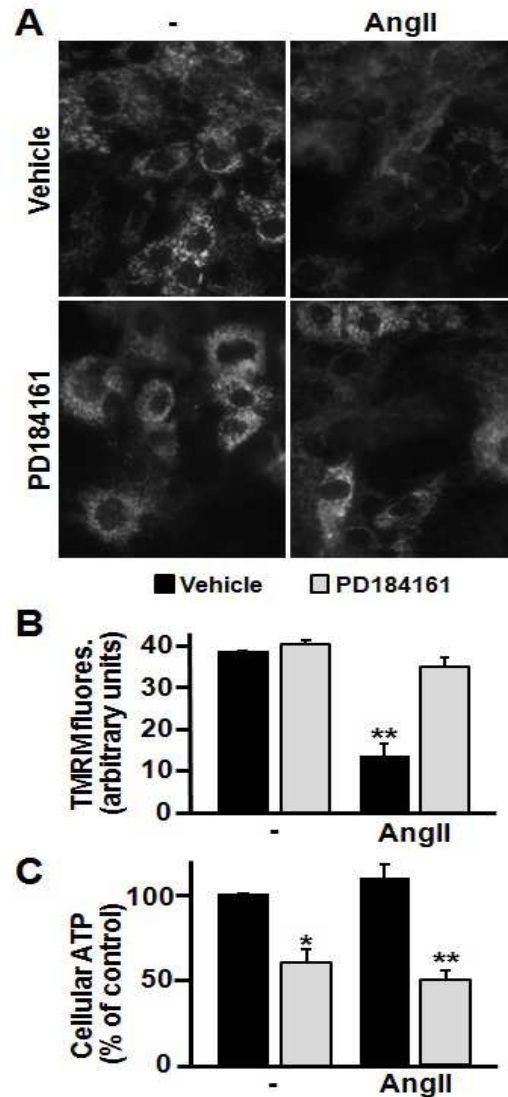


Figure 4.7: PD184161 inhibits mitochondrial membrane potential depolarization and ATP production. (A) VSMC, seeded on 35-mm glass-bottomed cell culture dishes, were cells were pretreated or not with PD184161 (50 nM) for 20 min and treated with Ang II (100 nM) for 40 min. Cells were then incubated with TMRM (200 nM) for 20 min before imaging. (B) Quantification of measurements in A are expressed as arbitrary units of TMRM fluorescence and are an average with SD of three independent experiments, $n = 50$ cells. $**p < 0.01$ as compared to untreated VSMC. (C) Quiescent VSMC were pretreated or not with PD184161 (50 nM) for 20 min and then treated with Ang II (100 nM) for 1 h. ATP levels were measured as described in Materials and Methods. Results are expressed as the percentage of relative ATP levels compared to untreated cells and are an average with SD of three independent experiments. $*p < 0.05$ and $**p < 0.01$ as compared to untreated cells.

4.7 Discussion

By blocking the p42/p44 MAPK signaling pathway, MEK 1/2 inhibitors, such as PD98059, act as negative regulators of HIF-1 transcriptional activity (Richard *et al.* 1999; Minet *et al.* 2000; Hur *et al.* 2001; Sodhi *et al.* 2001; Fukuda *et al.* 2002; Lee *et al.* 2002; Sutton *et al.* 2007). The present study demonstrates that PD184161, another potent MEK 1/2 inhibitor, is also a selective inhibitor of nonhypoxic HIF-1 α protein accumulation in VSMC. More specifically, we show that PD184161 strikingly decreased HIF-1 α protein levels during Ang II treatment by blocking associated mtROS generation, reestablishing cellular ascorbate levels, restoring proteasomal targeting by VHL, and finally, HIF-1 α proteasomal degradation.

In VSMC, Ang II is a strong activator of the p42/p44 MAPK pathway through EGFR transactivation as well as being a potent HIF-1 inducer (Lauzier *et al.* 2007). p42/p44 MAPK pathway activation by Ang II enhances HIF-1 transcriptional activity by promoting direct HIF-1 α phosphorylation (Lauzier *et al.* 2007). Pin1, a proline isomerase, can recognize this phosphorylation, modify HIF-1 α conformation and enhance HIF-1-related gene transcription (Jalouli *et al.* 2014). However, in Ang II-treated VSMC and other systems, p42/p44 MAPK pathway activation has only modest effects on HIF-1 α protein induction (Berra *et al.* 2001a; Lauzier *et al.* 2007). In fact, inhibition of EGFR and p42/p44 MAPK activation by AG1478 or PD98059, respectively, only cause a slight decrease in Ang II-increased HIF-1 α levels (Lauzier *et al.*, 2007). Consistent with these studies, we show here that unlike PD184161, PD98059 only modestly affects HIF-1 α induction by Ang II in conditions where p42/p44 MAPK activation is completely abolished. Given the potency of PD184161 to block HIF-1 α induction during VSMC stimulation with Ang II, our results indicate that PD184161 influences HIF-1 α protein levels through a mechanism distinct from its inhibitory effect on p42/p44 MAPK.

In addition to Ang II, other nonhypoxic stimuli, such as Thr, S1P and PDGF, are also able to induce HIF-1 α protein levels in VSMC through similar mechanisms. Our present study clearly shows that PD184161 selectively abolishes nonhypoxic HIF-1 α induction without interfering with hypoxic HIF-1 induction. We decided to investigate how this compound negatively impacts mechanisms involved in nonhypoxic HIF-1

induction. Our previous studies demonstrated that the main mechanism by which Ang II induces HIF-1 α protein is through the inhibition of PHD enzymatic activity, which leads to decreased HIF-1 α hydroxylation, VHL binding, ubiquitination, and proteasomal degradation (Page *et al.* 2008). mtROS generation is important for Ang II-induced HIF-1 α , most probably by the Fenton reaction (Fe²⁺ oxidation to Fe³⁺) resulting in decreased intracellular ascorbate levels (Gerald *et al.* 2004; Bell *et al.* 2007). Indeed, inhibition of mtROS production was shown to negatively regulate Ang II-induced HIF-1 α accumulation (Page *et al.* 2008; Patten *et al.* 2010). Accordingly, we show here that PD184161 promotes HIF-1 α proteasomal degradation, increased hydroxylation and VHL binding, inhibition of Ang II-induced mtROS generation production, and the reestablishment of intracellular ascorbate availability. Previous studies demonstrated that p42/p44 MAPK activity is not implicated in the HIF-1 α stability (Berra *et al.* 2001a). This supports our findings that the effect of PD184161 on HIF-1 α protein induction is independent of p42/p44 MAPK pathway inhibition.

The mitochondrial respiratory chain represents a major source of ROS (Page *et al.* 2008; Camara *et al.* 2010; Dedkova *et al.* 2013; Drose 2013; Wojtovich *et al.* 2013). Our previous work demonstrated that HIF-1 α induction by Ang II requires mitochondrial/complex III generated mtROS (Patten *et al.* 2010). Hence, PD184161 may reduce Ang II-mediated HIF-1 α accumulation by blocking mitochondrial respiratory chain function. Interestingly, unlike PD98059, PD184161 can induce a profound ATP depletion by modulating ATP synthase activity, in a similar manner to oligomycin A, a mitochondrial ATP synthase inhibitor (Yung *et al.* 2004). ATP synthase inhibition, and thus changes in oxidative phosphorylation, was shown to negatively regulate ROS production (Santamaria *et al.* 2006). A second study indicated that in addition to inhibiting MEK 1/2, PD184161 caused cell death in glucose-deprived cells, a result of profound ATP depletion caused by ATP-synthase inhibition (Yung *et al.* 2004). Accordingly, we show decreased ATP levels under PD184161 treatment in VSMC. It is therefore likely that reduced Ang II-induced mtROS generation under PD184161 treatment is a result of decreased ATP synthase activity and lower ATP levels. In addition, depolarization of mitochondrial membrane potential through the opening of

mitoKATP was shown to be implicated in Ang II-induced mtROS generation (Kimura *et al.* 2005a). It was reported that kinase inhibitors can affect protein function and act as competitors for ATP binding proteins by forming aggregates (Hanks *et al.* 1988; Halestrap 1999; Davies *et al.* 2000; Genini *et al.* 2000; Xue *et al.* 2002; Bain *et al.* 2003; McGovern & Shoichet 2003). We show that PD184161 exerts a negative effect on mitochondrial membrane depolarization in response to Ang II treatment in VSMC. This further indicates that decreased ATP, mitoKATP channel activity, and depolarization of the $\Delta\Psi_m$ are potentially involved in decreased mtROS generation and decreased HIF-1 induction in VSMCs during nonhypoxic activation.

Ang II is an important regulator for many physiopathological processes such as hypertension, atherosclerosis, VSMC remodeling, and fibrosis (Hanna *et al.* 2002; Touyz 2003; Heeneman *et al.* 2007). p42/p44 MAPK pathway activation is implicated in mediating the effects of Ang II (Ishida *et al.* 1998; Ishida *et al.* 1999; Queval & Noctor 2007; Wang *et al.* 2015). By activating genes involved in the control of several cell functions, HIF-1 is also implicated in number of Ang II-induced degenerative diseases, such as cardiovascular and kidney diseases (Zhu *et al.* 2011; Imanishi *et al.* 2014; Luo *et al.* 2015; Obama *et al.* 2015). Because of its important role in disease progression, HIF-1 targeting has gained significant interest. Our study demonstrates PD184161 is a potent inhibitor of Ang II-induced HIF-1 α protein induction and identifies this compound as a potential treatment strategy. PD184161 has an added advantage since it inhibits HIF-1 α by blocking mtROS production, an important mediator of Ang II-activated responses (Kimura *et al.* 2005a; Kimura *et al.* 2005b; Caldiz *et al.* 2007; De Giusti *et al.* 2008; Doughan *et al.* 2008; De Giusti *et al.* 2009; Patten *et al.* 2010; Caldiz *et al.* 2011). In addition, mice expressing mitochondria-targeted catalase were resistant to Ang II-dependent cardiac hypertrophy, autophagy, fibrosis and mitochondrial damage (Dai & Rabinovitch 2011). Therefore, we believe that PD184161 may be therapeutically interesting for further studies concerning the physiopathological roles of Ang II.

In summary, our study identifies PD184161 as a robust inhibitor of nonhypoxic HIF-1 induction. PD184161 is a potent p42/p44 MAPK pathway inhibitor, and the present work now identifies it as a HIF-1 α inhibitor, by way of blocking mtROS

generation in VSMC. Given the importance implication of p42/p44 MAPK pathway, ROS, and HIF-1 in several Ang II-mediated physiological and physiopathological processes, we believe that these studies have an interesting impact in Ang II-related vascular biology.

4.8 Acknowledgements

We thank Drs Jacques Pouyssegur, Peter Ratcliffe, Richard K. Bruick and Gregg Semenza for the GST-HIF-1 α , VHL-HA and luc-HIF-1 α ODDD constructs and pHIF-1A-572/+32Luc reporter vector, respectively. We would also like to thank Dr Josée N. Lavoie for technical support in using the Zeiss microscope.

4.9 References

- Bain J., McLauchlan H., Elliott M. & Cohen P. (2003) The specificities of protein kinase inhibitors: an update. *Biochem J* **371**, 199-204.
- Bell E.L., Klimova T.A., Eisenbart J., Moraes C.T., Murphy M.P., Budinger G.R. & Chandel N.S. (2007) The Qo site of the mitochondrial complex III is required for the transduction of hypoxic signaling via reactive oxygen species production. *J Cell Biol* **177**, 1029-36.
- 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.
- Caldiz C.I., Diaz R.G., Nolly M.B., Chiappe de Cingolani G.E., Ennis I.L., Cingolani H.E. & Perez N.G. (2011) Mineralocorticoid receptor activation is crucial in the signalling pathway leading to the Anrep effect. *J Physiol* **589**, 6051-61.
- Caldiz C.I., Garcarena C.D., Dulce R.A., Novaretto L.P., Yeves A.M., Ennis I.L., Cingolani H.E., Chiappe de Cingolani G. & Perez N.G. (2007) Mitochondrial reactive oxygen species activate the slow force response to stretch in feline myocardium. *J Physiol* **584**, 895-905.
- Camara A.K., Lesnefsky E.J. & Stowe D.F. (2010) Potential therapeutic benefits of strategies directed to mitochondria. *Antioxid Redox Signal* **13**, 279-347.
- 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.
- Dai D.F. & Rabinovitch P. (2011) Mitochondrial oxidative stress mediates induction of autophagy and hypertrophy in angiotensin-II treated mouse hearts. *Autophagy* **7**, 917-8.
- Davies S.P., Reddy H., Caivano M. & Cohen P. (2000) Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J* **351**, 95-105.
- De Giusti V.C., Correa M.V., Villa-Abrille M.C., Beltrano C., Yeves A.M., de Cingolani G.E., Cingolani H.E. & Aiello E.A. (2008) The positive inotropic effect of endothelin-1 is mediated by mitochondrial reactive oxygen species. *Life Sci* **83**, 264-71.

- De Giusti V.C., Garcarena C.D. & Aiello E.A. (2009) Role of reactive oxygen species (ROS) in angiotensin II-induced stimulation of the cardiac Na⁺/HCO₃⁻-cotransport. *J Mol Cell Cardiol* **47**, 716-22.
- de Jong L., Albracht S.P. & Kemp A. (1982) Prolyl 4-hydroxylase activity in relation to the oxidation state of enzyme-bound iron. The role of ascorbate in peptidyl proline hydroxylation. *Biochimica et Biophysica Acta* **704**, 326-32.
- Dedkova E.N., Seidlmayer L.K. & Blatter L.A. (2013) Mitochondria-mediated cardioprotection by trimetazidine in rabbit heart failure. *J Mol Cell Cardiol* **59**, 41-54.
- Doughan A.K., Harrison D.G. & Dikalov S.I. (2008) Molecular mechanisms of angiotensin II-mediated mitochondrial dysfunction: linking mitochondrial oxidative damage and vascular endothelial dysfunction. *Circ Res* **102**, 488-96.
- Drose S. (2013) Differential effects of complex II on mitochondrial ROS production and their relation to cardioprotective pre- and postconditioning. *Biochim Biophys Acta* **1827**, 578-87.
- 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.
- Fukuda R., Hirota K., Fan F., Jung Y.D., Ellis L.M. & Semenza G.L. (2002) Insulin-like growth factor 1 induces hypoxia-inducible factor 1-mediated vascular endothelial growth factor expression, which is dependent on MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling in colon cancer cells. *J Biol Chem* **277**, 38205-11.
- Genini D., Adachi S., Chao Q., Rose D.W., Carrera C.J., Cottam H.B., Carson D.A. & Leoni L.M. (2000) Deoxyadenosine analogs induce programmed cell death in chronic lymphocytic leukemia cells by damaging the DNA and by directly affecting the mitochondria. *Blood* **96**, 3537-43.
- Gerald D., Berra E., Frapart Y.M., Chan D.A., Giaccia A.J., Mansuy D., Pouyssegur J., Yaniv M. & Mechta-Grigoriou F. (2004) JunD reduces tumor angiogenesis by protecting cells from oxidative stress. *Cell* **118**, 781-94.
- Halestrap A.P. (1999) The mitochondrial permeability transition: its molecular mechanism and role in reperfusion injury. *Biochem Soc Symp* **66**, 181-203.
- Han H.J., Kwon N., Choi M.A., Jung K.O., Piao J.Y., Ngo H.K., Kim S.J., Kim D.H., Chung J.K., Cha Y.N., Youn H., Choi B.Y., Min S.H. & Surh Y.J. (2016) Peptidyl Prolyl Isomerase PIN1 Directly Binds to and Stabilizes Hypoxia-Inducible Factor-1alpha. *PLoS One* **11**, e0147038.
- Hanks S.K., Quinn A.M. & Hunter T. (1988) The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* **241**, 42-52.
- Hanna I.R., Taniyama Y., Szocs K., Rocic P. & Griendling K.K. (2002) NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species as mediators of angiotensin II signaling. *Antioxid Redox Signal* **4**, 899-914.

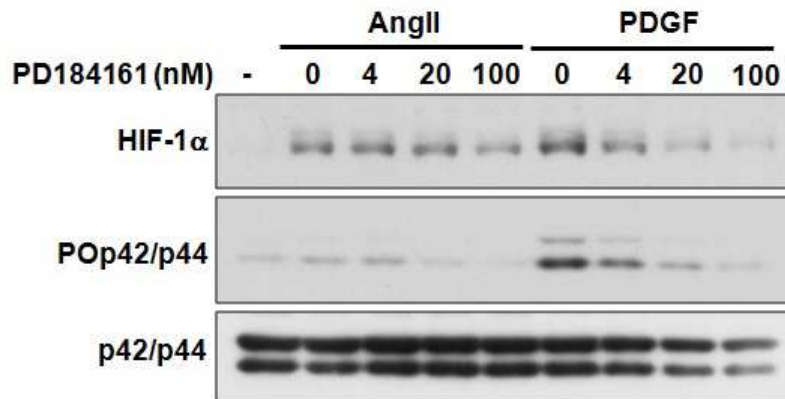
- Heeneman S., Sluimer J.C. & Daemen M.J. (2007) Angiotensin-converting enzyme and vascular remodeling. *Circ Res* **101**, 441-54.
- Huang L.E., Gu J., Schau M. & Bunn H.F. (1998) Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 7987-92.
- Hur E., Chang K.Y., Lee E., Lee S.K. & 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**, 1216-24.
- Imanishi M., Tomita S., Ishizawa K., Kihira Y., Ueno M., Izawa-Ishizawa Y., Ikeda Y., Yamano N., Tsuchiya K. & Tamaki T. (2014) Smooth muscle cell-specific Hif-1alpha deficiency suppresses angiotensin II-induced vascular remodeling in mice. *Cardiovasc Res* **102**, 460-8.
- Ishida M., Ishida T., Thomas S.M. & Berk B.C. (1998) Activation of extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2) by angiotensin II is dependent on c-Src in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* **82**, 7-12.
- Ishida T., Ishida M., Suero J., Takahashi M. & Berk B.C. (1999) Agonist-stimulated cytoskeletal reorganization and signal transduction at focal adhesions in vascular smooth muscle cells require c-Src. *J Clin Invest* **103**, 789-97.
- Ivan M., Kondo K., Yang H., Kim W., Valiando J., Ohh M., Salic A., Asara J.M., Lane W.S. & Kaelin W.G., Jr. (2001) HIF1alpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science* **292**, 464-8.
- Jaakkola P., Mole D.R., Tian Y.M., Wilson M.I., Gielbert J., Gaskell S.J., von Kriegsheim A., Hebestreit H.F., Mukherji M., Schofield C.J., Maxwell P.H., Pugh C.W. & Ratcliffe P.J. (2001) Targeting of HIF-1alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* **292**, 468-72.
- Jalouli M., Dery M.A., Lafleur V.N., Lamalice L., Zhou X.Z., Lu K.P. & Richard D.E. (2014) The prolyl isomerase Pin1 regulates hypoxia-inducible transcription factor (HIF) activity. *Cell Signal* **26**, 1649-56.
- Kaelin W.G., Jr. & Ratcliffe P.J. (2008) Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol Cell* **30**, 393-402.
- Kimura S., Zhang G.X., Nishiyama A., Shokoji T., Yao L., Fan Y.Y., Rahman M. & Abe Y. (2005a) Mitochondria-derived reactive oxygen species and vascular MAP kinases: comparison of angiotensin II and diazoxide. *Hypertension* **45**, 438-44.
- Kimura S., Zhang G.X., Nishiyama A., Shokoji T., Yao L., Fan Y.Y., Rahman M., Suzuki T., Maeta H. & Abe Y. (2005b) Role of NAD(P)H oxidase- and mitochondria-derived reactive oxygen species in cardioprotection of ischemic reperfusion injury by angiotensin II. *Hypertension* **45**, 860-6.
- Klein P.J., Schmidt C.M., Wiesenauer C.A., Choi J.N., Gage E.A., Yip-Schneider M.T., Wiebke E.A., Wang Y., Omer C. & Sebolt-Leopold J.S. (2006) The effects of a novel MEK inhibitor PD184161 on MEK-ERK signaling and growth in human liver cancer. *Neoplasia* **8**, 1-8.

- Lauzier M.C., Page E.L., Michaud M.D. & Richard D.E. (2007) Differential regulation of hypoxia-inducible factor-1 through receptor tyrosine kinase transactivation in vascular smooth muscle cells. *Endocrinology* **148**, 4023-31.
- Lee E., Yim S., Lee S.K. & Park H. (2002) Two transactivation domains of hypoxia-inducible factor-1 α regulated by the MEK-1/p42/p44 MAPK pathway. *Mol Cells* **14**, 9-15.
- Luo R., Zhang W., Zhao C., Zhang Y., Wu H., Jin J., Grenz A., Eltzschig H.K., Tao L., Kellems R.E. & Xia Y. (2015) Elevated Endothelial Hypoxia-Inducible Factor-1 α Contributes to Glomerular Injury and Promotes Hypertensive Chronic Kidney Disease. *Hypertension* **66**, 75-84.
- Majamaa K., Gunzler V., Hanauske-Abel H.M., Myllyla R. & Kivirikko K.I. (1986) Partial identity of the 2-oxoglutarate and ascorbate binding sites of prolyl 4-hydroxylase. *J Biol Chem* **261**, 7819-23.
- Marshall S.J., Senis Y.A., Auger J.M., Feil R., Hofmann F., Salmon G., Peterson J.T., Burslem F. & Watson S.P. (2004) GPIIb-dependent platelet activation is dependent on Src kinases but not MAP kinase or cGMP-dependent kinase. *Blood* **103**, 2601-9.
- Maxwell P.H., Wiesener M.S., Chang G.W., Clifford S.C., Vaux E.C., Cockman M.E., Wykoff C.C., Pugh C.W., Maher E.R. & Ratcliffe P.J. (1999) The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* **399**, 271-5.
- McGovern S.L. & Shoichet B.K. (2003) Kinase inhibitors: not just for kinases anymore. *J Med Chem* **46**, 1478-83.
- Michaud M.D., Robitaille G.A., Gratton J.P. & Richard D.E. (2009) Sphingosine-1-phosphate: a novel nonhypoxic activator of hypoxia-inducible factor-1 in vascular cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **29**, 902-8.
- Minet E., Arnould T., Michel G., Roland I., Mottet D., Raes M., Remacle J. & Michiels C. (2000) ERK activation upon hypoxia: involvement in HIF-1 activation. *FEBS Lett* **468**, 53-8.
- Mylonis I., Chachami G., Samiotaki M., Panayotou G., Paraskeva E., Kalousi A., Georgatsou E., Bonanou S. & Simos G. (2006) Identification of MAPK phosphorylation sites and their role in the localization and activity of hypoxia-inducible factor-1 α . *J Biol Chem* **281**, 33095-106.
- Obama T., Takayanagi T., Kobayashi T., Bourne A.M., Elliott K.J., Charbonneau M., Dubois C.M. & Eguchi S. (2015) Vascular induction of a disintegrin and metalloprotease 17 by angiotensin II through hypoxia inducible factor 1 α . *Am J Hypertens* **28**, 10-4.
- Owens G.K., Loeb A., Gordon D. & Thompson M.M. (1986) Expression of smooth muscle-specific alpha-actin in cultured vascular smooth muscle cells: relationship between growth and cytodifferentiation. *J Cell Biol* **102**, 343-52.
- Page E.L., Chan D.A., Giaccia A.J., Levine M. & Richard D.E. (2008) Hypoxia-inducible factor-1 α stabilization in nonhypoxic conditions: role of oxidation and intracellular ascorbate depletion. *Mol Biol Cell* **19**, 86-94.

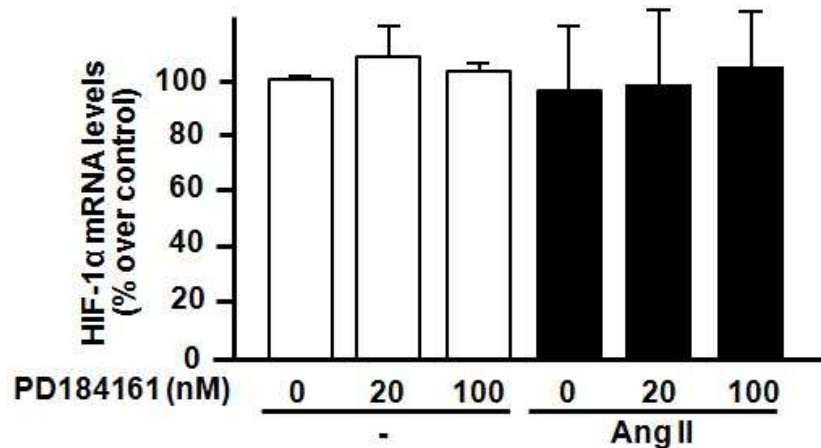
- Page E.L., Robitaille G.A., Pouyssegur J. & Richard D.E. (2002) Induction of hypoxia-inducible factor-1 α by transcriptional and translational mechanisms. *J Biol Chem* **277**, 48403-9.
- Patten D.A., Lafleur V.N., Robitaille G.A., Chan D.A., Giaccia A.J. & Richard D.E. (2010) Hypoxia-inducible factor-1 activation in nonhypoxic conditions: the essential role of mitochondrial-derived reactive oxygen species. *Mol Biol Cell* **21**, 3247-57.
- Pfaffl M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**, e45.
- Queval G. & Noctor G. (2007) A plate reader method for the measurement of NAD, NADP, glutathione, and ascorbate in tissue extracts: Application to redox profiling during Arabidopsis rosette development. *Anal Biochem* **363**, 58-69.
- Richard D.E., Berra E., Gothie E., Roux D. & Pouyssegur J. (1999) p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. *J Biol Chem* **274**, 32631-7.
- Richard D.E., Berra E. & Pouyssegur J. (2000) Nonhypoxic pathway mediates the induction of hypoxia-inducible factor 1 α in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* **275**, 26765-71.
- Salnikow K., Donald S.P., Bruick R.K., Zhitkovich A., Phang J.M. & Kasprzak K.S. (2004) Depletion of intracellular ascorbate by the carcinogenic metals nickel and cobalt results in the induction of hypoxic stress. *J Biol Chem* **279**, 40337-44.
- Santamaria G., Martinez-Diez M., Fabregat I. & Cuezva J.M. (2006) Efficient execution of cell death in non-glycolytic cells requires the generation of ROS controlled by the activity of mitochondrial H⁺-ATP synthase. *Carcinogenesis* **27**, 925-35.
- Schofield C.J. & Ratcliffe P.J. (2005) Signalling hypoxia by HIF hydroxylases. *Biochem Biophys Res Commun* **338**, 617-26.
- Semenza G.L. (2003) Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **3**, 721-32.
- Skulachev V.P., Anisimov V.N., Antonenko Y.N., Bakeeva L.E., Chernyak B.V., Elichev V.P., Filenko O.F., Kalinina N.I., Kapelko V.I., Kolosova N.G., Kopnin B.P., Korshunova G.A., Lichinitser M.R., Obukhova L.A., Pasyukova E.G., Pisarenko O.I., Roginsky V.A., Ruuge E.K., Senin, II, Severina, II, Skulachev M.V., Spivak I.M., Tashlitsky V.N., Tkachuk V.A., Vyssokikh M.Y., Yaguzhinsky L.S. & Zorov D.B. (2009) An attempt to prevent senescence: a mitochondrial approach. *Biochim Biophys Acta* **1787**, 437-61.
- Sodhi A., Montaner S., Miyazaki H. & Gutkind J.S. (2001) MAPK and Akt act cooperatively but independently on hypoxia inducible factor-1 α in rasV12 upregulation of VEGF. *Biochem Biophys Res Commun* **287**, 292-300.
- Sutton K.M., Hayat S., Chau N.M., Cook S., Pouyssegur J., Ahmed A., Perusinghe N., Le Floch R., Yang J. & Ashcroft M. (2007) Selective inhibition of MEK1/2 reveals a differential requirement for ERK1/2 signalling in the regulation of HIF-1 in response to hypoxia and IGF-1. *Oncogene* **26**, 3920-9.
- Thottassery J.V., Sun Y., Westbrook L., Rentz S.S., Manuvakhova M., Qu Z., Samuel S., Upshaw R., Cunningham A. & Kern F.G. (2004) Prolonged extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation during fibroblast growth factor 1- or heregulin

- beta1-induced antiestrogen-resistant growth of breast cancer cells is resistant to mitogen-activated protein/extracellular regulated kinase kinase inhibitors. *Cancer Res* **64**, 4637-47.
- Touyz R.M. (2003) The role of angiotensin II in regulating vascular structural and functional changes in hypertension. *Curr Hypertens Rep* **5**, 155-64.
- Wang C., Qian X., Sun X. & Chang Q. (2015) Angiotensin II increases matrix metalloproteinase 2 expression in human aortic smooth muscle cells via AT1R and ERK1/2. *Exp Biol Med (Maywood)* **240**, 1564-71.
- Wojtovich A.P., Smith C.O., Haynes C.M., Nehrke K.W. & Brookes P.S. (2013) Physiological consequences of complex II inhibition for aging, disease, and the mKATP channel. *Biochim Biophys Acta* **1827**, 598-611.
- Xue L., Borutaite V. & Tolkovsky A.M. (2002) Inhibition of mitochondrial permeability transition and release of cytochrome c by anti-apoptotic nucleoside analogues. *Biochem Pharmacol* **64**, 441-9.
- Yung H.W., Wyttenbach A. & Tolkovsky A.M. (2004) Aggravation of necrotic death of glucose-deprived cells by the MEK1 inhibitors U0126 and PD184161 through depletion of ATP. *Biochem Pharmacol* **68**, 351-60.
- Zhu Q., Wang Z., Xia M., Li P.L., Van Tassell B.W., Abbate A., Dhaduk R. & Li N. (2011) Silencing of hypoxia-inducible factor-1alpha gene attenuated angiotensin II-induced renal injury in Sprague-Dawley rats. *Hypertension* **58**, 657-64.

4.10 Supplementary figures



Supplementary figure 4. 1: PD184161 inhibits PDGF-induced HIF-1 α accumulation. Quiescent VSMC were pretreated or not with PD184161 (at indicated concentrations) and then treated with Ang II (100 nM) or PDGF (10 ng/ml) for 4h. Samples were resolved by SDS-PAGE and Western blotted with HIF-1 α , phospho-p42/p44 (POp42/p44) and total-p42/p44 (p42/p44) antibodies.



Supplementary figure 4. 2: PD184161 does not modify HIF-1 α gene transcription. Quiescent VSMC were pretreated or not with PD184161 (at indicated concentrations) for 20 min and then treated with Ang II (100 nM) for 4 h. Total RNA was the extracted and real-time qRT-PCR was performed to determine mRNA expression levels for HIF-1 α and HPRT (reference gene) mRNA. Results are expressed as the percentage of HIF-1 α mRNA levels compared to either vehicle (white bars) or Ang II (black bars) treated cells and are an average with SD of three independent experiments.

Chapitre 5: Discussion et perspectives futures

HIF-1 est un facteur de transcription d'une grande importance pour le maintien de l'homéostasie cellulaire dans des conditions à faible teneur en oxygène. En régulant une multitude de processus biologiques permettant la survie et l'adaptation cellulaire à l'hypoxie, HIF-1 est un médiateur majeur de diverses réponses physiologiques et un déterminant clé au niveau de plusieurs pathologies. Ainsi, la caractérisation des mécanismes d'activation/inactivation de ce facteur demeure de grand intérêt pour une connaissance approfondie des modes de régulation des réponses hypoxiques ainsi que pour la découverte des nouvelles stratégies thérapeutiques efficaces. Jusqu'à ce jour, de nombreuses études ont permis de mettre en lumière diverses voies de régulation du facteur HIF-1.

Les travaux présentés dans cette thèse permettent d'améliorer et d'élargir la connaissance sur la régulation de ce facteur. Plus précisément, nos études élucident des nouveaux mécanismes qui régulent l'expression de HIF-1 α , sa stabilité, ainsi que son activité transcriptionnelle. Dans un premier temps, nos travaux démontrent que la peptidyl isomérase Pin1 est un régulateur important de l'activité transcriptionnelle de HIF-1 et permet une régulation différentielle de ses gènes cibles, en changeant la conformation de sa sous-unité HIF-1 α d'une manière dépendante de la phosphorylation par p42/p44 MAPK. L'isomérisation de HIF-1 α par Pin1 représente donc une nouvelle modification post-traductionnelle régulant l'activité transcriptionnelle du complexe HIF-1 au même titre que l'acétylation, la phosphorylation, l'hydroxylation, la S-nitrosylation et la sumoylation. Dans un second temps, nos travaux indiquent que Pin1 est également impliquée dans l'activation des facteurs de transcription Sp1 et Sp3 ainsi que dans l'expression de leur gène cible important, *HIF-1A*, en augmentant leur capacité de liaison à l'ADN. La régulation de l'expression de HIF-1 α par Pin1 constitue donc un mécanisme de régulation supplémentaire de HIF-1 permettant ainsi une meilleure compréhension de la signalisation hypoxique. Dans un troisième temps, nous présentons PD184161, un puissant inhibiteur de MEK 1/2, comme un répresseur sélectif de l'accumulation non-hypoxique de HIF-1 dans les cellules vasculaires. Nous montrons que cet inhibiteur agit

en contrôlant négativement la production de mtROS par les inducteurs non-hypoxiques de HIF-1 α , ce qui conduit au rétablissement des niveaux intracellulaires d'ascorbate et à une augmentation de la liaison à pVHL, entraînant ainsi à une diminution de la stabilité de HIF-1 α . En mettant en évidence un rôle de PD184161 dans la déstabilisation de HIF-1 α par un mécanisme indépendant de l'inhibition de la voie p42/p44 MAPK, cette étude contribue ainsi à clarifier et à améliorer les connaissances concernant l'effet de cet inhibiteur couramment utilisé, permettant ainsi une meilleure analyse et interprétation des résultats obtenus suite à son utilisation.

5.1 Régulation post-traductionnelle de HIF-1 α par Pin1

5.1.1 Importance de l'isomérisation de HIF-1 α par Pin1 au niveau de l'activité du facteur HIF-1 et des réponses physiopathologiques

Diverses modifications post-traductionnelles de la sous-unité HIF-1 α ont été démontrées pour jouer un rôle clé dans l'augmentation de l'activité transcriptionnelle du facteur HIF-1 (Brahimi-Horn *et al.* 2005). De façon intéressante, nous avons démontré que l'isomérisation de HIF-1 α par Pin1 représente une modification post-traductionnelle importante contrôlant l'activité du facteur HIF-1 et permettant une expression sélective de certains gènes cibles tels que VEGF, PGK1 et GLUT1, impliqués respectivement dans l'angiogenèse et le métabolisme cellulaire. Dans le but d'élucider davantage la spécificité de la régulation de HIF-1 α par Pin1 à certains gènes cibles et de déterminer l'ensemble des gènes dont l'expression dépend de cette régulation, une étude simultanée de l'expression génique, dans des cellules transfectées par des siRNA dirigés contre HIF- α ou Pin1, sur micropuce à ADN (*microarray*) a été effectuée. Encore plus intéressant, l'analyse des résultats a montré que parmi plus de 900 gènes dépendants de HIF, seulement 474 de ces gènes sont sous le contrôle de l'isomérase Pin1 (Figure Annexe 1). Ces derniers gènes sont impliqués essentiellement dans la prolifération, la survie, la motilité, la migration, la différenciation et le métabolisme cellulaire. Ces résultats suggèrent donc que la régulation de HIF-1 α par Pin1 constitue un mécanisme essentiel pour coordonner l'expression de certains gènes impliqués dans des processus cellulaires

et biologiques spécifiques afin de permettre une réponse physiologique bien définie et précise. À notre connaissance et jusqu'à l'heure actuelle, aucune étude n'a démontré un effet clair des modifications post-traductionnelles de HIF-1 α sur l'expression de l'ensemble des gènes cibles. Ainsi, notre étude est la première à caractériser la contribution de l'isomérisation de HIF-1 α par Pin1 dans la régulation sélective des réponses cellulaires médiées par le facteur HIF-1.

En activant plusieurs gènes contrôlant divers aspects du développement tumoral, le facteur HIF-1 est considéré comme un régulateur majeur de la tumorigenèse (Brahimi-Horn & Pouyssegur 2007; Semenza 2010a). De plus, l'isomérase Pin1 est également reconnue comme un joueur important au niveau tumoral (Bao *et al.* 2004; Zhou & Lu 2016). De façon intéressante, nos études indiquent que Pin1 régule de manière sélective et spécifique des gènes impliqués dans des processus caractéristiques du cancer : l'angiogenèse, la prolifération, la survie et la migration cellulaire. Ceci suggère que l'isomérase Pin1 contribue au cancer, au moins en partie, en régulant des gènes dépendants du facteur HIF-1 et que la régulation de HIF-1 α par Pin1 est l'un des mécanismes importants contrôlant la fonction oncogénique du facteur HIF-1, ce qui permet une bonne compréhension des liens possibles unissant HIF-1 et Pin1 dans le contexte tumoral. Ainsi, une meilleure caractérisation du mécanisme impliqué dans la régulation dépendante de l'isomérase Pin1 des gènes cibles de HIF-1 sera d'un grand intérêt pour mieux comprendre les processus de signalisation oncogénique et pour l'identification de nouvelles stratégies thérapeutiques anti-tumorales.

En plus d'être considérés comme des processus pro-oncogéniques, l'angiogenèse, la prolifération et la migration cellulaire contribuent également à la progression de plusieurs maladies vasculaires à remodelage (*vascular remodeling diseases, VRD*) telle que l'athérosclérose. Des études élégantes ont permis de montrer que l'isomérase Pin1 et le facteur HIF-1 peuvent jouer le rôle de médiateurs des VRD (Kim *et al.* 2010; Lambert *et al.* 2010). En effet, l'inhibition de Pin1 ou HIF-1 entraîne une réduction de la formation de la néointima suite à une blessure vasculaire chez des modèles animaux susceptibles à l'athérosclérose (Kim *et al.* 2010; Lambert *et al.* 2010). Cependant, la relation entre HIF-1 et Pin1 au niveau des VRD, ainsi que les mécanismes précis responsables de

développement de ces pathologies, n'ont pas été investigués jusqu'à présent. À la lumière de nos résultats, il est possible que l'isomérisation de HIF-1 α par Pin1 contribuerait à la pathogenèse des VRD, surtout que des études réalisées dans notre laboratoire indiquent que l'activation de HIF-1 dans les VSMC est souvent associée à une augmentation de leurs propriétés prolifératives et migratoires. À ce sujet, il serait intéressant d'étudier l'implication de Pin1 dans la régulation de l'activité transcriptionnelle de HIF-1 et de l'expression de ses gènes cibles dans un modèle cellulaire vasculaire tel que les VSMC. Des essais de micropuce à ADN ou de séquençage de l'ARN, en utilisant des VSMC transfectées par des siRNA dirigés contre HIF- α , Pin1 ou des siRNA contrôles permettraient d'évaluer si des gènes cibles de HIF-1, impliqués dans le remodelage vasculaire, sont modulés par Pin1. Il serait également intéressant d'effectuer une étude consacrée à l'établissement de la relation qui pourrait exister entre la régulation de HIF-1 α par Pin1 et les VRD. Ceci pourrait être réalisé grâce à l'évaluation de l'effet de l'inhibition locale de Pin1 sur le remodelage et la cicatrisation des vaisseaux suite à l'application d'une lésion au niveau de l'artère carotide chez un modèle animal où le facteur HIF-1 est activé. L'investigation de la contribution de la modification post-traductionnelle de HIF-1 α par Pin1 au niveau des réponses et des pathologies vasculaires sera d'une grande importance dans la biologie vasculaire ainsi que dans l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques.

5.1.2 Mécanismes de régulation de l'activité transcriptionnelle de HIF-1 par Pin1

L'isomérase Pin1 est reconnue pour son rôle dans la régulation de la fonction de plusieurs protéines en modulant leur localisation cellulaire, leur stabilité, leur état de phosphorylation ainsi que leur interaction avec leurs protéines partenaires (Wulf *et al.* 2005; Lu *et al.* 2007; Liou *et al.* 2011; Khanal *et al.* 2012). Il est donc bien raisonnable de penser que Pin1 module l'activité transcriptionnelle du facteur HIF-1 par l'un de ces processus. À ce sujet, une série d'études évaluant l'effet de l'inhibition de Pin1 sur la stabilité, la localisation cellulaire et l'interaction de HIF-1 α avec HIF-1 β , une sous-unité essentielle pour la formation d'un complexe transcriptionnel fonctionnel HIF-1, a été

effectuée. Nos résultats ont montré que la déplétion de Pin1 par interférence à l'ARN n'a aucun effet sur la dimérisation de HIF-1 α avec HIF-1 β , ce qui indique que la régulation de l'activité du facteur HIF-1 par Pin1 n'est pas due à la modulation de l'interaction HIF-1 α /HIF-1 β (Figure Annexe 2). De même, nous avons démontré que l'isomérase Pin1 n'est pas impliquée dans la stabilisation de HIF-1 α puisque son inhibition par interférence à l'ARN dans les cellules HeLa n'accélère pas la cinétique de dégradation de cette sous-unité lors d'une réoxygénation (résultats non montrés). Cette observation indique que, dans notre modèle cellulaire, l'interaction fonctionnelle entre Pin1 et HIF-1 α , qui dépend strictement de l'activation de la voie de signalisation p42/p44 MAPK, régule l'activité du facteur HIF-1 par un mécanisme autre que la modulation de la stabilité de sa sous-unité HIF-1 α . Ceci s'accorde avec des études antérieures montrant que l'inhibition de la voie de signalisation p42/p44 MAPK entraîne une diminution de l'activité de HIF-1 sans affecter le niveau protéique de sa sous-unité HIF-1 α (Richard *et al.* 1999; Berra *et al.* 2001a; Hofer *et al.* 2001; Hur *et al.* 2001; Mylonis *et al.* 2006). Toutefois, une étude récente réalisée sur des cellules de cancer du côlon HCT116 a montré que l'interaction avec Pin1 augmente la stabilité de HIF-1 α , ce qui contribue à l'augmentation de l'activité du facteur HIF-1 (Han *et al.* 2016). Il est donc possible qu'il existe des différences entre les types cellulaires concernant l'implication de la voie p42/p44 MAPK ou d'autres voies de signalisation, phosphorylant d'autres sites de liaison de Pin1, dans la régulation de la stabilité de HIF-1 α . Effectivement, la phosphorylation du résidu sérine 668 par CDK1, qui est un site putatif de la liaison de Pin1, a été démontrée pour jouer un rôle important au niveau de la stabilisation de HIF-1 α (Warfel *et al.* 2013). À ce propos, il serait intéressant d'investiguer s'il existe d'autres sites de liaison de Pin1 et d'évaluer leur importance au niveau de la stabilité de HIF-1 α dans différentes lignées cellulaires. D'autre part, il est important de noter que dans plusieurs types de cancer, l'isomérase Pin1 permet l'augmentation du niveau protéique de HIF-1 α en interagissant et en favorisant la déstabilisation de PML (*Promyelocytic leukemia protein*), un régulateur négatif de la sous-unité HIF-1 α . Cette déstabilisation fait intervenir la protéine KLHL20, une E3 ubiquitine protéase induite par HIF-1, (Yuan *et al.* 2011). Donc, il est aussi fort probable que, dans l'étude de Han *et al.*, l'effet de Pin1 sur

la stabilité de HIF-1 α est un effet indirect dû à la dégradation de la protéine PML. D'ailleurs, une diminution du niveau protéique de PML a été observée dans des cellules HCT116 soumises à un stress hypoxique (Yuan *et al.* 2011).

Par la suite, nous nous sommes penchés vers l'investigation du rôle possible de Pin1 dans la régulation de la localisation cellulaire de HIF-1 α . De façon intéressante, il a été démontré que la phosphorylation de HIF-1 α par p42/p44 MAPK est à l'origine de la rétention nucléaire de HIF-1 α en masquant le signal d'export nucléaire dépendant de CRM1 (Mylonis *et al.* 2008). D'après cette étude, le traitement des cellules HeLa avec le PD98059, un inhibiteur de la voie p42/p44 MAPK, entraîne l'exportation de la protéine de fusion GFP-HIF-1 α du noyau vers le cytoplasme. Cependant, nos travaux indiquent que, dans nos modèles cellulaires et selon les conditions expérimentales utilisées, l'activation de la voie de signalisation p42/p44 MAPK ainsi que l'isomérisation par Pin1, ne sont pas requises pour la localisation nucléaire de HIF-1 α . En effet, aucun changement dans la distribution intracellulaire de la protéine HIF-1 α endogène n'a été observé dans des cellules MEF Pin1^{-/-} ainsi que dans des cellules HeLa traitées avec l'inhibiteur de la voie p42/p44 MAPK, PD98059 (Figure Annexe 3). Ces résultats concordent avec ceux observés dans une autre étude montrant que l'inhibition de la voie p42/p44 MAPK, par le PD98059, n'affecte pas la localisation nucléaire de HIF-1 α dans les cellules Hep3B (Hur *et al.* 2001). En somme, tous ces résultats indiquent que l'interaction fonctionnelle entre HIF-1 α et Pin1 ne module ni la stabilité de HIF-1 α , ni sa localisation cellulaire ou son interaction avec HIF-1 β et que Pin1 régule l'activité de HIF-1 par un autre mécanisme.

De plus, et dans un but continu de déterminer le mécanisme par lequel Pin1 régule l'activité transcriptionnelle de HIF-1, nous avons entrepris d'investiguer si la capacité de liaison du facteur HIF-1 à l'ADN pouvait être modulée par cette isomérase. En effet, de nombreuses études ont montré que Pin1 est un régulateur majeur de la liaison à l'ADN de plusieurs facteurs de transcriptions dont NF- κ B et c-Myc (Kuboki *et al.* 2009; Farrell *et al.* 2013). En accord avec ces études, nous avons élucidé que l'isomérase Pin1 est également importante pour le recrutement du facteur HIF-1 aux séquences HRE de certains gènes cibles. Précisément, nos résultats montrent une forte baisse de l'enrichissement du facteur HIF-1 sur la séquence HRE du gène *VEGF* suite à la

déplétion de Pin1 par interférence à l'ARN. Toutefois, l'effet de l'inhibition de Pin1 sur la liaison de HIF-1 à la séquence HRE du gène PFKFB4 n'était pas aussi fort que celui à la séquence HRE du gène VEGF, ce qui paraît logique puisque Pin1 régule l'expression de ces gènes de façon sélective (Figure Annexe 4). Ainsi, l'isomérisation de HIF-1 α par Pin1 est une modification post-traductionnelle requise pour la liaison de HIF-1 à certaines séquences HRE. Comme hypothèse possible expliquant la régulation sélective de la liaison de HIF-1 à l'ADN par Pin1, nous suggérons que l'isomérase Pin1 favorise l'interaction de HIF-1 avec des partenaires ou d'autres facteurs de transcription promouvant l'interaction HIF-1/ADN, et qui sont spécifiques à certains gènes cibles. En accord avec cette hypothèse, des évidences suggèrent que les facteurs de transcription AP1 (*activator protein 1*), CREB (*cAMP-response-element-binding protein*) et CEBP (*CCAAT enhancer-binding protein*) coopèrent avec HIF-1 afin d'augmenter sa liaison au promoteur de certains gènes cibles activant ainsi leur expression (Villar *et al.* 2012). Il est aussi intéressant de souligner que le changement de conformation de HIF-1 α par Pin1 pourrait être un événement indispensable pour augmenter l'affinité du facteur HIF-1 à certaines séquences HRE et leurs régions flanquantes afin de maximiser l'expression génique. En effet, il a été démontré que le degré d'activation des gènes cibles des HIF ainsi que l'affinité des facteurs HIF varient en fonction de la composition en nucléotides de la séquence HER (Wenger *et al.* 2005; Mole *et al.* 2009; Xia & Kung 2009; Schodel *et al.* 2011). De plus, en tenant compte du fait que certaines séquences HRE peuvent subir des modifications épigénétiques, ce qui empêche la liaison des HIF (Wenger *et al.* 2005), il paraît judicieux de supposer que l'isomérisation de HIF-1 α par Pin1 facilite son interaction avec des cofacteurs impliqués dans le remodelage de la chromatine. Il est également possible que Pin1 diminue l'association de HIF-1 avec des inhibiteurs transcriptionnels. À cet égard, des études plus approfondies permettront de décortiquer d'avantage l'effet différentiel de Pin1 sur l'expression des gènes cibles de HIF-1.

5.2 Régulation des facteurs Sp1 et Sp3 par Pin1 et son impact majeur sur l'expression de HIF-1 α

5.2.1 Modes de régulation de l'activité transcriptionnelle de Sp1 et Sp3 par Pin1

L'activité transcriptionnelle des facteurs Sp1 et Sp3 a été élucidée pour être finement régulée par plusieurs modifications post-traductionnelles (Li *et al.* 2004; Li & Davie 2010; Chang & Hung 2012; Chu 2012). De manière intéressante, nous avons démontré que l'isomérase Pin1 est impliquée dans l'activation de ces facteurs en augmentant leurs capacités de liaison à l'ADN. Également, une étude élégante a suggéré que durant la mitose, l'isomérisation par Pin1 permet le détachement du facteur Sp1 de l'ADN afin de faciliter la condensation de la chromatine (Yang *et al.* 2014). Ainsi, cette étude avec la nôtre indiquent que Pin1 peut à la fois favoriser et inhiber la liaison du facteur Sp1 aux sites Sp. Ceci est supporté par des études antérieures montrant que la phosphorylation du Thr739, situé en C-terminal de la protéine Sp1 et qui est un site de liaison de Pin1, peut jouer deux rôles opposés dépendamment du contexte cellulaire. En ce sens, il a été démontré que durant l'interphase, la phosphorylation de ce résidu par p42/p44 MAPK augmente la capacité de liaison du Sp1 au promoteur du gène *VEGF*, ce qui se traduit par l'induction de ce gène (Milanini-Mongiat *et al.* 2002). Cependant, durant la mitose, sa phosphorylation par CDK1 empêche le facteur Sp1 de se lier à l'ADN ce qui facilite le processus mitotique et la progression du cycle cellulaire (Chuang *et al.* 2012). Sachant que l'isomérisation *cis/trans* entraîne un changement de structure de la protéine substrat, lui permettant ainsi de jouer deux rôles différents, et que cette réaction est fortement accélérée par les PPIases relativement à celle non catalysée par les enzymes, il est donc raisonnable de croire que la forme *cis* ou *trans* de la partie C-terminale est fortement requise pour la liaison de Sp1 à l'ADN et par conséquent tout changement de cette forme entraîne son détachement, d'où l'importance de l'isomérase Pin1 pour assurer une modification structurale et fonctionnelle rapide de cette protéine en fonction du contexte cellulaire. Pour cela, une étude spectroscopique RMN de la protéine Sp1 ou encore le développement et l'utilisation des anticorps spécifiques à la

conformation *cis* et *trans* de Sp1, un outil qui a très récemment fait ses premiers pas d'épanouissement (Nakamura *et al.* 2012; Kondo *et al.* 2015), permettraient de vérifier cette hypothèse. L'idée selon laquelle l'isomérase Pin1 peut exercer deux effets distincts sur la même protéine substrat est supportée par une étude récente montrant qu'en plus de permettre la dégradation protéolytique de la protéine c-Myc, Pin1 intervient pour augmenter son activité transcriptionnelle en favorisant son recrutement aux promoteurs de ses gènes cibles (Farrell *et al.* 2013).

Plusieurs hypothèses peuvent être proposées pour expliquer le rôle de Pin1 dans l'activation du facteur Sp1. Étant donné que le résidu Thr739 est présent au niveau du domaine D nécessaire pour son activité transcriptionnelle synergique ainsi que pour l'interaction de Sp1 avec des protéines partenaires régulatrices (Pascal & Tjian 1991; Lee *et al.* 1993; Doetzlhofer *et al.* 1999), il est possible que l'isomérase Pin1 augmente l'interaction de Sp1 avec des facteurs de remodelage de la chromatine ou des cofacteurs promouvant l'interaction Sp1-ADN. En accord avec cette hypothèse, une étude récente a démontré que Pin1 augmente la capacité de liaison du facteur de transcription c-Myc aux promoteurs de ses gènes cibles en facilitant le recrutement des facteurs de remodelage de la chromatine tels que p300, SNF5 (*sucrose non-fermenting 5*) et GCN5 (*general control nonderepressible 5*) (Farrell *et al.* 2013). Une autre possibilité est que Pin1 pourrait empêcher la liaison de Sp1 à des inhibiteurs transcriptionnels. Des essais futurs de co-immunoprécipitation des complexes liés à Sp1 en présence et en absence de Pin1 permettront ainsi de vérifier ces hypothèses.

Tel que mentionné précédemment, malgré que Sp1 et Sp3 sont fortement homologues et peuvent lier les mêmes sites Sp, certains gènes cibles sont communs à ces facteurs de transcription, alors que d'autres leur sont propres. Plusieurs hypothèses, dont le changement du ratio des protéines Sp1 et Sp3 au sein de la cellule, la différence entre les partenaires transcriptionnels de ces facteurs, ainsi que l'implication de certaines modifications post-traductionnelle spécifiques, ont été proposées et ont fait l'objet des études afin d'expliquer cette spécificité pour les gènes cibles. De façon intéressante, nos résultats montrent que l'effet de Pin1 sur l'affinité de liaison à l'ADN de Sp3 n'est pas aussi fort que sur Sp1. Cette régulation différentielle par Pin1 de la capacité de liaison de

ces facteurs à l'ADN nous laisse proposer que cette PPIase puisse jouer un rôle clé dans la spécificité d'expression des gènes cibles de Sp1. Il serait donc intéressant de déterminer si l'expression des gènes cibles spécifiques à Sp1 est sous le contrôle de l'isomérase Pin1.

Bien que le potentiel de liaison à l'ADN de Sp3 ne semble pas affecté par l'isomérase Pin1, celle-ci est un activateur important de ce facteur de transcription. En effet, la déplétion de Sp3 provoque une baisse dans l'expression du gène rapporteur dépendant de Sp1/3 dans des cellules surexprimant Sp3. Sachant que le résidu Ser73 est situé à proximité des domaines de transactivation A et B, impliqués dans l'interaction avec des facteurs et des coactivateurs nécessaires pour l'initiation de la transcription, il est donc fort probable que l'isomérase Pin1 facilite le recrutement de ces facteurs ou ces coactivateurs. Cette hypothèse expliquant le rôle de Pin1 sur l'activité de Sp3 pourrait être vérifiée par des essais d'immunoprécipitation de la chromatine et la détection des complexes transcriptionnels liés à Sp3 au niveau des séquences GC des gènes cibles en absence, et en présence, de Pin1.

5.2.2 Importance de Pin1 dans l'expression du régulateur clé de l'homéostasie de l'oxygène, HIF-1, ainsi que dans les réponses médiées par Sp1 et Sp3

En raison de son importance dans l'induction des réponses adaptatives à l'hypoxie, le complexe HIF-1 subit un contrôle précis par différents régulateurs à plusieurs niveaux : transcriptionnel, post-transcriptionnel, traductionnel et post-traductionnel. Sp1 et Sp3 sont considérés comme d'importants facteurs impliqués dans la régulation transcriptionnelle de HIF-1 α . En effet, le promoteur du gène *HIF-1A* contient plusieurs sites de liaison Sp qui sont nécessaires pour son expression autant constitutive qu'inductible (Iyer *et al.* 1998b; Minet *et al.* 1999). De manière intéressante, nos travaux ont montré que Pin1 joue un rôle important dans la régulation de l'activité transcriptionnelle de Sp1 et Sp3, ce qui influence positivement l'expression génique de HIF-1 α . Nos études contribuent donc à approfondir les connaissances concernant la

régulation transcriptionnelle de HIF-1 α . Comme précédemment démontré au chapitre 2, Pin1 est un régulateur clé de l'activité de HIF-1 en agissant par isomérisation de sa sous-unité α . L'implication de cette isomérase dans l'activation de Sp1 et Sp3 au promoteur de *HIF-1A* constitue donc un mécanisme supplémentaire pour la régulation de HIF-1 par Pin1, permettant ainsi une meilleure compréhension de la réponse hypoxique.

Sp1 et Sp3 sont reconnus comme étant des joueurs importants au niveau tumoral (Li & Davie 2010; Beishline & Azizkhan-Clifford 2014). L'importance de ces facteurs réside dans leur capacité à réguler l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la tumorigenèse dont la sous-unité α du complexe HIF-1 qui est au cœur des processus oncogéniques (Brahimi-Horn & Pouyssegur 2007; Semenza 2010a). D'ailleurs, une surexpression de la protéine HIF-1 α associée à un mauvais pronostic a été observée dans divers types de tumeurs (Zhong *et al.* 1999; Daponte *et al.* 2008). Ainsi, une bonne compréhension des mécanismes impliqués dans l'activation de Sp1 et Sp3 est d'un grand intérêt. Plusieurs modifications post-traductionnelles de ces facteurs, dont la phosphorylation par p42/p44 MAPK, ont été démontrées pour jouer un rôle clé au niveau de leur activité ainsi qu'au niveau des pathologies associées (Tan & Khachigian 2009; Chu 2012). Ainsi, l'inhibition ou l'activation des processus responsables de ces modifications ou de leurs régulateurs peut servir comme éventuelle stratégie thérapeutique dans le traitement de plusieurs pathologies où les facteurs Sp1 et Sp3 semblent jouer un rôle important. D'ailleurs, il a été démontré que l'acide bétulinique, utilisé en tant qu'agent anticancéreux, permet la dégradation du facteur Sp1 en favorisant sa sumoylation impliquée dans le recrutement de l'ubiquitine ligase E3, RNF4 (Hsu *et al.* 2012). La démonstration de l'implication de l'isomérase Pin1, qui joue également un rôle clé dans le développement tumoral (Bao *et al.* 2004; Zhou & Lu 2016), dans la régulation de l'activité de Sp1 et Sp3 ainsi que dans l'expression de HIF-1 α permettrait donc une meilleure compréhension de la régulation des facteurs Sp1 et Sp3 ainsi que du réseau moléculaire unissant ces facteurs, HIF-1 et Pin1 dans un contexte pathologique, ce qui pourrait avoir un impact sur le plan thérapeutique.

Il est bien connu que les facteurs Sp1 et Sp3 jouent des rôles ambivalents, c'est-à-dire qu'ils sont capables de réguler à la fois l'expression des gènes pro- et anti-

apoptotiques, des gènes pro- et anti-angiogéniques, ainsi que des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs (DesJardins & Hay 1993; Kavurma *et al.* 2001; Kavurma & Khachigian 2003; Olofsson *et al.* 2007; Yuan *et al.* 2007b). Cependant, le mécanisme précis permettant une induction spécifique des gènes cibles dans différentes situations et contextes cellulaires est, à ce jour, encore mal défini. Il est donc envisageable que l'isomérase Pin1 soit impliquée dans la spécificité de réponse en permettant une régulation sélective des gènes cibles. De façon conceptuelle, il sera alors nécessaire d'évaluer si la régulation de Sp1 et Sp3 par Pin1 est importante pour l'expression de certains gènes cibles de Sp1/3. Une analyse de l'expression génique sur micropuce à ADN dans un contexte où l'isomérase Pin1 est inactive ou absente permettrait d'identifier les gènes modulés spécifiquement par Pin1. Cette étude ouvre des perspectives intéressantes quant à l'élaboration des stratégies thérapeutiques susceptibles d'inhiber des réponses biologiques spécifiques induites par Sp1 et Sp3 dans un contexte donné.

5.3 Régulation de l'induction non-hypoxique de HIF-1 α chez les VSMC par PD184161

Dans le chapitre 4, nous avons présenté l'inhibiteur de la voie p42/p44 MAPK, le PD184161, comme un suppresseur de l'induction non-hypoxique de HIF-1 α . Plus précisément, nous avons montré que PD184161 diminue le niveau protéique de HIF-1 α , chez les VSMC traitées par des agents inducteurs de cette protéine, en bloquant la génération de mtROS associée. Ceci entraîne le rétablissement du niveau intracellulaire d'ascorbate et l'augmentation de son ciblage vers la dégradation protéasomale dépendante de l'axe PHD/pVHL.

5.3.1 Importance de PD184161 dans les réponses induites par les mtROS

Les mtROS sont considérées comme d'importants médiateurs des réponses induites par l'Ang II (Kimura *et al.* 2005a; Caldiz *et al.* 2007; De Giusti *et al.* 2008; Doughan *et al.* 2008; De Giusti *et al.* 2009; Caldiz *et al.* 2011). Notre équipe de recherche a démontré

que l'Ang II induit la protéine HIF-1 α principalement par un mécanisme dépendant de la génération des mtROS (Patten *et al.* 2010). En diminuant le niveau intracellulaire de l'ascorbate via la production des mtROS, l'Ang II inhibe l'activité des PHD, stabilisant ainsi la sous-unité α du complexe HIF-1 (Page *et al.* 2008; Patten *et al.* 2010). De façon intéressante, nos travaux ont montré que le PD184161 est un agent capable d'inhiber la production des mtROS par l'Ang II, ce qui entraîne la déstabilisation de la sous-unité HIF-1 α . Par ailleurs, les mtROS agissent non seulement sur le facteur HIF-1 mais également sur plusieurs autres facteurs de transcription et sentiers de signalisation. Plus particulièrement, il a été démontré que les mtROS induisent la phosphorylation de l'inhibiteur I κ B par l'activation de la kinase IKK, ce qui conduit à sa dégradation protéasomale et, par conséquent, la translocation nucléaire et l'activation de NF- κ B (Wang *et al.* 2002). Ainsi, PD184161 est un inhibiteur qui agit non seulement sur MEK1/2 et HIF-1, mais également sur la voie NF- κ B, qui est à son tour activée par l'Ang II d'une manière ROS-dépendante (Brasier *et al.* 2000). Une telle activation a été démontré pour contribuer à la pathogenèse de plusieurs maladies cardiovasculaires, notamment la rigidité artérielle causée par la calcification, l'hypertension artérielle et l'athérosclérose (Takahashi *et al.* 2007; Jia *et al.* 2012; Liu *et al.* 2016). Étant donné que l'Ang II joue un rôle déterminant dans plusieurs processus biologiques des VSMC, ainsi que dans diverses pathologies associées, nous pensons donc que l'identification d'un nouveau inhibiteur des médiateurs importants des réponses physiopathologiques de l'Ang II sera importante dans le domaine de la biologie vasculaire.

5.3.2 Rôle potentiel de PD184161 dans le traitement des pathologies associées aux VSMC

Les VSMC constituent la composante cellulaire majoritaire des vaisseaux sanguins, qui jouent un rôle crucial dans le maintien du tonus vasculaire grâce à leur capacité contractile. Outre leur rôle physiologique important, ces cellules, situées au niveau de l'intima, sont impliquées dans le développement de plusieurs maladies vasculaires à remodelage (VRD) telles que l'athérosclérose et l'hypertension artérielle (Campbell & Chamley-Campbell 1981; Owens 1989; Rudijanto 2007). En effet, en situations

pathologiques (ex: atteinte vasculaire), ces cellules peuvent changer leur phénotype contractile non proliférant vers un phénotype synthétique caractérisé principalement par une prolifération et une migration cellulaire accrue, ce qui perturbe l'intégrité vasculaire et contribue fortement au phénomène de remodelage vasculaire (Campbell & Chamley-Campbell 1981). En régulant l'expression des gènes impliqués dans l'angiogenèse, la prolifération et la migration cellulaire, le facteur HIF-1 joue un rôle majeur dans ce changement phénotypique, et par conséquent dans le phénomène du remodelage vasculaire (Lambert *et al.* 2010; Rey & Semenza 2010; Lim *et al.* 2013). D'ailleurs, plusieurs études ont souligné la forte association entre l'activation accrue de HIF-1 et le développement des VRD telles que l'hypertension pulmonaire et l'athérosclérose (Veith *et al.* 2014; Liu *et al.* 2016). Il est largement reconnue que la protéine HIF-1 α est induite dans les VSMC, en plus que par l'hypoxie, par plusieurs stimuli non-hypoxiques dont l'Ang II et le PDGF (Richard *et al.* 2000) qui contribuent également à la pathogénèses des VRD (Raines 2004; Montezano *et al.* 2014). Étant donné que l'induction de la protéine HIF-1 α représente un phénomène important au cœur des pathologies associées aux VSMC, l'identification d'agents susceptibles de bloquer cette induction est donc importante pour développer un traitement efficace contre ces pathologies. De façon intéressante, nos travaux ont permis de mettre en lumière un inhibiteur de l'induction non-hypoxique de HIF-1 α chez les VSMC, le PD184161. D'après ces résultats prometteurs, le PD184161, ou un composé dérivé, pourrait avoir un potentiel thérapeutique intéressant dans le traitement des VRD. Certes, il est crucial d'évaluer le rôle de cet inhibiteur dans les réponses cellulaires ainsi que dans la physiologie des VSMC. Pour ce faire, il serait intéressant d'étudier l'effet de PD184161 sur des processus biologiques impliqués dans le remodelage vasculaire tels que la migration et la prolifération cellulaire qui sont médiés par HIF-1. Par la suite, il est également important d'étudier son effet sur le remodelage vasculaire chez un modèle animal, où la protéine HIF-1 α est induite par des stimuli non-hypoxiques, suite à l'application d'une lésion au niveau de l'artère carotide où suite à un régime riche en cholestérol. Il est intéressant de mentionner que l'activation de la voie p42/p44 MAPK par plusieurs stimuli dont l'Ang II et le PDGF est également importante au niveau du remodelage vasculaire (Lee *et al.* 2007; Abe *et al.* 2008). Étant donné que

PD184161 est un inhibiteur de MEK 1/2, il n'est pas exclu que les effets qui seront observés lors de ces études soient aussi une conséquence de l'inhibition de la voie p42/p44 MAPK, en plus de la suppression de HIF-1. Ceci souligne encore plus l'intérêt de l'utilisation de cet inhibiteur possédant un double avantage. Toutefois, afin de définir un rôle plus spécifique de PD184161 dans les réponses vasculaires méditées par HIF-1, indépendamment de la voie p42/p44 MAPK, il serait intéressant de générer un composé dérivé ayant un effet sur HIF-1 mais pas sur MEK 1/2.

La transdifférenciation des VSMC en cellules de phénotype ostéoblastique avec calcification est également un phénomène qui contribue au remodelage vasculaire et, par conséquent, à l'augmentation de risque de complications cardiovasculaires. Une étude récente réalisée au sein de notre laboratoire a permis de montrer que l'Ang II joue un rôle déterminant dans l'augmentation de la calcification des VSMC dans un milieu riche en phosphate inorganique (HiPO₄)². De plus, l'induction de HIF-1 a été démontré pour favoriser la transdifférenciation ostéogénique et la calcification des VSMC induites par HiPO₄ (Mokas *et al.* 2016). À la lumière de ces études, nous avons souhaité évaluer l'effet inhibiteur de PD184161. De façon intéressante, nos travaux préliminaires ont montré que le PD184161 baisse fortement la calcification des VSMC induite par HiPO₄ et Ang II, comparativement à PD98059, un autre inhibiteur de la voie p42/p44 MAPK. Ceci suggère que le PD184161 possède un potentiel thérapeutique prometteur au niveau des pathologies associées à la calcification vasculaire induite par une hyperphosphatémie, qui peut être une conséquence majeure d'insuffisance rénale chronique (IRC). À ce propos, il serait intéressant, dans une prochaine étape, d'investiguer davantage ce potentiel thérapeutique *in vivo* dans un modèle animal en IRC, causé par l'ablation chirurgicale de la masse rénale, et soumis à un déséquilibre minéral (phosphate inorganique élevé, calcitriol) et à une perfusion sous-cutanée de l'Ang II. Cette étude ouvre donc une nouvelle perspective quant à la découverte d'un nouvel agent

² Bisson SK, Ung RV, Richard DE, Agharazii M, Lariviere R. Blood pressure-independent regulation of vascular stiffness and calcification by angiotensin II (Ang II) and endothelin 1 (ET1). *In preparation*. 2017.

thérapeutique pour le traitement des pathologies vasculaires où HIF-1 est un déterminant principal.

Chapitre 6: Conclusion

Le facteur de transcription HIF-1 est un médiateur principal des réponses adaptatrices permettant la survie des cellules dans un environnement pauvre en oxygène. En régulant l'expression d'une multitude de gènes impliqués dans le maintien de l'hémostase cellulaire, HIF-1 joue un rôle capital dans divers processus physiologiques et pathologiques, notamment le remodelage vasculaire et la progression tumorale. Ainsi, une meilleure compréhension des mécanismes de sa régulation est d'un grand intérêt.

Nos travaux identifient la peptidyl-prolyl isomérase Pin1 comme un régulateur important de HIF-1. En effet, nos résultats mettent en évidence deux nouveaux mécanismes de régulation de la sous-unité HIF-1 α par Pin1 : la régulation transcriptionnelle et la régulation post-traductionnelle. En interagissant avec HIF-1 α , Pin1 module positivement l'activité transcriptionnelle de HIF-1 et permet une régulation différentielle de ses gènes cibles. Jusqu'à ce jour, aucun rôle clair des modifications post-traductionnelles de HIF-1 α sur l'expression de ses gènes cibles n'a été démontré. Nous croyons que la détermination du mécanisme moléculaire par lequel HIF-1 active spécifiquement certains gènes cibles, permettant ainsi une réponse biologique précise, aide à mieux comprendre l'implication de HIF-1 dans certains cas pathologiques. De plus, nous avons montré que Pin1 intervient également dans l'activation des facteurs de transcription Sp1 et Sp3, des régulateurs positifs de l'expression du gène *HIF-1A*, ce qui constitue un mécanisme supplémentaire pour la régulation de HIF-1 par Pin1. Étant donné que Pin1 joue un rôle important dans plusieurs types de cancers humains, une meilleure compréhension du rôle de cette protéine dans la régulation du HIF-1 s'avère donc essentiel pour son utilisation thérapeutique éventuelle.

D'autre part, nos travaux ont permis d'élucider un nouveau rôle d'un inhibiteur de MEK 1/2 couramment utilisé, le PD184161. Nous avons démontré que ce dernier est capable de bloquer l'induction non-hypoxique de la protéine HIF-1 α dans des cellules vasculaires, les VSMC. HIF-1 est reconnu pour son rôle majeur dans le système vasculaire et son activation contribue à la pathogenèse de diverses maladies associées aux VSMC. Nous pensons donc que l'investigation de l'effet négatif de PD184161 sur la

stabilité de HIF-1 α sera importante pour les études futures afin d'éclaircir le rôle de HIF-1 dans la biologie vasculaire.

En résumé, nos travaux contribuent à identifier et à améliorer les connaissances sur des régulateurs importants de HIF-1. Considérant l'important rôle physiologique et pathologique de HIF-1, nos travaux permettront une meilleure compréhension de la régulation de ce facteur et mèneront à l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques pour diverses pathologies où HIF-1 est un joueur important.

Références

- Abboud S. & Haile D.J. (2000) A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism. *J Biol Chem* **275**, 19906-12.
- Abdelrahim M., Smith R., 3rd, Burghardt R. & Safe S. (2004) Role of Sp proteins in regulation of vascular endothelial growth factor expression and proliferation of pancreatic cancer cells. *Cancer Res* **64**, 6740-9.
- Abe K., Nakashima H., Ishida M., Miho N., Sawano M., Soe N.N., Kurabayashi M., Chayama K., Yoshizumi M. & Ishida T. (2008) Angiotensin II-induced osteopontin expression in vascular smooth muscle cells involves Gq/11, Ras, ERK, Src and Ets-1. *Hypertens Res* **31**, 987-98.
- Amin M.R., Malakooti J., Sandoval R., Dudeja P.K. & Ramaswamy K. (2006) IFN-gamma and TNF-alpha regulate human NHE3 gene expression by modulating the Sp family transcription factors in human intestinal epithelial cell line C2BBel. *Am J Physiol Cell Physiol* **291**, C887-96.
- Appelhoff R.J., Tian Y.M., Raval R.R., Turley H., Harris A.L., Pugh C.W., Ratcliffe P.J. & Gleadle J.M. (2004) Differential function of the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3 in the regulation of hypoxia-inducible factor. *J Biol Chem* **279**, 38458-65.
- Aragones J., Schneider M., Van Geyte K., Fraisl P., Dresselaers T., Mazzone M., Dirx R., Zacchigna S., Lemieux H., Jeoung N.H., Lambrechts D., Bishop T., Lafuste P., Diez-Juan A., Harten S.K., Van Noten P., De Bock K., Willam C., Tjwa M., Grosfeld A., Navet R., Moons L., Vandendriessche T., Deroose C., Wijeyekoon B., Nuyts J., Jordan B., Silasi-Mansat R., Lupu F., Dewerchin M., Pugh C., Salmon P., Mortelmans L., Gallez B., Gorus F., Buyse J., Sluse F., Harris R.A., Gnaiger E., Hespel P., Van Hecke P., Schuit F., Van Veldhoven P., Ratcliffe P., Baes M., Maxwell P. & Carmeliet P. (2008) Deficiency or inhibition of oxygen sensor Phd1 induces hypoxia tolerance by reprogramming basal metabolism. *Nat Genet* **40**, 170-80.
- Arinze I.J. & Kawai Y. (2003) Sp family of transcription factors is involved in valproic acid-induced expression of Galphai2. *J Biol Chem* **278**, 17785-91.
- Augstein A., Poitz D.M., Braun-Dullaeus R.C., Strasser R.H. & Schmeisser A. (2011) Cell-specific and hypoxia-dependent regulation of human HIF-3alpha: inhibition of the expression of HIF target genes in vascular cells. *Cell Mol Life Sci* **68**, 2627-42.
- Azizkhan J.C., Jensen D.E., Pierce A.J. & Wade M. (1993) Transcription from TATA-less promoters: dihydrofolate reductase as a model. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **3**, 229-54.
- Baek J.H., Liu Y.V., McDonald K.R., Wesley J.B., Hubbi M.E., Byun H. & Semenza G.L. (2007) Spermidine/spermine-N1-acetyltransferase 2 is an essential component of the ubiquitin ligase complex that regulates hypoxia-inducible factor 1alpha. *J Biol Chem* **282**, 23572-80.
- Baek J.H., Mahon P.C., Oh J., Kelly B., Krishnamachary B., Pearson M., Chan D.A., Giaccia A.J. & Semenza G.L. (2005) OS-9 interacts with hypoxia-inducible factor

- 1alpha and prolyl hydroxylases to promote oxygen-dependent degradation of HIF-1alpha. *Mol Cell* **17**, 503-12.
- Bain J., McLauchlan H., Elliott M. & Cohen P. (2003) The specificities of protein kinase inhibitors: an update. *Biochem J* **371**, 199-204.
- Bao L., Kimzey A., Sauter G., Sowadski J.M., Lu K.P. & Wang D.G. (2004) Prevalent overexpression of prolyl isomerase Pin1 in human cancers. *Am J Pathol* **164**, 1727-37.
- Barsoum I.B., Smallwood C.A., Siemens D.R. & Graham C.H. (2014) A mechanism of hypoxia-mediated escape from adaptive immunity in cancer cells. *Cancer Res* **74**, 665-74.
- Barth S., Nesper J., Hasgall P.A., Wirthner R., Nytko K.J., Edlich F., Katschinski D.M., Stiehl D.P., Wenger R.H. & Camenisch G. (2007) The peptidyl prolyl cis/trans isomerase FKBP38 determines hypoxia-inducible transcription factor prolyl-4-hydroxylase PHD2 protein stability. *Mol Cell Biol* **27**, 3758-68.
- Bedolla R.G., Gong J., Prihoda T.J., Yeh I.T., Thompson I.M., Ghosh R. & Kumar A.P. (2012) Predictive value of Sp1/Sp3/FLIP signature for prostate cancer recurrence. *PLoS One* **7**, e44917.
- Beishline K. & Azizkhan-Clifford J. (2014) Interplay between the cell cycle and double-strand break response in mammalian cells. *Methods Mol Biol* **1170**, 41-59.
- Bell E.L., Klimova T.A., Eisenbart J., Moraes C.T., Murphy M.P., Budinger G.R. & Chandel N.S. (2007) The Qo site of the mitochondrial complex III is required for the transduction of hypoxic signaling via reactive oxygen species production. *J Cell Biol* **177**, 1029-36.
- Bell S.M., Schreiner C.M., Waclaw R.R., Campbell K., Potter S.S. & Scott W.J. (2003) Sp8 is crucial for limb outgrowth and neuropore closure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 12195-200.
- Bernardi R., Guernah I., Jin D., Grisendi S., Alimonti A., Teruya-Feldstein J., Cordon-Cardo C., Simon M.C., Rafii S. & Pandolfi P.P. (2006) PML inhibits HIF-1alpha translation and neoangiogenesis through repression of mTOR. *Nature* **442**, 779-85.
- Berra E., Benizri E., Ginouves A., Volmat V., Roux D. & Pouyssegur J. (2003) HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1alpha in normoxia. *EMBO J* **22**, 4082-90.
- Berra E., Richard D.E., Gothie E. & Pouyssegur J. (2001a) HIF-1-dependent transcriptional activity is required for oxygen-mediated HIF-1alpha degradation. *FEBS Lett* **491**, 85-90.
- Berra E., Roux D., Richard D.E. & Pouyssegur J. (2001b) Hypoxia-inducible factor-1 alpha (HIF-1 alpha) escapes O(2)-driven proteasomal degradation irrespective of its subcellular localization: nucleus or cytoplasm. *EMBO Rep* **2**, 615-20.
- Bertout J.A., Patel S.A. & Simon M.C. (2008) The impact of O2 availability on human cancer. *Nat Rev Cancer* **8**, 967-75.
- Betz C., Lenard A., Belting H.G. & Affolter M. (2016) Cell behaviors and dynamics during angiogenesis. *Development* **143**, 2249-60.

- Biggs J.R., Kudlow J.E. & Kraft A.S. (1996) The role of the transcription factor Sp1 in regulating the expression of the WAF1/CIP1 gene in U937 leukemic cells. *J Biol Chem* **271**, 901-6.
- Bishop T., Gallagher D., Pascual A., Lygate C.A., de Bono J.P., Nicholls L.G., Ortega-Saenz P., Oster H., Wijeyekoon B., Sutherland A.I., Grosfeld A., Aragonés J., Schneider M., van Geyte K., Teixeira D., Diez-Juan A., Lopez-Barneo J., Channon K.M., Maxwell P.H., Pugh C.W., Davies A.M., Carmeliet P. & Ratcliffe P.J. (2008) Abnormal sympathoadrenal development and systemic hypotension in PHD3^{-/-} mice. *Mol Cell Biol* **28**, 3386-400.
- Bjornheden T., Levin M., Evaldsson M. & Wiklund O. (1999) Evidence of hypoxic areas within the arterial wall in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19**, 870-6.
- Black A.R., Black J.D. & Azizkhan-Clifford J. (2001) Sp1 and kruppel-like factor family of transcription factors in cell growth regulation and cancer. *J Cell Physiol* **188**, 143-60.
- Blouin C.C., Page E.L., Soucy G.M. & Richard D.E. (2004) Hypoxic gene activation by lipopolysaccharide in macrophages: implication of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Blood* **103**, 1124-30.
- Bonello M.R. & Khachigian L.M. (2004) Fibroblast growth factor-2 represses platelet-derived growth factor receptor-alpha (PDGFR-alpha) transcription via ERK1/2-dependent Sp1 phosphorylation and an atypical cis-acting element in the proximal PDGFR-alpha promoter. *J Biol Chem* **279**, 2377-82.
- Bonomini M., Del Vecchio L., Sirolli V. & Locatelli F. (2016) New Treatment Approaches for the Anemia of CKD. *Am J Kidney Dis* **67**, 133-42.
- Bouwman P., Gollner H., Elsasser H.P., Eckhoff G., Karis A., Grosveld F., Philipsen S. & Suske G. (2000) Transcription factor Sp3 is essential for post-natal survival and late tooth development. *EMBO J* **19**, 655-61.
- Bracken C.P., Fedele A.O., Linke S., Balrak W., Lisy K., Whitelaw M.L. & Peet D.J. (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**, 22575-85.
- Bracken C.P., Whitelaw M.L. & Peet D.J. (2003) The hypoxia-inducible factors: key transcriptional regulators of hypoxic responses. *Cell Mol Life Sci* **60**, 1376-93.
- Brahimi-Horn C., Mazure N. & Pouyssegur J. (2005) Signalling via the hypoxia-inducible factor-1alpha requires multiple posttranslational modifications. *Cell Signal* **17**, 1-9.
- Brahimi-Horn M.C. & Pouyssegur J. (2007) Harnessing the hypoxia-inducible factor in cancer and ischemic disease. *Biochem Pharmacol* **73**, 450-7.
- Brasier A.R., Jamaluddin M., Han Y., Patterson C. & Runge M.S. (2000) Angiotensin II induces gene transcription through cell-type-dependent effects on the nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) transcription factor. *Mol Cell Biochem* **212**, 155-69.
- Briggs M.R., Kadonaga J.T., Bell S.P. & Tjian R. (1986) Purification and biochemical characterization of the promoter-specific transcription factor, Sp1. *Science* **234**, 47-52.

- Brooks D.P. & Ruffolo R.R. (1994) Functions mediated by peripheral angiotensin II receptors. In: *Angiotensin II Receptors*. (ed. by Ruffolo RR), pp. 71-102. CRC Press Inc., Boca Raton
- Bruick R.K. & McKnight S.L. (2001) A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science* **294**, 1337-40.
- Brusselmans K., Compennolle V., Tjwa M., Wiesener M.S., Maxwell P.H., Collen D. & Carmeliet P. (2003) Heterozygous deficiency of hypoxia-inducible factor-2alpha protects mice against pulmonary hypertension and right ventricular dysfunction during prolonged hypoxia. *J Clin Invest* **111**, 1519-27.
- Bucher P. (1990) Weight matrix descriptions of four eukaryotic RNA polymerase II promoter elements derived from 502 unrelated promoter sequences. *J Mol Biol* **212**, 563-78.
- Burke D.L., Frid M.G., Kunrath C.L., Karoor V., Anwar A., Wagner B.D., Strassheim D. & Stenmark K.R. (2009) Sustained hypoxia promotes the development of a pulmonary artery-specific chronic inflammatory microenvironment. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **297**, L238-50.
- Bushuev V.I., Miasnikova G.Y., Sergueeva A.I., Polyakova L.A., Okhotin D., Gaskin P.R., Debebe Z., Nekhai S., Castro O.L., Prchal J.T. & Gordeuk V.R. (2006) Endothelin-1, vascular endothelial growth factor and systolic pulmonary artery pressure in patients with Chuvash polycythemia. *Haematologica* **91**, 744-9.
- Caldiz C.I., Diaz R.G., Nolly M.B., Chiappe de Cingolani G.E., Ennis I.L., Cingolani H.E. & Perez N.G. (2011) Mineralocorticoid receptor activation is crucial in the signalling pathway leading to the Anrep effect. *J Physiol* **589**, 6051-61.
- Caldiz C.I., Garcarena C.D., Dulce R.A., Novaretto L.P., Yeves A.M., Ennis I.L., Cingolani H.E., Chiappe de Cingolani G. & Perez N.G. (2007) Mitochondrial reactive oxygen species activate the slow force response to stretch in feline myocardium. *J Physiol* **584**, 895-905.
- Cam H., Easton J.B., High A. & Houghton P.J. (2010) mTORC1 signaling under hypoxic conditions is controlled by ATM-dependent phosphorylation of HIF-1alpha. *Mol Cell* **40**, 509-20.
- Camara A.K., Lesnfsky E.J. & Stowe D.F. (2010) Potential therapeutic benefits of strategies directed to mitochondria. *Antioxid Redox Signal* **13**, 279-347.
- Campbell G.R. & Chamley-Campbell J.H. (1981) Smooth muscle phenotypic modulation: role in atherogenesis. *Med Hypotheses* **7**, 729-35.
- Campbell S.L., Khosravi-Far R., Rossman K.L., Clark G.J. & Der C.J. (1998) Increasing complexity of Ras signaling. *Oncogene* **17**, 1395-413.
- Carmeliet P., Dor Y., Herbert J.M., Fukumura D., Brusselmans K., Dewerchin M., Neeman M., Bono F., Abramovitch R., Maxwell P., Koch C.J., Ratcliffe P., Moons L., Jain R.K., Collen D. & Keshert E. (1998) Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature* **394**, 485-90.
- Carrero P., Okamoto K., Coumilleau P., O'Brien S., Tanaka H. & Poellinger L. (2000) Redox-regulated recruitment of the transcriptional coactivators CREB-binding protein and SRC-1 to hypoxia-inducible factor 1alpha. *Mol Cell Biol* **20**, 402-15.

- Carver L.A., Hogenesch J.B. & Bradfield C.A. (1994) Tissue specific expression of the rat Ah-receptor and ARNT mRNAs. *Nucleic Acids Res* **22**, 3038-44.
- Cassavaugh J.M., Hale S.A., Wellman T.L., Howe A.K., Wong C. & Lounsbury K.M. (2011) Negative regulation of HIF-1alpha by an FBW7-mediated degradation pathway during hypoxia. *J Cell Biochem* **112**, 3882-90.
- Cawley S., Bekiranov S., Ng H.H., Kapranov P., Sekinger E.A., Kampa D., Piccolboni A., Sementchenko V., Cheng J., Williams A.J., Wheeler R., Wong B., Drenkow J., Yamanaka M., Patel S., Brubaker S., Tammana H., Helt G., Struhl K. & Gingeras T.R. (2004) Unbiased mapping of transcription factor binding sites along human chromosomes 21 and 22 points to widespread regulation of noncoding RNAs. *Cell* **116**, 499-509.
- Ceradini D.J., Kulkarni A.R., Callaghan M.J., Tepper O.M., Bastidas N., Kleinman M.E., Capla J.M., Galiano R.D., Levine J.P. & Gurtner G.C. (2004) Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med* **10**, 858-64.
- Chan D.A., Sutphin P.D., Yen S.E. & Giaccia A.J. (2005) Coordinate regulation of the oxygen-dependent degradation domains of hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Mol Cell Biol* **25**, 6415-26.
- Chan J., Prado-Lourenco L., Khachigian L.M., Bennett M.R., Di Bartolo B.A. & Kavurma M.M. (2010) TRAIL promotes VSMC proliferation and neointima formation in a FGF-2-, Sp1 phosphorylation-, and NFkappaB-dependent manner. *Circ Res* **106**, 1061-71.
- Chang W.C. & Hung J.J. (2012) Functional role of post-translational modifications of Sp1 in tumorigenesis. *J Biomed Sci* **19**, 94.
- Chen C.H., Chang C.C., Lee T.H., Luo M., Huang P., Liao P.H., Wei S., Li F.A., Chen R.H., Zhou X.Z., Shih H.M. & Lu K.P. (2013) SENP1 deSUMOylates and regulates Pin1 protein activity and cellular function. *Cancer Res* **73**, 3951-62.
- Chen C.H., Li W., Sultana R., You M.H., Kondo A., Shahpasand K., Kim B.M., Luo M.L., Nechama M., Lin Y.M., Yao Y., Lee T.H., Zhou X.Z., Swomley A.M., Allan Butterfield D., Zhang Y. & Lu K.P. (2015) Pin1 cysteine-113 oxidation inhibits its catalytic activity and cellular function in Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* **76**, 13-23.
- Chen H., Li B. & Workman J.L. (1994) A histone-binding protein, nucleoplasmin, stimulates transcription factor binding to nucleosomes and factor-induced nucleosome disassembly. *EMBO J* **13**, 380-90.
- Cho H., Ahn D.R., Park H. & Yang E.G. (2007) Modulation of p300 binding by posttranslational modifications of the C-terminal activation domain of hypoxia-inducible factor-1alpha. *FEBS Lett* **581**, 1542-8.
- Cho Y.S., Park S.Y., Kim D.J., Lee S.H., Woo K.M., Lee K.A., Lee Y.J., Cho Y.Y. & Shim J.H. (2012) TPA-induced cell transformation provokes a complex formation between Pin1 and 90 kDa ribosomal protein S6 kinase 2. *Mol Cell Biochem* **367**, 85-92.
- Chu S. (2012) Transcriptional regulation by post-transcriptional modification--role of phosphorylation in Sp1 transcriptional activity. *Gene* **508**, 1-8.

- Chu S., Cockrell C.A. & Ferro T.J. (2003) Expression of alpha-ENaC2 is dependent on an upstream Sp1 binding motif and is modulated by protein phosphatase 1 in lung epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **303**, 1159-68.
- Chu S. & Ferro T.J. (2005) Sp1: regulation of gene expression by phosphorylation. *Gene* **348**, 1-11.
- Chuang J.Y. & Hung J.J. (2011) Overexpression of HDAC1 induces cellular senescence by Sp1/PP2A/pRb pathway. *Biochem Biophys Res Commun* **407**, 587-92.
- Chuang J.Y., Wang S.A., Yang W.B., Yang H.C., Hung C.Y., Su T.P., Chang W.C. & Hung J.J. (2012) Sp1 phosphorylation by cyclin-dependent kinase 1/cyclin B1 represses its DNA-binding activity during mitosis in cancer cells. *Oncogene* **31**, 4946-59.
- Clambey E.T., McNamee E.N., Westrich J.A., Glover L.E., Campbell E.L., Jedlicka P., de Zoeten E.F., Cambier J.C., Stenmark K.R., Colgan S.P. & Eltzschig H.K. (2012) Hypoxia-inducible factor-1 alpha-dependent induction of FoxP3 drives regulatory T-cell abundance and function during inflammatory hypoxia of the mucosa. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, E2784-93.
- 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-alpha binding and ubiquitylation by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *J Biol Chem* **275**, 25733-41.
- Corzo C.A., Condamine T., Lu L., Cotter M.J., Youn J.I., Cheng P., Cho H.I., Celis E., Quiceno D.G., Padhya T., McCaffrey T.V., McCaffrey J.C. & Gabrilovich D.I. (2010) HIF-1alpha regulates function and differentiation of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment. *J Exp Med* **207**, 2439-53.
- Courey A.J., Holtzman D.A., Jackson S.P. & Tjian R. (1989) Synergistic activation by the glutamine-rich domains of human transcription factor Sp1. *Cell* **59**, 827-36.
- Courey A.J. & Tjian R. (1988) Analysis of Sp1 in vivo reveals multiple transcriptional domains, including a novel glutamine-rich activation motif. *Cell* **55**, 887-98.
- Crenshaw D.G., Yang J., Means A.R. & Kornbluth S. (1998) The mitotic peptidyl-prolyl isomerase, Pin1, interacts with Cdc25 and Plx1. *EMBO J* **17**, 1315-27.
- Cross D.A., Alessi D.R., Cohen P., Andjelkovich M. & Hemmings B.A. (1995) Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* **378**, 785-9.
- Dai D.F. & Rabinovitch P. (2011) Mitochondrial oxidative stress mediates induction of autophagy and hypertrophy in angiotensin-II treated mouse hearts. *Autophagy* **7**, 917-8.
- Dalgard C.L., Lu H., Mohyeldin A. & Verma A. (2004) Endogenous 2-oxoacids differentially regulate expression of oxygen sensors. *Biochem J* **380**, 419-24.
- Dann C.E., 3rd, Bruick R.K. & Deisenhofer J. (2002) Structure of factor-inhibiting hypoxia-inducible factor 1: An asparaginyl hydroxylase involved in the hypoxic response pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 15351-6.
- Daponte A., Ioannou M., Mylonis I., Simos G., Minas M., Messinis I.E. & Koukoulis G. (2008) Prognostic significance of Hypoxia-Inducible Factor 1 alpha(HIF-1 alpha) expression in serous ovarian cancer: an immunohistochemical study. *BMC Cancer* **8**, 335.

- Davie J.R., He S., Li L., Sekhavat A., Espino P., Drobic B., Dunn K.L., Sun J.M., Chen H.Y., Yu J., Pritchard S. & Wang X. (2008) Nuclear organization and chromatin dynamics--Sp1, Sp3 and histone deacetylases. *Adv Enzyme Regul* **48**, 189-208.
- Davies S.P., Reddy H., Caivano M. & Cohen P. (2000) Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J* **351**, 95-105.
- Dayan F., Roux D., Brahimi-Horn M.C., Pouyssegur J. & Mazure N.M. (2006) The oxygen sensor factor-inhibiting hypoxia-inducible factor-1 controls expression of distinct genes through the bifunctional transcriptional character of hypoxia-inducible factor-1alpha. *Cancer Res* **66**, 3688-98.
- De Giusti V.C., Correa M.V., Villa-Abrille M.C., Beltrano C., Yeves A.M., de Cingolani G.E., Cingolani H.E. & Aiello E.A. (2008) The positive inotropic effect of endothelin-1 is mediated by mitochondrial reactive oxygen species. *Life Sci* **83**, 264-71.
- De Giusti V.C., Garciarena C.D. & Aiello E.A. (2009) Role of reactive oxygen species (ROS) in angiotensin II-induced stimulation of the cardiac Na⁺/HCO₃⁻-cotransport. *J Mol Cell Cardiol* **47**, 716-22.
- de Jong L., Albracht S.P. & Kemp A. (1982) Prolyl 4-hydroxylase activity in relation to the oxidation state of enzyme-bound iron. The role of ascorbate in peptidyl proline hydroxylation. *Biochimica et Biophysica Acta* **704**, 326-32.
- Dedkova E.N., Seidlmayer L.K. & Blatter L.A. (2013) Mitochondria-mediated cardioprotection by trimetazidine in rabbit heart failure. *J Mol Cell Cardiol* **59**, 41-54.
- Dengler V.L., Galbraith M.D. & Espinosa J.M. (2014) Transcriptional regulation by hypoxia inducible factors. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **49**, 1-15.
- Dennig J., Hagen G., Beato M. & Suske G. (1995) Members of the Sp transcription factor family control transcription from the uteroglobin promoter. *J Biol Chem* **270**, 12737-44.
- Dery M.A., Michaud M.D. & Richard D.E. (2005) Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators. *Int J Biochem Cell Biol* **37**, 535-40.
- DesJardins E. & Hay N. (1993) Repeated CT elements bound by zinc finger proteins control the absolute and relative activities of the two principal human c-myc promoters. *Mol Cell Biol* **13**, 5710-24.
- Dimova E.Y., Michiels C. & Kietzmann T. (2009) Kinases as upstream regulators of the HIF system: their emerging potential as anti-cancer drug targets. *Curr Pharm Des* **15**, 3867-77.
- Discher D.J., Bishopric N.H., Wu X., Peterson C.A. & Webster K.A. (1998) Hypoxia regulates beta-enolase and pyruvate kinase-M promoters by modulating Sp1/Sp3 binding to a conserved GC element. *J Biol Chem* **273**, 26087-93.
- Doedens A.L., Stockmann C., Rubinstein M.P., Liao D., Zhang N., DeNardo D.G., Coussens L.M., Karin M., Goldrath A.W. & Johnson R.S. (2010) Macrophage expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha suppresses T-cell function and promotes tumor progression. *Cancer Res* **70**, 7465-75.
- Doetzlhofer A., Rotheneder H., Lagger G., Koranda M., Kurtev V., Brosch G., Wintersberger E. & Seiser C. (1999) Histone deacetylase 1 can repress transcription by binding to Sp1. *Mol Cell Biol* **19**, 5504-11.

- Donovan A., Brownlie A., Zhou Y., Shepard J., Pratt S.J., Moynihan J., Paw B.H., Drejer A., Barut B., Zapata A., Law T.C., Brugnara C., Lux S.E., Pinkus G.S., Pinkus J.L., Kingsley P.D., Palis J., Fleming M.D., Andrews N.C. & Zon L.I. (2000) Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature* **403**, 776-81.
- Donovan A., Lima C.A., Pinkus J.L., Pinkus G.S., Zon L.I., Robine S. & Andrews N.C. (2005) The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis. *Cell Metab* **1**, 191-200.
- Doughan A.K., Harrison D.G. & Dikalov S.I. (2008) Molecular mechanisms of angiotensin II-mediated mitochondrial dysfunction: linking mitochondrial oxidative damage and vascular endothelial dysfunction. *Circ Res* **102**, 488-96.
- Drose S. (2013) Differential effects of complex II on mitochondrial ROS production and their relation to cardioprotective pre- and postconditioning. *Biochim Biophys Acta* **1827**, 578-87.
- Drutel G., Kathmann M., Heron A., Schwartz J.C. & Arrang J.M. (1996) Cloning and selective expression in brain and kidney of ARNT2 homologous to the Ah receptor nuclear translocator (ARNT). *Biochem Biophys Res Commun* **225**, 333-9.
- Dufner A. & Thomas G. (1999) Ribosomal S6 kinase signaling and the control of translation. *Exp Cell Res* **253**, 100-9.
- Dynan W.S. & Tjian R. (1983) The promoter-specific transcription factor Sp1 binds to upstream sequences in the SV40 early promoter. *Cell* **35**, 79-87.
- Emili A., Greenblatt J. & Ingles C.J. (1994) Species-specific interaction of the glutamine-rich activation domains of Sp1 with the TATA box-binding protein. *Mol Cell Biol* **14**, 1582-93.
- 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.
- Fandos C., Sanchez-Feutrie M., Santalucia T., Vinals F., Cadefau J., Guma A., Cusso R., Kaliman P., Canicio J., Palacin M. & Zorzano A. (1999) GLUT1 glucose transporter gene transcription is repressed by Sp3. Evidence for a regulatory role of Sp3 during myogenesis. *J Mol Biol* **294**, 103-19.
- Fanghanel J. & Fischer G. (2004) Insights into the catalytic mechanism of peptidyl prolyl cis/trans isomerases. *Front Biosci* **9**, 3453-78.
- Farrell A.S., Pelz C., Wang X., Daniel C.J., Wang Z., Su Y., Janghorban M., Zhang X., Morgan C., Impey S. & Sears R.C. (2013) Pin1 regulates the dynamics of c-Myc DNA binding to facilitate target gene regulation and oncogenesis. *Mol Cell Biol* **33**, 2930-49.
- Feldser D., Agani F., Iyer N.V., Pak B., Ferreira G. & Semenza G.L. (1999) Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha and insulin-like growth factor 2. *Cancer Res* **59**, 3915-8.

- Feng X.H., Lin X. & Derynck R. (2000) Smad2, Smad3 and Smad4 cooperate with Sp1 to induce p15(Ink4B) transcription in response to TGF-beta. *EMBO J* **19**, 5178-93.
- Ferns G.A.A. & Heikal L. (2017) Hypoxia in Atherogenesis. *Angiology* **68**, 472-93.
- Ferrara N. (2004) Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev* **25**, 581-611.
- Ferreira J.V., Fofu H., Bejarano E., Bento C.F., Ramalho J.S., Girao H. & Pereira P. (2013) STUB1/CHIP is required for HIF1A degradation by chaperone-mediated autophagy. *Autophagy* **9**, 1349-66.
- Finger E.C. & Giaccia A.J. (2010) Hypoxia, inflammation, and the tumor microenvironment in metastatic disease. *Cancer Metastasis Rev* **29**, 285-93.
- Flugel D., Gorlach A. & Kietzmann T. (2012) GSK-3beta regulates cell growth, migration, and angiogenesis via Fbw7 and USP28-dependent degradation of HIF-1alpha. *Blood* **119**, 1292-301.
- Flugel D., Gorlach 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**, 3253-65.
- Fojas de Borja P., Collins N.K., Du P., Azizkhan-Clifford J. & Mudryj M. (2001) Cyclin A-CDK phosphorylates Sp1 and enhances Sp1-mediated transcription. *EMBO J* **20**, 5737-47.
- Forsythe J.A., Jiang B.H., Iyer N.V., Agani F., Leung S.W., Koos R.D. & Semenza G.L. (1996) Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* **16**, 4604-13.
- Franciosa G., Diluvio G., Gaudio F.D., Giuli M.V., Palermo R., Grazioli P., Campese A.F., Talora C., Bellavia D., D'Amati G., Besharat Z.M., Nicoletti C., Siebel C.W., Choy L., Rustighi A., Sal G.D., Screpanti I. & Checquolo S. (2016) Prolyl-isomerase Pin1 controls Notch3 protein expression and regulates T-ALL progression. *Oncogene* **35**, 4741-51.
- Franke K., Kalucka J., Mamlouk S., Singh R.P., Muschter A., Weidemann A., Iyengar V., Jahn S., Wiczorek K., Geiger K., Muders M., Sykes A.M., Poitz D.M., Ripich T., Otto T., Bergmann S., Breier G., Baretton G., Fong G.H., Greaves D.R., Bornstein S., Chavakis T., Fandrey J., Gassmann M. & Wielockx B. (2013) HIF-1alpha is a protective factor in conditional PHD2-deficient mice suffering from severe HIF-2alpha-induced excessive erythropoiesis. *Blood* **121**, 1436-45.
- Freiman R.N. & Tjian R. (2002) Neurodegeneration. A glutamine-rich trail leads to transcription factors. *Science* **296**, 2149-50.
- Fujimori F., Takahashi K., Uchida C. & Uchida T. (1999) Mice lacking Pin1 develop normally, but are defective in entering cell cycle from G(0) arrest. *Biochem Biophys Res Commun* **265**, 658-63.
- Fukuda R., Hirota K., Fan F., Jung Y.D., Ellis L.M. & Semenza G.L. (2002) Insulin-like growth factor 1 induces hypoxia-inducible factor 1-mediated vascular endothelial growth factor expression, which is dependent on MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling in colon cancer cells. *J Biol Chem* **277**, 38205-11.

- Galban S., Kuwano Y., Pullmann R., Jr., Martindale J.L., Kim H.H., Lal A., Abdelmohsen K., Yang X., Dang Y., Liu J.O., Lewis S.M., Holcik M. & Gorospe M. (2008) RNA-binding proteins HuR and PTB promote the translation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Mol Cell Biol* **28**, 93-107.
- Galbraith M.D., Allen M.A., Bensard C.L., Wang X., Schwinn M.K., Qin B., Long H.W., Daniels D.L., Hahn W.C., Dowell R.D. & Espinosa J.M. (2013) HIF1A employs CDK8-mediator to stimulate RNAPII elongation in response to hypoxia. *Cell* **153**, 1327-39.
- Gartel A.L., Goufman E., Najmabadi F. & Tyner A.L. (2000) Sp1 and Sp3 activate p21 (WAF1/CIP1) gene transcription in the Caco-2 colon adenocarcinoma cell line. *Oncogene* **19**, 5182-8.
- Genini D., Adachi S., Chao Q., Rose D.W., Carrera C.J., Cottam H.B., Carson D.A. & Leoni L.M. (2000) Deoxyadenosine analogs induce programmed cell death in chronic lymphocytic leukemia cells by damaging the DNA and by directly affecting the mitochondria. *Blood* **96**, 3537-43.
- Gerald D., Berra E., Frapart Y.M., Chan D.A., Giaccia A.J., Mansuy D., Pouyssegur J., Yaniv M. & Mechta-Grigoriou F. (2004) JunD reduces tumor angiogenesis by protecting cells from oxidative stress. *Cell* **118**, 781-94.
- Gill G., Pascal E., Tseng Z.H. & Tjian R. (1994) A glutamine-rich hydrophobic patch in transcription factor Sp1 contacts the dTAFII110 component of the Drosophila TFIID complex and mediates transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 192-6.
- Gollner H., Bouwman P., Mangold M., Karis A., Braun H., Rohner I., Del Rey A., Besedovsky H.O., Meinhardt A., van den Broek M., Cutforth T., Grosveld F., Philipsen S. & Suske G. (2001a) Complex phenotype of mice homozygous for a null mutation in the Sp4 transcription factor gene. *Genes Cells* **6**, 689-97.
- Gollner H., Dani C., Phillips B., Philipsen S. & Suske G. (2001b) Impaired ossification in mice lacking the transcription factor Sp3. *Mech Dev* **106**, 77-83.
- Gordeuk V.R., Stockton D.W. & Prchal J.T. (2005) Congenital polycythemia/erythrocytoses. *Haematologica* **90**, 109-16.
- 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**, 23508-14.
- Greer S.N., Metcalf J.L., Wang Y. & Ohh M. (2012) The updated biology of hypoxia-inducible factor. *EMBO J* **31**, 2448-60.
- Gunaratnam L. & Bonventre J.V. (2009) HIF in kidney disease and development. *J Am Soc Nephrol* **20**, 1877-87.
- Habelhah H., Laine A., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Gershwin M.E., Bowtell D.D. & Ronai Z. (2004) Regulation of 2-oxoglutarate (alpha-ketoglutarate) dehydrogenase stability by the RING finger ubiquitin ligase Siah. *J Biol Chem* **279**, 53782-8.
- Hagen G., Muller S., Beato M. & Suske G. (1992) Cloning by recognition site screening of two novel GT box binding proteins: a family of Sp1 related genes. *Nucleic Acids Res* **20**, 5519-25.

- Hagen G., Muller S., Beato M. & Suske G. (1994) Sp1-mediated transcriptional activation is repressed by Sp3. *EMBO J* **13**, 3843-51.
- Halestrap A.P. (1999) The mitochondrial permeability transition: its molecular mechanism and role in reperfusion injury. *Biochem Soc Symp* **66**, 181-203.
- Han H.J., Kwon N., Choi M.A., Jung K.O., Piao J.Y., Ngo H.K., Kim S.J., Kim D.H., Chung J.K., Cha Y.N., Youn H., Choi B.Y., Min S.H. & Surh Y.J. (2016) Peptidyl Prolyl Isomerase PIN1 Directly Binds to and Stabilizes Hypoxia-Inducible Factor-1alpha. *PLoS One* **11**, e0147038.
- Han I. & Kudlow J.E. (1997) Reduced O glycosylation of Sp1 is associated with increased proteasome susceptibility. *Mol Cell Biol* **17**, 2550-8.
- Han J.W., Ahn S.H., Kim Y.K., Bae G.U., Yoon J.W., Hong S., Lee H.Y., Lee Y.W. & Lee H.W. (2001) Activation of p21(WAF1/Cip1) transcription through Sp1 sites by histone deacetylase inhibitor apicidin: involvement of protein kinase C. *J Biol Chem* **276**, 42084-90.
- Hanks S.K., Quinn A.M. & Hunter T. (1988) The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* **241**, 42-52.
- Hanna I.R., Taniyama Y., Szocs K., Rocic P. & Griendling K.K. (2002) NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species as mediators of angiotensin II signaling. *Antioxid Redox Signal* **4**, 899-914.
- Hara S., Hamada J., Kobayashi C., Kondo Y. & Imura N. (2001) Expression and characterization of hypoxia-inducible factor (HIF)-3alpha in human kidney: suppression of HIF-mediated gene expression by HIF-3alpha. *Biochem Biophys Res Commun* **287**, 808-13.
- Harrison S.M., Houzelstein D., Dunwoodie S.L. & Beddington R.S. (2000) Sp5, a new member of the Sp1 family, is dynamically expressed during development and genetically interacts with Brachyury. *Dev Biol* **227**, 358-72.
- Hata Y., Duh E., Zhang K., Robinson G.S. & Aiello L.P. (1998) Transcription factors Sp1 and Sp3 alter vascular endothelial growth factor receptor expression through a novel recognition sequence. *J Biol Chem* **273**, 19294-303.
- He S. & Davie J.R. (2006) Sp1 and Sp3 foci distribution throughout mitosis. *J Cell Sci* **119**, 1063-70.
- Hedrick E., Cheng Y., Jin U.H., Kim K. & Safe S. (2016) Specificity protein (Sp) transcription factors Sp1, Sp3 and Sp4 are non-oncogene addiction genes in cancer cells. *Oncotarget* **7**, 22245-56.
- Heeneman S., Sluimer J.C. & Daemen M.J. (2007) Angiotensin-converting enzyme and vascular remodeling. *Circ Res* **101**, 441-54.
- Hellmuth S., Rata S., Brown A., Heidmann S., Novak B. & Stemmann O. (2015) Human chromosome segregation involves multi-layered regulation of separase by the peptidyl-prolyl-isomerase Pin1. *Mol Cell* **58**, 495-506.
- Hewitson K.S., Lienard B.M., McDonough M.A., Clifton I.J., Butler D., Soares A.S., Oldham N.J., McNeill L.A. & Schofield C.J. (2007) Structural and mechanistic studies on the inhibition of the hypoxia-inducible transcription factor hydroxylases by tricarboxylic acid cycle intermediates. *J Biol Chem* **282**, 3293-301.

- Hickey M.M., Lam J.C., Bezman N.A., Rathmell W.K. & Simon M.C. (2007) von Hippel-Lindau mutation in mice recapitulates Chuvash polycythemia via hypoxia-inducible factor-2alpha signaling and splenic erythropoiesis. *J Clin Invest* **117**, 3879-89.
- Hickey M.M., Richardson T., Wang T., Mosqueira M., Arguiri E., Yu H., Yu Q.C., Solomides C.C., Morrissey E.E., Khurana T.S., Christofidou-Solomidou M. & Simon M.C. (2010) The von Hippel-Lindau Chuvash mutation promotes pulmonary hypertension and fibrosis in mice. *J Clin Invest* **120**, 827-39.
- Higgins K.J., Liu S., Abdelrahim M., Yoon K., Vanderlaag K., Porter W., Metz R.P. & Safe S. (2006) Vascular endothelial growth factor receptor-2 expression is induced by 17beta-estradiol in ZR-75 breast cancer cells by estrogen receptor alpha/Sp proteins. *Endocrinology* **147**, 3285-95.
- Hilton B.A., Li Z., Musich P.R., Wang H., Cartwright B.M., Serrano M., Zhou X.Z., Lu K.P. & Zou Y. (2015) ATR Plays a Direct Antiapoptotic Role at Mitochondria, which Is Regulated by Prolyl Isomerase Pin1. *Mol Cell* **60**, 35-46.
- Hirose K., Morita M., Ema M., Mimura J., Hamada H., Fujii H., Saijo Y., Gotoh O., Sogawa K. & Fujii-Kuriyama Y. (1996) cDNA cloning and tissue-specific expression of a novel basic helix-loop-helix/PAS factor (Arnt2) with close sequence similarity to the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (Arnt). *Mol Cell Biol* **16**, 1706-13.
- Hirsila M., Koivunen P., Gunzler V., Kivirikko K.I. & Myllyharju J. (2003) Characterization of the human prolyl 4-hydroxylases that modify the hypoxia-inducible factor. *J Biol Chem* **278**, 30772-80.
- Hofer T., Desbaillets I., Hopfl G., Gassmann M. & Wenger R.H. (2001) Dissecting hypoxia-dependent and hypoxia-independent steps in the HIF-1alpha activation cascade: implications for HIF-1alpha gene therapy. *FASEB J* **15**, 2715-7.
- Hoffman E.C., Reyes H., Chu F.F., Sander F., Conley L.H., Brooks B.A. & Hankinson O. (1991) Cloning of a factor required for activity of the Ah (dioxin) receptor. *Science* **252**, 954-8.
- Hsu T.I., Wang M.C., Chen S.Y., Yeh Y.M., Su W.C., Chang W.C. & Hung J.J. (2012) Sp1 expression regulates lung tumor progression. *Oncogene* **31**, 3973-88.
- Hu C.J., Sataur A., Wang L., Chen H. & Simon M.C. (2007) The N-terminal transactivation domain confers target gene specificity of hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha. *Mol Biol Cell* **18**, 4528-42.
- Hu Y.Y., Fu L.A., Li S.Z., Chen Y., Li J.C., Han J., Liang L., Li L., Ji C.C., Zheng M.H. & Han H. (2014) Hif-1alpha and Hif-2alpha differentially regulate Notch signaling through competitive interaction with the intracellular domain of Notch receptors in glioma stem cells. *Cancer Lett* **349**, 67-76.
- Huang L.E., Gu J., Schau M. & Bunn H.F. (1998) Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O2-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 7987-92.
- Huang Y., Hickey R.P., Yeh J.L., Liu D., Dadak A., Young L.H., Johnson R.S. & Giordano F.J. (2004) Cardiac myocyte-specific HIF-1alpha deletion alters vascularization, energy availability, calcium flux, and contractility in the normoxic heart. *FASEB J* **18**, 1138-40.

- Hubbi M.E., Hu H., Kshitiz, Gilkes D.M. & Semenza G.L. (2013) Sirtuin-7 inhibits the activity of hypoxia-inducible factors. *J Biol Chem* **288**, 20768-75.
- Hubbi M.E., Luo W., Baek J.H. & Semenza G.L. (2011) MCM proteins are negative regulators of hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell* **42**, 700-12.
- Hung W.C., Tseng W.L., Shiea J. & Chang H.C. (2010) Skp2 overexpression increases the expression of MMP-2 and MMP-9 and invasion of lung cancer cells. *Cancer Lett* **288**, 156-61.
- Hur E., Chang K.Y., Lee E., Lee S.K. & 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**, 1216-24.
- Idelevich A., Rais Y. & Monsonego-Ornan E. (2011) Bone Gla protein increases HIF-1alpha-dependent glucose metabolism and induces cartilage and vascular calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **31**, e55-71.
- Iliopoulos O., Ohh M. & Kaelin W.G., Jr. (1998) pVHL19 is a biologically active product of the von Hippel-Lindau gene arising from internal translation initiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 11661-6.
- Imanishi M., Tomita S., Ishizawa K., Kihira Y., Ueno M., Izawa-Ishizawa Y., Ikeda Y., Yamano N., Tsuchiya K. & Tamaki T. (2014) Smooth muscle cell-specific Hif-1alpha deficiency suppresses angiotensin II-induced vascular remodeling in mice. *Cardiovasc Res* **102**, 460-8.
- Infantino V., Convertini P., Iacobazzi F., Pisano I., Scarcia P. & Iacobazzi V. (2011) Identification of a novel Sp1 splice variant as a strong transcriptional activator. *Biochem Biophys Res Commun* **412**, 86-91.
- Isaacs J.S., Jung Y.J., Mole D.R., Lee S., Torres-Cabala C., Chung Y.L., Merino M., Trepel J., Zbar B., Toro J., Ratcliffe P.J., Linehan W.M. & Neckers L. (2005) HIF overexpression correlates with biallelic loss of fumarate hydratase in renal cancer: novel role of fumarate in regulation of HIF stability. *Cancer Cell* **8**, 143-53.
- Ishibashi H., Nakagawa K., Onimaru M., Castellanos E.J., Kaneda Y., Nakashima Y., Shirasuna K. & Sueishi K. (2000) Sp1 decoy transfected to carcinoma cells suppresses the expression of vascular endothelial growth factor, transforming growth factor beta1, and tissue factor and also cell growth and invasion activities. *Cancer Res* **60**, 6531-6.
- Ishida M., Ishida T., Thomas S.M. & Berk B.C. (1998) Activation of extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2) by angiotensin II is dependent on c-Src in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* **82**, 7-12.
- Ishida T., Ishida M., Suero J., Takahashi M. & Berk B.C. (1999) Agonist-stimulated cytoskeletal reorganization and signal transduction at focal adhesions in vascular smooth muscle cells require c-Src. *J Clin Invest* **103**, 789-97.
- Ito T., Azumano M., Uwatoko C., Itoh K. & Kuwahara J. (2009) Role of zinc finger structure in nuclear localization of transcription factor Sp1. *Biochem Biophys Res Commun* **380**, 28-32.
- Ito T., Kitamura H., Uwatoko C., Azumano M., Itoh K. & Kuwahara J. (2010) Interaction of Sp1 zinc finger with transport factor in the nuclear localization of transcription factor Sp1. *Biochem Biophys Res Commun* **403**, 161-6.

- Ivan M., Kondo K., Yang H., Kim W., Valiando J., Ohh M., Salic A., Asara J.M., Lane W.S. & Kaelin W.G., Jr. (2001) HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science* **292**, 464-8.
- Iyer N.V., Kotch L.E., Agani F., Leung S.W., Laughner E., Wenger R.H., Gassmann M., Gearhart J.D., Lawler A.M., Yu A.Y. & Semenza G.L. (1998a) Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 α . *Genes Dev* **12**, 149-62.
- Iyer N.V., Leung S.W. & Semenza G.L. (1998b) The human hypoxia-inducible factor 1 α gene: HIF1A structure and evolutionary conservation. *Genomics* **52**, 159-65.
- Jaakkola P., Mole D.R., Tian Y.M., Wilson M.I., Gielbert J., Gaskell S.J., von Kriegsheim A., Hestreit 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.
- Jalouli M., Dery M.A., Lafleur V.N., Lamalice L., Zhou X.Z., Lu K.P. & Richard D.E. (2014) The prolyl isomerase Pin1 regulates hypoxia-inducible transcription factor (HIF) activity. *Cell Signal* **26**, 1649-56.
- Jia G., Stormont R.M., Gangahar D.M. & Agrawal D.K. (2012) Role of matrix Gla protein in angiotensin II-induced exacerbation of vascular calcification. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **303**, H523-32.
- Jiang B.H., Rue E., Wang G.L., Roe R. & Semenza G.L. (1996) Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* **271**, 17771-8.
- Jiang B.H., Zheng J.Z., Leung S.W., Roe R. & Semenza G.L. (1997) Transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor 1 α . Modulation of transcriptional activity by oxygen tension. *J Biol Chem* **272**, 19253-60.
- Jiang N.Y., Woda B.A., Banner B.F., Whalen G.F., Dresser K.A. & Lu D. (2008) Sp1, a new biomarker that identifies a subset of aggressive pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **17**, 1648-52.
- Juan-Babot J.O., Martinez-Gonzalez J., Berrozpe M. & Badimon L. (2003) [Neovascularization in human coronary arteries with lesions of different severity]. *Rev Esp Cardiol* **56**, 978-86.
- Jungert K., Buck A., Buchholz M., Wagner M., Adler G., Gress T.M. & Ellenrieder V. (2006) Smad-Sp1 complexes mediate TGF β -induced early transcription of oncogenic Smad7 in pancreatic cancer cells. *Carcinogenesis* **27**, 2392-401.
- Kaczynski J., Cook T. & Urrutia R. (2003) Sp1- and Kruppel-like transcription factors. *Genome Biol* **4**, 206.
- Kadonaga J.T., Carner K.R., Masiarz F.R. & Tjian R. (1987) Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain. *Cell* **51**, 1079-90.
- Kadonaga J.T. & Tjian R. (1986) Affinity purification of sequence-specific DNA binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 5889-93.
- Kaelin W.G. (2007) Von Hippel-Lindau disease. *Annu Rev Pathol* **2**, 145-73.

- Kaelin W.G., Jr. (2008) The von Hippel-Lindau tumour suppressor protein: O₂ sensing and cancer. *Nat Rev Cancer* **8**, 865-73.
- Kaelin W.G., Jr. & Ratcliffe P.J. (2008) Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol Cell* **30**, 393-402.
- Kallio P.J., Okamoto K., O'Brien S., Carrero P., Makino Y., Tanaka H. & Poellinger L. (1998) Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1alpha. *EMBO J* **17**, 6573-86.
- Kalluri R. (2003) Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer* **3**, 422-33.
- Kamura T., Sato S., Iwai K., Czyzyk-Krzeska M., Conaway R.C. & Conaway J.W. (2000) Activation of HIF1alpha ubiquitination by a reconstituted von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 10430-5.
- Kasisvisvanathan V., Shalhoub J., Lim C.S., Shepherd A.C., Thapar A. & Davies A.H. (2011) Hypoxia-inducible factor-1 in arterial disease: a putative therapeutic target. *Curr Vasc Pharmacol* **9**, 333-49.
- Kavurma M.M. & Khachigian L.M. (2003) Sp1 inhibits proliferation and induces apoptosis in vascular smooth muscle cells by repressing p21WAF1/Cip1 transcription and cyclin D1-Cdk4-p21WAF1/Cip1 complex formation. *J Biol Chem* **278**, 32537-43.
- Kavurma M.M., Santiago F.S., Bonfoco E. & Khachigian L.M. (2001) Sp1 phosphorylation regulates apoptosis via extracellular FasL-Fas engagement. *J Biol Chem* **276**, 4964-71.
- Kelly D.J., Cox A.J., Gow R.M., Zhang Y., Kemp B.E. & Gilbert R.E. (2004) Platelet-derived growth factor receptor transactivation mediates the trophic effects of angiotensin II in vivo. *Hypertension* **44**, 195-202.
- Kembro J.M., Cortassa S. & Aon M.A. (2014) Complex oscillatory redox dynamics with signaling potential at the edge between normal and pathological mitochondrial function. *Front Physiol* **5**, 257.
- Kennett S.B., Moorefield K.S. & Horowitz J.M. (2002) Sp3 represses gene expression via the titration of promoter-specific transcription factors. *J Biol Chem* **277**, 9780-9.
- Khanal P., Yun H.J., Lim S.C., Ahn S.G., Yoon H.E., Kang K.W., Hong R. & Choi H.S. (2012) Proyl isomerase Pin1 facilitates ubiquitin-mediated degradation of cyclin-dependent kinase 10 to induce tamoxifen resistance in breast cancer cells. *Oncogene* **31**, 3845-56.
- Kietzmann T., Mennerich D. & Dimova E.Y. (2016) Hypoxia-Inducible Factors (HIFs) and Phosphorylation: Impact on Stability, Localization, and Transactivity. *Front Cell Dev Biol* **4**, 11.
- Kim J.A., Kim M.R., Kim O., Phuong N.T., Yun J., Oh W.K., Bae K. & Kang K.W. (2012) Amurensin G inhibits angiogenesis and tumor growth of tamoxifen-resistant breast cancer via Pin1 inhibition. *Food Chem Toxicol* **50**, 3625-34.
- Kim M.R., Choi H.S., Heo T.H., Hwang S.W. & Kang K.W. (2008) Induction of vascular endothelial growth factor by peptidyl-prolyl isomerase Pin1 in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* **369**, 547-53.

- Kim M.R., Choi H.S., Yang J.W., Park B.C., Kim J.A. & Kang K.W. (2009) Enhancement of vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis in tamoxifen-resistant breast cancer cells: role of Pin1 overexpression. *Mol Cancer Ther* **8**, 2163-71.
- Kim S.E., Lee M.Y., Lim S.C., Hien T.T., Kim J.W., Ahn S.G., Yoon J.H., Kim S.K., Choi H.S. & Kang K.W. (2010) Role of Pin1 in neointima formation: down-regulation of Nrf2-dependent heme oxygenase-1 expression by Pin1. *Free Radic Biol Med* **48**, 1644-53.
- Kim S.Y. & Park J.W. (2010) Modulation of hypoxia-inducible factor-1alpha expression by mitochondrial NADP+-dependent isocitrate dehydrogenase. *Biochimie* **92**, 1908-13.
- Kimura S., Zhang G.X., Nishiyama A., Shokoji T., Yao L., Fan Y.Y., Rahman M. & Abe Y. (2005a) Mitochondria-derived reactive oxygen species and vascular MAP kinases: comparison of angiotensin II and diazoxide. *Hypertension* **45**, 438-44.
- Kimura S., Zhang G.X., Nishiyama A., Shokoji T., Yao L., Fan Y.Y., Rahman M., Suzuki T., Maeta H. & Abe Y. (2005b) Role of NAD(P)H oxidase- and mitochondria-derived reactive oxygen species in cardioprotection of ischemic reperfusion injury by angiotensin II. *Hypertension* **45**, 860-6.
- Klein P.J., Schmidt C.M., Wiesenauer C.A., Choi J.N., Gage E.A., Yip-Schneider M.T., Wiebke E.A., Wang Y., Omer C. & Sebolt-Leopold J.S. (2006) The effects of a novel MEK inhibitor PD184161 on MEK-ERK signaling and growth in human liver cancer. *Neoplasia* **8**, 1-8.
- Koellensperger E., Gramley F., Preisner F., Leimer U., Germann G. & Dexheimer V. (2014) Alterations of gene expression and protein synthesis in co-cultured adipose tissue-derived stem cells and squamous cell-carcinoma cells: consequences for clinical applications. *Stem Cell Res Ther* **5**, 65.
- Koh M.Y., Darnay B.G. & 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**, 7081-95.
- Koivunen K., Sintonen H. & Lukkarinen H. (2007) Properties of the 15D and the Nottingham Health Profile questionnaires in patients with lower limb atherosclerotic disease. *Int J Technol Assess Health Care* **23**, 385-91.
- Koivunen P., Hirsila M., Gunzler V., Kivirikko K.I. & Myllyharju J. (2004) Catalytic properties of the asparaginyl hydroxylase (FIH) in the oxygen sensing pathway are distinct from those of its prolyl 4-hydroxylases. *J Biol Chem* **279**, 9899-904.
- Kollmar R., Sukow K.A., Sponagle S.K. & Farnham P.J. (1994) Start site selection at the TATA-less carbamoyl-phosphate synthase (glutamine-hydrolyzing)/aspartate carbamoyltransferase/dihydroorotase promoter. *J Biol Chem* **269**, 2252-7.
- Komar A.A., Mazumder B. & Merrick W.C. (2012) A new framework for understanding IRES-mediated translation. *Gene* **502**, 75-86.
- Kondo A., Shahpasand K., Mannix R., Qiu J., Moncaster J., Chen C.H., Yao Y., Lin Y.M., Driver J.A., Sun Y., Wei S., Luo M.L., Albayram O., Huang P., Rotenberg A., Ryo A., Goldstein L.E., Pascual-Leone A., McKee A.C., Meehan W., Zhou X.Z. & Lu K.P. (2015) Antibody against early driver of neurodegeneration cis P-tau blocks brain injury and tauopathy. *Nature* **523**, 431-6.

- Kong L.M., Liao C.G., Fei F., Guo X., Xing J.L. & Chen Z.N. (2010) Transcription factor Sp1 regulates expression of cancer-associated molecule CD147 in human lung cancer. *Cancer Sci* **101**, 1463-70.
- Kong L.M., Liao C.G., Zhang Y., Xu J., Li Y., Huang W., Bian H. & Chen Z.N. (2014) A regulatory loop involving miR-22, Sp1, and c-Myc modulates CD147 expression in breast cancer invasion and metastasis. *Cancer Res* **74**, 3764-78.
- Koop E.A., Lopes S.M., Feiken E., Bluysen H.A., van der Valk M., Voest E.E., Mummery C.L., Moolenaar W.H. & Gebbink M.F. (2003) Receptor protein tyrosine phosphatase mu expression as a marker for endothelial cell heterogeneity; analysis of RPTPmu gene expression using LacZ knock-in mice. *Int J Dev Biol* **47**, 345-54.
- Koshikawa N., Hayashi J., Nakagawara A. & Takenaga K. (2009) Reactive oxygen species-generating mitochondrial DNA mutation up-regulates hypoxia-inducible factor-1alpha gene transcription via phosphatidylinositol 3-kinase-Akt/protein kinase C/histone deacetylase pathway. *J Biol Chem* **284**, 33185-94.
- Krishnan J., Ahuja P., Bodenmann S., Knapik D., Perriard E., Krek W. & Perriard J.C. (2008) Essential role of developmentally activated hypoxia-inducible factor 1alpha for cardiac morphogenesis and function. *Circ Res* **103**, 1139-46.
- Kriwacki R.W., Schultz S.C., Steitz T.A. & Caradonna J.P. (1992) Sequence-specific recognition of DNA by zinc-finger peptides derived from the transcription factor Sp1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 9759-63.
- Kuboki S., Sakai N., Clarke C., Schuster R., Blanchard J., Edwards M.J. & Lentsch A.B. (2009) The peptidyl-prolyl isomerase, Pin1, facilitates NF-kappaB binding in hepatocytes and protects against hepatic ischemia/reperfusion injury. *J Hepatol* **51**, 296-306.
- Kudova J., Prochazkova J., Vasicek O., Perecko T., Sedlackova M., Pesl M., Pachernik J. & Kubala L. (2016) HIF-1alpha Deficiency Attenuates the Cardiomyogenesis of Mouse Embryonic Stem Cells. *PLoS One* **11**, e0158358.
- Labrousse-Arias D., Castillo-Gonzalez R., Rogers N.M., Torres-Capelli M., Barreira B., Aragonés J., Cogolludo A., Isenberg J.S. & Calzada M.J. (2016) HIF-2alpha-mediated induction of pulmonary thrombospondin-1 contributes to hypoxia-driven vascular remodelling and vasoconstriction. *Cardiovasc Res* **109**, 115-30.
- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.
- Lafleur V.N., Richard S. & Richard D.E. (2014) Transcriptional repression of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) by the protein arginine methyltransferase PRMT1. *Mol Biol Cell* **25**, 925-35.
- Lagger G., Doetzelhofer A., Schuettengruber B., Haidweger E., Simboeck E., Tischler J., Chiocca S., Suske G., Rotheneder H., Wintersberger E. & Seiser C. (2003) The tumor suppressor p53 and histone deacetylase 1 are antagonistic regulators of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21/WAF1/CIP1 gene. *Mol Cell Biol* **23**, 2669-79.
- Laitala A., Aro E., Walkinshaw G., Maki J.M., Rossi M., Heikkila M., Savolainen E.R., Arend M., Kivirikko K.I., Koivunen P. & Myllyharju J. (2012) Transmembrane

- prolyl 4-hydroxylase is a fourth prolyl 4-hydroxylase regulating EPO production and erythropoiesis. *Blood* **120**, 3336-44.
- Lambert C.M., Roy M., Robitaille G.A., Richard D.E. & Bonnet S. (2010) HIF-1 inhibition decreases systemic vascular remodeling diseases by promoting apoptosis through a hexokinase 2-dependent mechanism. *Cardiovasc Res* **88**, 196-204.
- Lancaster D.E., McNeill L.A., McDonough M.A., Aplin R.T., Hewitson K.S., Pugh C.W., Ratcliffe P.J. & Schofield C.J. (2004) Disruption of dimerization and substrate phosphorylation inhibit factor inhibiting hypoxia-inducible factor (FIH) activity. *Biochem J* **383**, 429-37.
- Lang K.J., Kappel A. & Goodall G.J. (2002) Hypoxia-inducible factor-1 α mRNA contains an internal ribosome entry site that allows efficient translation during normoxia and hypoxia. *Mol Biol Cell* **13**, 1792-801.
- Lauzier M.C., Page E.L., Michaud M.D. & Richard D.E. (2007) Differential regulation of hypoxia-inducible factor-1 through receptor tyrosine kinase transactivation in vascular smooth muscle cells. *Endocrinology* **148**, 4023-31.
- Lauzier M.C., Robitaille G.A., Chan D.A., Giaccia A.J. & Richard D.E. (2008) (2R)-[(4-Biphenyl)sulfonyl]amino]-N-hydroxy-3-phenylpropionamide (BiPS), a matrix metalloprotease inhibitor, is a novel and potent activator of hypoxia-inducible factors. *Mol Pharmacol* **74**, 282-8.
- Lee C., Kim S.J., Jeong D.G., Lee S.M. & Ryu S.E. (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**, 7558-63.
- Lee E., Yim S., Lee S.K. & Park H. (2002) Two transactivation domains of hypoxia-inducible factor-1 α regulated by the MEK-1/p42/p44 MAPK pathway. *Mol Cells* **14**, 9-15.
- Lee H.M., Kim H.J., Park H.J., Won K.J., Kim J., Shin H.S., Park P.J., Lee K.Y., Park S.H., Lee C.K. & Kim B. (2007) Spleen tyrosine kinase participates in Src-mediated migration and proliferation by PDGF-BB in rat aortic smooth muscle cells. *Arch Pharm Res* **30**, 761-9.
- Lee H.S., Park C.K., Oh E., Erkin O.C., Jung H.S., Cho M.H., Kwon M.J., Chae S.W., Kim S.H., Wang L.H., Park M.J., Lee S.Y., Yang H.B., Jia L., Choi Y.L. & Shin Y.K. (2013a) Low SP1 expression differentially affects intestinal-type compared with diffuse-type gastric adenocarcinoma. *PLoS One* **8**, e55522.
- Lee J.A., Suh D.C., Kang J.E., Kim M.H., Park H., Lee M.N., Kim J.M., Jeon B.N., Roh H.E., Yu M.Y., Choi K.Y., Kim K.Y. & Hur M.W. (2005) Transcriptional activity of Sp1 is regulated by molecular interactions between the zinc finger DNA binding domain and the inhibitory domain with corepressors, and this interaction is modulated by MEK. *J Biol Chem* **280**, 28061-71.
- Lee J.S., Galvin K.M. & Shi Y. (1993) Evidence for physical interaction between the zinc-finger transcription factors YY1 and Sp1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 6145-9.
- Lee J.S., Kim Y., Bhin J., Shin H.J., Nam H.J., Lee S.H., Yoon J.B., Binda O., Gozani O., Hwang D. & Baek S.H. (2011a) Hypoxia-induced methylation of a pontin chromatin remodeling factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 13510-5.

- Lee K.H., Lin F.C., Hsu T.I., Lin J.T., Guo J.H., Tsai C.H., Lee Y.C., Chen C.L., Hsiao M. & Lu P.J. (2014a) MicroRNA-296-5p (miR-296-5p) functions as a tumor suppressor in prostate cancer by directly targeting Pin1. *Biochim Biophys Acta* **1843**, 2055-66.
- Lee P.J., Jiang B.H., Chin B.Y., Iyer N.V., Alam J., Semenza G.L. & Choi A.M. (1997) Hypoxia-inducible factor-1 mediates transcriptional activation of the heme oxygenase-1 gene in response to hypoxia. *J Biol Chem* **272**, 5375-81.
- Lee S.H., Bae S.C., Kim K.W. & Lee Y.M. (2014b) RUNX3 inhibits hypoxia-inducible factor-1alpha protein stability by interacting with prolyl hydroxylases in gastric cancer cells. *Oncogene* **33**, 1458-67.
- Lee S.H., Jeong H.M., Han Y., Cheong H., Kang B.Y. & Lee K.Y. (2015) Prolyl isomerase Pin1 regulates the osteogenic activity of Osterix. *Mol Cell Endocrinol* **400**, 32-40.
- Lee T.H., Chen C.H., Suizu F., Huang P., Schiene-Fischer C., Daum S., Zhang Y.J., Goate A., Chen R.H., Zhou X.Z. & Lu K.P. (2011b) Death-associated protein kinase 1 phosphorylates Pin1 and inhibits its prolyl isomerase activity and cellular function. *Mol Cell* **42**, 147-59.
- Lee Y.C., Que J., Chen Y.C., Lin J.T., Liou Y.C., Liao P.C., Liu Y.P., Lee K.H., Lin L.C., Hsiao M., Hung L.Y., Huang C.Y. & Lu P.J. (2013b) Pin1 acts as a negative regulator of the G2/M transition by interacting with the Aurora-A-Bora complex. *J Cell Sci* **126**, 4862-72.
- Legros L., Bourcier C., Jacquel A., Mahon F.X., Cassuto J.P., Auberger P. & Pages G. (2004) Imatinib mesylate (STI571) decreases the vascular endothelial growth factor plasma concentration in patients with chronic myeloid leukemia. *Blood* **104**, 495-501.
- Lendahl U., Lee K.L., Yang H. & Poellinger L. (2009) Generating specificity and diversity in the transcriptional response to hypoxia. *Nat Rev Genet* **10**, 821-32.
- Li B., Adams C.C. & Workman J.L. (1994) Nucleosome binding by the constitutive transcription factor Sp1. *J Biol Chem* **269**, 7756-63.
- Li C., Chang D.L., Yang Z., Qi J., Liu R., He H., Li D. & Xiao Z.X. (2013) Pin1 modulates p63alpha protein stability in regulation of cell survival, proliferation and tumor formation. *Cell Death Dis* **4**, e943.
- Li G., Lu W.H., Ai R., Yang J.H., Chen F. & Tang Z.Z. (2014) The relationship between serum hypoxia-inducible factor 1alpha and coronary artery calcification in asymptomatic type 2 diabetic patients. *Cardiovasc Diabetol* **13**, 52.
- Li L. & Davie J.R. (2010) The role of Sp1 and Sp3 in normal and cancer cell biology. *Ann Anat* **192**, 275-83.
- Li L., He S., Sun J.M. & Davie J.R. (2004) Gene regulation by Sp1 and Sp3. *Biochem Cell Biol* **82**, 460-71.
- Li X., Tanaka K., Nakatani F., Matsunobu T., Sakimura R., Hanada M., Okada T., Nakamura T. & Iwamoto Y. (2005) Transactivation of cyclin E gene by EWS-Fli1 and antitumor effects of cyclin dependent kinase inhibitor on Ewing's family tumor cells. *Int J Cancer* **116**, 385-94.

- Lim C.S., Kiriakidis S., Sandison A., Paleolog E.M. & Davies A.H. (2013) Hypoxia-inducible factor pathway and diseases of the vascular wall. *J Vasc Surg* **58**, 219-30.
- Liou Y.C., Ryo A., Huang H.K., Lu P.J., Bronson R., Fujimori F., Uchida T., Hunter T. & Lu K.P. (2002) Loss of Pin1 function in the mouse causes phenotypes resembling cyclin D1-null phenotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 1335-40.
- Liou Y.C., Zhou X.Z. & Lu K.P. (2011) Prolyl isomerase Pin1 as a molecular switch to determine the fate of phosphoproteins. *Trends Biochem Sci* **36**, 501-14.
- Lisy K. & Peet D.J. (2008) Turn me on: regulating HIF transcriptional activity. *Cell Death Differ* **15**, 642-9.
- Liu D., Lei L., Desir M., Huang Y., Cleman J., Jiang W., Fernandez-Hernando C., Di Lorenzo A., Sessa W.C. & Giordano F.J. (2016) Smooth Muscle Hypoxia-Inducible Factor 1alpha Links Intravascular Pressure and Atherosclerosis--Brief Report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **36**, 442-5.
- Liu W., Youn H.D., Zhou X.Z., Lu K.P. & Liu J.O. (2001) Binding and regulation of the transcription factor NFAT by the peptidyl prolyl cis-trans isomerase Pin1. *FEBS Lett* **496**, 105-8.
- Liu Y.V., Baek J.H., Zhang H., Diez R., Cole R.N. & Semenza G.L. (2007) 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**, 207-17.
- Lok C.N. & Ponka P. (1999) Identification of a hypoxia response element in the transferrin receptor gene. *J Biol Chem* **274**, 24147-52.
- Lonati E., Brambilla A., Milani C., Masserini M., Palestini P. & Bulbarelli A. (2014) Pin1, a new player in the fate of HIF-1alpha degradation: an hypothetical mechanism inside vascular damage as Alzheimer's disease risk factor. *Front Cell Neurosci* **8**, 1-11.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. & Randall R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**, 265-75.
- Lu F., Zhou J., Wiedmer A., Madden K., Yuan Y. & Lieberman P.M. (2003) Chromatin remodeling of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ORF50 promoter correlates with reactivation from latency. *J Virol* **77**, 11425-35.
- Lu J., Lee W., Jiang C. & Keller E.B. (1994) Start site selection by Sp1 in the TATA-less human Ha-ras promoter. *J Biol Chem* **269**, 5391-402.
- Lu K.P., Finn G., Lee T.H. & Nicholson L.K. (2007) Prolyl cis-trans isomerization as a molecular timer. *Nat Chem Biol* **3**, 619-29.
- Lu K.P., Hanes S.D. & Hunter T. (1996) A human peptidyl-prolyl isomerase essential for regulation of mitosis. *Nature* **380**, 544-7.
- Lu K.P. & Zhou X.Z. (2007) The prolyl isomerase PIN1: a pivotal new twist in phosphorylation signalling and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 904-16.
- Lu P.J., Zhou X.Z., Liou Y.C., Noel J.P. & Lu K.P. (2002) Critical role of WW domain phosphorylation in regulating phosphoserine binding activity and Pin1 function. *J Biol Chem* **277**, 2381-4.
- Lu P.J., Zhou X.Z., Shen M. & Lu K.P. (1999) Function of WW domains as phosphoserine- or phosphothreonine-binding modules. *Science* **283**, 1325-8.

- Lu X. & Kang Y. (2010) Hypoxia and hypoxia-inducible factors: master regulators of metastasis. *Clin Cancer Res* **16**, 5928-35.
- Lufei C., Koh T.H., Uchida T. & Cao X. (2007) Pin1 is required for the Ser727 phosphorylation-dependent Stat3 activity. *Oncogene* **26**, 7656-64.
- Luo M.L., Gong C., Chen C.H., Lee D.Y., Hu H., Huang P., Yao Y., Guo W., Reinhardt F., Wulf G., Lieberman J., Zhou X.Z., Song E. & Lu K.P. (2014) Prolyl isomerase Pin1 acts downstream of miR200c to promote cancer stem-like cell traits in breast cancer. *Cancer Res* **74**, 3603-16.
- Luo R., Zhang W., Zhao C., Zhang Y., Wu H., Jin J., Grenz A., Eltzschig H.K., Tao L., Kellems R.E. & Xia Y. (2015) Elevated Endothelial Hypoxia-Inducible Factor-1alpha Contributes to Glomerular Injury and Promotes Hypertensive Chronic Kidney Disease. *Hypertension* **66**, 75-84.
- Luo W., Zhong J., Chang R., Hu H., Pandey A. & Semenza G.L. (2010) Hsp70 and CHIP selectively mediate ubiquitination and degradation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha but Not HIF-2alpha. *J Biol Chem* **285**, 3651-63.
- Lv L., Zhang J., Zhang L., Xue G., Wang P., Meng Q. & Liang W. (2013) Essential role of Pin1 via STAT3 signalling and mitochondria-dependent pathways in restenosis in type 2 diabetes. *J Cell Mol Med* **17**, 989-1005.
- MacKenzie E.D., Selak M.A., Tennant D.A., Payne L.J., Crosby S., Frederiksen C.M., Watson D.G. & Gottlieb E. (2007) Cell-permeating alpha-ketoglutarate derivatives alleviate pseudohypoxia in succinate dehydrogenase-deficient cells. *Mol Cell Biol* **27**, 3282-9.
- MacLachlan T.K., Somasundaram K., Sgagias M., Shifman Y., Muschel R.J., Cowan K.H. & El-Deiry W.S. (2000) BRCA1 effects on the cell cycle and the DNA damage response are linked to altered gene expression. *J Biol Chem* **275**, 2777-85.
- Mahon P.C., Hirota K. & Semenza G.L. (2001) FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1alpha and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes Dev* **15**, 2675-86.
- Majamaa K., Gunzler V., Hanauske-Abel H.M., Myllyla R. & Kivirikko K.I. (1986) Partial identity of the 2-oxoglutarate and ascorbate binding sites of prolyl 4-hydroxylase. *J Biol Chem* **261**, 7819-23.
- Majello B., De Luca P., Suske G. & Lania L. (1995) Differential transcriptional regulation of c-myc promoter through the same DNA binding sites targeted by Sp1-like proteins. *Oncogene* **10**, 1841-8.
- Manalo D.J., Rowan A., Lavoie T., Natarajan L., Kelly B.D., Ye S.Q., Garcia J.G. & Semenza G.L. (2005) Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Blood* **105**, 659-69.
- Mantovani F., Zannini A., Rustighi A. & Del Sal G. (2015) Interaction of p53 with prolyl isomerases: Healthy and unhealthy relationships. *Biochim Biophys Acta* **1850**, 2048-60.
- Marampon F., Casimiro M.C., Fu M., Powell M.J., Popov V.M., Lindsay J., Zani B.M., Ciccarelli C., Watanabe G., Lee R.J. & Pestell R.G. (2008) Nerve Growth factor regulation of cyclin D1 in PC12 cells through a p21RAS extracellular signal-

- regulated kinase pathway requires cooperative interactions between Sp1 and nuclear factor-kappaB. *Mol Biol Cell* **19**, 2566-78.
- Marin M., Karis A., Visser P., Grosveld F. & Philipsen S. (1997) Transcription factor Sp1 is essential for early embryonic development but dispensable for cell growth and differentiation. *Cell* **89**, 619-28.
- Marshall S.J., Senis Y.A., Auger J.M., Feil R., Hofmann F., Salmon G., Peterson J.T., Burslem F. & Watson S.P. (2004) GPIIb-dependent platelet activation is dependent on Src kinases but not MAP kinase or cGMP-dependent kinase. *Blood* **103**, 2601-9.
- Marsolier J., Perichon M., DeBarry J.D., Villoutreix B.O., Chluba J., Lopez T., Garrido C., Zhou X.Z., Lu K.P., Fritsch L., Ait-Si-Ali S., Mhadhbi M., Medjkane S. & Weitzman J.B. (2015) Theileria parasites secrete a prolyl isomerase to maintain host leukocyte transformation. *Nature* **520**, 378-82.
- Masoud G.N. & Li W. (2015) HIF-1alpha pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharm Sin B* **5**, 378-89.
- Mastrangelo I.A., Courey A.J., Wall J.S., Jackson S.P. & Hough P.V. (1991) DNA looping and Sp1 multimer links: a mechanism for transcriptional synergism and enhancement. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 5670-4.
- Maurer G.D., Leupold J.H., Schewe D.M., Biller T., Kates R.E., Hornung H.M., Lau-Werner U., Post S. & Allgayer H. (2007) Analysis of specific transcriptional regulators as early predictors of independent prognostic relevance in resected colorectal cancer. *Clin Cancer Res* **13**, 1123-32.
- Maxwell P. & Salnikow K. (2004) HIF-1: an oxygen and metal responsive transcription factor. *Cancer Biol Ther* **3**, 29-35.
- Maxwell P.H., Ferguson D.J., Nicholls L.G., Johnson M.H. & Ratcliffe P.J. (1997) The interstitial response to renal injury: fibroblast-like cells show phenotypic changes and have reduced potential for erythropoietin gene expression. *Kidney Int* **52**, 715-24.
- Maxwell P.H., Osmond M.K., Pugh C.W., Heryet A., Nicholls L.G., Tan C.C., Doe B.G., Ferguson D.J., Johnson M.H. & Ratcliffe P.J. (1993) Identification of the renal erythropoietin-producing cells using transgenic mice. *Kidney Int* **44**, 1149-62.
- Maxwell P.H., Wiesener M.S., Chang G.W., Clifford S.C., Vaux E.C., Cockman M.E., Wykoff C.C., Pugh C.W., Maher E.R. & Ratcliffe P.J. (1999) The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* **399**, 271-5.
- Mayfield J.E., Fan S., Wei S., Zhang M., Li B., Ellington A.D., Etzkorn F.A. & Zhang Y.J. (2015) Chemical Tools To Decipher Regulation of Phosphatases by Proline Isomerization on Eukaryotic RNA Polymerase II. *ACS Chem Biol* **10**, 2405-14.
- McDonough M.A., Li V., Flashman E., Chowdhury R., Mohr C., Lienard B.M., Zondlo J., Oldham N.J., Clifton I.J., Lewis J., McNeill L.A., Kurzeja R.J., Hewitson K.S., Yang E., Jordan S., Syed R.S. & Schofield C.J. (2006) Cellular oxygen sensing: Crystal structure of hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase (PHD2). *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 9814-9.
- McGovern S.L. & Shoichet B.K. (2003) Kinase inhibitors: not just for kinases anymore. *J Med Chem* **46**, 1478-83.

- McIntosh B.E., Hogenesch J.B. & Bradfield C.A. (2010) Mammalian Per-Arnt-Sim proteins in environmental adaptation. *Annu Rev Physiol* **72**, 625-45.
- McNeill L.A., Hewitson K.S., Claridge T.D., Seibel J.F., Horsfall L.E. & Schofield C.J. (2002) Hypoxia-inducible factor asparaginyl hydroxylase (FIH-1) catalyses hydroxylation at the beta-carbon of asparagine-803. *Biochem J* **367**, 571-5.
- Metzen E., Berchner-Pfannschmidt U., Stengel P., Marxsen J.H., Stolze I., Klinger M., Huang W.Q., Wotzlaw C., Hellwig-Burgel T., Jelkmann W., Acker H. & Fandrey J. (2003) Intracellular localisation of human HIF-1 alpha hydroxylases: implications for oxygen sensing. *J Cell Sci* **116**, 1319-26.
- Michaud M.D., Robitaille G.A., Gratton J.P. & Richard D.E. (2009) Sphingosine-1-phosphate: a novel nonhypoxic activator of hypoxia-inducible factor-1 in vascular cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **29**, 902-8.
- Milanini-Mongiati J., Pouyssegur J. & Pages G. (2002) Identification of two Sp1 phosphorylation sites for p42/p44 mitogen-activated protein kinases: their implication in vascular endothelial growth factor gene transcription. *J Biol Chem* **277**, 20631-9.
- Minamishima Y.A., Moslehi J., Bardeesy N., Cullen D., Bronson R.T. & Kaelin W.G., Jr. (2008) Somatic inactivation of the PHD2 prolyl hydroxylase causes polycythemia and congestive heart failure. *Blood* **111**, 3236-44.
- Minet E., Arnould T., Michel G., Roland I., Mottet D., Raes M., Remacle J. & Michiels C. (2000) ERK activation upon hypoxia: involvement in HIF-1 activation. *FEBS Lett* **468**, 53-8.
- Minet E., Ernest I., Michel G., Roland I., Remacle J., Raes M. & Michiels C. (1999) HIF1A gene transcription is dependent on a core promoter sequence encompassing activating and inhibiting sequences located upstream from the transcription initiation site and cis elements located within the 5'UTR. *Biochem Biophys Res Commun* **261**, 534-40.
- 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**, 847-55.
- Mokas S., Lariviere R., Lamalice L., Gobeil S., Cornfield D.N., Agharazii M. & Richard D.E. (2016) Hypoxia-inducible factor-1 plays a role in phosphate-induced vascular smooth muscle cell calcification. *Kidney Int* **90**, 598-609.
- Mole D.R., Blancher C., Copley R.R., Pollard P.J., Gleadle J.M., Ragoussis J. & Ratcliffe P.J. (2009) Genome-wide association of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha DNA binding with expression profiling of hypoxia-inducible transcripts. *J Biol Chem* **284**, 16767-75.
- Montagner M., Enzo E., Forcato M., Zanconato F., Parenti A., Rampazzo E., Basso G., Leo G., Rosato A., Biccato S., Cordenonsi M. & Piccolo S. (2012) SHARP1 suppresses breast cancer metastasis by promoting degradation of hypoxia-inducible factors. *Nature* **487**, 380-4.
- Montezano A.C., Nguyen Dinh Cat A., Rios F.J. & Touyz R.M. (2014) Angiotensin II and vascular injury. *Curr Hypertens Rep* **16**, 431.

- Moon E.J., Jeong C.H., Jeong J.W., Kim K.R., Yu D.Y., Murakami S., Kim C.W. & Kim K.W. (2004) Hepatitis B virus X protein induces angiogenesis by stabilizing hypoxia-inducible factor-1alpha. *FASEB J* **18**, 382-4.
- Moorefield K.S., Yin H., Nichols T.D., Cathcart C., Simmons S.O. & Horowitz J.M. (2006) Sp2 localizes to subnuclear foci associated with the nuclear matrix. *Mol Biol Cell* **17**, 1711-22.
- Moretto-Zita M., Jin H., Shen Z., Zhao T., Briggs S.P. & Xu Y. (2010) Phosphorylation stabilizes Nanog by promoting its interaction with Pin1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 13312-7.
- Mottet D., Ruys S.P., Demazy C., Raes M. & Michiels C. (2005) Role for casein kinase 2 in the regulation of HIF-1 activity. *Int J Cancer* **117**, 764-74.
- Munoz-Najar U.M., Neurath K.M., Vumbaca F. & Claffey K.P. (2006) Hypoxia stimulates breast carcinoma cell invasion through MT1-MMP and MMP-2 activation. *Oncogene* **25**, 2379-92.
- Murphy M.P. (2009) How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* **417**, 1-13.
- 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**, 27620-7.
- Mylonis I., Chachami G., Samiotaki M., Panayotou G., Paraskeva E., Kalousi A., Georgatsou E., Bonanou S. & Simos G. (2006) Identification of MAPK phosphorylation sites and their role in the localization and activity of hypoxia-inducible factor-1alpha. *J Biol Chem* **281**, 33095-106.
- Nakajima M., Hutchinson H.G., Fujinaga M., Hayashida W., Morishita R., Zhang L., Horiuchi M., Pratt R.E. & Dzau V.J. (1995) The angiotensin II type 2 (AT2) receptor antagonizes the growth effects of the AT1 receptor: gain-of-function study using gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 10663-7.
- Nakamura K., Greenwood A., Binder L., Bigio E.H., Denial S., Nicholson L., Zhou X.Z. & Lu K.P. (2012) Proline isomer-specific antibodies reveal the early pathogenic tau conformation in Alzheimer's disease. *Cell* **149**, 232-44.
- Nakashima K., Zhou X., Kunkel G., Zhang Z., Deng J.M., Behringer R.R. & de Crombrughe B. (2002) The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* **108**, 17-29.
- Nakatsu Y., Iwashita M., Sakoda H., Ono H., Nagata K., Matsunaga Y., Fukushima T., Fujishiro M., Kushiyama A., Kamata H., Takahashi S., Katagiri H., Honda H., Kiyonari H., Uchida T. & Asano T. (2015) Prolyl isomerase Pin1 negatively regulates AMP-activated protein kinase (AMPK) by associating with the CBS domain in the gamma subunit. *J Biol Chem* **290**, 24255-66.
- Nakatsu Y., Matsunaga Y., Yamamotoya T., Ueda K., Inoue Y., Mori K., Sakoda H., Fujishiro M., Ono H., Kushiyama A. & Asano T. (2016) Physiological and Pathogenic Roles of Prolyl Isomerase Pin1 in Metabolic Regulations via Multiple Signal Transduction Pathway Modulations. *Int J Mol Sci* **17**.
- Nakatsu Y., Sakoda H., Kushiyama A., Ono H., Fujishiro M., Horike N., Yoneda M., Ohno H., Tsuchiya Y., Kamata H., Tahara H., Isobe T., Nishimura F., Katagiri H.,

- Oka Y., Fukushima T., Takahashi S., Kurihara H., Uchida T. & Asano T. (2010) Pin1 associates with and induces translocation of CRTCL2 to the cytosol, thereby suppressing cAMP-responsive element transcriptional activity. *J Biol Chem* **285**, 33018-27.
- Nakatsu Y., Sakoda H., Kushiya A., Zhang J., Ono H., Fujishiro M., Kikuchi T., Fukushima T., Yoneda M., Ohno H., Horike N., Kanna M., Tsuchiya Y., Kamata H., Nishimura F., Isobe T., Ogihara T., Katagiri H., Oka Y., Takahashi S., Kurihara H., Uchida T. & Asano T. (2011) Peptidyl-prolyl cis/trans isomerase NIMA-interacting 1 associates with insulin receptor substrate-1 and enhances insulin actions and adipogenesis. *J Biol Chem* **286**, 20812-22.
- Nakayama K., Frew I.J., Hagensen M., Skals M., Habelhah H., Bhoumik A., Kadoya T., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Frappell P.B., Bowtell D.D. & Ronai Z. (2004) Siah2 regulates stability of prolyl-hydroxylases, controls HIF1alpha abundance, and modulates physiological responses to hypoxia. *Cell* **117**, 941-52.
- Nangaku M. & Eckardt K.U. (2007) Hypoxia and the HIF system in kidney disease. *J Mol Med (Berl)* **85**, 1325-30.
- Ng K.M., Lee Y.K., Chan Y.C., Lai W.H., Fung M.L., Li R.A., Siu C.W. & Tse H.F. (2010) Exogenous expression of HIF-1 alpha promotes cardiac differentiation of embryonic stem cells. *J Mol Cell Cardiol* **48**, 1129-37.
- Nicolas G., Bennoun M., Devaux I., Beaumont C., Grandchamp B., Kahn A. & Vaulont S. (2001a) Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 8780-5.
- Nicolas G., Bennoun M., Porteu A., Mativet S., Beaumont C., Grandchamp B., Sirito M., Sawadogo M., Kahn A. & Vaulont S. (2002) Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 4596-601.
- Nicolas M., Noe V., Jensen K.B. & Ciudad C.J. (2001b) Cloning and characterization of the 5'-flanking region of the human transcription factor Sp1 gene. *J Biol Chem* **276**, 22126-32.
- Nishi M., Akutsu H., Masui S., Kondo A., Nagashima Y., Kimura H., Perrem K., Shigeri Y., Toyoda M., Okayama A., Hirano H., Umezawa A., Yamamoto N., Lee S.W. & Ryo A. (2011) A distinct role for Pin1 in the induction and maintenance of pluripotency. *J Biol Chem* **286**, 11593-603.
- O'Rourke J.F., Tian Y.M., Ratcliffe P.J. & Pugh C.W. (1999) Oxygen-regulated and transactivating domains in endothelial PAS protein 1: comparison with hypoxia-inducible factor-1alpha. *J Biol Chem* **274**, 2060-71.
- Obama T., Takayanagi T., Kobayashi T., Bourne A.M., Elliott K.J., Charbonneau M., Dubois C.M. & Eguchi S. (2015) Vascular induction of a disintegrin and metalloprotease 17 by angiotensin II through hypoxia inducible factor 1alpha. *Am J Hypertens* **28**, 10-4.
- Oh S.J., Kim O., Lee J.S., Kim J.A., Kim M.R., Choi H.S., Shim J.H., Kang K.W. & Kim Y.C. (2010) Inhibition of angiogenesis by quercetin in tamoxifen-resistant breast cancer cells. *Food Chem Toxicol* **48**, 3227-34.

- Olofsson B.A., Kelly C.M., Kim J., Hornsby S.M. & Azizkhan-Clifford J. (2007) Phosphorylation of Sp1 in response to DNA damage by ataxia telangiectasia-mutated kinase. *Mol Cancer Res* **5**, 1319-30.
- Ou X.M., Chen K. & Shih J.C. (2004) Dual functions of transcription factors, transforming growth factor-beta-inducible early gene (TIEG)2 and Sp3, are mediated by CACCC element and Sp1 sites of human monoamine oxidase (MAO) B gene. *J Biol Chem* **279**, 21021-8.
- Owens G.K. (1989) Control of hypertrophic versus hyperplastic growth of vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* **257**, H1755-65.
- Owens G.K., Loeb A., Gordon D. & Thompson M.M. (1986) Expression of smooth muscle-specific alpha-isoactin in cultured vascular smooth muscle cells: relationship between growth and cytodifferentiation. *J Cell Biol* **102**, 343-52.
- Page E.L., Chan D.A., Giaccia A.J., Levine M. & Richard D.E. (2008) Hypoxia-inducible factor-1alpha stabilization in nonhypoxic conditions: role of oxidation and intracellular ascorbate depletion. *Mol Biol Cell* **19**, 86-94.
- Page E.L., Robitaille G.A., Pouyssegur J. & Richard D.E. (2002) Induction of hypoxia-inducible factor-1alpha by transcriptional and translational mechanisms. *J Biol Chem* **277**, 48403-9.
- Pages G. (2007) Sp3-mediated VEGF regulation is dependent on phosphorylation by extra-cellular signals regulated kinases (Erk). *J Cell Physiol* **213**, 454-63.
- Pagliuca A., Cannada-Bartoli P. & Lania L. (1998) A role for Sp and helix-loop-helix transcription factors in the regulation of the human Id4 gene promoter activity. *J Biol Chem* **273**, 7668-74.
- Palazon A., Aragonés J., Morales-Kastresana A., de Landazuri M.O. & Melero I. (2012) Molecular pathways: hypoxia response in immune cells fighting or promoting cancer. *Clin Cancer Res* **18**, 1207-13.
- Pang R., Lee T.K., Poon R.T., Fan S.T., Wong K.B., Kwong Y.L. & Tse E. (2007) Pin1 interacts with a specific serine-proline motif of hepatitis B virus X-protein to enhance hepatocarcinogenesis. *Gastroenterology* **132**, 1088-103.
- Pang R.W., Lee T.K., Man K., Poon R.T., Fan S.T., Kwong Y.L. & Tse E. (2006) PIN1 expression contributes to hepatic carcinogenesis. *J Pathol* **210**, 19-25.
- Parathath S., Yang Y., Mick S. & Fisher E.A. (2013) Hypoxia in murine atherosclerotic plaques and its adverse effects on macrophages. *Trends Cardiovasc Med* **23**, 80-4.
- Pascal E. & Tjian R. (1991) Different activation domains of Sp1 govern formation of multimers and mediate transcriptional synergism. *Genes Dev* **5**, 1646-56.
- Pastorino L., Sun A., Lu P.J., Zhou X.Z., Balastik M., Finn G., Wulf G., Lim J., Li S.H., Li X., Xia W., Nicholson L.K. & Lu K.P. (2006) The prolyl isomerase Pin1 regulates amyloid precursor protein processing and amyloid-beta production. *Nature* **440**, 528-34.
- Patten D.A., Lafleur V.N., Robitaille G.A., Chan D.A., Giaccia A.J. & Richard D.E. (2010) Hypoxia-inducible factor-1 activation in nonhypoxic conditions: the essential role of mitochondrial-derived reactive oxygen species. *Mol Biol Cell* **21**, 3247-57.

- Percy M.J., Furlow P.W., Beer P.A., Lappin T.R., McMullin M.F. & Lee F.S. (2007) A novel erythrocytosis-associated PHD2 mutation suggests the location of a HIF binding groove. *Blood* **110**, 2193-6.
- Percy M.J., Zhao Q., Flores A., Harrison C., Lappin T.R., Maxwell P.H., McMullin M.F. & Lee F.S. (2006) A family with erythrocytosis establishes a role for prolyl hydroxylase domain protein 2 in oxygen homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 654-9.
- Pfaffl M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**, e45.
- Phelan M.W., Forman L.W., Perrine S.P. & Faller D.V. (1998) Hypoxia increases thrombospondin-1 transcript and protein in cultured endothelial cells. *J Lab Clin Med* **132**, 519-29.
- Ploquin M., Petukhova G.V., Morneau D., Dery U., Bransi A., Stasiak A., Camerini-Otero R.D. & Masson J.Y. (2007) Stimulation of fission yeast and mouse Hop2-Mnd1 of the Dmc1 and Rad51 recombinases. *Nucleic Acids Res* **35**, 2719-33.
- Potente M., Gerhardt H. & Carmeliet P. (2011) Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell* **146**, 873-87.
- Pratt R.E. & Dzau V. (1993) Molecular and cellular biology of the angiotensin-mediated growth of the cardiovascular system. In: *Cellular and Molecular Biology of the Renin-Angiotensin System* (eds. by Raizada MK, Phillips MI & Sumners C), pp. 471-83. CRC Press Inc, Boca Raton
- Pugh B.F. & Tjian R. (1990) Mechanism of transcriptional activation by Sp1: evidence for coactivators. *Cell* **61**, 1187-97.
- Pugh C.W., O'Rourke J.F., Nagao M., Gleadle J.M. & Ratcliffe P.J. (1997) Activation of hypoxia-inducible factor-1; definition of regulatory domains within the alpha subunit. *J Biol Chem* **272**, 11205-14.
- Qing G. & Simon M.C. (2009) Hypoxia inducible factor-2alpha: a critical mediator of aggressive tumor phenotypes. *Curr Opin Genet Dev* **19**, 60-6.
- Queval G. & Noctor G. (2007) A plate reader method for the measurement of NAD, NADP, glutathione, and ascorbate in tissue extracts: Application to redox profiling during Arabidopsis rosette development. *Anal Biochem* **363**, 58-69.
- Raines E.W. (2004) PDGF and cardiovascular disease. *Cytokine Growth Factor Rev* **15**, 237-54.
- Rajbhandari P., Finn G., Solodin N.M., Singarapu K.K., Sahu S.C., Markley J.L., Kadunc K.J., Ellison-Zelski S.J., Kariagina A., Haslam S.Z., Lu K.P. & Alarid E.T. (2012) Regulation of estrogen receptor alpha N-terminus conformation and function by peptidyl prolyl isomerase Pin1. *Mol Cell Biol* **32**, 445-57.
- Rajbhandari P., Ozers M.S., Solodin N.M., Warren C.L. & Alarid E.T. (2015) Peptidylprolyl Isomerase Pin1 Directly Enhances the DNA Binding Functions of Estrogen Receptor alpha. *J Biol Chem* **290**, 13749-62.
- Raman M., Chen W. & Cobb M.H. (2007) Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene* **26**, 3100-12.
- Rao J., Zhang F., Donnelly R.J., Spector N.L. & Studzinski G.P. (1998) Truncation of Sp1 transcription factor by myeloblastin in undifferentiated HL60 cells. *J Cell Physiol* **175**, 121-8.

- Raught B., Gingras A.C. & Sonenberg N. (2001) The target of rapamycin (TOR) proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 7037-44.
- Rey S. & Semenza G.L. (2010) Hypoxia-inducible factor-1-dependent mechanisms of vascularization and vascular remodelling. *Cardiovasc Res* **86**, 236-42.
- Richard D.E., 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**, 32631-7.
- Richard D.E., Berra E. & Pouyssegur J. (2000) Nonhypoxic pathway mediates the induction of hypoxia-inducible factor 1alpha in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* **275**, 26765-71.
- Rickers A., Peters N., Badock V., Beyaert R., Vandenabeele P., Dorken B. & Bommert K. (1999) Cleavage of transcription factor SP1 by caspases during anti-IgM-induced B-cell apoptosis. *Eur J Biochem* **261**, 269-74.
- Riedel K., Riedel F., Goessler U.R., Germann G. & Sauerbier M. (2007) Tgf-beta antisense therapy increases angiogenic potential in human keratinocytes in vitro. *Arch Med Res* **38**, 45-51.
- Rizzolio F., Lucchetti C., Caligiuri I., Marchesi I., Caputo M., Klein-Szanto A.J., Bagella L., Castronovo M. & Giordano A. (2012) Retinoblastoma tumor-suppressor protein phosphorylation and inactivation depend on direct interaction with Pin1. *Cell Death Differ* **19**, 1152-61.
- Rosenberger C., Mandriota S., Jurgensen J.S., Wiesener M.S., Horstrup J.H., Frei U., Ratcliffe P.J., Maxwell P.H., Bachmann S. & Eckardt K.U. (2002) Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha and -2alpha in hypoxic and ischemic rat kidneys. *J Am Soc Nephrol* **13**, 1721-32.
- Rothem L., Aronheim A. & Assaraf Y.G. (2003) Alterations in the expression of transcription factors and the reduced folate carrier as a novel mechanism of antifolate resistance in human leukemia cells. *J Biol Chem* **278**, 8935-41.
- Rudijanto A. (2007) The role of vascular smooth muscle cells on the pathogenesis of atherosclerosis. *Acta Med Indones* **39**, 86-93.
- Rustighi A., Tiberi L., Soldano A., Napoli M., Nuciforo P., Rosato A., Kaplan F., Capobianco A., Pece S., Di Fiore P.P. & Del Sal G. (2009) The prolyl-isomerase Pin1 is a Notch1 target that enhances Notch1 activation in cancer. *Nat Cell Biol* **11**, 133-42.
- Rustighi A., Zannini A., Tiberi L., Sommaggio R., Piazza S., Sorrentino G., Nuzzo S., Tuscano A., Eterno V., Benvenuti F., Santarpia L., Aifantis I., Rosato A., Biciato S., Zambelli A. & Del Sal G. (2014) Prolyl-isomerase Pin1 controls normal and cancer stem cells of the breast. *EMBO Mol Med* **6**, 99-119.
- Ryan H.E., Lo J. & Johnson R.S. (1998) HIF-1 alpha is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *EMBO J* **17**, 3005-15.
- Ryo A., Liou Y.C., Wulf G., Nakamura M., Lee S.W. & Lu K.P. (2002) PIN1 is an E2F target gene essential for Neu/Ras-induced transformation of mammary epithelial cells. *Mol Cell Biol* **22**, 5281-95.

- Ryo A., Nakamura M., Wulf G., Liou Y.C. & Lu K.P. (2001) Pin1 regulates turnover and subcellular localization of beta-catenin by inhibiting its interaction with APC. *Nat Cell Biol* **3**, 793-801.
- Ryo A., Suizu F., Yoshida Y., Perrem K., Liou Y.C., Wulf G., Rottapel R., Yamaoka S. & Lu K.P. (2003) Regulation of NF-kappaB signaling by Pin1-dependent prolyl isomerization and ubiquitin-mediated proteolysis of p65/RelA. *Mol Cell* **12**, 1413-26.
- Ryo A., Uemura H., Ishiguro H., Saitoh T., Yamaguchi A., Perrem K., Kubota Y., Lu K.P. & Aoki I. (2005) Stable suppression of tumorigenicity by Pin1-targeted RNA interference in prostate cancer. *Clin Cancer Res* **11**, 7523-31.
- Safe S. & Abdelrahim M. (2005) Sp transcription factor family and its role in cancer. *Eur J Cancer* **41**, 2438-48.
- Saffer J.D., Jackson S.P. & Annarella M.B. (1991) Developmental expression of Sp1 in the mouse. *Mol Cell Biol* **11**, 2189-99.
- Salnikow K., Donald S.P., Bruick R.K., Zhitkovich A., Phang J.M. & Kasprzak K.S. (2004) Depletion of intracellular ascorbate by the carcinogenic metals nickel and cobalt results in the induction of hypoxic stress. *J Biol Chem* **279**, 40337-44.
- Santamaria G., Martinez-Diez M., Fabregat I. & Cuezva J.M. (2006) Efficient execution of cell death in non-glycolytic cells requires the generation of ROS controlled by the activity of mitochondrial H⁺-ATP synthase. *Carcinogenesis* **27**, 925-35.
- Santos C.R. & Schulze A. (2012) Lipid metabolism in cancer. *FEBS J* **279**, 2610-23.
- Sapetschnig A., Koch F., Rischitor G., Mennenga T. & Suske G. (2004) Complexity of translationally controlled transcription factor Sp3 isoform expression. *J Biol Chem* **279**, 42095-105.
- Schelling P., Fischer H. & Ganten D. (1991) Angiotensin and cell growth: a link to cardiovascular hypertrophy? *J Hypertens* **9**, 3-15.
- Schepens B., Tinton S.A., Bruynooghe Y., Beyaert R. & Cornelis S. (2005) The polypyrimidine tract-binding protein stimulates HIF-1alpha IRES-mediated translation during hypoxia. *Nucleic Acids Res* **33**, 6884-94.
- Schneider M., Van Geyte K., Fraisl P., Kiss J., Aragonés J., Mazzone M., Mairbaurl H., De Bock K., Jeoung N.H., Mollenhauer M., Georgiadou M., Bishop T., Roncal C., Sutherland A., Jordan B., Gallez B., Weitz J., Harris R.A., Maxwell P., Baes M., Ratcliffe P. & Carmeliet P. (2010) Loss or silencing of the PHD1 prolyl hydroxylase protects livers of mice against ischemia/reperfusion injury. *Gastroenterology* **138**, 1143-54 e1-2.
- Schnitzer S.E., Schmid T., Zhou J., Eisenbrand G. & Brune B. (2005) Inhibition of GSK3beta by indirubins restores HIF-1alpha accumulation under prolonged periods of hypoxia/anoxia. *FEBS Lett* **579**, 529-33.
- Schodel J., Oikonomopoulos S., Ragoussis J., Pugh C.W., Ratcliffe P.J. & Mole D.R. (2011) High-resolution genome-wide mapping of HIF-binding sites by ChIP-seq. *Blood* **117**, e207-17.
- Schofield C.J. & Ratcliffe P.J. (2004) Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 343-54.
- Schofield C.J. & Ratcliffe P.J. (2005) Signalling hypoxia by HIF hydroxylases. *Biochem Biophys Res Commun* **338**, 617-26.

- Schuermann A., Helker C.S. & Herzog W. (2014) Angiogenesis in zebrafish. *Semin Cell Dev Biol* **31**, 106-14.
- Scortegagna M., Ding K., Oktay Y., Gaur A., Thurmond F., Yan L.J., Marck B.T., Matsumoto A.M., Shelton J.M., Richardson J.A., Bennett M.J. & Garcia J.A. (2003) Multiple organ pathology, metabolic abnormalities and impaired homeostasis of reactive oxygen species in *Epas1*^{-/-} mice. *Nat Genet* **35**, 331-40.
- Selak M.A., Armour S.M., MacKenzie E.D., Boulahbel H., Watson D.G., Mansfield K.D., Pan Y., Simon M.C., Thompson C.B. & Gottlieb E. (2005) Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF- α prolyl hydroxylase. *Cancer Cell* **7**, 77-85.
- Semenza G.L. (2003) Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **3**, 721-32.
- Semenza G.L. (2010a) Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene* **29**, 625-34.
- Semenza G.L. (2010b) HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. *Curr Opin Genet Dev* **20**, 51-6.
- Semenza G.L. (2012) Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy. *Trends Pharmacol Sci* **33**, 207-14.
- Semenza G.L., Nejfelt M.K., Chi S.M. & Antonarakis S.E. (1991) Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 5680-4.
- Semenza G.L. & Wang G.L. (1992) A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* **12**, 5447-54.
- Shan F., Li J. & Huang Q.Y. (2014) HIF-1 α -induced up-regulation of miR-9 contributes to phenotypic modulation in pulmonary artery smooth muscle cells during hypoxia. *J Cell Physiol* **229**, 1511-20.
- Shen M., Stukenberg P.T., Kirschner M.W. & Lu K.P. (1998) The essential mitotic peptidyl-prolyl isomerase Pin1 binds and regulates mitosis-specific phosphoproteins. *Genes Dev* **12**, 706-20.
- Shimba S., Ishii N., Ohta Y., Ohno T., Watabe Y., Hayashi M., Wada T., Aoyagi T. & Tezuka M. (2005) Brain and muscle Arnt-like protein-1 (BMAL1), a component of the molecular clock, regulates adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 12071-6.
- Shimoda L.A. & Laurie S.S. (2014) HIF and pulmonary vascular responses to hypoxia. *J Appl Physiol (1985)* **116**, 867-74.
- Shimoda L.A., Manalo D.J., Sham J.S., Semenza G.L. & Sylvester J.T. (2001) Partial HIF-1 α deficiency impairs pulmonary arterial myocyte electrophysiological responses to hypoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **281**, L202-8.
- Siragy H.M. & Carey R.M. (2001) Angiotensin type 2 receptors: potential importance in the regulation of blood pressure. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **10**, 99-103.
- Sjottem E., Anderssen S. & Johansen T. (1996) The promoter activity of long terminal repeats of the HERV-H family of human retrovirus-like elements is critically dependent on Sp1 family proteins interacting with a GC/GT box located immediately 3' to the TATA box. *J Virol* **70**, 188-98.

- Skulachev V.P., Anisimov V.N., Antonenko Y.N., Bakeeva L.E., Chernyak B.V., Elichev V.P., Filenko O.F., Kalinina N.I., Kapelko V.I., Kolosova N.G., Kopnin B.P., Korshunova G.A., Lichinitser M.R., Obukhova L.A., Pasyukova E.G., Pisarenko O.I., Roginsky V.A., Ruge E.K., Senin, II, Severina, II, Skulachev M.V., Spivak I.M., Tashlitsky V.N., Tkachuk V.A., Vyssokikh M.Y., Yaguzhinsky L.S. & Zorov D.B. (2009) An attempt to prevent senescence: a mitochondrial approach. *Biochim Biophys Acta* **1787**, 437-61.
- Skuli N., Majmundar A.J., Krock B.L., Mesquita R.C., Mathew L.K., Quinn Z.L., Runge A., Liu L., Kim M.N., Liang J., Schenkel S., Yodh A.G., Keith B. & Simon M.C. (2012) Endothelial HIF-2alpha regulates murine pathological angiogenesis and revascularization processes. *J Clin Invest* **122**, 1427-43.
- Smith T.G., Brooks J.T., Balanos G.M., Lappin T.R., Layton D.M., Leedham D.L., Liu C., Maxwell P.H., McMullin M.F., McNamara C.J., Percy M.J., Pugh C.W., Ratcliffe P.J., Talbot N.P., Treacy M. & Robbins P.A. (2006) Mutation of von Hippel-Lindau tumour suppressor and human cardiopulmonary physiology. *PLoS Med* **3**, e290.
- Sodhi A., Montaner S., Miyazaki H. & Gutkind J.S. (2001) MAPK and Akt act cooperatively but independently on hypoxia inducible factor-1alpha in rasV12 upregulation of VEGF. *Biochem Biophys Res Commun* **287**, 292-300.
- Solak Y., Cetiner M., Siriopol D., Tarim K., Afsar B., Covic A. & Kanbay M. (2016) Novel Masters of Erythropoiesis: Hypoxia Inducible Factors and Recent Advances in Anemia of Renal Disease. *Blood Purif* **42**, 160-7.
- Song I.S., Ha G.H., Kim J.M., Jeong S.Y., Lee H.C., Kim Y.J., Kwon T.K. & Kim N.S. (2010) Human ZNF312b oncogene is regulated by Sp1 binding to its promoter region through DNA demethylation and histone acetylation in gastric cancer. *International Journal of Cancer*.
- Stolze I.P., Tian Y.M., Appelhoff R.J., Turley H., Wykoff C.C., Gleadle J.M. & Ratcliffe P.J. (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**, 42719-25.
- Stoner M., Wang F., Wormke M., Nguyen T., Samudio I., Vyhlidal C., Marme D., Finkenzeller G. & Safe S. (2000) Inhibition of vascular endothelial growth factor expression in HEC1A endometrial cancer cells through interactions of estrogen receptor alpha and Sp3 proteins. *J Biol Chem* **275**, 22769-79.
- Su K., Roos M.D., Yang X., Han I., Paterson A.J. & Kudlow J.E. (1999) An N-terminal region of Sp1 targets its proteasome-dependent degradation in vitro. *J Biol Chem* **274**, 15194-202.
- Su K., Yang X., Roos M.D., Paterson A.J. & Kudlow J.E. (2000) Human Sug1/p45 is involved in the proteasome-dependent degradation of Sp1. *Biochem J* **348 Pt 2**, 281-9.
- Su W., Jackson S., Tjian R. & Echols H. (1991) DNA looping between sites for transcriptional activation: self-association of DNA-bound Sp1. *Genes Dev* **5**, 820-6.

- Suizu F., Ryo A., Wulf G., Lim J. & Lu K.P. (2006) Pin1 regulates centrosome duplication, and its overexpression induces centrosome amplification, chromosome instability, and oncogenesis. *Mol Cell Biol* **26**, 1463-79.
- Sun X., Pang L., Shi M., Huang J. & Wang Y. (2015) HIF2alpha induces cardiomyogenesis via Wnt/beta-catenin signaling in mouse embryonic stem cells. *J Transl Med* **13**, 88.
- Supp D.M., Witte D.P., Branford W.W., Smith E.P. & Potter S.S. (1996) Sp4, a member of the Sp1-family of zinc finger transcription factors, is required for normal murine growth, viability, and male fertility. *Dev Biol* **176**, 284-99.
- Suske G. (1999) The Sp-family of transcription factors. *Gene* **238**, 291-300.
- Suske G., Bruford E. & Philipsen S. (2005) Mammalian SP/KLF transcription factors: bring in the family. *Genomics* **85**, 551-6.
- Sutton K.M., Hayat S., Chau N.M., Cook S., Pouyssegur J., Ahmed A., Perusinghe N., Le Floch R., Yang J. & Ashcroft M. (2007) Selective inhibition of MEK1/2 reveals a differential requirement for ERK1/2 signalling in the regulation of HIF-1 in response to hypoxia and IGF-1. *Oncogene* **26**, 3920-9.
- Suzuki H., Tomida A. & Tsuruo T. (2001) Dephosphorylated hypoxia-inducible factor 1alpha as a mediator of p53-dependent apoptosis during hypoxia. *Oncogene* **20**, 5779-88.
- Tacchini L., Bianchi L., Bernelli-Zazzera A. & Cairo G. (1999) Transferrin receptor induction by hypoxia. HIF-1-mediated transcriptional activation and cell-specific post-transcriptional regulation. *J Biol Chem* **274**, 24142-6.
- Takahashi Y., Watanabe H., Murakami M., Ohba T., Radovanovic M., Ono K., Iijima T. & Ito H. (2007) Involvement of transient receptor potential canonical 1 (TRPC1) in angiotensin II-induced vascular smooth muscle cell hypertrophy. *Atherosclerosis* **195**, 287-96.
- Takeda K., Ho V.C., Takeda H., Duan L.J., Nagy A. & Fong G.H. (2006) Placental but not heart defects are associated with elevated hypoxia-inducible factor alpha levels in mice lacking prolyl hydroxylase domain protein 2. *Mol Cell Biol* **26**, 8336-46.
- Tan N.Y. & Khachigian L.M. (2009) Sp1 phosphorylation and its regulation of gene transcription. *Mol Cell Biol* **29**, 2483-8.
- Tan Q., Kerestes H., Percy M.J., Pietrofesa R., Chen L., Khurana T.S., Christofidou-Solomidou M., Lappin T.R. & Lee F.S. (2013) Erythrocytosis and pulmonary hypertension in a mouse model of human HIF2A gain of function mutation. *J Biol Chem* **288**, 17134-44.
- Tan X., Zhou F., Wan J., Hang J., Chen Z., Li B., Zhang C., Shao K., Jiang P., Shi S., Feng X., Lv N., Wang Z., Ling Y., Zhao X., Ding D., Sun J., Xiong M. & He J. (2010) Pin1 expression contributes to lung cancer: Prognosis and carcinogenesis. *Cancer Biol Ther* **9**, 111-9.
- Tang N., Wang L., Esko J., Giordano F.J., Huang Y., Gerber H.P., Ferrara N. & Johnson R.S. (2004) Loss of HIF-1alpha in endothelial cells disrupts a hypoxia-driven VEGF autocrine loop necessary for tumorigenesis. *Cancer Cell* **6**, 485-95.

- Tapias A., Auriol J., Forget D., Enzlin J.H., Scharer O.D., Coin F., Coulombe B. & Egly J.M. (2004) Ordered conformational changes in damaged DNA induced by nucleotide excision repair factors. *J Biol Chem* **279**, 19074-83.
- Taylor M., Qu A., Anderson E.R., Matsubara T., Martin A., Gonzalez F.J. & Shah Y.M. (2011) Hypoxia-inducible factor-2alpha mediates the adaptive increase of intestinal ferroportin during iron deficiency in mice. *Gastroenterology* **140**, 2044-55.
- Terrados G., Finkernagel F., Stielow B., Sadic D., Neubert J., Herdt O., Krause M., Scharfe M., Jarek M. & Suske G. (2012) Genome-wide localization and expression profiling establish Sp2 as a sequence-specific transcription factor regulating vitally important genes. *Nucleic Acids Res* **40**, 7844-57.
- Thiesen H.J. & Bach C. (1990) Target Detection Assay (TDA): a versatile procedure to determine DNA binding sites as demonstrated on SP1 protein. *Nucleic Acids Res* **18**, 3203-9.
- Thiesen H.J. & Schroder B. (1991) Amino acid substitutions in the SP1 zinc finger domain alter the DNA binding affinity to cognate SP1 target site. *Biochem Biophys Res Commun* **175**, 333-8.
- Thottassery J.V., Sun Y., Westbrook L., Rentz S.S., Manuvakhova M., Qu Z., Samuel S., Upshaw R., Cunningham A. & Kern F.G. (2004) Prolonged extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation during fibroblast growth factor 1- or heregulin beta1-induced antiestrogen-resistant growth of breast cancer cells is resistant to mitogen-activated protein/extracellular regulated kinase kinase inhibitors. *Cancer Res* **64**, 4637-47.
- Timmermans P.B., Wong P.C., Chiu A.T., Herblin W.F., Benfield P., Carini D.J., Lee R.J., Wexler R.R., Saye J.A. & Smith R.D. (1993) Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol Rev* **45**, 205-51.
- Touyz R.M. (2003) The role of angiotensin II in regulating vascular structural and functional changes in hypertension. *Curr Hypertens Rep* **5**, 155-64.
- Tseng J.C., Chen H.F. & Wu K.J. (2015) A twist tale of cancer metastasis and tumor angiogenesis. *Histol Histopathol* **30**, 1283-94.
- Tun-Kyi A., Finn G., Greenwood A., Nowak M., Lee T.H., Asara J.M., Tsokos G.C., Fitzgerald K., Israel E., Li X., Exley M., Nicholson L.K. & Lu K.P. (2011) Essential role for the prolyl isomerase Pin1 in Toll-like receptor signaling and type I interferon-mediated immunity. *Nat Immunol* **12**, 733-41.
- Ueda T., Watanabe-Fukunaga R., Fukuyama H., Nagata S. & Fukunaga R. (2004) Mnk2 and Mnk1 are essential for constitutive and inducible phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4E but not for cell growth or development. *Mol Cell Biol* **24**, 6539-49.
- Ulrich F., Carretero-Ortega J., Menendez J., Narvaez C., Sun B., Lancaster E., Pershad V., Trzaska S., Veliz E., Kamei M., Prendergast A., Kidd K.R., Shaw K.M., Castranova D.A., Pham V.N., Lo B.D., Martin B.L., Raible D.W., Weinstein B.M. & Torres-Vazquez J. (2016) Reck enables cerebrovascular development by promoting canonical Wnt signaling. *Development* **143**, 1055.

- van Drogen F., Sangfelt O., Malyukova A., Matskova L., Yeh E., Means A.R. & Reed S.I. (2006) Ubiquitylation of cyclin E requires the sequential function of SCF complexes containing distinct hCdc4 isoforms. *Mol Cell* **23**, 37-48.
- Van Loo P.F., Bouwman P., Ling K.W., Middendorp S., Suske G., Grosveld F., Dzierzak E., Philipson S. & Hendriks R.W. (2003) Impaired hematopoiesis in mice lacking the transcription factor Sp3. *Blood* **102**, 858-66.
- van Patot M.C. & Gassmann M. (2011) Hypoxia: adapting to high altitude by mutating EPAS-1, the gene encoding HIF-2alpha. *High Alt Med Biol* **12**, 157-67.
- Vanhollebeke B., Stone O.A., Bostaille N., Cho C., Zhou Y., Maquet E., Gauquier A., Cabochette P., Fukuhara S., Mochizuki N., Nathans J. & Stainier D.Y. (2015) Tip cell-specific requirement for an atypical Gpr124- and Reck-dependent Wnt/beta-catenin pathway during brain angiogenesis. *Elife* **4**.
- Veith C., Zakrzewicz D., Dahal B.K., Balint Z., Murmann K., Wygrecka M., Seeger W., Schermuly R.T., Weissmann N. & Kwapiszewska G. (2014) Hypoxia- or PDGF-BB-dependent paxillin tyrosine phosphorylation in pulmonary hypertension is reversed by HIF-1alpha depletion or imatinib treatment. *Thromb Haemost* **112**, 1288-303.
- Villar D., Ortiz-Barahona A., Gomez-Maldonado L., Pescador N., Sanchez-Cabo F., Hackl H., Rodriguez B.A., Trajanoski Z., Dopazo A., Huang T.H., Yan P.S. & Del Peso L. (2012) Cooperativity of stress-responsive transcription factors in core hypoxia-inducible factor binding regions. *PLoS One* **7**, e45708.
- Vissers M.C., Gunningham S.P., Morrison M.J., Dachs G.U. & Currie M.J. (2007) Modulation of hypoxia-inducible factor-1 alpha in cultured primary cells by intracellular ascorbate. *Free Radic Biol Med* **42**, 765-72.
- Voelkel N.F., Mizuno S. & Bogaard H.J. (2013) The role of hypoxia in pulmonary vascular diseases: a perspective. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **304**, L457-65.
- Wakisaka N., Kondo S., Yoshizaki T., Muroso S., Furukawa M. & Pagano J.S. (2004) Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces synthesis of hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Mol Cell Biol* **24**, 5223-34.
- Wang C., Qian X., Sun X. & Chang Q. (2015) Angiotensin II increases matrix metalloproteinase 2 expression in human aortic smooth muscle cells via AT1R and ERK1/2. *Exp Biol Med (Maywood)* **240**, 1564-71.
- Wang G.L., Jiang B.H., Rue E.A. & Semenza G.L. (1995a) Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 5510-4.
- Wang G.L., Jiang B.H. & Semenza G.L. (1995b) Effect of protein kinase and phosphatase inhibitors on expression of hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Biophys Res Commun* **216**, 669-75.
- Wang G.L. & Semenza G.L. (1993) Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia. *J Biol Chem* **268**, 21513-8.
- Wang G.L. & Semenza G.L. (1995) Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* **270**, 1230-7.
- Wang T., Zhang X. & Li J.J. (2002) The role of NF-kappaB in the regulation of cell stress responses. *Int Immunopharmacol* **2**, 1509-20.

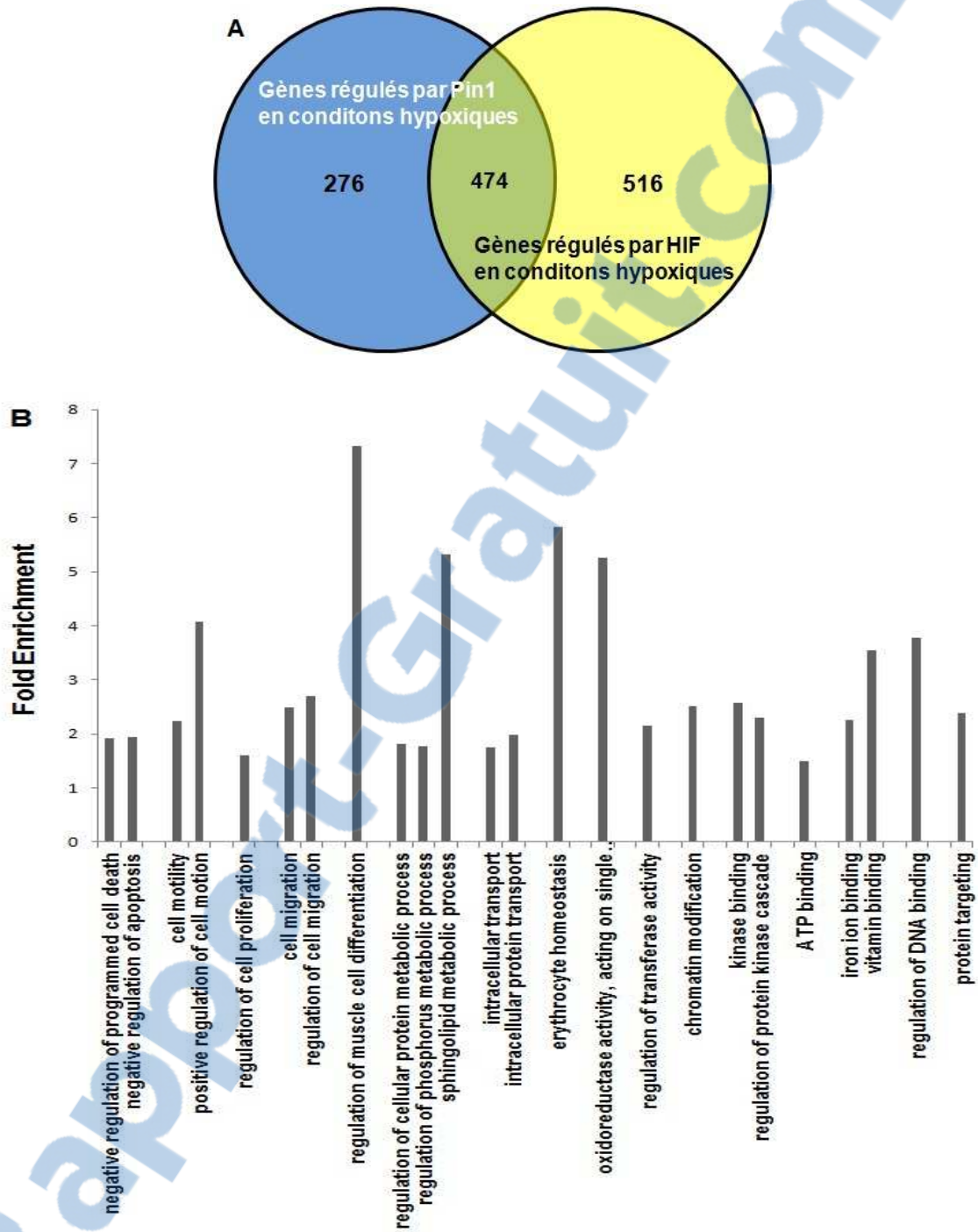
- Wang Y.T., Chuang J.Y., Shen M.R., Yang W.B., Chang W.C. & Hung J.J. (2008) Sumoylation of specificity protein 1 augments its degradation by changing the localization and increasing the specificity protein 1 proteolytic process. *J Mol Biol* **380**, 869-85.
- Wang Y.T., Yang W.B., Chang W.C. & Hung J.J. (2011) Interplay of posttranslational modifications in Sp1 mediates Sp1 stability during cell cycle progression. *J Mol Biol* **414**, 1-14.
- Wang Y.X., Crofton J.T., Liu H., Brooks D.P. & Share L. (1994) Effects of gonadectomy on sexually dimorphic antidiuretic action of vasopressin in conscious rats. *Am J Physiol* **267**, R536-41.
- Warfel N.A., Dolloff N.G., Dicker D.T., Malysz J. & El-Deiry W.S. (2013) CDK1 stabilizes HIF-1 α via direct phosphorylation of Ser668 to promote tumor growth. *Cell Cycle* **12**, 3689-701.
- Wax S.D., Tsao L., Lieb M.E., Fallon J.T. & Taubman M.B. (1996) SM-20 is a novel 40-kd protein whose expression in the arterial wall is restricted to smooth muscle. *Lab Invest* **74**, 797-808.
- Webb J.D., Coleman M.L. & Pugh C.W. (2009) Hypoxia, hypoxia-inducible factors (HIF), HIF hydroxylases and oxygen sensing. *Cell Mol Life Sci* **66**, 3539-54.
- Wei S., Kozono S., Kats L., Nechama M., Li W., Guarnerio J., Luo M., You M.H., Yao Y., Kondo A., Hu H., Bozkurt G., Moerke N.J., Cao S., Reschke M., Chen C.H., Rego E.M., Lo-Coco F., Cantley L.C., Lee T.H., Wu H., Zhang Y., Pandolfi P.P., Zhou X.Z. & Lu K.P. (2015) Active Pin1 is a key target of all-trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemia and breast cancer. *Nat Med* **21**, 457-66.
- Wenger R.H., Stiehl D.P. & Camenisch G. (2005) Integration of oxygen signaling at the consensus HRE. *Sci STKE* **2005**, re12.
- Werner-Allen J.W., Lee C.J., Liu P., Nicely N.I., Wang S., Greenleaf A.L. & Zhou P. (2011) cis-Proline-mediated Ser(P)5 dephosphorylation by the RNA polymerase II C-terminal domain phosphatase Ssu72. *J Biol Chem* **286**, 5717-26.
- Wiley D.M., Kim J.D., Hao J., Hong C.C., Bautch V.L. & Jin S.W. (2011) Distinct signalling pathways regulate sprouting angiogenesis from the dorsal aorta and the axial vein. *Nat Cell Biol* **13**, 686-92.
- Willam C., Maxwell P.H., Nichols L., Lygate C., Tian Y.M., Bernhardt W., Wiesener M., Ratcliffe P.J., Eckardt K.U. & Pugh C.W. (2006) HIF prolyl hydroxylases in the rat; organ distribution and changes in expression following hypoxia and coronary artery ligation. *J Mol Cell Cardiol* **41**, 68-77.
- Willoughby J.A., Sr., Sundar S.N., Cheung M., Tin A.S., Modiano J. & Firestone G.L. (2009) Artemisinin blocks prostate cancer growth and cell cycle progression by disrupting Sp1 interactions with the cyclin-dependent kinase-4 (CDK4) promoter and inhibiting CDK4 gene expression. *J Biol Chem* **284**, 2203-13.
- Wojtovich A.P., Smith C.O., Haynes C.M., Nehrke K.W. & Brookes P.S. (2013) Physiological consequences of complex II inhibition for aging, disease, and the mKATP channel. *Biochim Biophys Acta* **1827**, 598-611.
- Won J., Yim J. & Kim T.K. (2002) Sp1 and Sp3 recruit histone deacetylase to repress transcription of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) promoter in normal human somatic cells. *J Biol Chem* **277**, 38230-8.

- Wood K.W., Sarnecki C., Roberts T.M. & Blenis J. (1992) ras mediates nerve growth factor receptor modulation of three signal-transducing protein kinases: MAP kinase, Raf-1, and RSK. *Cell* **68**, 1041-50.
- Wulf G., Finn G., Suizu F. & Lu K.P. (2005) Phosphorylation-specific prolyl isomerization: is there an underlying theme? *Nat Cell Biol* **7**, 435-41.
- Wulf G.M., Liou Y.C., Ryo A., Lee S.W. & Lu K.P. (2002) Role of Pin1 in the regulation of p53 stability and p21 transactivation, and cell cycle checkpoints in response to DNA damage. *J Biol Chem* **277**, 47976-9.
- Wulf G.M., Ryo A., Wulf G.G., Lee S.W., Niu T., Petkova V. & Lu K.P. (2001) Pin1 is overexpressed in breast cancer and cooperates with Ras signaling in increasing the transcriptional activity of c-Jun towards cyclin D1. *EMBO J* **20**, 3459-72.
- Xia X. & Kung A.L. (2009) Preferential binding of HIF-1 to transcriptionally active loci determines cell-type specific response to hypoxia. *Genome Biol* **10**, R113.
- Xu R., Zhang P., Huang J., Ge S., Lu J. & Qian G. (2007) Sp1 and Sp3 regulate basal transcription of the survivin gene. *Biochem Biophys Res Commun* **356**, 286-92.
- Xu Y.X. & Manley J.L. (2007) The prolyl isomerase Pin1 functions in mitotic chromosome condensation. *Mol Cell* **26**, 287-300.
- Xue L., Borutaite V. & Tolkovsky A.M. (2002) Inhibition of mitochondrial permeability transition and release of cytochrome c by anti-apoptotic nucleoside analogues. *Biochem Pharmacol* **64**, 441-9.
- Yang H.C., Chuang J.Y., Jeng W.Y., Liu C.I., Wang A.H., Lu P.J., Chang W.C. & Hung J.J. (2014) Pin1-mediated Sp1 phosphorylation by CDK1 increases Sp1 stability and decreases its DNA-binding activity during mitosis. *Nucleic Acids Res* **42**, 13573-87.
- Yang X., Su K., Roos M.D., Chang Q., Paterson A.J. & Kudlow J.E. (2001) O-linkage of N-acetylglucosamine to Sp1 activation domain inhibits its transcriptional capability. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 6611-6.
- Yao L., Nie X., Shi S., Song S., Hao X., Li S. & Zhu D. (2012) Reciprocal regulation of HIF-1 α and 15-LO/15-HETE promotes anti-apoptosis process in pulmonary artery smooth muscle cells during hypoxia. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **99**, 96-106.
- Ye X. & Liu S.F. (2002) Lipopolysaccharide down-regulates Sp1 binding activity by promoting Sp1 protein dephosphorylation and degradation. *J Biol Chem* **277**, 31863-70.
- Yoon W.J., Cho Y.D., Kim W.J., Bae H.S., Islam R., Woo K.M., Baek J.H., Bae S.C. & Ryoo H.M. (2014) Prolyl isomerase Pin1-mediated conformational change and subnuclear focal accumulation of Runx2 are crucial for fibroblast growth factor 2 (FGF2)-induced osteoblast differentiation. *J Biol Chem* **289**, 8828-38.
- Yu A.Y., Shimoda L.A., Iyer N.V., Huso D.L., Sun X., McWilliams R., Beaty T., Sham J.S., Wiener C.M., Sylvester J.T. & Semenza G.L. (1999) Impaired physiological responses to chronic hypoxia in mice partially deficient for hypoxia-inducible factor 1 α . *J Clin Invest* **103**, 691-6.
- Yu B., Datta P.K. & Bagchi S. (2003) Stability of the Sp3-DNA complex is promoter-specific: Sp3 efficiently competes with Sp1 for binding to promoters containing multiple Sp-sites. *Nucleic Acids Res* **31**, 5368-76.

- Yuan L., Ahn I.S. & Davis P.F. (2007a) Inhibition of tyrosine phosphorylation of vascular endothelial growth factor receptors in human umbilical vein endothelial cells: a potent anti-angiogenic lipid-rich extract from shark. *J Med Food* **10**, 657-61.
- Yuan P., Wang L., Wei D., Zhang J., Jia Z., Li Q., Le X., Wang H., Yao J. & Xie K. (2007b) Therapeutic inhibition of Sp1 expression in growing tumors by mithramycin a correlates directly with potent antiangiogenic effects on human pancreatic cancer. *Cancer* **110**, 2682-90.
- Yuan W.C., Lee Y.R., Huang S.F., Lin Y.M., Chen T.Y., Chung H.C., Tsai C.H., Chen H.Y., Chiang C.T., Lai C.K., Lu L.T., Chen C.H., Gu D.L., Pu Y.S., Jou Y.S., Lu K.P., Hsiao P.W., Shih H.M. & Chen R.H. (2011) A Cullin3-KLHL20 Ubiquitin ligase-dependent pathway targets PML to potentiate HIF-1 signaling and prostate cancer progression. *Cancer Cell* **20**, 214-28.
- Yung H.W., Wyttenbach A. & Tolkovsky A.M. (2004) Aggravation of necrotic death of glucose-deprived cells by the MEK1 inhibitors U0126 and PD184161 through depletion of ATP. *Biochem Pharmacol* **68**, 351-60.
- Zacchi P., Gostissa M., Uchida T., Salvagno C., Avolio F., Volinia S., Ronai Z., Blandino G., Schneider C. & Del Sal G. (2002) The prolyl isomerase Pin1 reveals a mechanism to control p53 functions after genotoxic insults. *Nature* **419**, 853-7.
- Zaid A., Hodny Z., Li R. & Nelson B.D. (2001) Sp1 acts as a repressor of the human adenine nucleotide translocase-2 (ANT2) promoter. *Eur J Biochem* **268**, 5497-503.
- Zhang C.S., Liu Q., Li M., Lin S.Y., Peng Y., Wu D., Li T.Y., Fu Q., Jia W., Wang X., Ma T., Zong Y., Cui J., Pu C., Lian G., Guo H., Ye Z. & Lin S.C. (2015) RHOBTB3 promotes proteasomal degradation of HIFalpha through facilitating hydroxylation and suppresses the Warburg effect. *Cell Res* **25**, 1025-42.
- Zhang X., Zhang B., Gao J., Wang X. & Liu Z. (2013) Regulation of the microRNA 200b (miRNA-200b) by transcriptional regulators PEA3 and ELK-1 protein affects expression of Pin1 protein to control anoikis. *J Biol Chem* **288**, 32742-52.
- Zheng X.L., Matsubara S., Diao C., Hollenberg M.D. & Wong N.C. (2000) Activation of apolipoprotein AI gene expression by protein kinase A and kinase C through transcription factor, Sp1. *J Biol Chem* **275**, 31747-54.
- Zheng Y., Xia Y., Hawke D., Halle M., Tremblay M.L., Gao X., Zhou X.Z., Aldape K., Cobb M.H., Xie K., He J. & Lu Z. (2009) FAK phosphorylation by ERK primes ras-induced tyrosine dephosphorylation of FAK mediated by PIN1 and PTP-PEST. *Mol Cell* **35**, 11-25.
- Zheng Y., Yang W., Xia Y., Hawke D., Liu D.X. & Lu Z. (2011) Ras-induced and extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 phosphorylation-dependent isomerization of protein tyrosine phosphatase (PTP)-PEST by PIN1 promotes FAK dephosphorylation by PTP-PEST. *Mol Cell Biol* **31**, 4258-69.
- Zhong H., De Marzo A.M., Laughner E., Lim M., Hilton D.A., Zagzag D., Buechler P., Isaacs W.B., Semenza G.L. & Simons J.W. (1999) Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases. *Cancer Res* **59**, 5830-5.

- Zhou X.Z., Kops O., Werner A., Lu P.J., Shen M., Stoller G., Kullertz G., Stark M., Fischer G. & Lu K.P. (2000) Pin1-dependent prolyl isomerization regulates dephosphorylation of Cdc25C and tau proteins. *Mol Cell* **6**, 873-83.
- Zhou X.Z. & Lu K.P. (2016) The isomerase PIN1 controls numerous cancer-driving pathways and is a unique drug target. *Nat Rev Cancer* **16**, 463-78.
- Zhu Q., Wang Z., Xia M., Li P.L., Van Tassell B.W., Abbate A., Dhaduk R. & Li N. (2011) Silencing of hypoxia-inducible factor-1alpha gene attenuated angiotensin II-induced renal injury in Sprague-Dawley rats. *Hypertension* **58**, 657-64.
- Zhuang Z., Yang C., Lorenzo F., Merino M., Fojo T., Kebebew E., Popovic V., Stratakis C.A., Prchal J.T. & Pacak K. (2012) Somatic HIF2A gain-of-function mutations in paraganglioma with polycythemia. *N Engl J Med* **367**, 922-30.

Annexe 1



(La légende est à la page suivante)

Figure Annexe 1: Étude de l'implication de Pin1 dans la régulation des gènes cibles de HIF par micropuce à ADN (microarray). Des ARN totaux de cellules HeLa transfectées avec un siRNA contrôle, un siRNA contre HIF-1/2 α ou Pin1, puis incubées ou non en hypoxie pendant 8 heures, ont été extraits pour effectuer une analyse de l'expression génique sur micropuce à ADN (*microarray*). (A) Régulation sélective des gènes cibles de HIF par Pin1. Nombre des gènes pour HIF, Pin1 et HIF/Pin1 identifiés par analyse des données de *microarray* (B) Représentation graphiques de principales fonctions biologiques régulées par HIF-1 et Pin1. Ces fonctions correspondent à un *set* des gènes cibles de HIF-1 et Pin1 et sont présentées en score d'enrichissement calculé en ligne sur le site David bioinformatics (<https://david.ncifcrf.gov>).

Annexe 2

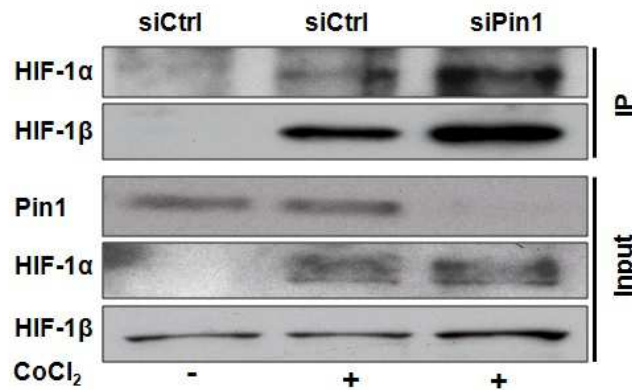


Figure Annexe 2: Pin1 n'affecte pas l'interaction entre HIF-1 α et HIF-1 β . Des cellules HeLa ont été transfectées avec des siRNA dirigés contre Pin1 (siPin1) ou contrôle (siCtrl). 48 heures après la transfection, les cellules ont été incubées avec le cobalt (CoCl₂) durant 2 heures. Des extraits protéiques de ces cellules ont été par la suite préparés pour effectuer des essais de co-immunoprécipitation (IP) avec des billes couplées avec un anticorps dirigé contre HIF-1 α , suivies d'une analyse en immunobuvardage en utilisant les anti-corps anti-HIF-1 α , anti-HIF-1 β et anti-Pin1.

Annexe 3

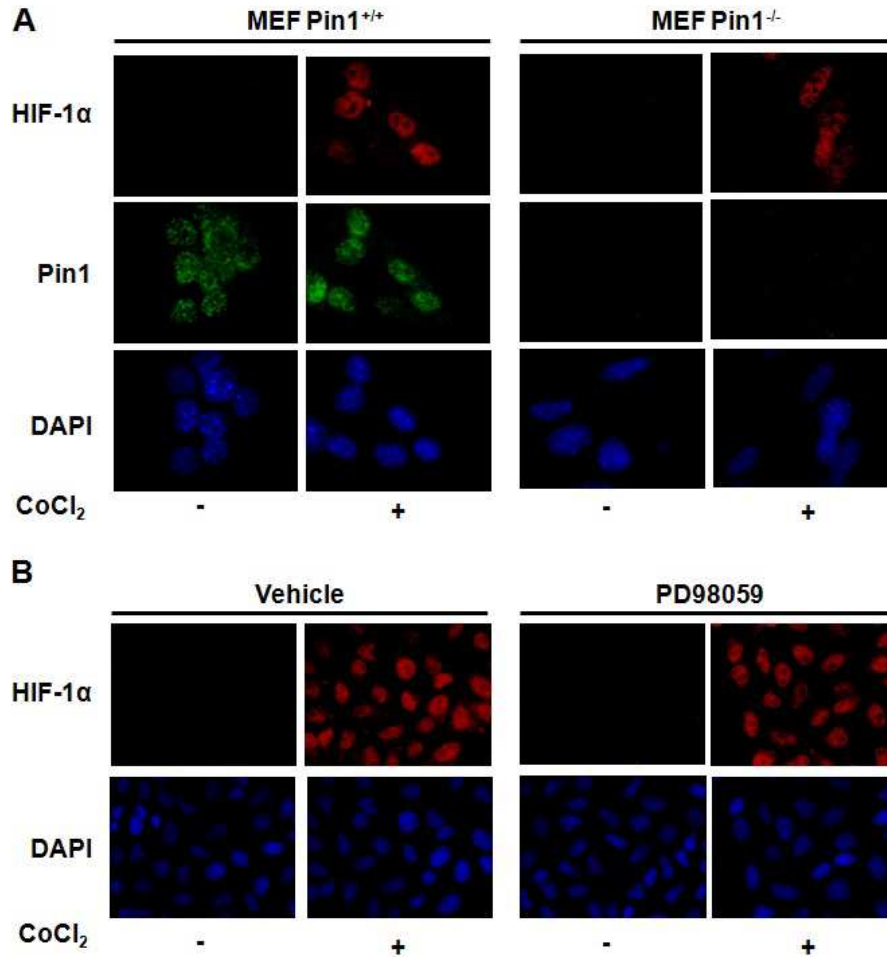


Figure Annexe 3: Pin1 n'a aucun effet sur la localisation cellulaire de HIF-1 α . Des cellules MEF provenant de souris sauvages (MEF *Pin1*^{+/+}) ou de souris dont le gène *Pin1* a été inactivé (MEF *Pin1*^{-/-}) (A) et des cellules HeLa privées de sérum et traitées ou non avec un inhibiteur de la voie p42/p44 MAPK, le PD98059 (50 μ M) (B), ont été incubées avec le CoCl₂ (200 μ M) pendant 1 heure puis fixées avec le formaldéhyde. Des essais d'immunofluorescence ont été effectués en utilisant des anticorps anti-HIF-1 α , anti-Pin1 et du 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI).

Annexe 4

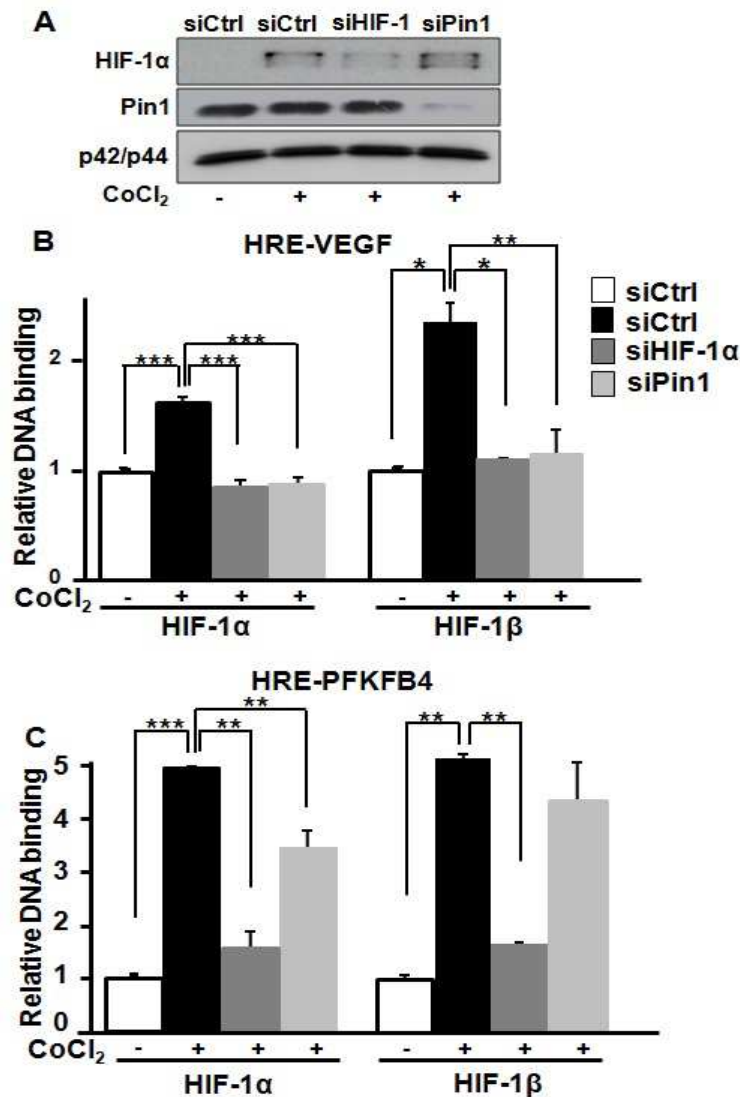


Figure Annexe 4: Pin1 régule la liaison de HIF-1 aux séquences HRE des gènes cibles. Des cellules HeLa ont été transfectées avec un siRNA contrôle (siCtrl) ou des siRNA dirigés contre Pin1 (siPin1) ou HIF-1α (siHIF-1α). 48 heures après la transfection, les cellules ont été incubées avec le CoCl₂ (200 μM) durant 2 heures. Des extraits nucléaires de ces cellules ont été préparés et analysés par immunobuvardage en utilisant les anti-corps anti-HIF-1α, anti-Pin1 et anti-p42/p44 MAPK (A). Les extraits nucléaires ont été incubés dans une plaque à 96 puits revêtue d'oligonucléotides contenant une séquence HRE du gène *VEGF* (HRE-VEGF) (B) ou la séquence HRE du gène *PFKFB4* (HRE-PFKFB4) (C). La liaison de HIF-1 à l'ADN a été détectée en utilisant des anticorps anti-HIF-1α et anti-HIF-1β. Les résultats représentent une moyenne ± SEM de deux expériences indépendantes réalisées en triplicata. * P<0,05, ** P< 0,01 et *** p <0,001 par rapport aux cellules contrôles non traitées ou traitées avec le CoCl₂.